ANALES DE LA
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Volumen. 84, Número 2 - Abril - Junio (2018)

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
ISSN (Online) 1697-4298
Opinion Pieces
analesranf.com

RACVE, a fellow Academy

Title in Spanish: *La RACVE, una academia hermana*

Antonio R. Martínez Fernández[1]

[1]Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia y de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España, Madrid.

[*]**Corresponding Author:** amf@ucm.es

An Real Acad Farm Vol. 84, Nº 2 (2018), pp. 119-121
Received: November 6, 2017 **Accepted:** Mars 5, 2018
Language of Manuscript: Spanish

Al escribir esto tengo presente que algún lector pueda acordarse de la parábola breve y contundente (Mateo,6:24)[1], al ver que quien firma es presidente de sendas secciones en las Reales Academias de Ciencias Veterinarias de España (RACVE) y Nacional de Farmacia (RANF): "nadie puede servir a dos señores porque o bien aborrece a uno y ama al otro", o lo contrario. Por si así sucediera, aclaro que el texto bíblico antepone el servicio a dos señores rivales e incompatibles y este no es el caso en el servicio a dos corporaciones científicas: RACVE y RANF, distintas pero no distantes ya que, junto con la RANM (real academia nacional de medicina), confluyen en uno de sus aspectos, la medicina como concepto holístico: medicina humana como motivo principal en la RANM, medicina bajo otros varios aspectos en las ciencias farmacéuticas y en un tercio, medicina animal, de los aspectos formativos y de acción social de la ciencias veterinarias. Coincidencias de raíz común de árboles diferenciados.

Huelga ahora y aquí glosar la rica historia y realidad actual de la RANF, recogidas en obras recientes (Puerto Sarmiento,2012[2] , Doadrio, 2011[3]), fruto de sus Estatutos/Reglamento[4]. Lo que importa ahora es glosar brevemente a la otra, la RACVE. Es ésta una academia de ámbito estatal, prima inter pares de las academias de ciencias veterinarias regionales: Cataluña, Andalucía Oriental, Andalucía occidental, Galicia, Extremadura, Murcia, Castilla y León, coaligadas entre sí por convenio, formando en esencia una unidad diversa – una red -, al servicio de la sociedad española. Las academias de ciencias veterinarias son asociaciones público-privadas, con funciones asesoras, que a la par, honran a las figuras destacadas de la profesión.

La RACVE, acogida al alto patrocinio del jefe del Estado, representa al amplio abanico científico y práctico de tres ámbitos propios de las ciencias veterinarias: **medicina** animal, **zootecnia** en todos sus aspectos y **tecnología** de los alimentos más **inspección**, **higiene y seguridad** alimentaria; y es, insisto, de ámbito estatal – de España. De aquí su nombre: Real Academia de Ciencias Veterinarias de España (acrónimo: RACVE)[5],[6].

Entre algunos de los fines de las academias de ciencias de la salud miembros del Instituto de España y la RACVE, insisto, hay afinidades dentro de uno de sus campos: la medicina animal. Efectivamente, hay analogías filogenéticamente derivadas entre la medicina humana y la de los animales monogástricos como suinos y carnívoros, alejándose sin embargo con aquella de los mamíferos herbívoros no poligástricos (equinos y lepóridos) y poligástricos (rumiantes) y en mayor medida de las aves e insectos domésticos de la apicultura y sericultura. La confluencia es mayor en el capítulo de enfermedades infecciosas y parasitarias. Y lo es, particularmente en las antropozoonosis, es decir, en las zoonosis transmisibles desde los animales – domésticos y salvajes - al hombre, uno de los grandes objetivos de la actividad científica y social veterianria.

En otro aspecto además hay confluencia entre las ciencias veterinarias, las farmacéuticas y la medicina humana. Es el amplísimo espacio de los modelos animales de terapéutica experimental. Aunque se procura evitar mediante ensayos in vitro sobre líneas celulares, tras acercamientos de cribado por métodos bioquímicos diversos e *in sílico*, al final la toxicología y farmacología real y útil pasa por un modelo animal. Coinciden aquí también de modo inseparable la actividad veterinaria, farmacéutica y médica. Y el hecho se refleja en la historia reciente en nuestro país del desarrollo de la microbiología y parasitología con las ciencias farmacéuticas como adalides del mismo, seguido por las ciencias veterinarias.

Aquí terminan en la práctica los campos próximos, desarrollados en paralelo. El resto de las actividades veterinarias tiene menos que ver con los de la medicina o farmacia y no están representados en las actuales academias respectivas[7],[8]. Valga un ejemplo para no ser prolijo: muchos de los procesos de transformación y conservación de alimentos están amplísimamente relacionados con modificaciones en sus componentes ocasionados por especies bacterianas y micóticas, espontáneas o cultivadas, o sus metabolitos, para crear los

alimentos derivados lácticos: quesos, mantequillas, natas, yogures, kéfires, helados, salsas, etc) o cárnicos y de pescados: jamones, cecinas, embutidos de todo tipo, salazones, surimis, restructurados y un largo etcétera; son las industrias de la leche, carne y pescado que hacen llegar al consumo alimentos fundamentales y particularmente sanos o seguros si así se entiende mejor. Son alimentos conservados que, junto con los frescos, proceden de un animal sano, crecido para ese fin específico, sacrificado en condiciones humanitarias, inspeccionado *ante* y *post morten* para garantizar su inocuidad para el consumo; son productos nacidos y llevados al consumo bajo la supervisión veterinaria, una veterinaria de salud integral, o en el contexto global que denominan "una salud".

Sí es cierto que entre el cupo de académicos de ciencias afines de la RANM y RANF hay doctores licenciados en veterinaria, a título personal, escogidos en su día en virtud de sus *currícula* y especialidad, no de su licenciatura.

Quizá por ser la penúltima de las nacionales, el Estututo actual de la RACVE sea, en palabras prestadas[9] "la más avanzada de todas las academias estatales. Entre éstas, sólo la primera de las creadas en el reinado de Felipe V, la de la Lengua (Real Academia Española) cita en su nombre el del Estado al que pertenece. Sólo otras dos, llevan en su título el adjetivo nacional que podría, con anterioridad a la Constitución vigente, ser sinónimo de España, lo que en el momento presente no es unívoco; la de Ciencias Veterinarias lo especifica: de España. En otros dos aspectos fundamentales destaca la norma:

Uno, el engarce permanente coordinando los fines de la academia del conjunto (RACVE) con los de las academias de ámbitos regional citadas. Lo que no se hace de modo potencial sino real, con participación a través de sesiones comunes anuales y membresía nata de los presidentes de estas otras academias a la estatal: académicos correspondientes natos, éstos, durante el tiempo de su mandato y correspondientes asociados todos los demás numerarios de las academias locales.

Otro aspecto novedoso, singular y único por el momento, es el mecanismo estatutario de rejuvenecimiento permanente de la Academia. Gracias a este mecanismo la RACVE no es ya, como antaño, la corporación que honora a los poseedores de altos méritos intelectuales y científicos de este ámbito, es ahora, un lugar de trabajo independiente, libre y altruista al servicio de las administraciones y la sociedad. Lo es porque siempre estará formada por los más activos de los elegidos y en su mejor tiempo de extensión de su experiencia: así, solo antes de cumplidos 85 años los académicos de número son elegibles para cargos directivos y pasada esta edad, la Academia duplica el puesto - medalla - de numerario. Así, sin perder ningún otro de sus derechos, pasa el académico mayor a ser emérito y uno nuevo, más joven entra a servir a la academia y sus fines".

Esta academia fue en otro tiempo, junto con otra de ámbito nacional, **asociada** al Instituto de España que distinguía así éstas de las academias regionales consideradas por ello **adheridas** al Instituto. Por acuerdo del Instituto de 13 de junio de 1996 quedó anulada la categoría de «Academia Adherida del Instituto de España», pasando las que tenían dicha condición a denominarse «Academia Asociada del Instituto de España»[10]; todas en el mismo saco: *Sic transit miseria…*

La realidad es tozuda, mal que pese a los desinformados, como en el resto de especializaciones científicas: la lengua, la historia, las bellas artes, las ciencias jurídicas, las ciencias experimentales, la medicina y la farmacia, las ciencias económicas, las ingenierías, las ciencias veterinarias cuentan también con una academia al mismo nivel, al servicio de las administraciones y la sociedad que la sostiene.

---

[1] Bover JM, Cantera F. 1957. Sagrada Biblia, BAC, Madrid

[2] Puerto Sarmiento J. Historia de la Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia, 2012. En línea: http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/1273/1319

[3] Doadrio Villarejo AL. Memorias de Secretaría. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia, 2011. En línea: http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/1134/1173

[4] RANF. Reglamento de Régimen Interno. En línea: http://www.ranf.com/la-institucion/estatuto.html

Estatuto/Reglamento avanzado, aunque necesitados ya de cierto "aggiornamento", derivado éste del nuevo e inane Real Decreto 2010 (http://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2010-14304) que regula el Instituto de España, así como de la introducción de algún procedimiento atrevido de renovación, más ágil y útil que el clásico actual.

[5] Estatuto de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España. BOE **101/2014 de 21 de marzo.** Véase: http://www.racve.es.

[6] Fundada en 1975 como Academia de Ciencias Veterinarias de Madrid, le fue concedido el título de Real en 1988 y en 1990 (28 de febrero) se incorporó como academia asociada al Instituto de España, siendo la primera academia que se acogió a este privilegio, siguiendo la norma establecida por el Instituto en Junio de 1979. Posteriormente en1997 se extiende desde el ámbito madrileño al estatal, lo que se define jurídicamente en el Estatuto de 2001. Fuente: Vives Valles, M.A. 2010. Las Academias de Veterinaria en España. Anuario 2010 de la Real Academia de Ciencias Veterinarias.

[7] Los tres ámbitos de actividad de las ciencias veterinarias son comunes en el mundo hispano desarrollado, como ejemplo transcribo los objetivos de la profesión en la Revista de Salud Animal, Chile: difundir investigaciones en la salud animal con temas de actualidad relacionados con: bioquímica e higiene de la leche, biotecnología, biomodelos, calidad, clínica, ensayos clínicos, epizootiología, farmacología,

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

genética, microbiología, parasitología, patología, procesos productivos, reproducción animal, toxicología, zoohigiene.

[8] Aun cuando la actividad veterinaria es exclusivamente médica, como la que se realiza sobre animales de compañía, bascula además hacia el bienestar animal. Por ejemplo, el lema, misión y objetivos de una fundación veterinaria amercicana: Animal Health foundation, Lema:*Together We Can Make a Difference in the Welfare of Animals*. Misión*: To help pets and wildlife in times of need.* Objetivos*: Encourage the human-animal bond; Promote public education about animals; Forward the study and advancement of animal health; Aid domestic animals and their owners; Support projects aiding wildlife.*

[9] Tomo a continuación prestado una parte de mi editorial en el número uno de un nuevo diario profesional: http://www.animalshealth.es/redaccion/nace-animals-health-el-diario-de-la-salud-animal

[10] Fue esta una norma humillante, impropia de un Instituto "máximo exponente de la cultura del país en el orden académico" al menos para la RACVE, sólo movida por la precaución de no aumentar el divisor del presupuesto estatal. Esta circunstancia ya no existe, cada academia nacional, la RACVE también tiene en el presupuesto del Ministerio de Educación, Cultura y Deportes un epígrafe específico.

https://es.wikipedia.org/wiki/Anexo:Academias_asociadas_al_Instituto_de_Espa%C3%B1a.

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
ISSN (Online) 1697-4298
Review
analesranf.com

Discovery and handling of Genes. Connetions with Biology and Medicine

Title in Spanish: *Descubrimiento y manipulación de los genes. Conexión con la Biología y la Medicina*

M.ª del Carmen Avendaño López[1,*]

[1]Catedrática de Química Orgánica y Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

ABSTRACT: This review analyses the advances of biological knowledge derived from the discovery and handling of genes, the connections between genetics and medicine and the perspectives of genomic editing.

RESUMEN: En esta revisión se analiza el avance que han experimentado los conocimientos biológicos como consecuencia del descubrimiento y manipulación de los genes, las interacciones de la genética y la medicina, y las perspectivas de la edición genómica.

[*]**Corresponding Author:** avendano@ucm.es
Received: May 22, 2018 **Accepted:** May 23, 2018
An Real Acad Farm Vol. 84, Nº 2 (2018), pp. 122-153
Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

Lo que impulsa a la ciencia es el intento de entender la naturaleza, y lo que impulsa a la tecnología, el intento de manipularla (1).

Desde que a principio de los años setenta los biólogos empezaron a comprender cómo generan los genes la enorme complejidad de los seres vivos, tuvieron que afrontar también los efectos que produciría su inevitable manipulación. Cuando en **1971** los Institutos Nacionales de Salud de EEUU organizaron el congreso **"Perspectivas del cambio genético planeado"** para analizar las posibilidades de manipular genéticamente a los seres humanos, todos los participantes estuvieron de acuerdo en que su desarrollo solo era cuestión de tiempo.

A partir del **año 2013**, en que se supo que la **tecnología CRISPR/Cas9** permite de forma económica y sencilla reeditar los genes alterando las secuencias de ADN y modificar su función con toda precisión, la excitación y el miedo se han mezclado ante la perspectiva de que los humanos pueden por primera vez modificar o quizás eliminar por completo diversas poblaciones de organismos. Entre las potenciales aplicaciones de esta tecnología se incluye la corrección de defectos genéticos (eugenesia), el tratamiento y la prevención de la propagación de enfermedades, y la mejora de los cultivos agrícolas. Sin embargo, su utilización plantea serios interrogantes, porque **reescribir el código genético podría eliminar enfermedades pero también alterar el destino de las especies**. Este tema se ha comentado recientemente en una sesión de la RANF (2), pero creemos que podría ser de interés revisar algunos hitos del camino que se ha recorrido con anterioridad para descifrar la mecánica de los genes y cómo éstos pueden manipularse, así como su impacto en la biología y la medicina.

Desde el principio de la historia de la humanidad fue evidente que los padres transmiten a sus hijos unos rasgos que a su vez ellos transmiten a sus hijos a lo largo de generaciones, pero el mecanismo de esta transmisión (la herencia) fue un gran misterio durante muchos siglos. Al conocimiento del gen como la unidad irreductible de la herencia y de la información biológica, transportador de cualquier rasgo que pueda heredarse total o parcialmente, se ha llegado en fechas relativamente recientes, y su manipulación sigue actualmente un progreso imparable.

2. EL CAMINO HACIA EL CONOCIMIENTO Y MANIPULACIÓN DE LOS GENES

2.1. El misterio de la herencia

En el siglo VI antes de Cristo, **Pitágoras** propuso una de las primeras y más extendidas teorías para explicar la herencia: el **"espermismo"**. Según ésta, la información hereditaria está contenida en el esperma del varón y se transmite al cuerpo de la mujer durante el coito para que ésta se encargue de la nutrición del nuevo ser. Esta teoría fue desmantelada por **Aristóles** al observar que los hijos pueden heredar características de sus madres y abuelas, y que estas características pueden desaparecer en una generación y reaparecer en la siguiente. Para explicarlo, propuso que las hembras debían contribuir a la formación del feto aportando una especie de semen femenino: la sangre menstrual. Aristóteles concebía la herencia como una transmisión de información, aunque el papel de ambas aportaciones era diferente: la masculina se consideraba como "mensaje" y la femenina como "material".

Los conocimientos científicos sobre la herencia apenas progresaron en los dos mil años siguientes y, a principios del siglo XVIII, varios biólogos seguían creyendo en la

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

teoría del "espermismo" (3). La idea de que la cabeza del espermatozoide contiene un "homúnculo", un ser humano minúsculo a la espera de poder desarrollarse, surgió de la alquimia y se aplicó más tarde en la discusiones sobre la concepción y la herencia (Figura 1). Irónicamente, de existir este ser diminuto preformado, debería denominarse "femúnculo" porque el óvulo, además de proteínas y nutrientes, ribosomas y membranas, proporciona al embrión sus **mitocondrias**, unas estructuras subcelulares del citoplasma que sirven para producir energía. Éstas poseen un minigenoma de 37 genes, la seismilésima parte de los 21.000 a 23.000 genes presentes en los 23 pares de cromosomas que tienen las células humanas. Como su origen es exclusivamente femenino, los **genes mitocondriales** (que rara vez se combinan) están presentes como una sola copia, y sus mutaciones se transmiten intactas de mujer a mujer en las distintas generaciones. Cada mujer lleva en sus células genomas mitocondriales de sus futuros descendientes, un hecho que da cierto sentido a los términos "Eva, la madre bíblica" o "Lucy, la madre ancestral".

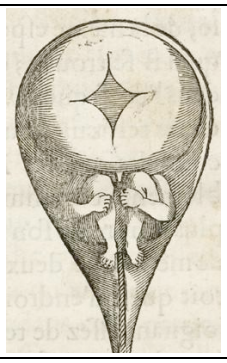


Figura 1. Representación de un "homúnculo".

2.1. Darwin y Mendel. La evolución y la transmisión genética

Hacia la mitad del siglo XIX, los teólogos, astrólogos y estudiosos de la naturaleza, intimidados por el hecho de que si se apartaban del Génesis se apartaban de Dios, consideraban la cuestión del origen de las especies como "el misterio de los misterios". Era menos problemático abordar la cuestión de cómo se genera la diversidad en la naturaleza, tarea que realizaron **Charles Darwin** a través de la observación y **Gregor Mendel** a través de la experimentación (Figura 2).

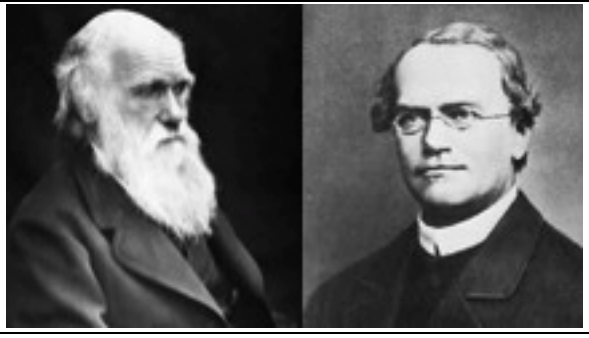


Figura 2. Charles Darwin y Gregor Mendel.

Durante su viaje de cinco años en el *Beagle*, Darwin se preocupó fundamentalmente del fenómeno de la **variación natural** o **evolución espontánea**: ¿cómo producen los animales en ocasiones descendientes con rasgos diferentes a los de sus progenitores y tiene lugar la **especiación**?. En la naturaleza tenía que ser posible la producción de variantes y la transmisión de estas variaciones, por lo que **la herencia tenía que ser estable y a la vez mudable**. Cuando en 1859, tras largos años de reflexión, Darwin publicó **"El origen de las especies por medio de la selección natural"**, toda su teoría requería apoyarse en conocimientos básicos acerca de la herencia que todavía no se habían desarrollado. Lleno de dudas, propuso la **teoría de la "pangénesis"** (génesis de todo), imaginando que las células de todos los organismos producen partículas diminutas, las **"gémulas"**, que contienen la información hereditaria y circulan por los animales y plantas hasta que pasan su información a las células germinales cuando llegan a la madurez. Las gémulas secretadas por cada órgano llevan las instrucciones para generar un órgano similar y, al formarse un embrión, las instrucciones de los progenitores se mezclan como los colores en una pintura. **Jenkin**, uno de los críticos de Darwin, argumentaba que si la herencia no tiene **recursos para mantener una variación y fijar un carácter alterado**, esta variación se desvanecería con el paso del tiempo, diluyéndose en la mezcla de pinturas hasta desaparecer.

Parece que Darwin no conoció, o no le interesó, un artículo sobre híbridos de guisantes titulado **"Experimentos de hibridación en plantas"**. Este trabajo se publicó en 1866 en *Anales de la Sociedad de Ciencias Naturales de Brno*, una revista que apenas se leía en el mundo científico. Su autor fue el modesto monje agustino Gregor **Mendel**, un pionero que tras más de ocho años de trabajo **proporcionó los conocimientos básicos de la herencia y fundó la biología moderna** a través de su aparentemente sencilla experimentación realizada en la abadía de Brno, hoy perteneciente a la República Checa. Los experimentos de Mendel pusieron de manifiesto que la herencia solo puede explicarse por la transmisión de los progenitores a su progenie de **unidades discretas de información** que se comportan como entidades independientes. Por ejemplo, el color de la flor del guisante no tiene ningún vínculo con la altura del tallo o el aspecto de las semillas. Según Mendel, cada característica se hereda de forma independiente, siendo posibles todas las combinaciones de rasgos.

A pesar de su transcendencia, los descubrimientos de Mendel permanecieron olvidados casi 40 años, y solo empezaron a interesar a los científicos a finales del siglo XIX. Uno de sus seguidores fue el biólogo inglés **William Bateson**, que acuñó en el año 1905 el término **"genética"** para designar el estudio de la herencia. Otro firme defensor de Mendel fue el botánico danés **Wilhelm Johannsen**, que en 1909 acuñó el término **"gen"** como abreviatura de la palabra *pangen* previamente propuesta por el holandés **Hugo de Vries** en 1889. Los experimentos de Johannsen

apoyaron la teoría de este último acerca de que **la mutación se produce a través de cambios repentinos y específicos de las unidades de la herencia en las células germinales**.

Cien años después de las observaciones de Darwin, **Theodosius Dobzhansky** (un biólogo ucraniano emigrado a Estados Unidos) estudió la variación genética en poblaciones salvajes, demostrando que ninguna variante es superior a las demás y que la variación genética es la norma en la naturaleza. Sin una profunda diversidad, un organismo puede terminar perdiendo su capacidad para evolucionar. En su labor como **crítico de la eugenesia** señaló que la selección de los mejores en función de sus fenotipos es un método defectuoso para garantizar una genética óptima porque **los fenotipos no solo están determinados por los genes, sino también por el medio ambiente y el azar**. El año 1973 aseguraba que **nada tiene sentido en biología si no es a la luz de la evolución**: *"Creation is not an event that happened in 4004 BC. It is a process that began some 10 billion years ago and is still under way*" (4). En este periodo se reavivó la controversia entre la teoría de la evolución y la fe religiosa, destacando el filósofo creacionista **Pierre Teilhard de Chardin**, que consideró que la creación se realiza de forma continuada por medio de la evolución.

En la actualidad, muchos científicos consideran que **la teoría de la evolución natural de las especies** se puede aplicar a la oncología. De acuerdo con las ideas darwinianas, la intervención terapéutica puede diezmar a las células cancerosas, pero al mismo tiempo ejerce una presión que favorece las **variaciones clonales que hacen a estas células resistente al tratamiento** (5). El complejo ecosistema humano permite que un tumor crezca, mute y atraviese etapas en las que se altera y responde a su entorno con el objeto de sobrevivir.

2.3. Eugenesia e higiene racial

Entre los científicos que se opusieron a la teoría mendeliana de los genes se encontraba **Francis Galton**, un prolífico autor que apoyado en las ideas de su primo Charles Darwin se dedicó al estudio del ser humano y de las diferencias individuales. Galton acuñó en sus últimos años el término **"eugenesia"** para denominar a la ciencia dedicada al estudio de la mejora de la raza humana a través de la reproducción selectiva de los individuos que poseen los mejores rasgos (6). Estas ideas se convertirían poco después en la base de la **"higiene racial"** propuesta por la doctrina nazi, que utilizó la esterilización, el confinamiento y el exterminio de los seres que a su entender poseían genes defectuosos. En los Estados Unidos la discriminación de los ciudadanos negros comenzó mucho antes, y en los años 1920 se aprobaba la esterilización forzada de mujeres consideradas como imbéciles (Figura 3).

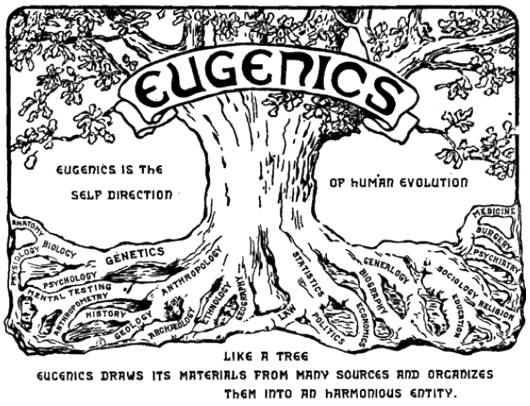


Figura 3. Representación del árbol eugenésico.

En el mismo periodo, los **científicos de la Unión Soviética** plantearon que los genes eran un espejismo creado por la burguesía para fijar las diferencias individuales, y propusieron que la limpieza que necesitaba el Estado se lograría a través de la reeducación de los individuos. Por extensión, el investigador agrícola **Lysenko** propugnó que la hambruna podía combatirse "reeducando" a las plantas alimenticias para que crecieran en cualquier clima. Los argumentos para defender la **preponderancia de unas razas sobre otras** se aplican hoy como base de algunos nacionalismos, y el nexo entre el crimen y ciertos genes se ha debatido y se sigue debatiendo en múltiples países.

2.4. Los cromosomas: descubrimiento del cromosoma Y y del gen de la masculinidad

Para entender como funcionan los genes tenía que descubrirse primero en qué lugar de las células se encuentan, ya que a lo largo del siglo XIX solo eran "visibles" en un sentido estadístico. **Theodor Boveri**, un embriólogo alemán que trabajaba con erizos de mar en la década de 1890, propuso que los genes se encontraban en unas estructuras filiformes enrolladas en el núcleo de las células que se denominaron **"cromosomas"** porque podían teñirse de azul con anilina. Esta hipótesis fue corroborada en 1906 por **Nettie Maria Stevens**, quien demostró que los genes que determinan el sexo en los gusanos de la harina se encontraban en cromosomas que podían distinguirse al microscopio. Por analogía, aunque no se supiera cómo se organizaban, todos los genes deberían estar situados en los distintos cromosomas.

Cuando se observaban al microscopio las células de los gusanos hembra de la harina se veían 10 pares de cromosomas "homólogos", mientras que en las de los gusanos macho había un par de cromosomas dispares. Uno de éstos, al que se denominó posteriormente "**cromosoma Y**" (el masculino), se veía como una pequeña mancha de forma nudosa mientras que su pareja era un cromosoma más grande que se denominó posteriormente "**cromosoma X**" (el femenino). Entonces pudo razonarse en lenguaje cromosómico que las células masculinas serían XY y las femeninas XX. El óvulo contendría un único cromosoma X mientras que el espermatozoide puede ser portador del cromosoma Y, resultando la combinación XY la que

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

determina el sexo masculino, mientras que si es portador del cromosoma X resulta la combinación XX que determina el sexo femenino. La **determinación del sexo es un proceso aleatorio** regido por la naturaleza genética X o Y del primer espermatozoide que alcanza y fecunda el óvulo (Figura 4).

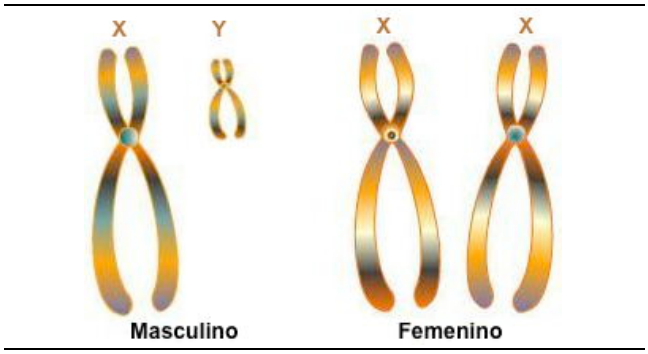


Figura 4. Cromosomas sexuales.

Hacia el año 400 a. C., el filósofo presocrático **Anaxágoras** pensaba también que la determinación del sexo era un proceso aleatorio, pero creía que dependía del lugar de producción y de destino del esperma: el producido en el testículo derecho se dirigíría al lado derecho del útero donde se formaría un feto masculino, mientras que el del izquierdo lo haría al lado izquierdo donde se formaría un feto femenino. Estas ideas, que hoy parecen tan absurdas, se debían al gran desconocimiento que se tuvo durante miles de años de las diferencias anatómicas entre hombres y mujeres. **Galeno** en el siglo II, y sus seguidores durante la Edad Media, consideraron que el útero era un escroto alojado en el interior de la mujer y las trompas de Falopio eran vesículas geminales más grandes que las del varón.

Tras descubrirse el **cromosoma Y** sorprendió su pequeño tamaño. Hoy se supone que, a fin de preservar a lo largo de millones de años los genes que albergan la información que determina la masculinidad, este cromosoma ha ido perdiendo otros genes porque al carecer de pareja o copia que lo duplique no podrían reparase los genes que contiene si éstos se alteran. Algunos consideran que la reducción de tamaño del cromosoma Y no ha acabado (recordemos que **la evolución está ligada a la pérdida de genes o de su función**) (7). El por qué de la reproducción sexual, siendo la asexual un proceso más simple y eficiente, sigue siendo intrigante, y muchos evolucionistas opinan que el sexo no se creó para la reproducción sino para permitir la recombinación genética y lograr una mayor variación entre las especies.

Una vez descubierto que el alojamiento de los genes que determinan el sexo masculino era el cromosoma Y, quedaba por conocer cuáles eran estos genes. El problema se resolvió gracias al hallazgo en 1955 del **síndrome de Swyer**, nombre de un endocrinólogo inglés que estudiaba la infertilidad humana. Las mujeres infértiles que mostraban este síndrome eran anatómica y fisiológicamente femeninas durante su infancia, pero no alcanzaban la madurez sexual femenina al comienzo de su edad adulta. Cuando los genetistas estudiaron sus células descubrieron que todas ellas tenían cromosomas XY, por lo que nacían con el patrón cromosómico masculino, pero en un momento dado de la gestación se debía producir una mutación que inactivaba al gen que especifica la masculinidad. En los años 1980, el genetista británico **Peter Goodfellow** estudió a estas mujeres y encontró que, en efecto, **un gen situado en el cromosoma Y estaba mutado e inactivado** por lo que los individuos eran anatómica y fisiológicamente femeninos. Estos genes, que se denominaron **genes *SRY*** (***sex-determining region* Y**), son pequeños y sin intrones (ver el apartado 2.9) y codifican una proteína que se expresa preferentemente en los testículos. Cuando Goodfellow insertó una copia extra de este gen en hembras de ratones, sus crías nacieron con el cromosoma XX en todas sus células pero eran machos anatómicamente y en su comportamiento (se había producido el síndrome de Swyer al revés) (8). El gen *SRY* controla la determinación del **sexo**, entendido éste como la suma de aspectos anátomicos y fisiológicos de los cuerpos masculino y femenino. Si *SRY* está "conectado" un animal será anatómica y fisiológicamente macho, pero si se "desconecta" se volverá anatómica y fisiológicamente hembra.

Los determinantes genéticos de la conducta y las preferencias sexuales fueron un misterio para **Darwin**, quien dedicó a este asunto gran parte de su libro publicado en 1871 "El origen del hombre. La selección natural y la sexual". Si se admite que el sexo es algo diferente al **género** (las actitudes psíquicas, sociales y culturales que asume una persona) o a la **identidad de género** (el sentimiento que se tiene de sí mismo), podemos preguntarnos si estas cuestiones también están gobernadas por los genes. Dentro de la controversia general sobre **lo innato y lo adquirido**, la teoría dominante en la sociedad hasta finales de los años ochenta fue que la homosexualidad era adquirida, no innata. Sin embargo, hoy parece estar claro que los genes son mucho más influyentes que cualquier otra circunstancia, y muchos consideran que para definir el género o la identidad de género, el gen *SRY* u otros posibles genes todavía desconocidos deben actuar, activando unos genes y reprimiendo otros, complementados con otros muchos factores ambientales. Algunos estudios han validado el nexo entre la homosexualidad y un gen próximo al **fragmento Xq28** situado en el cromosoma X (9), pero todavía no se ha aislado un gen que influya realmente en la identidad sexual.

2.5. Vinculación de los genes e intercambio genético.

En 1905 el genetista **Thomas Hunt Morgan**, trabajando en la Universidad de Columbia, comenzó a estudiar el desarrollo embrionario de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) aplicando a los animales los estudios que Mendel había realizado con plantas (figura 5). Se trataba de **identificar las mutaciones de rasgos visibles que pudieran seguirse a lo largo de generaciones**. Sus estudios convirtieron a esta mosca en uno de los principales organismos modelo utilizados en genética y dieron lugar a varios Premios Nobel incluyendo

el otorgado a Morgan en 1933.

Figura 5. ***Drosophila melanogaster.***

Morgan y sus discípulos descubrieron en 1910 que había aparecido de forma espontánea entre las moscas de estirpe silvestre de ojos rojos un mutante de ojos blancos. El gen mutado responsable de este cambio en el color de los ojos se denominó **"gen white"**, un calificativo que fue la causa de que a partir de entonces comenzaran a nombrarse los genes según el fenotipo que producían sus alelos mutantes. Un fenotipo es el conjunto de características de orden físico o biológico que distinge a un organismo mientras que un genotipo es su composición genética. Un alelo es una variante de un gen generalmente causada por mutaciones. Un gen puede tener múltiples alelos que se diferencian en su secuencia y pueden manifestarse en modificaciones concretas de la función de ese gen.

El rasgo "ojos blancos" solo aparecía en los machos, luego estaba sistemáticamente ligado al sexo y el gen responsable de su aparición residía en el cromosoma Y, pero al tener el *gen white* un carácter recesivo, cuando un macho de ojos blancos se cruzaba con una hembra de ojos rojos su progenie tenía ojos rojos. Se había descubierto que los **genes no siempre se comportan de forma independiente**. Hoy sabemos que la vinculación de un determinado gen al sexo no solo se da en las moscas de la fruta, sino también en las personas. En éstas es notable el caso de la **hemofilia**, una enfermedad de la sangre potencialmente letal provocada por una mutación que causa la ausencia o disminución de proteínas esenciales para la coagulación (factores VIII o IX). Las mujeres pueden transportar el gen de la hemofilia, pero solo los varones pueden resultar afectados por la enfermedad.

El grupo de Morgan observó que también estaban vinculados entre sí otros genes. Por ejemplo, el gen de ojos color azabache en las moscas casi nunca se heredaba independientemente del gen de las alas pequeñas, por lo que ambos deberían residir en el mismo cromosoma. En general, la herencia de rasgos inseparables se debía a que los genes responsables estaban situados en un mismo cromosoma (10). Si dos genes tendían a ser coheredados deberían encontrarse en el mismo cromosoma, mientras que si no estaban vinculados deberían estar localizados en cromosomas distintos. Sin embargo, en algunas ocasiones se observaba que un gen de un cromosoma paterno se desvinculaba de sus compañeros en un embrión y pasaba a uno materno, produciendo un individuo "raro". Esto significaba que, además de la transmisión vertical de los genes, **el material genético puede transmitirse horizontalmente** (Morgan calificó este fenómeno como **"intercambio genético"** o **"transformación"**). Quedaba establecido que la información genética puede intercambiarse entre cromosomas de un organismo, entre organismos y entre especies, y unque se produce raramente en mamíferos, es frecuente entre bacterias (recordemos que los genes de resistencia a antibióticos son intercambiables habitualmente entre ellas) (11).

El bacteriólogo inglés **Frederick Griffith** demostró en 1928 que en la "transformación" los genes pueden ser transportados por simple contacto, al margen de cualquier forma de reproducción (12). Griffith utilizó dos cepas de la bacteria *Streptococcus pneumoniae*, causante de la neumonía neumocócica, que podían distinguirse porque una tenía una capa lisa formada por azúcar (y por eso escapaba del sistema inmunitario por lo que era muy virulenta) mientras que la otra era áspera, carecía de la capa de azúcar y era vulnerable al ataque inmunológico. Cuando mezcló la cepa de bacterias lisas (virulentas), muertas previamente por el calor, con bacterias vivas de la cepa arrugada, estas últimas adquirieron la capa lisa y se convirtieron en virulentas. El fenómeno se había producido químicamente, ya que el gen que determina la virulencia había pasado de la sopa química formada por los restos de las bacterias muertas a las vivas. Por su parte **Muller** (otro antiguo alumno de Morgan), había descubierto en 1926 que las mutaciones podían inducirse en una población de moscas exponiéndolas a rayos X de intensidad baja, es decir, suministrando energía (13). Así pues, **las alteraciones genéticas podían inducirse artificialmente**, y **la biología empezaba a convertirse en química**.

2.6. Componentes químicos de los genes: Estructura del ADN

Los genetistas habían empezado a visualizar los genes contenidos en los cromosomas, pero ¿qué componentes químicos constituían los genes? El experimento de Griffith dio paso a muchas especulaciones sobre la identidad molecular de los genes. Ésta se buscaba triturando células y analizando sus componentes químicos. Se sabía que los genes se encontraban en la **cromatina** del núcleo y que ésta estaba formada por proteínas y ácidos nucleicos. Las proteínas y sus funciones eran entonces bastante conocidas, mientras que los ácidos nucleicos eran muy desconocidos. Por ello, se pensó en principio que los genes estaban compuestos de proteínas.

Los ácidos nucleicos se habían descubierto en 1869 por el bioquímico suizo **Friedich Miescher** en materiales procedentes de los núcleos de ciertas células humanas y animales. Eran hebras blanquecinas que poseían carácter ácido, de ahí su nombre. A principios de la década de 1920 se sabía que existían dos modalidades, el ADN y el ARN, y que ambos estaban formados por bases unidas entre sí a lo largo de una cadena. Las bases presentes en el ADN eran adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T), mientras que en el ARN había uracilo (U) en vez de timina. Eran compuestos demasiado simples para ser los agentes activos de la herencia, aunque sí podrían ser el hilo del collar que sujeta a las perlas, que serían las proteínas.

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

En 1933 **Oswald Avery**, un profesor de la Universidad Rockefeller experto en neumococos, conoció el experimento de transformación de Griffith y decidió repetirlo, porque no creía que unos desechos químicos pudieran transportar información genética a una célula. Al comprobar que el fenómeno se repetía, desarrolló diversos cultivos hasta que logró un detritus bacteriano muy concentrado. Tras separar sus componentes con distintos tratamientos, examinó la capacidad de cada porción para transmitir la información genética, observando exclusivamente la "transformación" en la fracción formada por ácidos nucleicos. Puesto que con la adición de una enzima que digería el ARN no desaparecía la actividad, ésta se debía al ADN. La publicación de éste y otros experimentos confirmativos se produjo en 1944 (14), aunque muchos eminentes científicos tardaron años en aceptar que el ADN pudiera contener la información genética. De hecho, a Avery se le negó el Premio Nobel de Fisiología o Medicina a pesar de que obtuvo tres nominaciones para el mismo.

El conocimiento de la estructura del ADN tuvo lugar en 1953, cuando **James Watson** y **Francis Crick**, apoyados en los trabajos que realizó **Rosalind Franklin** utilizando la cristalografía de rayos X para fotografiar al ADN en el King's College de Londres, resolvieron su estructura de doble hélice estabilizada por enlaces de hidrógeno entre las 4 bases púricas (A y G) y pirimidínicas (T y C) (15). La historia es bien conocida y podemos resumirla empezando por la llegada a Cambridge del físico neozelandés **Maurice Wilkins**, quien decidió estudiar por difracción de rayos X la estructura del ADN. Esta técnica, junto con un uso inteligente de modelos moleculares, había sido utilizada en el Caltech por los químicos físicos **Linus Pauling** y **Robert Corey** para determinar la estructura de varios fragmentos de proteínas y descubrir que éstas se pliegan con frecuencia formando una sola hélice. Al proyecto de Wilkins se incorporó como cristalógrafa en 1950 Rosalind Franklin, mientras que Watson y Crick lo hicieron en 1951. Pauling y Corey trataban también de resolver la estuctura del ADN con una metodología semejante, por lo que la competencia era enorme.

Aunque los datos de rayos X que originaban los cristales de ADN eran compatibles con una estructura de dos, tres, o cuatro cadenas, cuando Watson y Crick observaron la mejor fotografía obtenida por Franklin, la "fotografía 51", se dieron cuenta de su sencillez y empezaron a elaborar diversos modelos que contenían dos cadenas helicoidales entrelazadas. Se basaron también en las mediciones que Franklin había reflejado en un informe previo que, aunque no era expresamente "Confidencial", era obvio por su importancia que no debía manejarse libremente. Fueron también de gran ayuda para determinar la disposición y apareamiento de las bases los trabajos del bioquímico **Erwing Chargaff**, quien encontró en 1950 que al descomponer el ADN, las bases A y T, al igual que G y C, siempre estaban presentes en una proporción casi idéntica. Además, los modelos moleculares corroboraron que el par A…T tenía una forma idéntica al par G…C, de forma que los pares de bases podían apilarse hacia el centro de la hélice.

Aunque la estructura de doble hélice del ADN es general, se conocen otras estructuras que están presentes de forma minoritaria. En las células eucariotas los extremos de los cromosomas están marcados por los **"telómeros"**, que son secuencias de ADN no codificantes cuya función principal está relacionada con la estabilidad estructural de los cromosomas, la división celular, y el tiempo de vida de las estirpes celulares. Un ADN telomérico humano puede formar una doble hélice clásica, pero también, una hebra rica en G puede adoptar por separado una conformación de cuatro pisos ("**quadruplex**"), cada uno de los cuales es un plano formado por cuartetes de guanina (Figura 6) (16). Si una hebra de ADN es rica en citosina puede plegarse también como un **motivo intercalado** (***i-motif***), un nudo en el que algunas citosinas en vez de unirse por enlaces de hidrógeno a guaninas se enlazan a otras citosinas que se encuentran en forma protonada (17). Las secuencias que originan G-quadruplex están relacionadas con la actividad transcripcional de genes relacionados con el cáncer (como *c-Myc*, *k-Ras*, *PDGF*, etc.) y, por esta razón, algunos de sus ligandos inducen la apoptosis de células cancerosas. Por otra parte, los *i-motifs* se forman, disuelven y se vuelven a formar en las fases G1 tardías (cuando el ADN se "lee" con más intensidad para ser copiado) y pueden aparecer en las regiones promotoras y en los telómeros. Por ello, se piensa que pueden tener importancia como reguladores del funcionamiento celular. Varios biólogos australianos han observado recientemente *i-motifs* en células humanas vivas (18).

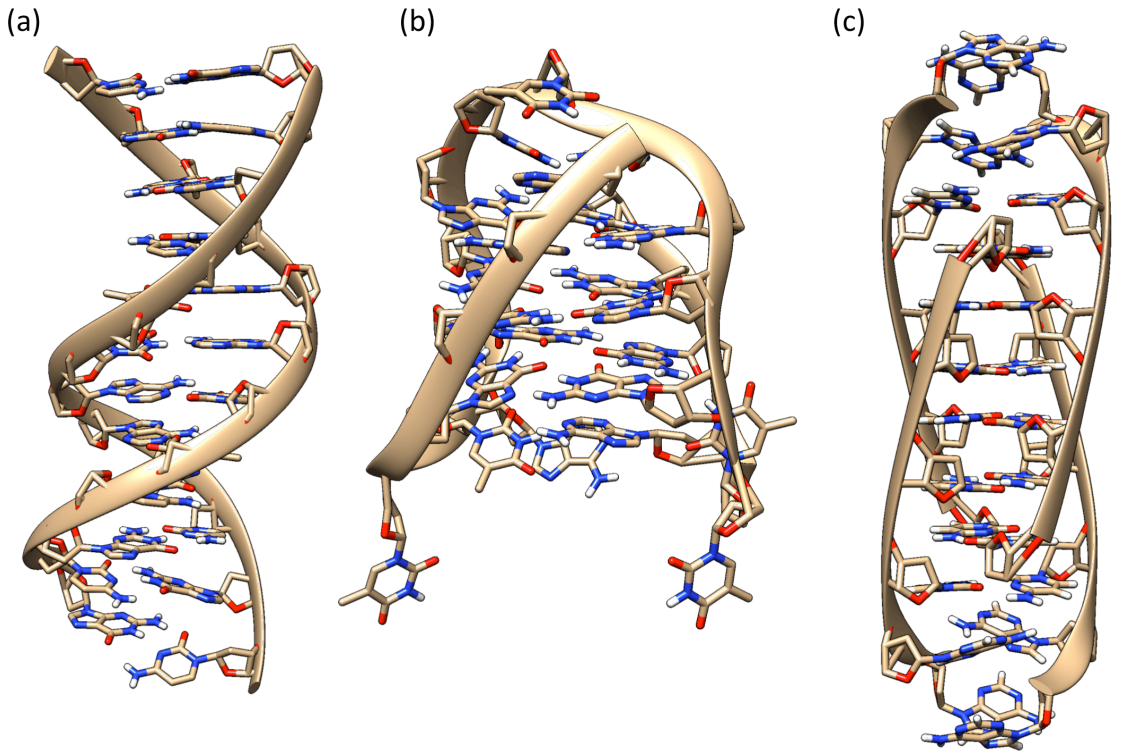


Figura 6. ADN de doble hélice (pdb 6cq3), quadruplex (pdb 143d), e *i-motif* (pdb 1ybl). Las tres estructuras se han representado con el programa Chimera 1.10.

Watson, Crick y Wilkins recibieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina de 1962. Su modelo de ADN marcó el final de una concepción del gen como un portador y transmisor misterioso de mensajes a lo largo de generaciones y el comienzo de los trabajos para descifrar su código. En química, la estructura de una molécula está íntimamente ligada a su función. ¿Cómo podían cuatro bases de una cadena molecular determinar el color de los ojos o la propensión a padecer una enfermedad?

2.7. El código genético

El eslabón perdido entre los genes y los rasgos físicos empezó a desvelarse en 1941, cuando **George W. Beadle** (otro alumno de Morgan) y **Edwars L. Tatum** demostraron cómo **los genes dirigen la síntesis de enzimas que controlan procesos metabólicos**. En 1937 decidieron experimentar con *Neurospora crassa*, un moho del pan todavía más simple que la mosca de la fruta que es capaz de crecer en caldos de cultivo que solo contienen un azúcar y biotina. Las células de este moho deberían poseer una maquinaria enzimática capaz de sintetizar macromoléculas complejas con estos simples compuestos por lo que, si se producía un mutante del moho en el que una de estas enzimas estuviera inactivada, su función metabólica desaparecería y sería necesaria la adición al medio de cultivo del ingrediente ausente para la supervivencia del moho. Al observar que cada mutante perdía una sola función metabólica que correspondía a la actividad de una sola enzima, dedujeron que **un gen actúa codificando información para construir una proteína y ésta posibilita una función** (19). Estos hallazgos les valieron para recibir el Premio Nobel en 1958, pero sus estudios dejaban sin resolver una gran pregunta: ¿Cómo genera una secuencia de ADN (ATCCCG…..) las instrucciones para construir una proteína?

A mediados de los años 1950 algunos investigadores, entre otros **Watson**, **George Gamow,** y **Walter Gilbert** en Harvard, **Sydney Brenner** en Cambridge, y **Jacques Monod** (otro discípulo de Morgan) y **François Jacob** en París, sospechaban que el ADN creaba primero una molécula mensajera (intermedia), que debería ser un ARN puesto que tendría que desplazarse desde el núleo al citoplasma. Los expertos sabían que las proteínas se sintetizaban en componentes celulares especializados llamados **ribosomas**, pero cuando éstos intentaban aislarlos se descomponían. Tras descubrirse que el ión magnesio era necesario para estabilizarlos, se pudo aislar una pequeña cantidad de moléculas mensajeras procedentes de células bacterianas que se identificaron como **ARN mensajero**. Los resultados se publicaron en 1960 en dos trabajos consecutivos de la revista *Nature* (20). En la generación de una copia de un gen en el ARN se reescribe una "palabra" en un lenguaje que sólo se diferencia del original en la sustitución de la letra T por U, por ello se denominó **"transcripción"**. El problema ahora era resolver cómo se realizaba la descodificación (o "**traducción"**).

Puesto que las proteínas se construyen con 20 aminoácidos, cuatro letras no pueden determinar por sí solas 20 alternativas. **Watson** y **Crick** supusieron desde un principio que la información genética se encierra en

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

secuencias precisas de bases (21). **Crick** y **Brenner**, basándose en ingeniosos experimentos y en una aritmética elemental, propusieron que cada aminoácido de una proteína tendría que estar especificado por tres bases. Un **código triplete** permitía 64 combinaciones, suficientes para especificar los 20 aminoácidos y otras funciones (como las de empezar o parar la síntesis de una cadena de proteína). Si el código estuviera especificado por 2 bases, solo se podrían obtener 16 combinaciones (insuficientes para 20 aminoácidos) y si fueran 4 bases habría 256 permutaciones (muchas más de las necesarias). En 1965, numerosos estudios habían logrado **asignar correctamente cada triplete de ADN a un aminoácido diferente**. También se sabía que el triplete ATG era el código para iniciar la síntesis de una proteína y que los tripletes TAA, TAG y TGA eran códigos para detenerla (figura 7).

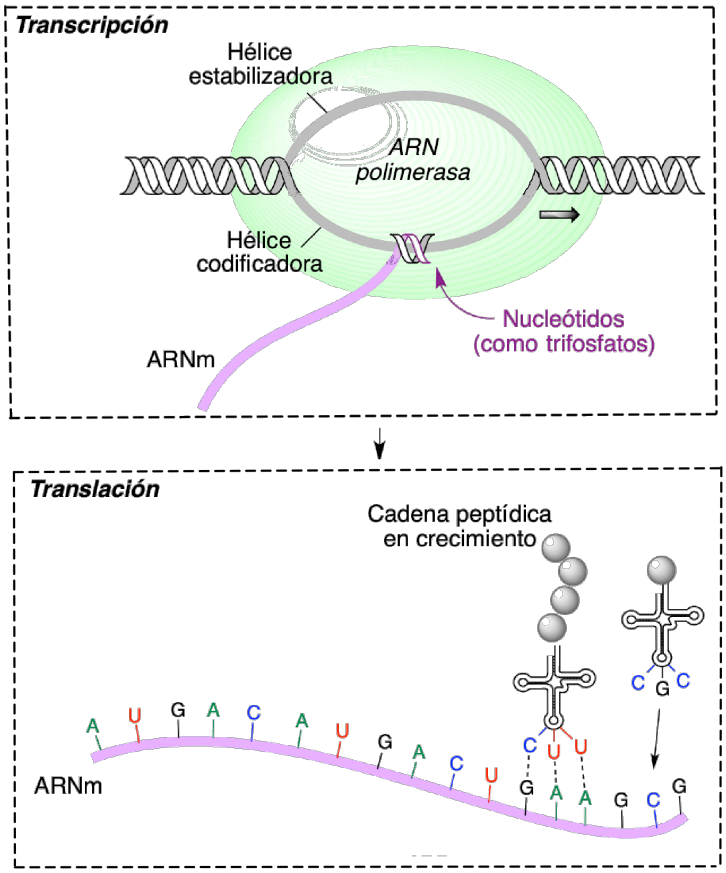


Figura 7. Transcripción y traducción.

La información genética está contenida en la propia molécula de ADN. El código o la clave radica en el orden en que se presentan las cuatro bases: adenina, citosina, guanina y timina. El cambio de una sola base de un triplete que codifique un aminoácido importante para la función de una proteína puede originar graves problemas, como es el **caso de la anemia falciforme**. En los enfermos que la padecen, un triplete GAG en el ADN del gen que codifica la cadena B de la hemoglobina cambia a GTG, lo que implica la sustitución de un residuo de glutamato por uno de valina que altera el plegamiento normal de la hemoglobina y su función transportadora de oxígeno.

Para reconocer el sitio donde tiene que comenzar la transcripción existen proteínas reguladoras denominadas "**factores de transcripción**" que se unen a secuencias específicas de ADN llamadas **promotores**. La transcripción del ADN al ARN es universal en los seres vivos, aunque en los retrovirus se produce a la inversa, del ARN a ADN. Hay que señalar que el ARN no es solo un mensajero imprescndible en la transcripción genética, sino que tiene otras muchas funciones (22-24).

2.8. Secuenciación de genes

En 1962, el bioquímico **Frederick Sanger**, que había recibido el Premio Nobel en 1958 por haber determinado cual es la secuencia de aminoácidos de la insulina y otras muchas proteínas mediante reacciones sucesivas de degradación, empezó a pensar en cómo se podía identificar la secuencia de mononucleótidos en un gen. Sin embargo, cuando intentaba utilizar la degradación del ADN para este propósito, sólo obtenía una mezcla indescifrable. En 1971 pensó que sería más útil trabajar al revés: construyendo el ADN en vez de degradarlo. Su técnica consistía en **utilizar**

la reacción de la polimerasa en la copia del ADN (ver el apartado 2.13), pero esta enzima actuaba a gran velocidad añadiendo nucleótidos a la copia sin que se pudiesen determinar cuáles eran las bases que se iban añadiendo (-A,C,C,C,T,G,C, etc.). En 1977, Sanger desarrolló un método para parar la reacción utilizando pequeñas cantidades de 2',3'-didesoxinucleótido trifosfatos (ddNTPs) (ver un ejemplo en la Figura 8). Éstos impiden la elongación de cadena catalizada por la ADN polimerasa porque, aunque pueden insertarse en una hebra de ADN, la carencia del grupo 3'-hidroxilo no permite que se formen enlaces fosfato con un nuevo 2'-desoxiribonucleósido trifosfato.

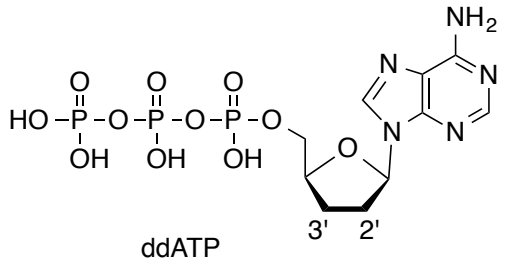


Figura 8. Los ddATPs carecen del grupo hidroxilo en 3' de los 2'-desoxiribonucleótidos.

La reacción en cadena de la polimerasa con una muestra de ADN en una mezcla que contenga un cebador, los cuatro 2'-desoxiribonucleótidos, y un 2',3'-didesoxiribonucleótido, producirá cadenas cuya longitud dependerá de donde se encuentre el nucleótido con una base complementaria a la del 2',3'-didesoxiribonucleótido utilizado, porque su incorporación finalizará la reacción en cadena. La secuenciación se lleva a cabo en cuatro tubos, cada uno con un ddNTP distinto. Cuando la ADN polimerasa incorpora aleatoriamente un ddNTP la reacción se detiene, de manera que se generan fragmentos de distinta longitud, todos ellos con el mismo ddNTP terminal. Los diversos fragmentos se separan en función de su tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (una técnica que permite separar fragmentos de ADN cuya longitud difiere en un sólo nucleótido). A partir del gel se puede reconstruir la secuencia que se ha sintetizado, que es complementaria a la secuencia del molde (25). Mediante esta tecnología, se puede determinar la secuencia de moléculas de ADN de hasta 800 nucleótidos de longitud y fue utilizada por primera vez por Sanger para resolver la secuencia completa del **bacteriófago ΦX174** en 1977 (26).

En 1976-1977, **Allan Maxan** y **Walter Gilbert** desarrollaron un método diferente para secuenciar ADN basado en su modificación química y posteror escisión donde se encuentren bases específicas (27). El método requiere el marcaje radioactivo en uno de los extremos y la purificación del fragmento que se desea secuenciar. Tras un adecuado tratamiento químico se obtienen fragmentos de ADN de diferente longitud cuyas secuencias de nucleótidos se identifican por electroforesis en gel. Para visualizar los fragmentos generados en cada reacción se hace una autoradiografía que proporciona una imagen de bandas oscuras correspondientes a los fragmentos marcados con el radioisótopo y, a partir de ellos, se puede deducir la secuencia. Por ser bastante laborioso este procedimiento se ha sustituido por métodos enzimáticos como el de Sanger que, además de ser más sencillos, pueden llevarse a cabo de forma automatizada.

El año 1980, **Sanger** y **Gilbert** compartieron la mitad del Premio Nobel de Química "for their contributions concerning the determination of base sequences in nucleic acids". **Paul Berg** recibió la otra mitad "for his fundamental studies of the biochemistry of nucleic acids, with particular regard to recombinant-DNA" (ver el apartado 2.11) (Figura 9).

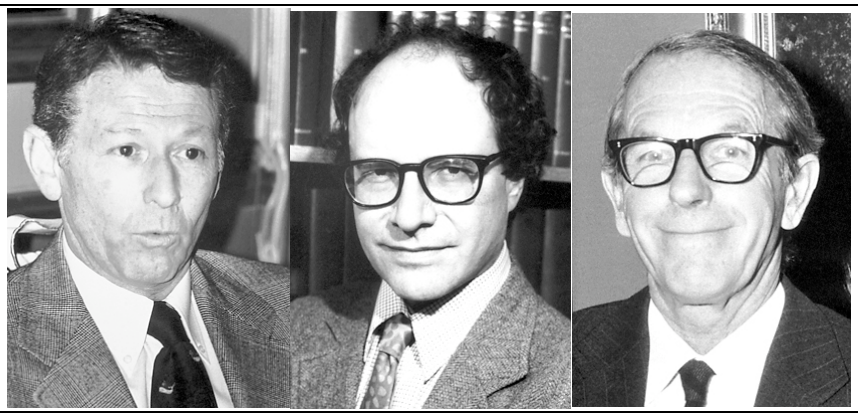


Figura 9. Paul Berg, Walter Gilbert y Frederick Sanger.

2.9. ADN complementario o ADN copia (ADNc). Transcriptasa inversa

En 1970 los virólogos **David Baltimore** y **Howard Temin**, trabajando de forma independiente, descubrieron en los retrovirus una enzima que contradecía el dogma central de Crick: "la información genética solo transita de los genes a los mensajes y nunca al revés". Esta enzima podía construir ADN a partir de una plantilla de ARN, por lo que la llamaron **transcriptasa inversa** o **retrotranscriptasa**. Pronto demostró su utilidad en el proceso de **clonación de genes**. Las técnicas de secuenciación de genes habían permitido descubrir que

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

mientras que los genes bacterianos no contienen módulos separados ni están divididos por espaciadores, los de los virus y animales suelen estar divididos en módulos denominados **"exones"** interrumpidos por largos tramos de ADN denominados **"intrones"** que carecen de información para codificar una proteína. Estas divisiones permiten a las células generar múltiples mensajes a partir de un único gen variando el modo de empalmar los módulos, dando lugar a distintas **"isoformas"**.

El **ADN complementario (ADNc)** es un ADN de doble cadena que, debido a la naturaleza de su síntesis, carece de intrones. Se sintetiza a partir de una hebra simple de ARNm maduro y se suele utilizar para la clonación de genes propios de células eucariotas en células procariotas. El ARNm eucariótico y el procariótico también se diferencian en que el primero puede contener intrones mientras que el segundo no los tiene, por lo que las células procarióticas carecen del mecanismo para eliminar los intrones siguiendo el proceso de **corte y empalme** (***splicing* de ARN**) que utilizan las células eucariotas. En éstas, los ARNs transcritos se modifican a través de un proceso de maduración que, tras cortes y empalmes, elimina ciertos intrones para producir el ARNm final. Si se quieren expresar genes eucariotas en células procariotas para su clonación, y se inserta en éstas el ADN eucariótico para que se transcriba en ARNm, el proceso no puede completarse por la carencia mencionada. Además, como en los genes humanos los intrones son a menudo enormes y ocupan grandes tramos de ADN, resultan demasiado largos para caber en un plásmido bacteriano. En definitiva, **si se quiere expresar un gen eucariótico en un sistema procariótico se deberá clonar a partir de su ADNc** y no de su secuencia genómica, porque probablemente ésta estará interrumpida por intrones.

La transcriptasa inversa resolvió estos problemas al permitir construir genes a partir de plantillas de ARN y clonarlos después de que los intrones se han eliminado (antes de introducir el ADN eucariota en el hospedador). Tras la transcripción de ADN en ARNm en una célula eucariótica, ésta lo procesa eliminando los intrones y añadiendo una cola poli-A y un terminal GTP. Después se extraen las cadenas de ARNm "maduro" de la célula, la cola poli-A se hibrida sobre un oligonucleótido poli-T (porque, aunque existen otras alternativas, la transcriptasa inversa necesita un cebador de doble cadena para comenzar a trabajar), y se añaden estos componentes a las células procarióticas junto con la transcriptasa inversa y las bases A, T, C y G. La transcriptasa inversa recorre la cadena de ARNm y sintetiza la cadena de ADNc, complementaria según la correspondencia de bases (Figura 10).

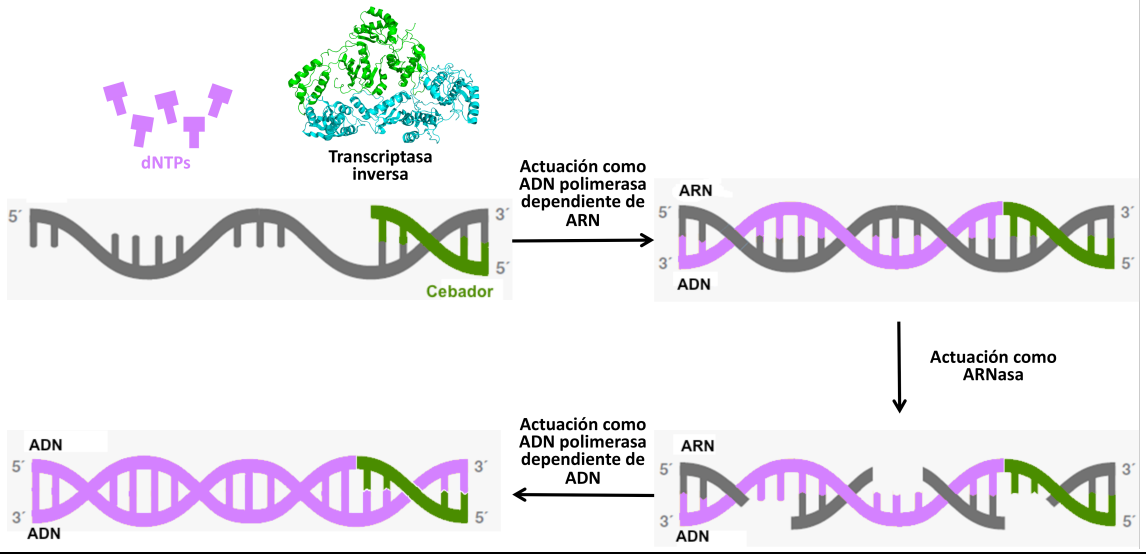


Figura 10. Transcriptasa inversa.

La clonación del ADNc que codifica la proteína **"receptora de antígenos de los linfocitos T"**, realizada con éxito en 1984, fue un hito en la inmunología al permitir conocer el mecanismo de funcionamiento de estos linfocitos (28). Los receptores de antígenos de los linfocitos T actúan como sensores que detectan la presencia de células invasoras y de células infectadas por virus, enviando una señal para eliminarlas.

2.10. Mecánica de los genes. Las cuatro "R"

Desde finales de la década de los cincuenta hasta los años setenta la fisiología de los genes centró el interés de los investigadores, descubriéndose que por la acción de determinadas señales éstos podían **Regularse** (activarse y desactivarse), **Replicarse**, **Recombinarse** y **Repararse**. Estos conocimientos empezaron a explicar cómo los genes construyen, reproducen, conservan y reparan a los seres humanos, y cómo se ven afectadas la identidad y la salud de éstos.

El descubrimiento de la **regulación genética** se inició a finales de los años cincuenta estudiando el crecimiento de *Escherichia coli*, una minúscula bacteria del intestino que puede sobrevivir nutriéndose de glucosa y de lactosa. **Jacques Monod** descubrió que cuando se añadían estos dos azúcares al cultivo bacteriano, las células de *E. coli*

consumían primero la glucosa y, tras un pequeño parón, la lactosa. Para el científico, este hecho era consecuencia de un reajuste metabólico: cuando las bacterias pasaban de la glucosa a la lactosa se inducía la producción de enzimas específicas para digerir esta última, y cuando pasaban de nuevo a la glucosa como nutriente, dichas enzimas desaparecían y reaparecían las que metabolizan la glucosa. En consecuencia, los genes podían conectarse y desconectarse como un interruptor de corriente. En colaboración con **François Jacob** y el bioquímico norteamericano **Arthur Pardee**, un especialista en genética microbiana, Monod descubrió tres principios fundamentales en la regulación de los genes. En primer lugar, el ADN se mantiene intacto cuando un gen es conectado o desconectado, lo que cambia es la cantidad de ARN que produce el gen (cuando el ADN está conectado se le induce a generar más mensajes de ARN y por tanto más enzimas). Además, la producción de ARN está regulada coordinadamente, de forma que cuando la fuente de azúcar pasa a ser la lactosa las bacterias activan uno o varios genes que lo controlan todo y que Monod llamó **operón**. El operón de la lactosa está a su vez controlado por una sola proteína que, cuando detecta la adición de lactosa al medio de cultivo, altera su estructura molecular y desbloquea los genes implicados en su transporte y digestión (29). Finalmente, delante de cada gen hay secuencias anexas de ADN (aunque pueden también encontrarse en los extremos y en la mitad de los genes) que actúan como **señales específicas de reconocimiento o etiquetas**. Cuando una determinada proteína detecta un azúcar en el medio de cultivo, reconoce una de estas etiquetas y activa o desactiva los genes corresponientes para producir más ARN y generar las enzimas necesarias para digerir el azúcar. En resumen: **un gen es una combinación de secuencias codificantes y reguladoras**, por lo que no solo posee información para codificar una proteína sino también sobre cuándo y dónde producirla.

La regulación de genes activados o desactivados por proteínas describe el mecanismo por el que se puede generar complejidad dentro de una célula, pero no explica cómo se duplican los genes cuando una célula se divide en dos (la **replicación genética**). Parecía obvio que cada hebra de ADN podía generar una copia de sí misma, pero este proceso debería estar controlado por alguna enzima. Ésta se denominó **"ADN polimerasa"**, y fue encontrada por el bioquímico **Arthur Kornberg** (discípulo de **Severo Ochoa**) en 1958 depurando residuos bacterianos de cultivos de *E. coli* hasta conseguir un preparado enzimático casi puro. Dicha enzima es producto de un gen que puede activarse o desactivarse por diversas señales o reguladores. Si todo está "en orden", las células harán copias de su ADN cuando estén listas para dividirse, pero si los propios reguladores actúan de forma caprichosa nada puede detener su multiplicación contínua y se origina el cáncer. Con la ADN polimerasa podía crearse un gen a partir de sus subunidades químicas, aunque hoy se sabe que la replicación del ADN requiere además otras proteínas para desplegar la doble hélice y asegurar que la información genética se copia con exactitud.

En 1955 **Ochoa**, junto con su discípula **Marianne Grunberg-Manago**, habían aislado del colibacilo la enzima que cataliza la síntesis de ARN, denominada en un principio "polinucleótido-fosforilasa" y posteriormente **polirribonucleótido nucleotidil-transferasa** (30). El hallazgo de una enzima inédita, que hacía desaparecer el ADP de la muestra de estudio fue fortuito, puesto que la científica estudiaba el papel del ATP, la '"moneda" energética celular. Una vez aislada, esta enzima catalizaba *in vitro* la síntesis de poliribonucleótidos a partir de ribonucleótidos difosfato, permitiendo la preparación de polinucleótidos sintéticos con distinta composición de bases. Tuvieron mucha suerte, porque *in vivo* (en otras condiciones) la reacción catalizada discurre "al revés" y la misma enzima degrada el ARN. **Ochoa y Kornberg compartieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1959**.

Hay que mencionar aquí los trabajos de **Margarita Salas** (otra discípula de Ochoa) con **el fago Φ29**, un virus que posee solo 20 genes e infecta a *Bacillus subtilis* y otras bacterias del mismo género. Estos trabajos condujeron a la determinación de la direccionalidad de la lectura de la información genética y al descubrimiento y caracterización de la enzima **ADN polimerasa de dicho fago**, que tiene múltiples aplicaciones biotecnológicas debido a su gran capacidad de amplificación del ADN, por lo que su patente es una de las más rentables de España en su campo (31).

Las unidades de información genética contenidas en el ADN y empaquetadas en los cromosomas codifican mensajes para construir proteínas y determinan la forma y función de un organismo vivo. Así queda explicada la pregunta de Mendel de cómo lo semejante engendra lo semejante pero, aunque es obvio que para generar evolución es necesaria la diversidad genética, no queda resuelto el enigma de Darwin de cómo lo semejante engendra lo desemejante.

La diversidad puede generarse por la alteración de las secuencias de ADN inducida por productos químicos, rayos X u otros agentes; por errores cometidos en la copia de los genes (la replicación); y por intercambio o **recombinación** entre cromosomas. Como ya se ha comentado, estas recombinaciones pueden ocurrir si el ADN de un cromosoma materno se intercambia con el paterno generando un gen híbrido de ambos, pero también por procesos más complejos. Cuando se daña el ADN y la información genética resulta amenazada, el gen puede recopiarse de la copia de su pareja en el cromosoma, de forma que una copia materna puede ser reescrita a partir de la copia paterna y originar un gen híbrido.

En la fisiología de los genes hay una cuarta "R" esencial para la supervivencia de los organismos: la **Reparación**. Gracias a varios genetistas, entre ellos **Evelyn M. Witkin** y **Stephen J. Elledge**, se han identificado muchas proteínas que, como las *checkpoint kinases* que regulan el ciclo celular, activan una respuesta celular tras detectar un daño en el ADN para repararlo, retardarlo, o detener la división celular. Estos mecanismos

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

no vamos a comentarlos en detalle, pero es obvio que si los genes que codifican estas proteínas mutan, puede producrse una acumulación de daños en el ADN que de lugar a más mutaciones y finalmente al cáncer.

2.11. ADN recombinante o ADN ligado. Enzimas de restricción

Esta tecnología trata de crear *in vitro* una molécula de ADN artificial por la unión de secuencias de ADN que provienen de dos organismos distintos. En general, cuando un virus penetra en una célula se despoja de su cubierta proteica y utiliza la maquinaria celular del hospedador para copiar sus genes y generar nuevas cubiertas dando lugar a millones de virus que salen de la célula. Sin embargo algunos virus, en vez de producir millones de nuevos virus tras la infección, insertan su ADN en el cromosoma celular del hospedador entrando después en un estado de letargo hasta que son activados por determinados estímulos.

El bioquímico **Paul Berg**, anteriormente mencionado, comenzó a pensar en 1968 en la posibilidad de utilizar alguno de estos virus como vehículo para incorporar un gen extraño en un cromosoma humano insertándolo previamente en el genoma vírico. Empezó a trabajar con el **simian virus 40** (SV40), que es capaz de instalarse en células de simios y de humanos con una gran compactibilidad y eficacia. El primer problema era que sus 7 genes, en vez de estar encadenados en forma de un collar abierto por los extremos a lo largo de los cromosomas como los genes humanos, forman un collar cerrado. Berg podía disponer de muchas de las enzimas bacterianas que en los años 60 habían aislado y purificado los microbiólogos, pero tendría que encontrar una que cortase este collar y otra que pegase un trozo de ADN extraño y creara un **gen híbrido** (una **quimera**). Entre las enzimas bacterianas conocidas se encontraban las "**enzimas de restricción**", unas endonucleasas que reconocen dianas específicas en el ADN siempre que determinadas bases de la secuencia de reconocimiento no estén metiladas y, actuando como unas "tijeras", degradan el ADN "intruso" de los bacteriófagos que las atacan. Este ADN queda "**restringido"** (es decir, "**fragmentado"**) mientras que el propio está protegido porque las adeninas y citosinas de las dianas de restricción están metiladas.

Las enzimas de restricción serían decisivas para el desarrollo de la **ingeniería genética** y han servido para el avance en la fragmentación del genoma, la elaboración de mapas de restricción o el diagnóstico de enfermedades. En otras aplicaciones se han combinado con otras técnicas, como el clonaje de genes o genomas, la secuenciación, o la reacción en cadena de la polimerasa. Su descubrimiento permitiría **unir *in vitro* fragmentos de procedencia muy diversa** y diseñar construcciones genéticas capaces de replicarse en células huésped para obtener un gran número de copias idénticas a la original.

Tras múltiples esfuerzos, Berg y su colaborador **Davis Jackson** consiguieron en 1972 unir el genoma de SV40 a una pieza de ADN del bacteriófago lambda (fago λ) y a tres genes de la bacteria *E. coli*, y denominaron a estos genomas híbridos **ADN recombinante** (32).

Cuando **Janet Mertz** se incorporó al grupo de Berg, descubrió que si utilizaba la enzima de restricción que le había proporcionado el microbiólogo **Herb Boyer** *EcoR1*, producida por *Eschericia coli RY13*, el proceso de creación de ADN recombinante era mucho más eficiente que el utilizado por Berg y Jackson, y podía hacerse en dos etapas en vez de en seis. Mertz pensó también en crear híbridos genéticos con genes de SV40 insertados en el genoma de *E. coli* y, de esta forma, crear bacterias portadoras de genes víricos en vez de virus portadores de genes bacterianos. Pero Mertz no pudo realizar estas experiencias porque Berg había impuesto una moratoria, que tuvo gran repercusión, para no transferir los híbridos de genes a células bacterianas ni a ningún organismo vivo mientras no se demostrara que el riesgo de estas manipulaciones era cero (33). Combinando genes de diversos organismos podrían diseñarse genes a voluntad y serían posibles la ingeniería genética y la terapia génica en humanos, pero si se introdujeran estos híbridos genéticos en el organismo equivocado se podría desencadenar una catástrofe biológica y ecológica.

Muchas de estas cuestiones se debatieron en 1975 en la ***Asilomar Conference on Recombinant* DNA**, que tuvo una gran influencia en la regulación de la biotecnología, pero en ella no se afrontó la aplicación de estas tecnologías para manipular genes humanos en células humanas. Siguiendo las recomendaciones que había sugerido Berg en esta reunión, se creó en el seno de los Institutos Nacionales de Salud de EEUU el **Comité Consultivo del ADN Recombinante (RAC)**.

Además del SV40 y otros virus, existen unos minicromosomas llamados **"plásmidos"** que podrían ser también portadores de genes. Los plásmidos son collares circulares de genes que viven y se replican dentro de las bacterias y pueden transferirse entre distintas cepas. Al crecer y dividirse las bacterias, un plásmido al que se haya incorporado un gen extraño que se encontrara en su interior se multiplicaría, y al final se tendrían millones de réplicas exactas (**"clones"**) de un trozo de ADN. Puesto que el libre intercambio de genes es una caraterística de las bacterias, esta manipulación no traspasaba ninguna barrera evolutiva, por lo que **Herb Boyer** y **Stanley Cohen** decidieron obtener estas quimeras pensando que serían mucho menos peligrosas que los híbridos de virus y bacterias al estar compuestas exclusivamente por genes bacterianos.

Cohen había aislado algunos plásmidos que contenían genes que conferían resistencia a ciertos antibióticos (34) y había logrado en 1973 injertarlos en *E. coli* creando cepas de esta bacteria igualmente resistentes (35). Estos plásmidos podrían utilizarse para seleccionar las bacterias que, tras haber adquirido un gen extraño, no morirían por la acción de los antibióticos y, una vez cultivadas, originarían millones de copias de la quimera genética.

2.12. Las bacterias como fábricas biológicas de fármacos o productos químicos

En 1975, la **insulina** se producía todavía a partir de páncreas de ternera y cerdo, (se necesitaban 7 toneladas para obtener 1 Kg de la hormona). Sanger había dilucidado en 1953 la secuencia de los 51 aminoácidos de esta enzima y había determinado que está formada por una cadena A con veintiún aminoácidos, y una B con treinta. Ambas están enlazadas por dos puentes disulfuro entre los residuos A7-B7 y A20-B19 (la cadena A contiene además un puente de disulfuro interno entre los residuos A6 y A11).

En 1976 **Herb Boyer** y el empresario **Robert Swanson** se asociaron para fundar **Genentech** (una contracción de *Genetic Engineering Technology*), la primera empresa biotecnológica que utilizaría las técnicas de clonación de genes para fabricar fármacos. Como Boyer no disponía del gen que codifica la insulina humana, pensó en crear los genes de las cadena A y B por separado añadiendo químicamente nucleótido por nucleótido, pero la dificultad de la empresa le motivó a ensayar primero el proceso con la somatostatina, una proteína de 14 aminoácidos. En 1977 su equipo insertó en un plásmido bacteriano el gen de la somatostatina enganchado a un gen bacteriano, cultivó las bacterias transformadas, y éstas produjeron somatostatina. En Genentech se estudió este mismo proceso para la insulina, y en 1978 se obtuvieron las dos cadenas de insulina procedentes de cultivos bacterianos. Una vez purificadas se practicó su unión en un tubo de ensayo, lo que dio lugar a las primeras moléculas de **insulina recombinante** (Figura 11). En 1982, la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos concedió a Genentech una de las patentes más lucrativas y discutidas para utilizar ADN recombinante a fin de producir proteínas como la insulina o la somatostatina en un organismo microbiano. El mismo año 1982 la empresa empezó a producir la hormona de crecimiento humana.

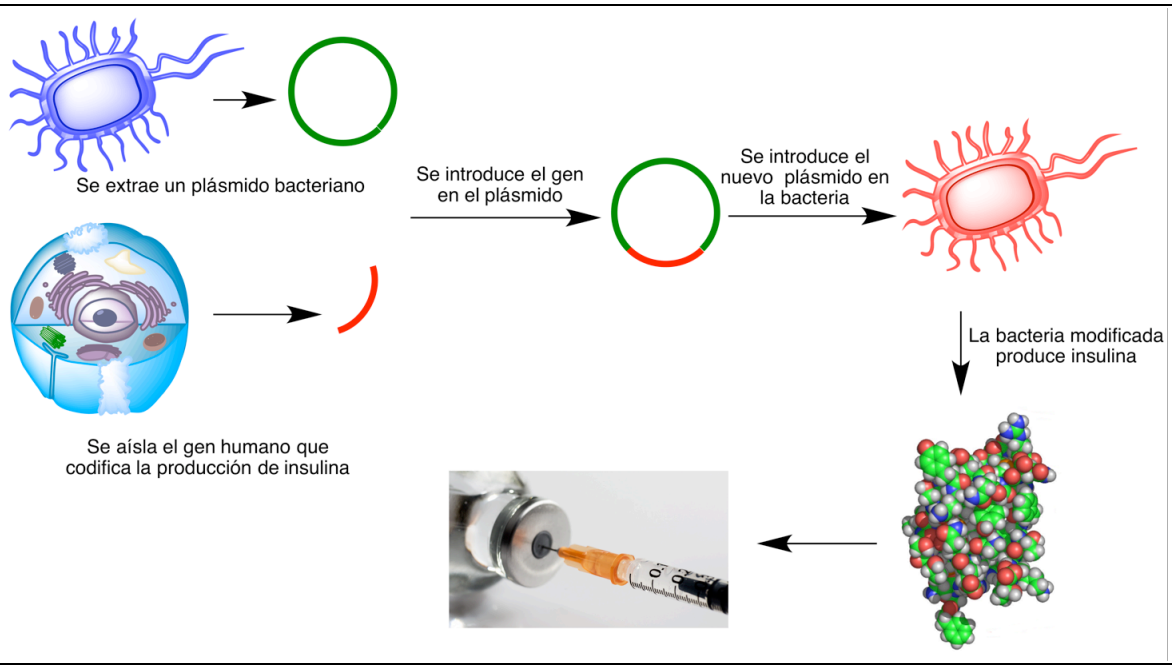


Figura 11. Producción de insulina recombinante.

La detección del **"síndrome de inmunodeficiencia adquirida" (SIDA)** en pacientes con hemofilia A sometidos a múltiples transfusiones que estaban siendo tratados con inyecciones de **factor VIII**, hizo pensar que la causa de este síndrome en estos pacientes era un contaminante de la sangre humana de la que se extraía el factor VIII (posiblemente un nuevo virus) y en la ventaja que supondría obtener éste biotecnológicamente, sin estar contaminado con sangre humana. El problema era que el factor VIII contiene 2.350 aminoácidos y su gen, que se encuentra en el cromosoma X, es demasiado grande para crearlo utilizando la química del ADN. Por ello se clonó su ADNc y se insertó en plásmidos que se introdujeron en células de ovario de hámster (muy eficientes en la producción de proteínas). Finalmente se purificaron las proteínas, obteniéndose en 1984 el **factor VIII recombinante**, que se comercializó en 1987.

En 1985 se clonó y expresó el gen de la **eritropoyetina** (EPO), el factor estimulante de la diferenciación y maduración de precursores de eritrocitos (36), lo que posibilitó el desarrollo de la **EPO recombinante** humana (37), que se utiliza en el tratamiento de la anemia en pacientes con enfermedad renal crónica y después de ciclos agresivos en la quimioterapia del cáncer. Además de los ejemplos mencionados, los microorganismos modificados genéticamente han permitido producir **interferones**, diversos **antígenos** como la vacuna contra la hepatitis B5 y la vacuna contra el virus del papiloma humano, etc.

En la actualidad, la **transferencia génica a organismos enteros** (o introducción de un gen foráneo en un organismo) puede tener muchas finalidades y realizarse de varias formas. Si se transfieren genes a células germinales se originan adultos en los que el gen insertado

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

se encuentra en todos los tejidos y además, estos genes se transmitirán a la progenie originando **organismos transgénicos**. También se pueden producir individuos transgénicos introduciendo un determinado gen en unas pocas células embrionarias que posteriomente se incorporan a un embrión. Así resultan **quimeras transgénicas** en las que los tejidos pueden derivarse de las células manipuladas o de las endógenas. Otro modo de modificar un organismo muy frecuente en terapias génicas humanas es la **manipulación *ex vivo***, en la que se aíslan células (generalmente sanguíneas o de la médula ósea) para modificarlas genéticamente *in vitro* y reintroducirlas en el organismo de partida.

Las técnicas de ADN recombinante también han permitido obtener **plantas transgénicas** resistentes a insectos, hongos, bacterias y herbicidas con alto contenido nutricional, así como la **clonación de animales**. Su desarrollo ha dado pie a la **terapia génica** y ha hecho posible la **edición genética**, ya que los genes no solo saben leerse sino también escribirse.

2.13. Secuenciación del genoma humano y otros genomas. PCR

A finales de los ochenta ya existía la tecnología para secuenciar el **genoma humano**, pero **secuenciar sus tres mil millones de pares de bases** era una tarea hercúlea. **El impulso** para acometer esta labor **provino del cáncer**, cuyo origen genético se conocía desde 1872 pero no se corroboró hasta finales de la década de los 70. Los cánceres son originados por células normales que han sufrido mutaciones en los genes que regulan su crecimiento, por lo que el objetivo esencial y la gran incógnita de la terapia contra estas enfermedades es encontrar cómo podría restablecerse el estado "apagado" de los genes alterados.

Las mutaciones causantes del cáncer pueden originarse por agresiones ambientales (luz ultravioleta, rayos X, humo del tabaco, etc.), que atacan al ADN y cambian su estructura química, por errores espontáneos en el proceso de copia del ADN en la división celular (por ejemplo, el cambio de una base por otra), por incorporación de los genes mutados a través de los virus (que son los portadores de los genes en el mundo microbiano), o por herencia. En 1993 ya se sabía que, independiente de la causa que las origina, un cáncer surge por acumulación de docenas de mutaciones (38). Para entender el cáncer y otras enfermedades hereditarias en las que están involucradas decenas de genes (como la esquizofrenia), los biólogos necesitaban revisar todo el genoma humano.

Tras varias reuniones fallidas celebradas entre los biólogos más involucrados, se llegaron a algunos acuerdos para iniciar esta tarea en una reunión convocada por **James Watson** en 1986. En ella, **Walter Gilbert**, uno de los pioneros en la secuenciacón del ADN, estimó que se necesitarían unas cincuenta mil personas trabajando durante un año con un coste no excesivamente grande (unos 3.000 millones de dólares). En esta reunión se notificaron varios avances tecnológicos entre los que destacaron el invento de **Leroy Hood** de una máquina semiautomatizada que podría aumentar entre 10 y 20 veces la velocidad de secuenciación por el método de Sanger, y la optimización que había logrado **Kary Mullis** de una técnica introducida en 1985 que era capaz de multiplicar una hebra de ADN millones de veces y aumentar la producción de un gen de forma exponencial. Los avances en esta técnica, que se denominó **reacción en cadena de la polimerasa (RCP** o **PCR)**, le valieron para obtener el Premio Nobel de Química de 1993. La técnica de Mullis fue fundamental en el desarrollo del **Proyecto Genoma Humano** porque para secuenciar genes se necesita disponer de éstos en cantidad, lo que es difícil cultivando células humanas (39).

La **PCR** es un método enzimático que utiliza dos secuencias cortas de oligonucleótidos (oligos) complementarias de los extremos 3' del molde de ADN (con sus terminales 3'-OH enfrentadas) denominadas ***primers***, **iniciadores** o **cebadores**. Éstos permiten que se inicie la reacción de polimerización para sintetizar numerosas copias del fragmento de ADN comprendido entre ambos oligonucleótidos. La sucesión de una serie de ciclos en los que tiene lugar la desnaturalización del molde (que se disocia por una subida de temperatura a 96 °C permitiendo el acceso al ADN de oligos, nucleótidos y polimerasa), la estabilización de los híbridos con los cebadores por una bajada de temperatura a 50 °C, y la extensión de la síntesis catalizada por una ADN polimerasa termoestable a través de una subida a 72°C, origina una acumulación exponencial de fragmentos específicos cuyos extremos están definidos por los extremos 5' de los cebadores. También son necesarios algunos cationes como el Mg^{2+} **cofactores de la enzima**. Hoy el proceso está automatizado y se utiliza sobre todo en el ámbito de la investigación forense.

Tanto la puesta en marcha del Proyecto Genoma Humano, que oficialmente tuvo lugar en enero de 1989, como su desarrollo, se encontraron con múltiples controversias administrativas y científicas. La primera provino del neurobiólogo **Craig Venter**, que propuso ir más rápido ignorando el ADN intergénico y los intrones, y abandonó en 1992 su trabajo en los Institutos Nacionales de Salud de EEUU creando su propio instituto (*The Institute for Genomic Research*, TIGR) dentro de una empresa denominada *Human Genome Sciences*. Desde 1993 a 1995, el equipo de Venter logró descifrar con su "técnica de escopeta" el genoma completo del bacilo ***Haemophilus influenzae***, causante de neumonías letales. A pesar de éste y otro éxitos decidió abandonar el mencionado Instituto y crear la empresa **Celera** (contracción de *accelerate*).

La técnica de ensamblaje clon por clon que se desarrollaba en el Proyecto oficial (en el que llgaron a participar 18 países) era más laboriosa y costosa, pero para algunos era la única que tenía sentido. Dicha técnica tuvo un éxito importante en 1998 cuando se completó el genoma del nematodo *Caenoabditis elegans*, un organismo pluricelular que posee 18.891 genes (Figura 12) (40). El 36

% de las proteínas que codifica este gusano minúsculo eran similares a las de los seres humanos, pero el resto eran entonces desconocidas y tenían una gran diversidad de funciones. Había también genes agrupados en ciertos cromosomas que no codificaban ninguna proteína pero codificaban pequeñas cantidades de ARN (al que denominaron **"micro ARN"**) y regulaban a los genes de forma específica. Estos descubrimientos ampliaron la comprensión del gen ya que, además de codificar proteínas, podía también codificar ARN. Además, un gen no tenía que ser una pieza continua de ADN, sino que podía estar dividido en partes y vinculado a secuencias reguladoras que no tenían que situarse necesariamente adyacentes a él.

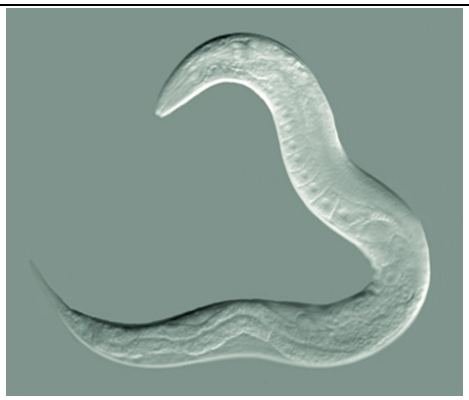


Figura 12. ***Caenorhabditis elegans*** (Wikimedia Commons).

Celera no se quedó atrás y ensambló en once meses el genoma de ***Drosophila melanogaster***, aunque la estrategia de la escopeta había dejado fuera algunas partes de ciertas secuencias (41). Más del 60 % de los 289 genes humanos que se sabía que estaban involucrados en una enfermedad, tenían un homólogo en la mosca aunque, sorprendentemente, su genoma era casi la mitad del genoma humano (tenía 13.601 genes).

Desde 1999 hasta su renuncia en 2008, el reconocido genetista **Francis Collins** (Premio Príncipe de Asturias de Investigación Científica y Técnica de 2001) fue Director del Proyecto oficial relevando a Watson. Se había secuenciado una cuarta parte del genoma humano pero, ante la rapidez con que avanzaba Venter en Celera, Collins cosiguó una inyección importante de dinero para resolver los problemas de ensamblaje. El 26 de junio del 2000 tuvo lugar en la Casa Blanca la comparecencia previamente pactada de Venter, Collins, el presidente Clinton, y el Primer ministro británico Tony Blair (que lo hizo por videoconferencia), para anunciar conjuntamente la inminente culminación del proyecto en ambos grupos (Figura 13). A la hora de publicar el resultado final hubo fuertes enfrentamientos en gran parte debidos a que Celera pretendía publicar su genoma y a la vez venderlo. Finalmente, ambos grupos publicaron los resultados del Proyecto Genoma Humano los días 15 y 16 de febrero de 2001 en dos revistas distintas, en *Science* Celera (42) y en *Nature* los grupos subvencionados con fondos públicos (43).

Figura 13. Venter, Clinton y Collins.

Estos resultados han permitido conocer mejor el funcionamiento de la biología humana. Gracias a ellos se sabe, por ejemplo, que el genoma humano es capaz de evolucionar en algunas células como las del sistema inmunitario, por lo que éstas pueden responder a la constante evolución de los gérmenes produciendo una diversidad de anticuerpos. El estudio comparativo de los genomas de distintos organismos ha dado un soporte molecular al trabajo de Darwin sobre la variación y la selección natural, y ha permitido concluir a casi todos los biólogos que los humanos compartimos un ancestro común con otras formas de vida. Esta relación se pone de manifiesto de múltiples formas, entre las que mencionaremos el mantenimiento del mismo orden de los genes en largos tramos de ADN en los cromosomas del ser humano y del ratón. Si se comparan los genomas de los chimpancés y los humanos se observa que su secuencia genómica es idéntica en un 96 %, pero en vez de los 23 pares de cromosomas que tienen los humanos los chimpancés tienen 24 pares. En algún momento de la evolución, ambos genomas se separaron y dos cromosomas presentes en estos últimos debieron fusionarse en el hombre para formar el cromosoma 2. Otro ejemplo que ha despertado mucho interés es el **gen FOXP2**. Su secuencia es muy estable en casi todos los mamíferos, pero en el hombre hay dos cambios importantes que ocurrieron aparentemente hace solo cien mil años y pueden haber contribuido al desarrollo del lenguaje. Otra característica que distingue al genoma humano del de otras especies del planeta es su baja diversidad genética: a nivel de ADN todos los hombres son idénticos en un 99,9 % mientras que en otras especies la diversidad del ADN es diez o incluso cincuenta veces mayor.

Varios descubrimientos del genoma han abierto múltiples cuestiones. Por ejemplo, es desconcertante saber que el 98 % de nuestro genoma esté reservado a larguísimos tramos de ADN intercalados entre los genes (**ADN intergénico**) o situados dentro de ellos (**intrones**) que no codifican proteínas ni ARN. Lo más probable es que existan para regular la expresión de genes o para otras misiones que no se comprenden todavía, aunque atrevidamente se han denominado **"ADN basura"**. También son en buena parte incomprensibles algunas secuencias de 300 pares de bases, como las **"secuencias Alu"** muy abundantes en el genoma de los primates, que

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

son elementos móviles que aparecen y desaparecen millones de veces, o los miles de "cadáveres" de genes que antes fueron funcionales a los que se llama **"pseudogenes"**.

Sorprende también que nuestro genoma es **en gran medida no humano**, ya que tiene intercalados fragmentos de ADN que provienen de antiguos virus y que ahora permanecen en gran medida silenciados. Según un estudio publicado en 2016, entre el 40 y el 80 % del genoma humano procede de alguna invasión viral arcáica. Fueron genomas de retrovirus que infectaron células germinales experimentando un proceso de transcripción inversa (44). Uno de estos genes procedentes de virus ancestrales cuya actividad parece ser muy importante es el **gen *Arc***, que se localiza en le cromosoma 8 humano y está presente también en muchos vertebrados. Descubierto en 1995, este gen codifica una proteína de origen viral asociada al citoesqueleto (*Activity-Regulated Cytoskeleton-associated protein*) (45) que tiene un papel esencial en la plasticidad sináptica y en la formación y almacenamiento de la memoria en el cerebro. Cuando se activa una sinapsis, el gen *Arc* se activa y produce ARN que codifica la correspondiente proteína, cuyo comportamiento es semejante al de los virus cuando infectan las células hospedadoras. Su alteración se ha relacionado con diversos trastornos neurológicos, como el Alzhéimer o la esquizofrenia (46).

Además del Proyecto Genoma Humano, actualmente están en marcha otros proyectos genoma globales como el *Earth Microbiome Project*, creado el año 2010 para avanzar en el conocimiento de los principios que gobiernan el mundo de las bacterias y las arqueas (47), o el *Earth BioGenome Project*, recientemente propuesto por varios científicos liderados por **Gene Robinson**. En éste se pretende secuenciar, catalogar y analizar los genomas de todas las especies eucariotas, una tarea que según los expertos se podrá completar en diez años con un presupuesto de unos 3.800 millones de euros y que requerirá una capacidad de almacenamiento digital de 200 petabytes (un PB equivale a 10^{15} bytes) (48).

2.14. Epigenética

El estudio de cómo afectan las señales ambientales al genoma de una célula y al uso de sus genes fue denominado **epigenética** (por encima de los genes) por el embriólogo inglés **Conrad Hal Waddington** en su famoso libro **"*The Waddington's epigenetic landscape*"**, publicado en 1957. Hoy día, este término hace referencia a los fenotipos heredables que resultan de cambios en el cromosoma sin alteraciones en la secuencia primaria de ADN.

Los primeros experimentos de transplante de núcleos se realizaron en anfibios debido a que los huevos fecundados son de gran tamaño (1 a 2 mm) y la embriogénesis ocurre fuera del cuerpo materno. En 1958, el estudiante de postgrado **John Bertrand Gurdon** descubrió que al reemplazar el núcleo de una célula del ovocito de una rana por el de una célula madura del intestino de otra rana se desarrollaba un renacuajo normal. En consecuencia, el óvulo no era más que un recipiente para el genoma injertado de otra célula (49). Era la **primera clonación de un animal adulto** y sus variaciones pudieron generalizarse a otros animales, lo que condujo a la famosa clonación de la **oveja Dolly**.

El experimento de Gurdon demostraba que el ADN de la célula madura tiene toda la información necesaria para desarrollar todas las células del un organismo y que aunque las células somáticas estén especializadas, **la especialización es reversible**. La técnica iniciada por Gurdon se denominó **transferencia nuclear de células somáticas** (*somatic cell nuclear transfer*, SNCT), y su descubrimiento le valió para compartir con **Shinya Yamanaka** el Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 2012 (Figura 14).

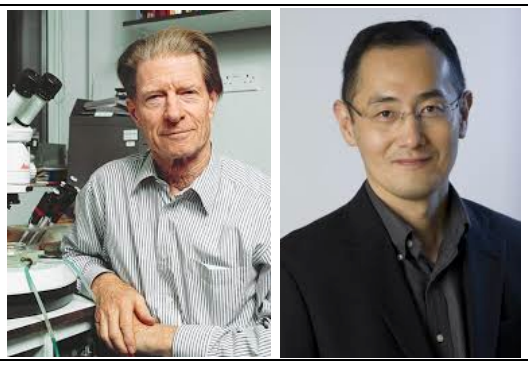


Figura 14. John Bertrand Gurdon y Shinya Yamanaka.

Actualmente, la transferencia nuclear está legalizada en ciertos países y se aplica por ejemplo a las parejas en las que la mujer tiene una mutación en un gen mitocondrial importante. El núcleo de un óvulo de la madre fecundado con el esperma del padre se extrae y se inyecta en un óvulo enucleado de una donante que aporta las mitocrodias "normales". En consecuencia, ya existen **"hijos de dos madres y un padre"**.

A Gurdon le intrigaba el alto porcentaje de fracasos que se obtenía en los experimentos de transferencia del núcleo de una célula del intestino de rana al ovocito enucleado de otra. ¿Por qué le costaba tanto al genoma de una rana adulta regresar al estado embrionario? Debía de haber marcas epigenéticas que dificultaban este regreso.

En 1966 **Mary Frances Lyon**, una antigua alumna de Waddington, visualizó por vez primera un cambio epigenético en células de ratones. En sus experimentos de tinción de cromosomas, todos los pares aparecían con idéntica pigmentación menos el par de cromosomas XX de todas las células en los animales hembra. En estas células, uno de los dos cromosomas X estaba desactivado, su secuencia de ADN era idéntica a la del otro cromasoma X pero sus genes no producían ARN, por lo que todo el cromosoma estaba "silencioso". El proceso se denominó **lionización**, un fenómeno estocástico que ocurre en la embriogénesis temprana femenina para lograr una compensación de dosis génica respecto a los varones. En los mamíferos placentarios, la decisión de cuál de los

cromosomas X se inactiva se produce al azar, en unos casos se inactiva el cromosoma X del padre y en otros el procedente de la madre. En ciertos casos existen mecanismos que afectan el proceso normal y propician una inactivación sesgada que puede tener efectos clínicos relevantes, por ejemplo en mujeres portadoras de trastornos recesivos ligados al cromosoma X, como la hemofilia.

Cuando se estudió este asunto a finales de los años setenta se descubrió que el silenciamiento genético se debía a la metilación de las bases de algunas secuencias de ADN. Esta reacción estaba promovida entre otros agentes por un gen de ARN situado en el cromosoma X que se denominó **Xist** (*X-inactive specific transcript*). La secuencia de ADN de la que se transcribe un ARN no codificante (ncRNA o npcRNA, que no se traduce en una proteína) se denomina a menudo gen de ARN. Este gen se expresa en los cromosomas inactivos pero no en los activos (50) y podría provenir de un gen que evolucionó a pseudogen (51).

El silenciamiento de los genes por medio de proteínas reguladoras (los **factores de transcripción**) se conocía desde los años 50, pero fue después cuando se supo que estos factores pueden reclutar otras proteínas para dejar marcas químicas permanentes en los genes que se conservan en el genoma. La **metilación del ADN**, catalizada por enzimas DNMT (*DNA methyl transferases*), se realiza preferentemente en residuos de citosina situados en regiones del ADN en las que están concentrados la mayor parte de los factores de transcripción. Los cambios estructurales del ADN que produce esta metilación bloquean el enlace de dichos factores o reclutan represores de la transcripción denominados **MBDs** (*methyl binding proteins*), que subsequentemente reclutan histona desacetilasas (**HDACs**) e histona metiltransferasas (**HMTs**), produciendo el **silenciamiento de la expresión génica** (Figura 15a). En 1996, **David Allis** encontró otras marcas epigenéticas que tienen lugar en las histonas, proteínas que empaquetan al ADN y pueden cambiar la actividad de un gen si se modifican químicamente (52). La metilación o acetilación de residuos de lisina o arginina, o la ubiquitilación y fosforilación de residuos de serina y treonina son marcas que se producen en las histonas y podrían haberse transmitido de levaduras y gusanos. La acetilación del grupo amino de la lisina descompacta la cromatina y facilita la transcripción porque elimina la basicidad del grupo amino y su carga positiva, lo que debilita la interacción electrostática entre las histonas y el ADN dejando un espacio para que accedan al ADN los factores de transcripción y las polimerasas. Las histona desacetilasas eliminan los restos de acetilo y dificultan la expresión génica (Figura 15b).

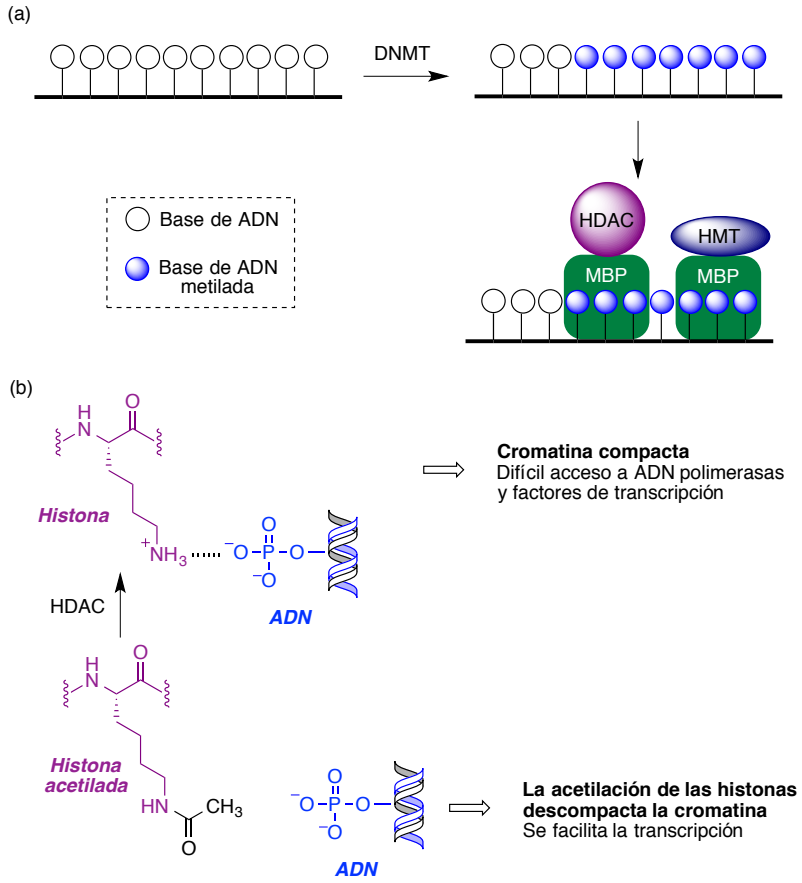


Figura 15. a) Metilación del ADN y silenciamiento de la expresión génica. b) La desacetilación de las histonas dificulta la expresión génica.

Un óvulo posee factores (proteínas o ARN) capaces de borrar estas marcas epigenéticas del genoma, pero revertir

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

la identidad de una célula adulta a su estado embrionario borrándolas todas es más difícil. Esta es la causa del alto porcentaje de fracasos en los experimentos de Gurdon. **Yamanaka** intentó identificar en un óvulo cuáles eran los factores capaces de revertir una célula de la piel de un ratón completamente desarrollado a una célula embrionaria y, tras infinidad de ensayos, redujo estos factores a las proteínas codificadas por solo cuatro genes (o **protooncogenes**). Cuando los introdujo en células maduras de piel de ratón consiguió que algunas se transformaran en algo parecido a las células embrionarias, ya que podían producir todos los tipos de células presentes en el organismo del ratón. El **protooncogen c-Myc** (el más importante ya que los otros tres son colaboradores) dirige la transcripción de ADN a ARN, por lo que desempeña un papel crítico en la selección de las proteínas que tiene que sintetizar la célula. En el experimento de Yamanaka c-Myc actuó como un factor de rejuvecimiento, pero si se activa en las células de un organismo vivo se transforma en un oncogen que puede sobreexpresarse en varios tipos de cáncer mediante un mecanismo de amplificación. Esta realidad es una de las muchas que demuestran que, aunque actualmente se entiende cómo se utiliza la información de un solo gen para construir una proteína (el **código genético**) y puede determinarse el genoma humano, no se sabe prácticamente nada de cómo múltiples genes dispersos en este último coordinan la expresión de los genes en el espacio y en el tiempo para construir, mantener y reparar el organismo (el **código genómico**).

3. GENES Y MEDICINA

3.1. Anomalías cromosómicas vinculadas a enfermedades

En 1956, utilizando una preparación con colchicina y una solución salina hipotónica en la que los cromosomas se descompactaban y podían contarse, el genetista **Joe Hin Tjio** determinó de forma definitiva que **los cromosomas humanos son 46** y que están agrupados en **23 pares** (53). El hallazgo de Tjio contribuyó a importantes avances en la aplicación de la genética a la medicina. Por ejemplo, al descubrimiento de que la **anomalía cromosómica** causante de la mayoría de los casos de síndrome de Down es la **trisomía del cromosoma 21**. Estas personas poseen 47 cromosomas en todas sus células porque el cromosoma 21, que tiene insertados trescientos y pico genes, presenta tres copias en vez de dos (54). El mismo año de su descubrimiento, se empezaron a examinar las células fetales de líquido amniótico aspirado para conocer el sexo del feto, y estos avances dieron paso al diagnóstico de anormalidades cromosómicas *in utero* y a la confrontación entre el derecho a abortar de la mujer embarazada y los derechos del feto por su condición de persona.

Para los defensores del aborto selectivo posterior al **diagnóstico genético prenatal**, el derecho a nacer debería reformularse como el derecho a nacer sin anomalías. Es **una nueva forma de eugenesia** que, en vez de basarse en características físicas o mentales (fenotipos), se basa en sus determinantes genéticos. Se trata de preservar al feto de ciertos trastornos genéticos, pero también se podría utilizar para la elección de los gametos con fines reproductivos, una "**selección germinal**" de espermatozoides u óvulos portadores de genotipos óptimos. Dejando aparte el problema moral, la crítica principal a esta nueva eugenesia se debe a las variaciones que se observan entre pacientes con enfermedades monogénicas y poligénicas portadores de una misma mutación, lo que demuestra que las interacciones entre los genes humanos y las enfermedades son complejas.

En 1957, **Victor McKusick** y **Arno G. Motulsky** abrieron en EEUU sendas clínicas de **genética médica**. McKusick fue el pionero en el estudio de los nexos entre los genes y numerosos síndromes patológicos. Estudiando primero las enfermedades genéticas más conocidas, como la hemofilia o la anemia falciforme, fue creando un enorme catálogo de fenotipos, rasgos y transtornos genéticos monogénicos o poligénicos que eran leves en unos casos pero en otros ponían la vida en peligro. En los transtornos monogénicos, una mutación o aberración cromosómica es necesaria y suficiente para causar la enfermedad, mientras que en las enfermedades poligénicas el efecto de un gen concreto es más tenue y el componente genético puede ser necesario pero no suficiente para causar la enfermedad. También advirtió que las mutaciones de un solo gen pueden manifestarse en diferentes órganos causando distintas patologías, pero se dan casos (como la hipertensión) en que influyen múltiples genes en una sola patología. También hay casos de **"penetrancia incompleta"** o **"expresividad variable"**, en los que aunque esté presente una mutación en el genoma su capacidad para manifestarse física o morfológicamente no es completa y las manifestaciones clínicas son variables. La **penetrancia genética** es la proporción de individuos de una población que expresan el fenotipo patológico, entre todos los que presentan un genotipo portador de un alelo mutado. La **expresividad variable** es la variación de las manifestaciones clínicas (tipo y severidad) de trastornos genéticos entre individuos afectados. Por ejemplo, aunque la herencia de mutantes del gen BRCA1 aumenta el riesgo de cáncer de mama, sus distintas variantes tienen distintos niveles de penetración o manifestación clínica.

A pesar de que la lista de enfermedades humanas influidas por alteraciones genéticas había crecido exponencialmente y que las técnicas de clonación y secuenciación de genes hacían pensar en que la identificación de los genes responsables de enfermedades era factible, la tarea era abrumadora. Por ejemplo, si en un gen ligado a una enfermedad está mutado un solo par de bases ¿cómo encontrar esta mutación entre los 3.000.000.000 de pares de bases que aproximadamente tiene el genoma humano?.

A mediados de los años 1970, **Kerry Kravitz** y **Mark Skolnick** trataron de identificar al gen causante de la **hemocromatosis**, una enfermedad producida por la mutación de un gen que regula la absorción de hierro en el intestino. Al ser una mutación recesiva, solo se manifiesta en individuos con dos copias defectuosas, una del padre y otra de la madre. Afortunadamente, se descubrió que este

gen está vinculado a otro localizado en el cromosoma seis que codifica una proteína de respuesta inmunitaria de la que existen muchas variantes fácilmente detectables. Por tanto, el gen causante de la hemocromatosis también tenía que estar en el mismo cromosoma. Fue un golpe de suerte, porque el hallazgo no hubiera sido tan sencillo si el gen vinculado no fuera fácilmente detectable.

En 1978 empezaron a utilizarse los **"polimorfismos"** de ADN situados cerca de un gen ligado a una enfermedad como **marcadores** para localizarlo. Los polimorfismos son variaciones en la secuencia de ADN, semejantes a los alelos en términos de genes, que pueden existir en los intrones y se han producido a lo largo de siglos de evolución. Estas variantes son invisibles al ojo humano y no pueden distinguirse por rasgos biológicos o físicos, pero sí por diferentes técnicas moleculares. En una de ellas se utilizan enzimas que cortan ADN y reconocen una secuencia de bases, pero no otra análoga con una secuencia de bases diferente (por ejemplo distinguen entre A**G**TACCG y A**C**TACCG). En 1980 se publicó cómo la vinculación de un rasgo genético a una de estas variantes podía servir para una **localización cromosómica aproximada del gen** (55), un método que se utilizó por un equipo de investigación liderado por **Nancy Wexler** en la identificación en 1994**,** tras diez años de búsqueda, del gen responsable del **corea de Huntington** (es un gen dominante y basta una sola copia para producir una enfermedad que acaba siendo mortal). En este largo proceso se estudiaron las muestras de sangre de enfermos norteamericanos y las que Wexler enviaba desde una zona de Venezuela donde esta enfermedad era muy frecuente. El ADN de las células sanguíneas se fraccionaba con numerosas enzimas buscando una variante polimórfica que pudiera servir de marcador hasta que finalmente se encontró una variante de ADN situada en el cromosoma cuatro que estaba claramente asociada a la enfermedad. La identificación de este gen requirió la división y subdivisión del cromosoma cuatro, el aislamiento e inserción de las partes más pequeñas en cromosomas de levaduras o bacterias para su clonación, y la secuenciación de estos clones hasta que se identificó el gen en un solo fragmento de ADN. Por último se compararon las secuencias del gen aislado de individuo sanos y de pacientes para confirmar que en estos últimos estaba alterado. La proteína que se encuentra alterada en la enfermedad de Huntington es una de las más grandes del cuerpo humano (tiene 3.144 aminoácidos), y la mutación ligada a esta enfermedad neurodegenerativa no consiste en la alteración de uno o más de sus aminoácidos, sino en un aumento en el número de repeticiones de la secuencia del trinucleótido CAG (-CAGCAGCAG…) (56). Debido a estas repeticiones adicionales, cuyo número aumenta a lo largo de generaciones haciéndose más letal, la proteína codificada aumenta su tamaño y se agrega a las neuronas.

En 1985 se demostró que el gen de la **fibrosis quística** (FQ), una grave enfermedad que afecta a múltples órganos y se manifiesta con bastante frecuencia en individuos de ascendencia europea, debe residir en alguna parte de un segmento de ADN dentro de dos millones de pares de bases alrededor del cromosoma siete (57). La FQ se manifiesta cuando se heredan dos copias del gen mutado, mientras que los portadores de una sola copia mutada suelen ser asíntomáticos. En la búsqueda de este gen se empleó una modificación de la metodología utilizada para el gen responsable de la enfermedad de Huntington: en vez de ir clonando trechos contiguos o parcialmente superpuestos del cromosoma se fue más deprisa por medio de "saltos". Finalmente el gen de la FQ fue localizado en 1989, comprobándose que los niños afectados tenían dos copias mutadas, una del padre y otra de la madre. Se habían necesitado más veinticuatro equipos en todo el mundo, más de diez años y más de cincuenta millones de dólares para identificar un solo gen para una sola enfermedad. La mutación más común se produce por la deleción de un triplete de bases de ADN, lo que origina la supresión de un aminoácido en la proteína que codifica y la pérdida de su actividad como transportadora del ion cloruro a través de las membranas. Tras la clonación del gen FQ se dispuso de una **prueba diagnóstica *in utero*** que permitía a los padres considerar el aborto de los fetos, y las parejas en las que ambos eran portadores del gen mutante podían optar por no concebir un hijo (58).

3.2. Diagnósticos genéticos

Además de los ejemplos comentados, desde mediados de los setenta a mediados de los ochenta se aislaron, secuenciaron y clonaron cientos de genes que tenían una función de interés médico o científico, aunque algunos de ellos se identificaron posteriormente. Por ejemplo el **gen BRCA1** (*breast cancer 1*), que es el más comúnmente asociado a las **formas hereditarias del cáncer de mama**, empezó a buscarse a principios de los años setenta por la genetista **Mary-Claire King** estudiando la herencia de los cánceres de mama y ovario. En 1988 se ubicó en una región del cromosoma diecisiete (59), pero no se aisló hasta 1994 (60). En este tiempo de búsqueda fue desconcertante su "**penetrancia incompleta**" ya que, aunque la presencia del gen mutante aumentaba diez veces el riesgo de cáncer entre las portadoras, no siempre "penetraba" su efecto. El interés de la empresa Myriad Genetics, responsable de su aislamiento, se centraba en desarrollar un diagnóstico genético que, finalmente, fue comercializado en 1996. Éste se realiza en las mujeres con antecedentes familiares analizando un frotis de células de la boca, amplificando el gen BRCA1 por la reacción en cadena de la polimerasa, secuenciándolo, e identificando los genes mutantes. Actualmente, cuando se detecta una mujer con un cáncer de mama o de ovario a causa de mutaciones en los genes BRCA1 o BRCA2, se aconseja detectar éstas no sólo a sus hermanas e hijas, sino también a los varones. Su penetrancia es menor en éstos, pero sus efectos son mucho más difíciles de prevenir porque pueden manifestarse originando distintos tipos de cáncer (próstata, melanoma, colon, páncreas o mama).

En general, los diagnósticos genéticos de personas que conocen con anticipación los riesgos de experimentar en el futuro graves patologías, pero no saben cuándo podrían

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

desarrollarse ni su grado, obligan a vivir con una gran ansiedad. Es importante señalar que asociar ciertos genes con enfermedades (gen del mal de Huntington, gen de la fibrosis quística, gen causante del cáncer de mama, etc.) no es correcto científicamente, porque la misión de los genes no es causar enfermedades y, si lo hacen, es porque sufren alteraciones. Los genes BRCA en su versión normal reparan el ADN cuando éste ha sufrido un daño, los cánceres de mama y de ovario aparecen cuando BRCA1 está mutado y no funciona. Incluso en los pacientes con BRCA1 mutado, el desarrollo de cáncer requiere múltples desencadenantes.

El nexo genético de otras enfermedades que pueden presentarse *de novo* (sin antecedentes familiares) o por herencia, como la **esquizofrenia**, el **desorden bipolar**, o el **autismo**, se demostró en la década de los ochenta. Para avanzar en la identificación de los genes mutados desencadenantes de estas patologías ha habido que esperar al desarrollo de la **secuenciación en paralelo**, en la que el genoma se divide en decenas de miles de fragmentos de ADN que se secuencian en paralelo y luego se reensamblan con la ayuda de ordenadores. Esta tecnología y otras apuntan a que existen más de cien genes o regiones genéticas asociados a estas patologías, aunque solo se conocen unos pocos. La asociación más fuerte encontrada hasta el momento con la esquizofrenia implica variaciones en el **locus del complejo de histocompatibilidad** (**MHC**, *major histocompatibility complex*), denominado también HLA (*human leucocytic antigen,* porque se creía que solo se expresaba en leucocitos). Este locus es un conjunto de genes ubicados en el cromosoma 6 que codifican antígenos de histocompatibilidad que activan procesos críticos en la generación de la **respuesta inmunitaria adaptativa** (específica para cada agente infeccioso). Para que ésta pueda mostrar todas sus características de especificidad, memoria, diversidad y discriminación entre lo propio y lo ajeno, los antígenos extraños deben ser procesados y presentados a los linfocitos T para que puedan ser reconocidos, y esta presentación está mediada por las moléculas MHC que se encuentran en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APCs), entre otras. La **asociación entre esquizofrenia y MHC** se debe en parte a la existencia de múltiples alelos en los genes del componente complementario 4 que aumentan la expresión de la variante C4A respecto a la C4B en el cerebro. En consecuencia, **la proteína codificada por C4** (que estaba diseñada para dicha acción inmunitaria) se "reorienta" para eliminar sinapsis cerebrales (61). El número de sinapsis en bebés y en niños es aproximadamente el doble que en adultos, lo que permite a los bebés aprender rápidamente nuevas tareas a medida que crecen y se desarrollan. La "poda sináptica" es un proceso regulador cerebral que comienza en la adolescencia y se prolonga hasta la treintena, el periodo en que se suelen manifestar muchos síntomas de la esquizofrenia. En él se eliminan conexiones sinápticas entre neuronas para que el cerebro del adulto sea capaz de centrarse en tareas más complejas eliminando asociaciones simples construidas durante la etapa infantil.

Valorar el alcance del riesgo que corre una persona de padecer una enfermedad genética que todavía no se ha manifestado a través de diagnósticos genéticos no es tarea fácil, porque hay que considerar los distintos niveles de penetrancia de las mutaciones y las influencias ambientales. En los casos en que existen tratamientos profilácticos, como la mastectomía o la terapia hormonal en el caso del cáncer de mama hereditario, éstos pueden comportar riegos y sufrimientos, y en casos como la esquizofrenia no tienen sentido porque no hay tratamientos profilácticos ni curativos. Muchos científicos opinan que **el diagnóstico prenatal y la interrupción del embarazo** cuando existen **mutaciones específicas** que originan enfermedades raras y devastadoras es una opción más sencilla que **secuenciar genomas con la esperanza de generar tratamientos a medida** para paliar los efectos de estas mutaciones. Pronto será posible diseñar pruebas prenatales para detectar irregularidades en el genoma fetal (la **genética del nonato**), pero deshacerse de genes defectuosos supone deshacerse de personas.

Una alternativa que también produce vértigo ético es el **diagnóstico genético preimplantacional** (**DGP**), que se realiza biopsiando embriones humanos en una etapa temprana antes de su implantación, por lo que es una forma de seleccionar fetos sin abortarlos (62). Desde que se utilizó en 1989 el DGP para seleccionar embriones, muchos países impusieron inmediatamente límites estrictos a su uso, pero estas limitaciones no evitaron que en ciertos países como India y China se utilizara el DGP para la selección de niños varones.

La intervención posterior a un diagnóstico prenatal o preimplantacional es **una forma de eugenesia** que sirve para separar los débiles de los fuertes. Hasta hace poco tiempo se ha regido por tres principios tácitos: el hallazgo de variantes genéticas singulares y altamente penetrantes con una probabilidad cercana al 100 % de desarrollarse (como el síndrome de Down o la fibrosis quística), variantes genéticas causantes de enfermedades que provocan grandes sufrimientos o son incompatibles con una vida "normal", y tomar la decisión de forma voluntaria tras recibir todo tipo de advertencias médicas. Aunque los conceptos de "sufrimiento extraordinario", "normalidad" y "libertad de elección" son relativos, parece que estos tres límites han sido útiles, aunque no se esté de acuerdo con estos métodos. Un problema más grave todavía es que se traspasen estos límites, simplemente porque tenemos en nuestras manos "**el saber y el poder**".

4. TERAPIA GÉNICA

La terapia génica es un recurso médico que pretende combatir ciertas enfermedades mediante la **introducción de genes específicos en las células del paciente**. La novedad radica en que **el agente curativo es un gen**. Estas terapias pueden efectuarse *ex vivo*, manipulando *in vitro* las células del paciente que se devuelven al organismo de partida por lo que no existe rechazo inmunológico, o *in vivo*, introduciendo el gen terapéutico desnudo o en el interior de un vector viral.

En 1974 se había investigado en ratones si los genes insertados en virus SV40, posteriormente incorporados a células embrionarias tempranas, podían transmitirse verticalmente de ratón a ratón y de generación a generación, originando organismos modificados genéticamente de forma permanente. En estos experimentos, las células embrionarias infectadas con virus manipulados se mezclaron con células embrionarias no infectadas y esta mezcla se implantó en ratones. Los genes insertados en el virus deberían encontrarse en algunos de los nuevos ratones engendrados si, además de formarse células de la sangre, intestino, etc., se formaban unos pocos gametos. Sin embargo, los experimentos demostraron que la expresión de los genes virales en espermatozoides y óvulos estaba bloqueada, ya que su presencia era extraordinariamente escasa (63), por lo que se investigó la terapia génica en **células madre embrionarias** o **células ES** (*embryonic stem cells*). Como ya se ha comentado, años después se sabría que los genes virales se habían silenciado con marcas epigenéticas.

4.1. Células madre embrionarias (células ES). Animales transgénicos

Además de renovarse a sí mismas como hacen las células que están presentes en la mayoría de los órganos para reemplazar a las células muertas, **las células ES pueden originar cualquier tipo de célula funcional**, pueden cultivarse en placas Petri, congelarse y conservarse vivas después de descongelarse, y reproducirse en medios líquidos. Además, es relativamente fácil extraer de ellas su genoma e insertar en él otros genes y, lo que es más sorprendente, cuando se mezclan con células embrionarias y se implantan en un útero de ratón, las modificaciones a las que han sido sometidas se transfirieren al organismo engendrado provocando en él un cambio permanente. Otra ventaja importantísima frente a los virus es que las células ES permiten modificar lugares específicos del genoma de un animal si se realizan algunas manipulaciones (64), mientras que los genes víricos se insertan al azar y no se puede predecir el lugar en que se van a insertar debido a que el genoma humano es demasiado grande.

En los años noventa, los **ratones "transgénicos"** engendrados por terapia génica se crearon a centenares con el fin de descifrar la función de los genes, y muchos de ellos se utilizaron como modelo para el estudio de enfermedades. Sus alteraciones genéticas les forzaban a desarrollar distintas patologías, destacando los que desarrollaban tumores por haberles introducido oncogenes porque han sido decisivos para el **estudio de tumores malignos**. Al intentar aplicar estas técnicas a **células madre embrionarias humanas** se observó que éstas no tenían la misma capacidad para ser manipuladas que las células ES de ratón. Cuando se transplataban células ES humanas en animales, solo se lograba que produjeran ciertas capas de tejido embrionario humano sin coordinación anatómica ni fisiológica. Tampoco era factible ni ética ni tecnológicamente intentar la modificación genética de un embrión unos cuantos días o semanas después de la concepción, por lo que la **modificación transgénica de embriones humanos** estuvo detenida por un tiempo.

4.2. Primeros pasos en la modificación transgénica de embriones humanos

El virólogo y genetista **Richard Mulligan**, aprovechando que los retrovirus injertan su genoma en el de las células fácilmente y de forma permanente, diseñó en 1986 unas variantes de virus que no podían salir de las células y propagar infecciones. El equipo de **William F. Anderson** y **Michael Blaese** las ensayó en 1987 para introducir el **gen humano ADA** (**adenosina desaminasa**) (65). Este gen, que en el hombre se sitúa en el cromosoma veinte, codifica la enzima que metaboliza la adenosina del organismo y la convierte en inosina. Su deficiencia es un transtorno raro y hereditario que si no se trata puede ser fatal, sobre todo en la primera infancia. Los individuos en que este gen se encuentra mutado se ven afectados por una grave inmunodeficiencia debido a que la toxicidad de los metabolitos de adenosina acumulados afecta sobre todo a los linfocitos T (Figura 16).

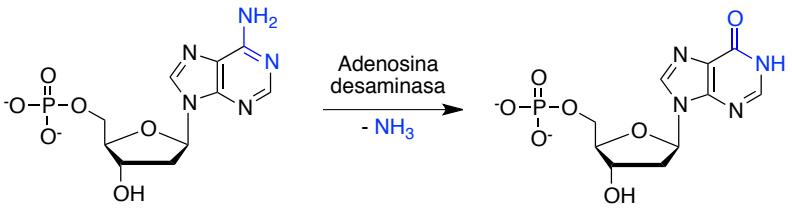


Figura 16. Reacción catalizada por adenosina desaminasa.

Entre las opciones terapéuticas para su tratamiento se encuentra el **transplante de células madre hematopoyéticas** (cuyo éxito depende de encontrar un donante adecuado), la **terapia de reemplazamiento** con pegademasa bovina (**PEG-ADA**) que requiere una inyección intravenosa mensual y puede generar anticuerpos (66), y la **terapia génica**. Los primeros resultados obtenidos por Anderson y Blaese con células madre de ratones y de monos fueron desalentadores porque el grado de implantación del gen era muy bajo. Tampoco obtuvieron la aprobación oficial para aplicar su protocolo en humanos. Por ello, pensaron en prescindir de las células madre e insertar el gen directamente en los linfocitos T. Este nuevo protocolo fue muy discutido, pero finalmente se aprobó en 1990 un ensayo piloto para determinar su seguridad en dos pacientes. Éstas recibieron células T

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

extraídas de su sangre que fueron infectadas posteriormente con el virus en el que se había insertado el gen ADA y finalmente multiplicadas en una placa Petri. Los resultados de estos dos ensayos indicaron que las **células T infectadas con retrovirus** podrían introducirse con seguridad en organismos humanos, pero no sirvieron para valorar su eficacia curativa porque después de estos ensayos las dos pacientes continuaron siendo tratadas con PEG-ADA por vía intravenosa.

4.3. Inicio de la terapia génica

Los datos que proporcionaron estos ensayos eran insuficientes, pero despertaron el entusiasmo de los defensores de la **terapia génica**. Era una eugenesia positiva en la que los científicos no eliminaban seres humanos con genes defectuosos, sino que trataban de corregir la acción de éstos haciendo al genoma "un poco mejor". Si se introduce un cambio genético en células no reproductivas, como las de la sangre o los músculos, solo se altera una generación del genoma porque el gen introducido se pierde cuando muere la célula, pero si el cambio afecta a las células embrionarias (óvulos o espermatozoides) el cambio permanece y se transmite a las futuras generaciones.

En 1993 los pediatras Mark Batshaw y James Wilson empezaron a experimentar una terapia génica para curar a niños con deficiencia de la enzima **ornitina transcarbamilasa** (**OTC**, también llamada ornitina carbamoiltransferasa). Esta enzima es esencial en el segundo de los cinco pasos del complejo **ciclo de la urea** de los mamíferos, en el que el amoniaco procedente fundamentalmente del metabolismo proteico y depositado en las mitocondrias de los hepatocitos se transforma en urea, que pasa al torrente sanguíneo y se excreta en la orina. Si hay deficiencia de OTC, el amoníaco daña las células y los vasos sanguíneos, atraviesa la barrera cerebral, y envenena las neuronas, de tal forma que la mayoría de los pacientes fallecen en la infancia. La OTC cataliza la reacción entre el carbamoil fosfato y la ornitina para formar citrulina y fosfato. La citrulina así formada pasa al citoplasma, donde continúa el resto de este ciclo (Figura 17).

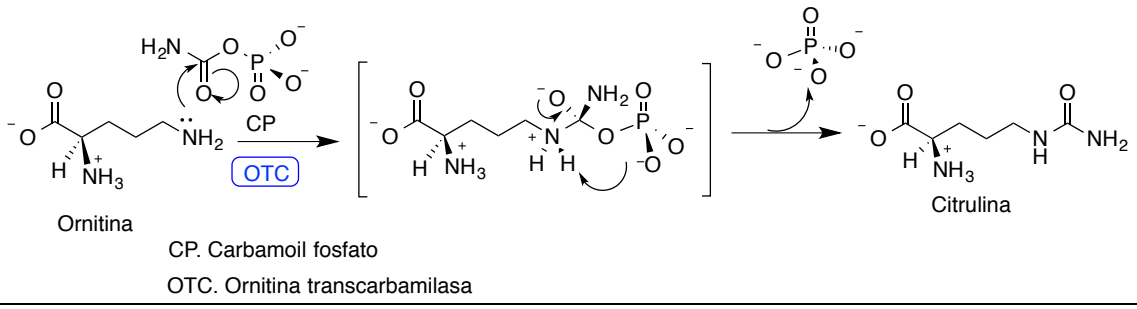


Figura 17. Reacción catalizada por la enzima OTC.

El plan de Batshaw y Wilson era inyectar el gen en el hígado de los pacientes a través del torrente sanguíneo utilizando como sistema de transporte adenovirus que no se asociaran con ninguna enfermedad grave. El proceso se ensayó en ratones con éxito, pero los experimentos con monos necesitaron concentraciones tan altas de virus que provocaron una gran respuesta inmunitaria. En 1997, tras modificar muchos genes virales y disminuir la dosis para redoblar la seguridad, solicitaron al RAC el visto bueno para realizar un ensayo en humanos. Éste se realizó el 13 de Septiembre de 1999 con **Jesse Gelsinger**, un chico de 17 años con una falta de OTC leve (es posible que en alguna de sus células se encontrara el gen normal porque su mutación no era heredada sino que se había producido en la gestación, Figura 18). Lamentablemente, la inyección del adenovirus portador del gen normal produjo una respuesta inmunitaria hiperactiva y graves transtornos en distintos órganos, hasta que el paciente finalmente falleció el 17 de Septiembre. Una investigación posterior sobre la responsabilidad de la Universidad de Pensilvania en su muerte encontró graves irregularidades, incompetencia, y negligencia, por lo que se prohibieron los ensayos de terapia génica (67). Aunque los diagnósticos genéticos humanos experimentaron un notable renacimiento, la moratoria afectó a proyectos que pretendieran una alteración deliberada de los genes (o "reescribir el genoma").

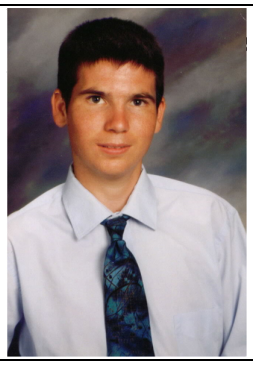


Figura 18. Jesse Gelsinger.

Casi dos décadas después de la muerte de Gelsinger, se habían reemplazado las tecnologías empleadas con anterioridad, se seleccionaban con todo rigor los nuevos virus utilizados para transferir genes a las células humanas, y se controlaba todo el proceso. El año 2014 se realizó con éxito el **tratamiento por ingeniería genética** de 10 pacientes con **hemofilia B severa** introduciendo el **gen que expresa el factor de coagulación IX** (68). Aunque la inyección del virus portador del gen solo aumentó un 5 % la concentración del factor IX, los pacientes

experimentaron una reducción de los episodios hemorrágicos de un 90 %, y el efecto persistió durante tres años.

4.4. Terapia génica en la línea germinal

Para que la igeniería genética tenga un efecto permanente se requiere alterar el genoma de las **células ES**, pero los experimentos con células ES humanas fracasaron hasta finales de los años noventa, quizás por su mala calidad o porque las condiciones para su crecimiento no eran apropiadas. El embriólogo **James Thomson**, tras experimentar con células extraídas de embriones de macaco Rhesus que dejaba crecer en placas Petri con otras células que aportaban factores de crecimiento, obtuvo el permiso para utilizar esta técnica con células ES humanas procedentes de las clínicas de fecundación *in vitro*. En **1998** logró **cultivar** por primera vez **células ES humanas** que, implantadas en ratones, eran capaces de generar las tres capas del embrión humano (69) y de fabricar prácticamente todos los tejidos, pero no eran eficientes en la fabricación de espermatozoides y óvulos, por lo que no podían transmitir un cambio genético a la siguiente generación. Inmediatamente, numerosos grupos de investigación empezaron a extraer decenas de líneas de células madre humanas de tejidos fetales con la esperanza de descubrir una capaz de transmitir genes en la línea germinal, pero no lo consiguieron. El año 2001 el Presidente G. W. Bush restringió esta línea de investigación al estudio con las líneas celulares que se habían creado previamente (70). Estas limitaciones no impidieron el desarrollo de un método para introducir modificaciones deliberadas y permanentes en el genoma humano mediante la tecnología CRISPR.Cas9. Por otra parte, el año 2014, embriólogos de Cambridge y del Instituto Weizmann de Israel desarrollaron un sistema para producir células germinales precursoras de espermatozoides y óvulos a partir de células madre embrionarias (71).

4.5. Terapia génica del cáncer

La ingeniería genética se ha utilizado en múltiples aproximaciones para el tratamiento del cáncer, de las que aquí solo vamos a comentar algunas (72). **Los virus son los vectores de genes más comúnmente empleados**, a pesar de que promueven una respuesta inmunológica. Entre los **vectores no virales** los transposones (secuencias móviles de ADN) pueden evitar el uso de los virus. Los liposomas catiónicos sintéticos, son más seguros que los virus pero menos eficientes, por lo que se necesitan cantidades demasiado grandes para su uso clínico.

Hacia finales de los años 1800, los médicos observaron que en algunos pacientes con cáncer, éste remitía al menos temporalmente tras una infección vírica. Según la *NCI Conference on Microbial-Based Cancer Therapy*, celebrada en Bethesda en Julio de 2017, a día de hoy se están estudiando como posibles tratamientos del cáncer varias docenas de virus y algunas bacterias. Los primeros tratamientos para tratar el cáncer a través de la infección provocada por **virus oncolíticos** (llamados así porque tienden a infectar y matar células tumorales) se realizaron hacia la mitad del siglo veinte. Como no se disponía de técnicas precisas para modificarlos, estos tratamientos produjeron gran morbilidad y mortalidad, siendo frecuente la anulación de su efecto por la muerte de los virus que provocaba el sistema inmune. En la actualidad, la terapia viral es posible utilizando virus oncolíticos o vectores virales en los que se han modificado alguno de sus genes, se han insertado genes extraños, y/o se ha eliminado, modificado o reemplazado su cubierta, a fin de que se reproduzcan eficazmente en las células cancerosas sin dañar a las sanas (73). Cuando se internalizan dentro de las células, el contenido de estos virus manipulados por ingeniería genética se libera en el citoplasma, entra en el núcleo a través de un poro nuclear, y tiene lugar la expresión transgénica.

Uno de los primeros virus oncolíticos utilizados en la terapia del cáncer fue Oncorina®, comercializado en China en 2006 (74). Es un adenovirus recombinante que contiene el gen *p53* y produce el correspondiente **factor de transcripción oncosupresor**, que activa genes que paralizan el ciclo celular o disparan el mecanismo de apoptosis. Este virus se ha manipulado para que en las células normales, con un gen *p53* funcional, los virus no puedan multiplicarse, mientras que en una célula deficiente en p53 (cancerosa) sobrevivan y se multipliquen produciendo la destrucción selectiva de las células. Además de este ejemplo, se han evaluado en ensayos clínicos un gran número de virus, pero solo ha sido aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) Talimogene laherparepvec (T-VEC, Imlygic®), un virus oncolítico modificado de un virus herpes para tratar el melanoma en sus manifestaciones más graves. En éste se han eliminado los genes ICP34.5 y ICP47 con el objetivo de reducir su patogenicidad y aumentar la capacidad de respuesta del sistema inmune del hospedador, y se ha introducido el gen humano GM-CSF para aumentar la respuesta inmune de los linfocitos hacia las células tumorales (75). A partir de 2005, prevalece la idea de que el verdadero valor de los microbios en la terapia del cáncer se debe a su interacción con el sistema inmune, de forma que **los virus se consideran una forma de inmunoterapia**. Cuando un virus infecta a una célula tumoral, se multiplica hasta que la célula explosiona y libera antígenos tumorales que permiten que el cáncer sea "reconocido" por el sistema inmune.

Los virus que infectan selectivamente las células cancerosas pueden modificarse también para actuar **como vectores de un gen que codifique una enzima capaz de activar un profármaco antitumoral** y administrarse conjuntamente con éste. Esta transferencia genética se denomina ***virus-directed enzyme prodrug therapy* (VDEPT)**. El virus modificado llamado Sitimagene ceradenovec (Cerepro®) se llegó a administrar conjuntamente con ganciclovir para el tratamiento del glioblastoma multiforme, aunque se retiró posteriormente. Cerepro® utilizó el adenovirus Ad5 como vector para introducir el gen que induce a las células tumorales a

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

expresar la enzima timidina cinasa (TK) del virus *herpes simplex,* que activa el ganciclovir transformándolo en su trifosfato. Éste se incorpora al ADN de la célula tumoral pero, al carecer del grupo 3'-OH, la cadena no puede proseguir su síntesis y se produce la muerte celular (Figura 19) (76).

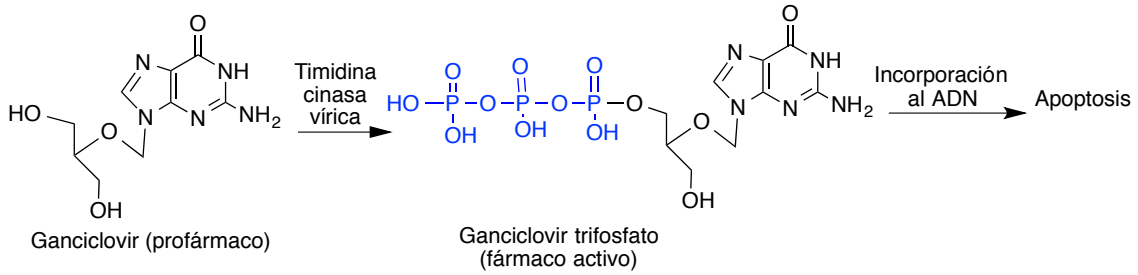


Figura 19. Activación de ganciclovir por timidina cinase vírica.

En la **terapia génica inmunomoduladora** se modifican genéticamente *ex vivo* células implicadas en el sistema inmune. A dichas células extraídas del tumor se transfieren genes inmunomoduladores utilizando un vector viral que los contiene para que, una vez reimplantadas en el paciente, produzcan citocinas (los agentes responsables de la comunicación intercelular) sin la toxicidad asociada a su administración sistémica. Alternativamente, **pueden modificarse genéticamente células T para que expresen receptores de antígeno artificiales** (quiméricos) asociados a tumores. Por ejemplo, cuando las células T de pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL) se tradujeron con un vector viral que codifica el receptor de antígeno quimérico anti-CD19, se expandieron *ex vivo*, y se infundieron en los pacientes, se observó una rápida respuesta antitumoral (77). Algunos **tratamientos para el cáncer de próstata basados en la terapia génica inmunomoduladora** han llegado a fases avanzadas de ensayos clínicos. Uno de ellos fue rilimogene galvacirepvec (Prostvac®), que implicaba el uso para una vacunación primaria de un vector recombinante vaccinia seguida de vacunas de refuerzo empleando un vector recombinante de viruela aviar. Estos vectores contienen genes para expresar el antígeno prostático específico (PSA) y numerosas moléculas coestimuladoras de las células T. Cuando estas vacunas infectan a las células presentadoras de antígeno (APCs en inglés) generan proteínas que se expresan en su superficie induciendo la interacción de estas APCs con las células T y la consiguiente repuesta inmune, que supone la destrucción de la célula tumoral (78).

También se puede bloquear la expresión de oncogenes (como *Ras* o *Myc*) con **oligonucleótidos antisentido** (**ASOs** en inglés), que son hebras cortas de "ácido nucleico" sintético (generalmente modificado) con secuencias complementarias a las de las hebras de un ARNm diana. Como los ribosomas no pueden traducir RNAs de doble hebra, la traducción de un ARNm concreto puede inhibirse por un fragmento de su secuencia complementaria, por lo que la terapia con ASOs es una forma de prevenir las enfermedades en las que está involucrada una determinada proteína, no solamente el cáncer (Figura 20) (79).

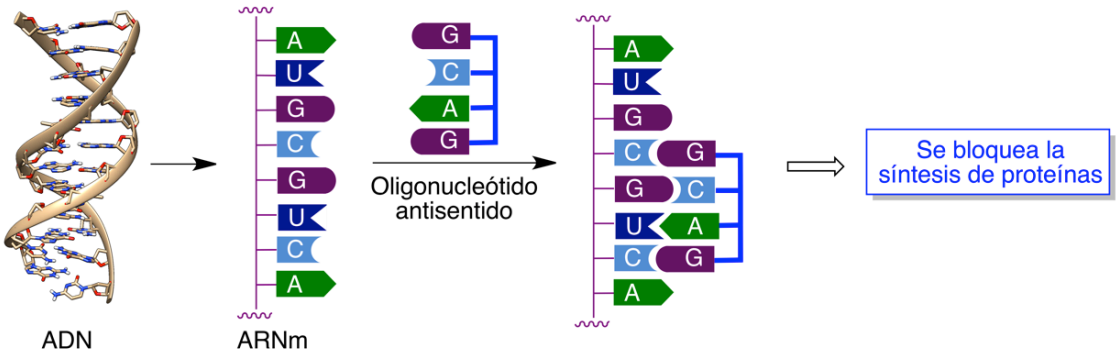


Figura 20. Mecanismo de acción de los oligonucleótidos antisentido.

Hasta ahora no se ha aprobado ningún ASO para el tratamiento del cáncer, aunque hay muchos datos preclínicos y algunos estudios clínicos de algunos de ellos. La elección acertada del vector y del gen diana son decisivas, pero hay que evitar también la toxicidad y los efectos sobre otras posibles dianas (80).

4.6. Medicina genómica (medicina de precisión o medicina personalizada)

La secuenciación del genoma humano ha propiciado la aparición de la **medicina genómica**, también llamada medicina de precisión o medicina personalizada, que pretende la **adaptación del tratamiento médico (generalmente oncológico) a las características individuales de cada paciente**. Las decisiones referentes al tratamiento o la prevención del cáncer se deberían tomar

en base a la integración de las características genómicas y moleculares del tumor y a la información sobre la situación clínica y los hábitos del paciente. Este planteamiento requiere el conocimiento de las **alteraciones genéticas y moleculares que producen el desarrollo de tumores y de sus metástasis,** el conocimiento del **desarrollo de fármacos que actúen a nivel de dichas alteraciones,** y **la creación de nuevo conocimiento** mediante el análisis de **Big Data** (almacenamiento en red de grandes volúmenes de datos relevantes de los pacientes). En definitiva, **el oncólogo médico** no debería focalizarse exclusivamente en su labor asistencial sino que debería ser también un **investigador**.

Se espera que en los próximos años, se tendrá información relevante sobre el impacto de la medicina guiada por alteraciones genómicas en la supervivencia y los costes asociados al uso de estas técnicas y tratamientos. La medicina personalizada está transformando desde un punto de vista conceptual y metodológico la investigación clínica y biomédica y la asistencia sanitaria.

5. EDICIÓN GENÓMICA

La edición genómica, o cambio de secuencias de ADN que codifican una serie de mensajes e instrucciones, implica insertar un corte o ruptura en el ADN, engañar a los mecanismos naturales para evitar su reparación, e introducir los cambios que se deseen.

5.1. La tecnología CRISPR.Cas9

Las bacterias y las arqueas, microorganismos unicelulares sin núcleo y en general sin orgánulos membranosos internos, han ido incorporando a su ADN como mecanismo de defensa ciertas secuencias repetidas de nucleótidos procedentes del material genético de los virus que las han atacado con anterioridad. El año 2007 **Philipe Horvath y Rodolphe Barrangou**, dos ingenieros que trabajaban en la fábrica de yogures Danisco France SARL (subsidiaria de DuPont Nutrition Biosciences), observaron que las bacterias *Streptococcus thermophilus*, que transforman los azúcares de la leche en ácido láctico y se utilizan en la fabricación de quesos y yogures, incorporaban a su ADN espaciadores con una secuencia idéntica a partes del genoma de los virus invasores. Para confirmar este hallazgo, alteraron la resistencia de las bacterias frente a los virus manipulando los espaciadores por eliminación o adición de nuevas secuencias de ADN viral, demostrando el papel de este fenómeno en la regulación de la inmunidad bacteriana (81). Varios años antes, el microbiólogo español **Francisco Martínez Mojica** había descubierto en la arquea *Haloferax mediterranei*, responsable de que las salinas de Santa Pola adquieran un color rosáceo cuando crece la concentración de sal, unas secuencias de ADN repetidas a las que denominó **"repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas"** (**CRISPR**, acrónimo de *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*). En estos estudios pioneros, Mojica sugirió que estas secuencias deberían tener un papel en los mecanismos de inmunidad de las células procariotas (82), pero no pudo imaginar que este descubrimiento resultaría útil para la edición de genomas mediante las herramientas CRISPR/Cas9 desarrolladas más tarde por Emmanuelle Charpentier, Jennifer Doudna, y otros investigadores (Figura 21).

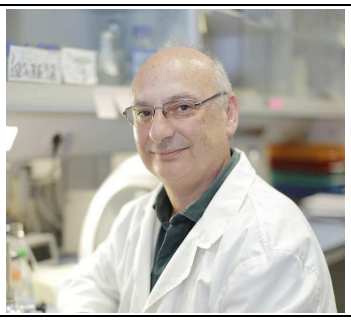


Figura 21. Francisco Mojica.

5.2. Mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas9

En la naturaleza, las repeticiones palindrómicas actúan como una plantilla cuando el virus ataca de nuevo y permiten que la bacteria produzca una secuencia complementaria de ARN monocatenario denominado **ARN Crispr** (o "ARNcr"). Éste es un **"buscador"** capaz de encontrar y reconocer el ADN del virus invasor por ser una imagen especular de los tramos de su ADN incorporados previamente en el ADN bacteriano. El mecanismo de defensa se completa con la **proteína Cas9**, una **endonucleasa del grupo de las proteínas Cas** ("asociadas a Crispr"), que actúa como un par de tijeras moleculares cortando y destruyendo el ADN de los invasores. Cas9 se une a ARNcr y a otro ARN denominado **ARNtracr** ("ARNcr trans-activado"), y ambos dirigen a la enzima al sitio de destino, donde Cas9 corta ambas cadenas de la doble hélice de ADN usando dos regiones separadas o "dominios" de su estructura y produciendo lo que se conoce como una **"ruptura de doble hebra"**. Además de los componentes mencionados, existen unas **secuencias** de ADN cortas conocidas como **PAM** ("motivo adyacente de protoespaciador") que se sitúan adyacentes a la secuencia de ADN que ha de cortarse y sirven como marcas para asegurar que Cas9 no corte en cualquier parte de un genoma. Si el complejo Cas9 no ve un PAM junto a su secuencia de ADN objetivo, no cortará (Figura 22).

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

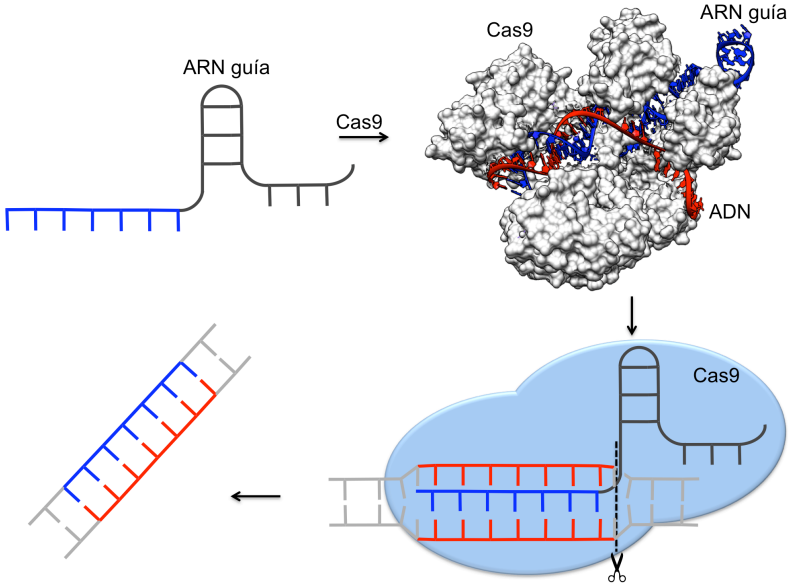


Figura 22. Mecanismo de corte y pega de CRISPR/Cas9. (a) Se genera un ARN guía que corresponde al ADN que se desea modificar. (b) Esta secuencia se incorpora a una célula, junto con la proteína Cas9. El ARN guía se dirige a la secuencia de ADN complementaria de la suya y Cas9 actúa como nucleasa. (c) El ARN guía se separa, y queda la pieza de ADN modificada.

5.3. CRISPR-Cas9 como una herramienta de edición genómica

En los años 2011 y 2012, **Emmanuelle Charpentier** y **Jennifer Doudna** se dieron cuenta de que el sistema podría reprogramarse sustituyendo el elemento de reconocimiento. Cambiando el "buscador", las bacterias buscarían y cortarían un gen seleccionado, mutándolo a voluntad. El sistema CRISPR-Cas9 bacteriano podría utilizarse para cortar cualquier región del ADN cambiando la secuencia de nucleótidos del ARNcr que se une a la secuencia de ADN objetivo del corte, transformándose así en una herramienta simple y programable de edición del genoma. El año 2012 se publicaron dos artículos fundamentales en las revistas *Science* y *PNAS*. En el estudio publicado en *Science*, **Charpentier**, **Doudna**, **Martin Jinek** y sus colegas identificaron una familia de endonucleasas y simplificaron aún más el sistema fusionando ARNcr y ARNtracr para crear un ARN quimera capaz de dirigirse a una secuencia epecífica de ADN. De esta forma, la edición del genoma requiere sólo dos componentes: un ARN guía y la proteína Cas9 (83). En la publicación de PNAS se describieron tres sistemas CRISPR, los tipos I y III en los que los complejos que silencian a los ácidos nucleicos extraños están formados por grandes agregados, y el tipo II en el que el complejo silenciador está compuesto de una sola proteína (Cas9) que se enlaza al ARNcr (84). Posterirmente se ha sabido que combinando la proteína Cas9 con un RNA exógeno es posible la manipulación (o "edición") de los genes de organismos más complejos (85). Cuando se corta un gen quedan dos cabos de ADN sueltos y se intenta recuperar la información perdida copiando la otra copia de reserva del gen presente en la célula. Sin embargo, si ésta se inunda de un ADN extraño (el que se desea insertar) el sistema de reparación copia la información de éste en vez de la contenida en la copia de reserva. Se ha borrado una palabra (por ejemplo, el gen mutante de la fibrosis quística) y se ha sustituído por otra (la versión normal del gen), de ahí el nombre de "edición genómica". El trabajo de Charpentier y Doudna fue reconocido en España con el Premio Princesa de Asturias de Investigación Científica y Técnica del año 2015 (Figura 23).

Figura 23. Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier.

5.4. Utilidad y limitaciones

La tecnología CRISPR-Cas9 se ha popularizado en los últimos años porque es fácil de usar y aproximadamente cuatro veces más eficiente que el uso de otras herramientas disponibles con anterioridad como las **nucleasas TALENs** (*transcription activator-like effector nucleases*) (86). Para evitar que los cortes de efectúen en los genes equivocados o que la reparación no sea eficaz dificultando que se "reescriba" en los sitios adecuados del genoma, la tecnología CRISPR se sigue perfeccionando. Se ha aplicado en agricultura para mejorar el rendimiento, resistencia a enfermedades, tolerancia a la sequía, eliminación de la resistencia a los herbicidas o pesticidas y optimización de las propiedades nutricionales de los cultivos (87). Muchos opinan que los cultivos modificados

genéticamente mediante CRISPR llegarán al mercado en cinco años.

Los estudios realizados *in vitro* o con animales modelo de enfermedades humanas (fibrosis quística, cataratas o anemia de Fanconi, entre otras) han demostrado que esta tecnología puede ser eficaz para corregir defectos genéticos, y han allanado el camino para su aplicación terapéutica en seres humanos, aunque si se introduce artificialmente un gen en una línea germinal humana, el embrión resultante sería obligatoriamente portador del cambio genético en todas su células, incluídos espermatozoides y óvulos.

En 2015, científicos chinos editaron genéticamente embriones humanos no viables por ser triplonucleares (3PN) con la tecnología CRISPR. Se intentaba corregir el gen responsable de la **β-talasemia**, un trastorno sanguíneo que puede producir una anemia severa y ser potencialmente mortal. CRISPR/Cas9 pudo romper eficazmente el gen de la β-globina endógena (HBB), pero la eficiencia del mecanismo de reparación HDR (*homologous recombination directed repair*) fue baja y se obtuvieron embriones en mosaico en los que existen líneas celulares con diferente dotación cromosómica. El investigador principal era **Junjui Huang**, conocido por haber protagonizado en 2006 uno de los mayores fraudes de la historia de la ciencia moderna. Hwang había tenido que retirar entonces dos estudios de *Science* en los que aseguraba haber usado la técnica de la oveja Dolly para clonar embriones humanos, por lo que fue expulsado de su puesto en la Universidad Nacional de Seúl y acusado de varios cargos, como malgastar fondos de investigación o violar leyes éticas. En el trabajo que realizó en 2015 para corregir el gen responsable de la **β-talasemia** observó que en un tercio de los embriones se habían introducido mutaciones no deliberadas en otros genes que eran esenciales para su supervivencia. A pesar de estas advertencias, su publicación fue rechazada por consideraciones éticas en las revistas *Science, Nature* y *Cell*. Finalmente, el trabajo se publicó en una revista de libre acceso y poca relevancia (*Protein & Cell*) (88).

En occidente se afirma que es necesaria una moratoria para seguir experimentando con embriones humanos, pero al parecer los chinos no tienen ese rechazo. De hecho, un equipo de científicos de la Universidad Médica de Cantón anunció en 2016 que había conseguido **embriones humanos resistentes al VIH** (el virus causante del sida). Utilizando 26 embriones "con taras y no aptos para tratamientos de fertilidad" (en palabras **Fan Yong** el investigador principal), lograron que cuatro de ellos desarrollaran inmunidad frente al VIH, aunque el resto mostraron mutaciones "no planificadas" (89).

El 3 de mayo de 2017 se publicaba en el periódico "El País" el siguiente titular: "Científicos de varios países corrigen una enfermedad hereditaria en embriones humanos. La técnica CRISPR elimina la causa genética de la muerte súbita." Se trataba de experimentos realizados en EEUU, Corea del Sur y China por varios científicos entre los que destacaban **Juan Carlos Izpisúa** (investigador del Instituto Salk), **Shoukhrat Mitalipov** y **Jin-Soo Kim** (Figura 24).

Figura 24. De izquierda a derecha, Juan Carlos Izpisúa, Shoukhrat Mitalipov y Jin-Soo Kim.

Este grupo había eliminado en embriones la **miocardiopatía hipertrófica**, una enfermedad del corazón hereditaria que provoca muerte súbita en deportistas y personas jóvenes (90). Una de las causas que la provocan es que una de las dos copias del **gen *MYBPC3*** es errónea. Este gen codifica a la proteína C, que se enlaza a la miosina del músculo cardíaco para dar el complejo **MyBP-C** y éste se asocia a la estructura del sarcómero (la unidad funcional del músculo estriado en la contracción muscular). La reedición de este gen mutado se realizó en espermatozoides de un hombre portador de la enfermedad utilizando la técnica CRISPR, inyectando al mismo tiempo en óvulos donados por mujeres sanas, los espermatozoides del portador y un conjunto formado por el ARN buscador, Cas9 y la versión correcta del gen. De los 58 embriones resultantes, 42 se desarrollaron sin la mutación que causa la enfermedad, lo que supone una tasa de éxito del 72 %. Por primera vez se había logrado que un número sustancial de embriones fueran totalmente viables, sin errores genéticos adicionales (aunque fueron destruidos algunos días después de la investigación).

La clave de este éxito radica según los autores en que los componentes de CRISPR/Cas9 se inyectaron junto al esperma en el óvulo, y no después cuando ya se ha formado un embrión, como se había hecho previamente en otros laboratorios. En este caso resultó sorprendente que,

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

una vez cortado el genoma, los mecanismos naturales de reparación de los óvulos no usaron la versión correcta del gen introducida en el experimento, sino que duplicaron la propia copia correcta del gen que ya llevaban en su genoma. Este fenómeno, que no se había observado antes ni en animales de laboratorio ni en las células somáticas humanas, apunta a que las células reproductoras tienen un mecanismo único y muy robusto que tiene sentido desde el puno de vista evolutivo puesto que los óvulos son las células encargadas de perpetuar la especie. Lo que todavía no se sabe es si este fenómeno impedirá corregir con esta técnica defectos genéticos que estén en el óvulo en vez de en el espermatozoide.

El logro que comentamos es "sorprendente y preocupante a la vez", señala **Lluís Montoliu**, miembro del comité de bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas: "Son unos resultados muy convincentes y demuestran que para reparar un gen no hace falta ni siquiera un factor exógeno, el propio óvulo lo repara", añade. "Lo preocupante es que esta investigación también contraviene el Protocolo de Oviedo", un pacto europeo sobre medicina y biología firmado por 29 países, incluida España, y en el que no están EE UU, China ni Reino Unido". Montoliu también advierte de que la aplicación de esta técnica en gametos solo sería útil en un reducidísimo número de casos. En el resto, el diagnóstico preimplantacional permitiría identificar y descartar los embriones con defectos genéticos. Lo realmente importante parece ser la futura aplicación a las células somáticas.

Idealmente, la técnica CRISPR podría permitir que la enfermedad desapareciera progresivamente, pero también desaparecería la identidad. El venezolano **José Luis Cordeiro** y **David W. Wood** (un matemático de Cambridge cofundador del sistema operativo Symbian), en su libro "La muerte de la muerte" (91), defienden que "La muerte será opcional en el año 2045 y el envejecimiento una enfermedad curable". En su opinión, esto será posible gracias a varias tecnologías como la edición genética, la medicina regenerativa, la eliminación de las células muertas del cuerpo, los tratamientos con células madre, la reparación de las células dañadas y la impresión de órganos en 3D. ¿No resulta asustante, además de altamente imaginativo?

5.5. Genética dirigida.

El año 2014, **Kevin M. Esvelt** y colaboradores en la Universidad de Harvard indicaron que la tecnología CRISPR podría combinarse con un fenómeno natural conocido como **genética dirigida**, para alterar el destino genético de una especie. Algunos alelos han evolucionado y adoptado mecanismos moleculares que les confieren una posibilidad de transmisión mayor del 50 % (que es lo normal), lo que les confiere propiedades de genética dirigida. También se han desarrollado módulos genéticos sintéticos con propiedades similares. Estos **"*gene drivers*"**, son **genes "egoístas"** dominantes que se extienden rápidamente en la población y aumentan la probabilidad de que un rasgo concreto pase desde un progenitor a la descendencia. La genética dirigida podría utilizarse por ejemplo para evitar la resistencia a los pesticidas y para ayudar a controlar la propagación de enfermedades como el paludismo induciendo la esterilidad en el vector de la enfermedad (las hembras del mosquito *Anopheles gambiae*) (92). Ciertos genes que impiden multiplicarse al parásito de la malaria se harían con el tiempo más comunes y se extenderían a toda la población.

La genética dirigida se ha propuesto también como técnica para cambiar las poblaciones salvajes, por ejemplo para combatir insectos que transmiten enfermedades (en particular mosquitos en los casos de malaria, dengue y zika) o para controlar especies invasoras, salvando de la extinción a la fauna autóctona de un ecosistema aislado implantando un gen que reduzca la fertilidad de los organismos invasores (93). Sin embargo, **es una manera de sesgar o predisponer una herencia de genes artificialmente**, por lo que su liberación en la naturaleza tiene un impacto potencialmente enorme y levanta importantes preocupaciones bioéticas. **Kenneth Akito Oye** y sus colegas señalan el posible impacto ecológico del uso del *gene drive* (94), porque podría reducir la diversidad genética de las poblaciones y un rasgo introducido podría extenderse más allá de la población objetivo a otros organismos a través de cruzamientos (95).

La edición de la línea germinal puede acarrear consecuencias no deseadas para las futuras generaciones porque hay todavía mucho desconocimiento en la comunidad científica (96). Otras preocupaciones éticas son de carácter general: ¿Se deben hacer cambios que podrían afectar a generaciones futuras sin tener su consentimiento? ¿Qué pasa si el uso de la edición de la línea germinal cambia de ser una herramienta terapéutica a una herramienta de mejora para diversas características humanas?

Para abordar estas preocupaciones, las Academias Nacionales de Ciencias, Ingeniería y Medicina de Estados Unidos han elaborado un informe completo con directrices y recomendaciones para la edición del genoma. **Izpisúa** ha sido uno de los miembros de este panel internacional, que publicó un documento a principios del 2018 señalando qué usos de CRISPR deben ser permitidos. La tecnología, decían, debe usarse solo en los casos en los que sea el último recurso para evitar enfermedades graves y nunca para intentar mejorar las capacidades físicas o mentales de un individuo, algo que, para Izpisúa, ni siquiera sería posible desde el punto de vista técnico hoy por hoy. En este documento instan a la prudencia en la búsqueda de la edición de la línea germinal, pero enfatizan que "la precaución no significa prohibición".

Esta investigación no habría sido posible en España porque la ley prohíbe expresamente crear embriones para investigación y solo se pueden usar aquellos que sean descartados en las clínicas de reproducción asistida.

6. AGRADECIMIENTOS

La autora está en deuda con varios científicos que han sido descubridores o transmisores de los avances que se

comentan en esta breve revisión, muy particularmente con Siddhartha Mukherjee y Francis S. Collins por sus libros "The gene: An intimate history" (1) y "The Language of God" (97), respectivamente. También agradece la elaboración de algunas figuras por el Dr. J. C. Menéndez.

7. REFERENCIAS

1. Siddhartha Mukherjee. "The gene: An intimate history". Ed. Scribner, New York, 2016.
2. Sesión del jueves 22 de marzo de 2018: "Modificación genética humana: una prespectiva tecnológica y ética", a cargo de los Dres. C. Nombela y R. Sentandreu.
3. Esta situación ha sido reflejada en clave de comedia por el dramaturgo Fernando Arrabal en un reciente artículo del periódico ABC: Fernando Arrabal. "Las olvidadas". ABC, 21 de Marzo de 2018.
4. Dobzhansky T. Nothing in Biology Makes Sense except in the Light of Evolution. The American Biology Teacher 1973; 35: 125-9.
5. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. Nature 2012; 481: 306-13.
6. Dalton F. "Essays in Eugenics". Ed. Macmillan, 1909.
7. Avendaño C. Biological relevance of a misterious hydroxyl group. Anales RANF 2016; 82: 274-82.
8. Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M. Genetic evidence equating *SRY* and the testis-determining factor. Nature, 1990; 348: 448-50.
9. Hamer DH, Hu S, Magnuson VL, Hu N, Pattatucci AM. A linkage between DNA markers on the X chromosome and male sexual orientation. Science 1993; 261: 321-7.
10. Morgan TH, Sturtevant AH, Muller HJ, Bridges CB. "The Mechanism of Mendelian Heredity". Ed. Henri Holt and Company, 1915.
11. Avendaño C. Antimicrobial resistance. Some aspects of a big problem. Anales RANF 2017; 83: 380-91.
12. Griffith F. The significance of pneumococcal types. Journal of Hygiene, 1928; 27: 113-59.
13. Muller HJ. Artifitial transmutation of the genes. Science 1927; 22: 84-7.
14. Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococal types. Induction of tranformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. Journal of Experimental Medicine 1944; 79: 137-58.
15. Watson JD, Crick FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. Nature 1953; 171: 737-8.
16. Biffi G, Tannahill D, McCafferty J, Balasubramanian S. Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. Nature Chemistry 2013; 5: 182-6.
17. Phan AT, Mergny JL. Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson-Crick double hélix. Nucleic Acids Research 2002; 30: 4618-25.
18. Zeraati M, Langley DB, Schofield P, Moye AL, *et al.* I-motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells. Nature Chemistry 2018; doi:10.1038/s41557-018-0046-3.
19. Beadle G. Genetics and metabolism in Neurospora. Physilogical Reviews 1945; 25: 643-63.
20. a) Brenner S, Jacob S, Meselson M. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. Nature, 1960; 190: 576-81. b) Gross F, Hiatt H, Gilbert W, Kurland CG, Risebrough RW, Watson JD. Unstable ribonucleic acid revealed by pulse labelling of *Escherichia coli*. Nature, 1960; 190: 581-5. (*Pulse labelling* es una técnica bioquímica para detectar la presencia de una molécula marcando una muestra con radioisótopos).
21. Watson JD, Crick FHC. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. Nature, 1953; 171: 965.
22. Szathmáry E. The origin of the genetic code: amino acids as cofactors in an RNA world. Trends Genet. 1999; 15: 223-9.
23. Dafny-Yelin M, Chung S., Frankman EL, Tzfira T. pSAT RNA interference vectors: a modular series for multiple gene down-regulation in plants. Plant Physiol. 207; 145: 1272-81.
24. Ruvkun G. Glimpses of a tiny RNA world. Science, 2001; 294: 797-99.
25. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci 1977; 74: 5463-7.
26. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, *et al*. Nucleotide sequence of bacteriophage ΦX174; Nature 1977; 265: 687-95.
27. Maxam A, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 1977; 74: 560-4.
28. a) Hedrick SM, Cohen DI, Nielsen EA, Davis MM. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. Nature 1984; 308: 149-53. b) Yanagi Y, Yoshikai Y, Leggett K, Clark SP, Aleksander I, Mak TW. A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains, Nature 1984; 308: 145-9.
29. Pardue AB, Jacob F, Monod J. The genetic control and cytoplasmic expression of "inducibility" in the synthesis of b-galactosidase by *E. coli*. Journal of Molecular Biology, 1959; 1: 165-78.
30. Enzymatic synthesis and breakdown of polynucleotides; polynucleotide phosphorylase. Grunberg-Manago M, Ochoa S. J Am Chem Soc 1955; 77: 3165-6.

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

31. Salas M, Blanco L, Lázaro JM, de Vega M. The bacteriophage phi29 DNA polymerase. IUBMB Life. 2008; 60: 82-5.

32. Jackson DA, Symons RH, Berg P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40. Circular SV40 DNA molecules containing lambda fage genes and the galactose operon of *Escherischia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 1972; 69: 2904-9.

33. a) Berg P, Baltimore D, Boyer H, Cohen S, *et al*. Potential biohazards of recombinant DNA molecules. Science, 1974; 185: 3034. b) Ver también: Palmer JG, Cook-Deegan R., Chapter 17 of "Designing Our Descendants: The Promises and Perils of Genetic Modifications" (Chapman AR, Frankel MS, Ed.). Johns Hopkins University Press, 2003.

34. Cohen SN, Miller CA. Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria. II. Molecular nature of R-factors isolated from *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. J Mol Biol. 1970; 50: 671–87.

35. Cohen SN, ACY, Boyer HW, RB. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1973; 70: 3240-4.

36. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Broune JK, *et al*. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. Proc Natl Acad Sci U S A 1985; 92: 7850-84.

37. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, *et al*. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. Nature 1985; 313: 806-10.

38. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. Trends in Genetics 1993; 9: 138-41.

39. Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erlich H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239: 487-91.

40. *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. Science 1998; 282: 2012-8.

41. Kornberg TB, Krasnow MA. The Drosophila genome sequence: implications for biology and medicine. Science 2000; 287: 2.218-20. Science 2000; 287: 2.105-364.

42. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, *et al*. The sequence of the human genome. Science 2001; 291: 1304-51.

43. International Human Genoma Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001; 409: 860-921.

44. Parrish NF, Tomonaga K. Endogenized viral sequences in mammals. Curr Opin Microbiol 2016; 31: 176-83.

45. a) Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, *et al*. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeletal-associated protein that is enriched in neuronal dendrites." Neuron 1995; 14: 433-45. b) Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, *et al*. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. Proc Nat Acad Sci USA 1995; 92: 1734-8.

46. a) Pastuzyn ED, Day CE, Kearns RB, Kyrke-Smith M, *et al*. The Neuronal Gene Arc Encodes a Repurposed Retrotransposon Gag Protein that Mediates Intercellular mRNA Transfer. Cell 2018; 172: 275-88. b) Parrish NF, Tomonaga K. A Viral (Arc)hive for Metazoan Memory. Cell 2018; 172: 8-10.

47. Thompson LR, Sanders JG, McDonald D, Amir A, *et al*. The Earth Microbiome Project Consortium. A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. Nature 2017; 551: 457-63.

48. Lewin HA, Robinson GE, Kress WJ, Baker WJ, *et al*. Earth BioGenome Project: Sequencing life for the future of life. Proc Natl Acad Sci USA 2018; DOI: 10.1073/pnas.

49. a) Gurdon JB, Elsdale TR, Fischberg M. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. Nature 1958; 182: 64-5. b) Gurdon JB. The transplantation of nuclei between two species of *Xenopus*. Developmental Biology 1962; 6: 68-83.

50. Chow JC, Yen Z, Ziesche SM, Brown CJ. Silencing of the mammalian X chromosome. Annual Review of Genomics and Human Genetics 2005; 6: 69-92.

51. Duret L, Chureau C, Samain S, Weissenbach J, Avner P. "The Xist RNA gene evolved in eutherians by pseudogenization of a protein-coding gene". Science 2006; 312: 1653-5.

52. Kuo M-H, Brownell JE, Sobel RE, Ranalli TA, *et al*. Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines, Nature 1996; 383: 269-72.

53. Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. Hereditas 1956; 42: 1-6.

54. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences (Paris) 1959; 248: 1721-2.

55. Botstein D, White RL, Skilnick M, Davis RW. Construcion of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorfisms. American Journal of Human Genetics 1980; 32: 314-31.

56. Kieburtz K, MacDonald M, Shih C, Feigin A, *et al*. Trinucleotide repeat length and progression of illness in Huntington's disease. Journal of Medical Genetics 1994; 31: 872-4.

57. Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, *et al*. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. Science 1985; 230: 1.054-7.

58. Wanda K, Lenma WK, Feldman GL, Kerem BS, *et al*. Mutation analysis for heterocygote detection and the prenatal diagnosis of cystic fibrosis. New England Journal of Medicine 1990; 322: 291-6.

59. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science 1990; 250: 1684-9.

60. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, *et al*. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science 1994; 266: 66-71.

61. Sekar A, Bialas AR, de Rivera H, Davis A, *et al*. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. Nature 2016; 530: 177-83.

62. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplifications. Nature 1990; 344: 25-6.

63. Jaenich R, MintzB. Simian virus 40 DNA squences in DNA of healthy adult mice derived from primplantation blastocytes inyected with viral DNA. Proc Natl Acad Sci USA 1974; 71: 1.250-4.

64. Thomas KR, Capecchi RM. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. Cell 1987; 51: 503-12.

65. a) Wivel NA, Anderson WF. Human gene therapy. Public policy and regulatory issues. Cold Spring Harbor Monograph Archive 1999; Chapter 24, nº 36: 671-89. b) Anderson WF. The best of times, the worst of times. Science 2000; 288: 627.

66. Booth C, Gaspar HB. Pegademase bovine (PEG-ADA) for the treatment of infants and children with severe combined immunodeficiency (SCID). Biologics: Targets and Therapy 2009; 3: 349-58.

67. Lehrmas S. Virus treatment questioned after gene therapy death. Nature 1999; 401: 517-8.

68. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, Rosales C, *et al*. Long term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. New England Journal of Medicine 2014; 371; 1.994-2.004.

69. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282: 1145-7.

70. Wertz DW. Embryo and stem cell research in the United States. History and politics. Gene Therapy 2002; 9: 674-8.

71. Tang WW, Dietmann S, Irie N, Leitch HG, *et al.* A Unique Gene Regulatory Network Resets the Human Germline Epigenome for Development. Cell 2015;161: 1.453-67.

72. Avendaño C, Menéndez JC. "Gene therapy" en "Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs", 2015, Ed. Elsevier, pág. 582 y siguientes.

73. Ferguson MS, Lemoine NR, Wang Y. Systemic Delivery of Oncolytic Viruses: Hopes and Hurdles. Adv Virol 2012; 2012: 1-14.

74. Pan J-J, Zhang SW, Chen C-B, Xiao S-W, *et al*. Effect of recombinant adenovirus-p53 combined with radiotherapy on long-term prognosis of advanced nasopharyngeal carcinoma. J Clin Oncol 2009; 27: 799-804.

75. Andtbacka RH, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, *et al*. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. J Clin Oncol 2015; 33: 2780-8.

76. Sandmair AM, Loimas S, Puranen P, Immonen A, *et al*. Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses. Hum Gene Ther 2000; 11: 2197-205.

77. Jin Z, Maiti S, Huls H, Sing H, Olivares S, *et al*. The hyperactive Sleeping Beauty transposase SB100X improves the genetic modification of T cells to express a chimeric antigen receptor. Gene Ther 2011; 18: 849-56.

78. Madan RA, Arlen PM, Mohebtash M, Hodge JW, *et al*. Prostvac-VF: a vector-based vaccine targeting PSA in prostate cancer. Expert Opin Invest Drugs 2009; 18: 1001-11.

79. Khuri FR, Kurie JM. Antisense approaches enter the clinic. Clin Cancer Res 2000; 6: 1607-13.

80. Moreno PM, Pego AP. Therapeutic antisense oligonucleotides against cancer: hurdling to the clinic. Front Chem 2014; 2: 87.

81. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, *et al*. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science 2007; 23; 315: 1709-12.

82. a) Mojica FJ, Juez G, Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of Haloferax mediterranei sequences adjacent to partially modified PstI sites. Mol Microbiol 1993; 9: 613-21. b) Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. J Mol Evol. 2005; 60:174-82.

83. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacteral immunity. Science 2012; 337: 816-21.

84. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath Ph, Siksnys V. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. PNAS 2012 ; 109: 15539-40.

85. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nature Biotechnology 2014; 32: 347-55.

86. Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, Kume S, et al. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. Nature Communications 2014; 5: 5560.

87. McCarthy J. 10 ways CRISPR (gene-editing) can fight poverty. Global Citizen, 27 Nov. 2015.

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

88. a) Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding Ch, *et al*. CRISPR/Cas9-mediated editing in human triplonoclear zygotes. Protein & Cell 2015; 6: 1-10. b) Ver la noticia en Nature News, 22 de abril 2015: Cyranoski D, Reaedon S. "Chinese scientists genetically modify human embryos".

89. Kang X, He W, Huang Y, Yu Q, *et al*. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 2016; 33: 581-8.

90. Ma H, Marti-Gutierrez N, Park S-W, Wu J, *et al*. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. Nature 2017; 548: 413-9.

91. Cordeiro JL, Wood DW. "La muerte de la muerte". Editorial Deusto 2017.

92. Hammond A, Galizi R, Kyrou K, Simoni A, *et al*. A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector Anopheles gambia. Nature Biotechnology 2016; 34: 78-83.

93. Leitschuh CM, Kanavy D, Backus GA, Valdez RX, Serr M, Pitts EA, Threadgill D, Godwin J. Developing Gene Drive Technologies to Eradicate Invasive Rodents From Islands, 2018; Journal of Responsible Innovation 5 (S1): S13–S39.

94. Oye KA, Esvelt K, Appleton E, Catterucci F, *et al*. Regulating gene drives. Science 2014; 345: 626-8.

95. Esvelt KM, Gemmell NJ. Conservation demands safe gene drive. PLOS Biology 2017; https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003850.

96. Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, *et al*. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. Science 2015; 348: 36-8.

97. Collins FS. "The Language of God". Free Press, New York, London, Toronto Sydney, 2006.

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
ISSN (Online) 1697-4298
Review
analesranf.com

Differentiation therapy: development of a new drug discovery platform

Title in Spanish: *Terapia de diferenciación: desarrollo de una nueva plataforma de descubrimiento de fármacos*

Ruth M. Risueño[1,*]

[1]Josep Carreras Leukaemia Research Institute. Campus Clínic-UB. Barcelona, España.

ABSTRACT: Most of the tumors are hierarchically organized, with a cellular subpopulation of cancer stem cells in the apex. This population is responsible for the initiation and maintenance of the tumor. Due to their "stem cell"-like properties, cancer stem cells display self-renewal and differentiation potential, both properties are tightly regulated. Thus, direct inhibition of self-renewal or induction of terminal differentiation will eradicate cancer stem cells and, thus, the maintenance and regeneration capacity of the neoplasia will be eliminated. Two distinct drug discovery platforms were developed to identify small bioactive compounds that induce terminal differentiation of cancer stem cells. These platforms are based on high-throughput and high-content screenings using a transformed embryonic stem cell system and an *in silico* bioinformatics analysis. Using acute myeloid leukemia as a hierarchically organized tumor model, these compounds were studied *ex vivo* and *in vivo* and optimized for clinical settings. These platforms have been validated as a new experimental approach to identify differentiating-inducing drugs as anti-neoplastic compounds.

RESUMEN: La mayor parte de los tumores están estructurados jerárquicamente, siendo la población de células madre del cáncer la encargada de iniciar y mantener el tumor. Estas células madre del cáncer, debido a sus similitudes con las células madre sanas, tienen capacidad de auto-renovación y diferenciación. Existe un balance altamente regulado que controla ambos procesos. De forma que la eliminación de la auto-renovación directamente o la inducción terminal de diferenciación producen la eliminación de las células madre del cáncer y, por lo tanto, la capacidad de mantenimiento y regeneración de la neoplasia. El desarrollo de dos plataformas distintas para buscar compuestos de pequeño tamaño bioactivos que induzcan la diferenciación terminal de las células madre del cáncer ha permitido identificar distintos fármacos con potencial acción neoplásica. Estas plataformas están basadas en cribados de alto rendimiento y alto contenido usando un sistema de células madre embrionarias transformadas y un análisis bioinformático *in silico*. Usando la leucemia mieloide aguda como modelo de tumor jerárquico, estos compuestos se estudiado *ex vivo* y *in vivo* y se han optimizado para su evaluación clínica. Estas plataformas de descubrimiento de fármacos se han validado como una nueva aproximación experimental para identificar nuevos fármacos con actividad diferenciadora anti-tumoral.

[*]**Corresponding Author:** risueno@carrerasresearch.org
Received: March 13, 2018 **Accepted:** March 20, 2018
An Real Acad Farm Vol. 84, Nº 2 (2018), pp. 154-163
Language of Manuscript: Spanish
Accésit del Premio Real Academia Nacional de Farmacia en el Concurso Ciéntifico 2017 de la RANF.

1. HETEROGENEIDAD TUMORAL: MODELO ESTOCÁSTICO VS. MODELO JERÁRQUICO

La mayoría de los tumores están compuestos por una variedad de tipos celulares que presentan distintas características genéticas, epigenéticas y morfológicas. Los tumores son, por tanto, un grupo de células transformadas con distintos fenotipos y propiedades funcionales discretas. A nivel clínico, los tumores de distintos pacientes exhiben frecuentemente una heterogeneidad significativa en cuanto a morfología, marcadores de superficie, lesiones genéticas, tasa de proliferación celular y respuestas a terapia, entre otras. Por tanto, es necesario entender las bases moleculares y celulares de esta heterogeneidad para diseñar aproximaciones terapéuticas efectivas y selectivas. Actualmente, la heterogeneidad tumoral puede ser explicada basada en dos grandes modelos: la hipótesis de células madre del cáncer (modelo jerárquico) y el modelo de evolución clonal (modelo estocástico).

Hasta los años 70, el campo fue dominado por el modelo de evolución clonal. En base a este modelo, se establece que cualquier célula dentro del tumor tiene el mismo potencial de adquirir secuencialmente los cambios genéticos y/o epigenéticos que les confieren las ventajas de crecimiento y generación de nuevos tumores (1, 2). Las diferencias intrínsecas dentro de las células tumorales

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

pueden ser causadas por cambios estocásticos tanto genéticos como epigenéticos adquiridos a lo largo del tiempo. La heterogeneidad también podría ser explicada por mecanismos extrínsecos en los que los distintos microambientes dentro del tumor pueden conferir diferencias fenotípicas y funcionales en las células tumorales dependiendo de la localización anatómica (3, 4). De acuerdo al modelo de evolución clonal, el cáncer se inicia en una célula individual que sufre un proceso mutacional al azar y múltiple, adquiriendo una ventaja de crecimiento selectiva sobre las células adyacentes normales. A medida que el cáncer progresa, la inestabilidad genética y la proliferación incontrolada permite la generación de células transformadas con alteraciones genéticas adicionales que pueden conferir comportamientos diversos. Alternativamente, las nuevas mutaciones pueden inducir una ventaja en supervivencia sobre las otras células tumorales que les permita resistir a terapias o ser insensibles a los estímulos apoptóticos (1). Por lo tanto, la progresión clonal es un proceso evolutivo que está dirigido por la selección darwiniana y expansión de subclones celulares más adaptados (5). Según este modelo, todas las células tumorales contribuyen al mantenimiento y regeneración del tumor aportando distintas capacidades. Este modelo está apoyado científicamente por evidencias histopatológicas de progresión de la enfermedad y metástasis (6-10), análisis genético a nivel de células individuales (11-17) y inmunofenotipo (18).

La evolución clonal ya empieza en una fase temprana de la enfermedad y los múltiples sublones son anteriores al diagnóstico. Estos subclones tienen diferentes propiedades de supervivencia, proliferación, resistencia a terapia y tumorogeneicidad. Una vez la terapia ha empezado, aquellos sublones sensibles a los fármacos usados se erradicarán, originándose una selección farmacológica de los clones resistentes al tratamiento que podrán llegar a expandirse eventualmente y producir un episodio de recaída. Después de que la mayoría de los subclones son eliminados por la terapia, la evolución clonal y la competición entre los clones resistentes empieza de nuevo produciéndose una nueva mezcla heterogénea de clones que se parecen al tumor primario. Con cada ronda de tratamiento, los cuellos de botella durante el desarrollo son creados siguiendo un proceso de selección clonal que, finalmente, resulta en la selección de los subclones más agresivos y resistentes a los tratamientos. Siguiendo este modelo, una terapia solamente será efectiva si es capaz de eliminar todos los subclones dentro del tumor puesto que cualquiera de ellos puede eventualmente adquirir capacidad tumorogénica. Por lo tanto, los fármacos antineoplásicos deberían actuar sobre rutas de señalización específicas que están altamente conservadas en todos los procesos de transformación que sufren los distintos subclones que conforman el tumor.

El modelo de células madre del cáncer (CSCs, *cancer stem cell*), también denominado modelo jerárquico, propone que el crecimiento y progresión de los tumores está dirigido por una subpoblación celular aislada de células madre del cáncer, siendo el tumor una caricatura del desarrollo tisular normal (19). Por tanto, las CSCs comparten con las células madre sanas su capacidad de auto-renovación y el potencial de diferenciación. Las CSCs no sólo se mantienen a sí mismas, sino que también se pueden diferenciar en células transformadas sin propiedades de CSCs que constituyen la mayoría de las células neoplásicas. La primera evidencia experimental de la existencia de una subpoblación de células neoplásicos se obtuvo en leucemia linfoide, demostrando la capacidad de auto-renovación en un modelo de ratón *in vivo* (20). Posteriormente, se mostró que no todas las células neoplásicas aisladas de tumores humanos pueden regenerar el tumor en auto-trasplantes (21). El potencial de diferenciación de algunos subtipos celulares ha sido descrito en la mayoría de los tipos de cáncer, incluyendo cáncer de células germinales (22), neuroblastomas (23) y leucemias (24). El desarrollo de técnicas avanzadas de citometría de flujo hizo posible aislar fenotípicamente distintas poblaciones celulares vivas y comparar su potencial tumorogénico en modelos de xenotrasplante en ratón. Usando esta aproximación de aislamiento prospectivos de CSCs, se demostró que algunas leucemias mieloides agudas (LMA) (25, 26) y el cáncer de mama (27) siguen este modelo de CSCs, sugiriendo que la organización jerárquica de un tumor en subpoblaciones tumorogénicas y no tumorogénicas es general y similar a los tejidos sanos. En estos estudios, el porcentaje de células con capacidad de formar el tumor al ser trasplantadas en ratones inmunosuprimidos condicionados era muy bajo, pero podían obtenerse fracciones enriquecidas mediante aislamiento de poblaciones fenotípicas. Posteriormente, se evidenció que otros tumores sólidos como el cáncer de colon (28), cáncer pancreático (29), tumor cerebral (30) y cáncer de ovario (31). En todos estos casos, la capacidad de propagar la enfermedad estaba restringida en una subpoblación de células transformadas fenotípicamente única que podía generar todas las células tumorales que contenía el tumor del que proceden. Por tanto, los tumores que siguen el modelo de CSCs podrían ser más efectivamente tratados eliminando las CSCs para erradicar la capacidad de auto-renovación del tumor que, eventualmente, supondrá la eliminación de la capacidad de regeneración y mantenimiento de la neoplasia.

A pesar de las evidencias experimentales anteriormente descritas, el modelo jerárquico sigue siendo controvertido. La identificación de la población de CSCs no ha sido posible en todos los tipos tumorales. En algunos melanomas, virtualmente todas las células del tumor son capaces de regenerar la enfermedad en modelos de ratón, sugiriendo que todas las células del tumor tiene un comportamiento homogéneo (32, 33). Además, en otros tumores, la población sin características de CSCs puede adquirirlas dependiendo de las señales del microambiente, sugiriendo que la población de CSCs es plástica (34, 35).

Aunque estos dos modelos puedan parecer mutuamente

excluyentes, los datos actuales indicarían que ambos dos coexistirían. De hecho, se ha descrito la existencia de una diversidad genética dentro de la fracción de CSCs tanto al diagnóstico como durante la progresión de la enfermedad gracias a la combinación de los ensayos funcionales con análisis genéticos (13, 36-38). Es más, los subclones genéticamente diversos ya poseen agresividad diversa al tiempo de diagnóstico (36). Por lo tanto, estas evidencias experimentales sugieren que muchos tumores son mantenidos por una población de CSCs que puede sufrir una evolución clonal. Esta evolución clonal de la población de CSC hace que el aislamiento prospectivo de las CSCs sea complejo.

2. SISTEMA HEMATOPOYÉTICO – ANTECEDENTES HISTÓRICOS

De todos los tejidos de mamíferos, el sistema hematopoyético fue el primero y mejor caracterizado en términos de la organización jerárquica y diferenciación secuencial de cada una de las subpoblaciones celulares que lo componen. Mediante experimentos de trasplante en ratón, se demostró la existencia de precursores clonogénicos en la médula ósea con capacidad de expansión a largo plazo y diferenciación mielo-eritroide. Estos estudios permitieron la caracterización jerárquica progresiva de los distintos linajes celulares en base a su funcionalidad y fenotipo; y la identificación de las células madre hematopoyéticas (HSCs, *hematopoietic stem cells*). Todas las poblaciones de células madre se caracterizan por su capacidad de diferenciación (la habilidad de dar lugar a una progenie celular heterogénea, que progresivamente se amplifica, diversifica y se especializa siguiendo un proceso jerárquico) y auto-renovación (la habilidad de formar nuevas células madre idénticas, con el mismo potencial de proliferación, expansión y diferenciación) [revisado en (19)].

3. IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE LEUCÉMICAS

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia hematológica caracterizada por la rápida expansión de progenitores mieloides inmaduros en la médula ósea y la sangre (39). El curso de la enfermedad está marcado por las frecuentes recaídas, la alta mortalidad y la mala prognosis (40). El tratamiento actual, que no ha sufrido cambios significativos en las últimas décadas, comprende distintos ciclos de quimioterapia y la posibilidad de realización de un trasplante de progenitores hematopoyéticos. Más del 70 % de los pacientes de LMA conseguirán la remisión completa tras el tratamiento de inducción con quimioterapia (41). Sin embargo, la mayoría recaerán y sucumbirán a la enfermedad a los 5 años del diagnóstico (42). Es por ello, que la tasa de supervivencia de los pacientes de LMA no ha sufrido cambios dramáticos en los últimos años (43) y nuevas aproximaciones terapéuticas son necesarias en esta enfermedad (44).

El modelo jerárquico fue demostrado por primera vez en LMA. La primera evidencia directa de la existencia de LSCs fue la identificación de una población minoritaria de células leucémicas capaces de recapitular la enfermedad humana en xenotransplantes en ratón (26). El grupo de Dick realizó experimentos pioneros para determinar si la jerarquía funcional observada en la hemopoyesis normal también se conservaba en los tumores sanguíneos. Estos estudios demostraron que en múltiples formas de LMA (salvo la leucemia promielocítica aguda), las células con capacidad de regeneración en ratones inmunosuprimidos estaban restringidas a una subpoblación definida por un fenotipo característico: $CD34^{+}CD38^{-}$, fenotipo compartido con la población de HSCs (25). De hecho, el análisis fenotípico de las células leucémicas de los ratones trasplantados revelaba la regeneración del fenotipo heterogéneo observado en el paciente, indicando que las LSCs mantenían el potencial de diferenciación. La habilidad para regenerar la LMA en trasplantes seriados demostraba la capacidad de auto-renovación de esta población. Estas observaciones constituyeron la primera prueba experimental de que, en una enfermedad neoplásica en humanos, las poblaciones de células tumorales estaban organizadas de acuerdo a una jerarquía funcional similar al sistema de células madre de los tejidos sanos.

El desarrollo de nuevas cepas de ratón con una mayor inmunodeficiencia y el empleo de nuevas vías de inyección permitió demostrar que la actividad LSC también reside en la población $CD34^{+}CD38^{+}$ de algunos pacientes (45), sugiriendo que el compartimiento de LSC es heterogéneo. De hecho, se han descrito LSC $CD34^{-}$ (46) y poblaciones de LSCs con plasticidad de linaje (47). En los últimos años, se han identificado varios marcadores de superficie asociados a LSCs como CD13, CD25, CD32, CD33, CD47, CD90, CD96, CD117, CD123, CLL-1 ó TIM3 (48). Sin embargo, y como ocurre con CD34 y CD38, el fenotipo de las LSCs no es uniforme ni entre pacientes ni en un solo paciente (48).

Hasta la fecha, los ensayos de xenotrasplantes en ratones inmunodeficientes siguen siendo el método más sensible que soporta el crecimiento mayoritario de tumores. Aunque es posible que la capacidad de regeneración de una célula en un ratón condicionado trasplantado puede no reflejar fielmente el comportamiento en el paciente. Adicionalmente, pueden existir limitaciones inherentes al modelo de ratón como es la vida media limitada del ratón, la alteración del *homing* de CSCs, la falta de citoquinas o la ausencia de células inmunes. Para poder mejorar el conocimiento sobre la biología de las CSCs, es necesario desarrollar métodos de mayor precisión.

4. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LAS LSCS

Las LSCs se caracterizan por una capacidad ilimitada de auto-renovación. Evidencias experimentales han demostrado la primacía, en este proceso, de rutas de señalización imprescindibles durante el desarrollo y altamente conservadas como Bmi-1, Hox, Wnt, Hedgehog y Notch. Sin embargo, el grado de activación parece ser dependiente de contexto y oncogén, puesto que la

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

señalización mayoritaria que dirige el proceso de auto-renovación es diferente según las aberraciones genómicas presentes en la LSC. HSCs y LSCs también comparten los mecanismos responsables de la resistencia a estímulos apoptóticos, la prevalencia del estado quiescente y la resistencia a multidrogas. Aunque el mecanismo de auto-renovación y citoprotección es compartido, la actividad telomerasa está altamente reducida o ausente en LSCs. En HSCs, la actividad telomerasa contribuye al mantenimiento a largo plazo de la auto-renovación en un contexto altamente regulado. Sin embargo, la actividad telomerasa en LSCs aparece disminuida y, como consecuencia de ella, los telómeros son más cortos. De hecho, se ha hipotetizado que el acortamiento acelerado de los telómeros puede predisponer a padecer una LMA [revisado en (49)].

Recientemente, se ha propuesto que las LSCs pueden usar un mecanismo nuevo para evadir la inmunovigilancia basado en la expresión en superficie de CD47, una proteína de membrana reconocida por macrófagos y que inhibe la fagocitosis (50). De hecho, en pacientes con LMA, la expresión de CD47 se correlaciona negativamente con la respuesta a la quimioterapia convencional (51).

El perfil de expresión génica de las LSCs es distinto al del resto de células leucémicas del paciente. Sin embargo, conserva muchas similitudes con el patrón génico de las HSCs y progenitores tempranos hematopoyéticos (52, 53). Desafortunadamente, las firmas génicas de LSCs publicadas tienen una homología parcial, probablemente debido a diferencias en el método de aislamiento y a las variaciones entre pacientes (52-54).

Las LSCs migran a la médula ósea y residen en microambientes similares a los de las HSCs. Las células estromales con las que interaccionan protegen de la apoptosis inducida por quimioterapéuticos, potencialmente mediante la inducción en LSCs de un estado de quiescencia. La interacción con el microambiente medular también es imprescindible para mantener el estado indiferenciado y la capacidad ilimitada de auto-renovación. La alteración de estas uniones supone la movilización de las LSCs y una reducción en su viabilidad (55).

5. EVIDENCIAS CLÍNICAS DE LA EXISTENCIA DE LAS LSCS

La presencia de LSCs así como la existencia de una firma génica en pacientes con LMA asociada a LSCs se ha relacionado tanto con enfermedad mínima residual como con un pronóstico adverso. El porcentaje de LSCs al diagnóstico está relacionada con la capacidad de regeneración de la LMA en ratones inmunosuprimidos, la agresividad de la enfermedad en humanos (56, 57) y la supervivencia libre de enfermedad (58, 59). De hecho, la cantidad relativa de LSCs en el momento del diagnóstico predice la respuesta al tratamiento quimioterapéutico convencional (59) y tiene valor pronóstico (57, 60). Además, la detección de LSCs residuales en muestras de médula ósea en remisión predice la recaída en pacientes con LMA (59, 61). Aunque todos estos estudios demuestran la utilidad potencial de la detección de LSCs en clínica para estratificar pacientes en los distintos grupos pronósticos, es necesario unificar los criterios de detección de LSCs y validar estos resultados.

Los perfiles de expresión génica de LSCs también han sido relacionados con el desarrollo clínico de la enfermedad. La expresión de una firma génica asociada a LSCs al diagnóstico predice una menor supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad y un mayor riesgo de recaída (52). Esta firma génica es similar a la obtenida de HSCs y ambas predicen la supervivencia del paciente (53).

6. IMPLICACIÓN TERAPÉUTICA

Debido a sus propiedades de células madre, las CSCs se mantienen mayormente inalterables tras el tratamiento por la resistencia a fármacos y/o radiación (62-65). La resistencia al tratamiento se cree que está sustentada en un aumento del reconocimiento y reparación del ADN dañado, la alteración de los puntos de control del ciclo celular, la desensibilización a los estímulos apoptósticos y la sobreexpresión de los transportadores de resistencia a multidrogas (63). De forma similar a las células madre sanas, las CSCs son mayormente quiescentes, siendo esta propiedad muy importante para la resistencia a terapia.

La resistencia de las CSCs al tratamiento ha sido descrito tanto *ex vivo* como *in vivo*. La inducción de apoptosis en la presencia de los quimioterapéuticos comúnmente usados en clínica es menor que en células tumorales más diferenciadas. De hecho, las diferencias en sensibilidad son independiente de la tasa de proliferación. Por tanto, la resistencia a la terapia es una característica intrínseca a las CSCs. Las CSCs remanentes tras el tratamiento pueden restablecer la enfermedad, confirmando su implicación en el fracaso del tratamiento (62, 66-70). En cuanto a los ensayos de xenotrasplantes, las CSCs parecen insensibles a los fármacos neoplásicos convencionales. Es más, la población de CSCs se enriquece tras el tratamiento (64, 71-75).

Aunque la supervivencia a largo plazo de los pacientes con LMA ha aumentado en las últimas décadas, los episodios de recaída siguen siendo frecuentes. De acuerdo con el modelo de células madre del cáncer, cualquier aproximación terapéutica que no erradique las LSCs probablemente tendrá poco éxito. Aunque elimine la mayoría de los blastos leucémicos e induzca la remisión temporal del tumor, no impedirá la regeneración de la enfermedad y la diseminación metastásica del mismo. Por lo tanto, se requieren nuevos tratamientos que afecten selectivamente a las LSCs con una mínima toxicidad para las células madre hematopoyéticas. Un aspecto importante de la biología de las LSCs es su plasticidad y la formación de subclones durante la evolución de la enfermedad. Por lo tanto, son necesarias mejoras en el tratamiento y es previsible que las nuevas terapias que actúen sobre LSCs aumenten la tasa de curación, disminuyendo las recaídas.

7. TERAPIA DE DIFERENCIACIÓN

Existen tres grandes tipos de terapias neoplásticas:

- Inhibidores de productos de fusión génica
- Moduladores de rutas de señalización
- Inducción de diferenciación terminal

La LMA en particular, y el resto de los tumores en general, son neoplasias altamente heterogéneas con varias anormalidades moleculares y citogenéticas (43). El diseño de nuevas terapias cuya diana específica sea una proteína de fusión sería de utilidad clínica limitada. Esta aproximación sería únicamente eficaz para aquellas patologías donde una única lesión genética sea responsable del fenotipo transformado.

Otra aproximación terapéutica basada en el mecanismo de transformación explorada ha sido la modificación de rutas de señalización (39). Hasta la fecha, para LMA, el éxito ha sido dispar. El uso de anticuerpos bloqueantes que reconozcan antígenos de superficie específicos o sobreexpresados en LSCs como CD33 (76), CD44 (77), CD123 (78) o CD47 (51) ha mostrado ser efectivo en modelos preclínicos aunque el efecto en pacientes ha sido irrelevante clínicamente (55). La inhibición de Akt (79), JunB (80), CDX (81) o NFkb (82) elimina la población de LSCs en modelo preclínicos pero aún no hay datos clínicos de su efectividad. Sin embargo, debido a la similitud en el patrón de expresión génica de LSCs y HSCs (52, 53, 83), es esperable que la modulación farmacéutica de rutas de señalización implicadas en la supervivencia de LSCs puede ser tóxica en HSCs.

Sin embargo, existe una tercera aproximación terapéutica basada en superar el bloqueo en diferenciación causado por mutaciones y/o cambios epigenéticos y, por lo tanto, inducir diferenciación directa a un linaje hematopoyético alternativo (84). Las células madre están definidas por dos propiedades únicas: capacidad de auto-renovación prolongada y potencial para generar células progenitoras más maduras y con capacidad de amplificación a corto plazo que darán lugar a las células especializadas que constituyen un tejido determinado mediante procesos de diferenciación. Por lo tanto, el equilibrio entre auto-renovación y diferenciación está altamente regulado, como también lo está el balance entre quiescencia y proliferación (85). En LSCs, el balance está desplazado hacia la auto-renovación produciendo una ventaja proliferativa y un bloqueo en la diferenciación (86). Tanto la inhibición de la auto-renovación como el incremento en la presión diferenciadora podrían agotar la población de LSCs (77, 87). Esta aproximación terapéutica está obteniendo datos prometedores a nivel preclínico (55).

8. CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS TRANSFORMADAS: MODELO DE CSCS *IN VITRO*

Las células madre pluripotentes humanas (embrionarias) neoplásticas fueron descritas en 2009 como una variante de las células humanas pluripotentes (embrionarias) generadas espontáneamente en cultivo celular que mantenía un cariotipo normal pero mostraban las características fenotípicas clásicas de la transformación tumoral (88), conservando también sus propiedades de células madre. Entre estas características se encuentra el incremento en la auto-renovación y menor dependencia de factores de crecimiento para la supervivencia, acompañada con el bloqueo de la diferenciación. El comportamiento de estas células transformadas pluripotentes es parecido al de las CSCs, convirtiéndose en un sustituto de las CSCs con un alto valor científico como modelo *in vitro*. Posteriormente, se generaron líneas derivadas de éstas que contenían la expresión de la proteína de fusión Oct4-GFP (Oct4 es un marcador de pluripotencia), como marcado de diferenciación. Las células derivadas fueron usadas para generar una plataforma de cribado de alto rendimiento y alto contenido de compuestos con actividad diferenciadora. Las librerías de compuestos conocidos, naturales o sintetizados *de novo*, fueron probadas sobre estas células y su efecto en la diferenciación de este modelo de CSCs fue determinado por las variaciones en la intensidad de fluorescencia del GFP. Para confirmar que los compuestos que inducían diferenciación en las células pluripotentes transformadas de forma específica, se generaron células humanas embrionarias que expresaban este mismo marcador. Se consideraron como positivos todos aquellos compuestos químicos que indujesen diferenciación en las células transformadas y no en las sanas (89).

De una librería compuesta de más de 2,000 compuestos, identificaron 26 positivos. La mayoría de ellos eran antagonistas de receptores de dopamina que son usados para tratar los síntomas de la esquizofrenia. La validación funcional se realizó en LMA puesto que es el modelo neoplásico jerárquico más estudiado. Se eligió tioridazina como representante de los positivos. El tratamiento con tioridazina inducía la diferenciación de las LSCs tanto *ex vivo* como en modelo de xenotrasplante en ratón. No se demostró ningún efecto significativo en la hematopoyesis sana ni en la funcionalidad de las células madre hematopoyéticas. Teniendo en cuenta que las LSCs son mayormente quiescentes y la inducción de diferenciación supone la entra en ciclo celular, el tratamiento con tioridazina producía un efecto citotóxico sinérgico con los quimioterapéuticos utilizados en clínica (89). Se ha finalizado ya la fase clínica I para evaluar la toxicidad de este tratamiento en pacientes de LMA (NCT02096289 – Thoridal).

9. REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS PARA LA TERAPIA DE DIFERENCIACIÓN BASADO EN UN CRIBADO *IN SILICO*

Las LSCs pueden diferenciarse en granulocitos, monocitos y/o células dendríticas (90). Todas ellas tienen una vida media limitada y son más sensibles a fármacos. Los mecanismos que bloquean la diferenciación e incrementan la auto-renovación son parcialmente desconocidos; sin embargo, sí se conocen compuestos que inducen diferenciación mieloide en LSCs *in vitro*. Se obtuvieron los perfiles de expresión génica correspondientes a las células leucémicas no LSCs, las LSCs, granulocitos, monocitos y células dendríticas.

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

Adicionalmente, se obtuvieron los perfiles correspondientes a líneas celulares de LMA tratadas con agentes diferenciadores ya conocidos procedentes de repositorios públicos (GEO, ArrayExpress). Mediante un estudio *in silico* se identificó la firma génica asociada al proceso de diferenciación de LSCs hacia monocitos, granulocitos y células dendríticas. De forma similar, se obtuvo la firma génica asociada a la diferenciación sana hematopoyética de los linajes mieloides. Se descartaron aquellos genes que estuviesen regulados de forma equivalente en los procesos de diferenciación de LSCs y células madre hematopoyéticas para poder obtener una firma génica asociada exclusivamente a las LSCs. Estas firmas refinadas fueron optimizadas posteriormente excluyendo aquellos genes que se expresaban de forma similar en células madre hematopoyéticas y LSCs. Cada una de las firmas génicas constituye una diana terapéutica *per se*. Se enfrentaron a la base de datos de Connectivity Maps (91) para encontrar pequeñas moléculas bioactivas aprobadas por la FDA que produjesen una regulación génica similar a la firma identificada previamente en cualquier sistema celular. Los resultados positivos fueron filtrados primeramente en base a su valor en el cribado *in silico*, la concentración a la cual inducía esa expresión génica y la significación estadística. De una librería de más de 3000 compuestos, se obtuvieron 17 positivos, que correspondían a 4 grandes familias:

- Inhibidores de XIAPs (92)
- Fármacos anti-malaria (93)
- Moduladores del receptor de dopamina (94)
- Antagonistas del receptor de serotonina (95)

La primera familia de fármacos descrita usando esta estrategia fueron los inhibidores de XIAP, una proteína proapoptótica. Dequalinum fue el primer compuesto identificado, un fármaco conocido por inhibir XIAP y aprobado como antiséptico y antifúngico (96, 97). Tanto Dequalinium como otros inhibidores de XIAPs afectan selectivamente a las LSCs, induciendo su diferenciación.

Algunos fármacos anti-malaria como mefloquinina poseen actividad anti-leucémica (98). La segunda familia de fármacos identificada en el cribado *in silico* fueron compuestos con actividad anti-malaria como la emetina, aunque con distinto mecanismo de acción de las quininas. Se demostró que la inhibición de HIF-1α era crítica para la inducción de diferenciación de las LSCs y el efecto anti-leucémico fue detectado en modelos de xenotrasplante en ratón. La inhibición de HIF-1α no tenía efectos significativos en las células madre hematopoyéticas.

El último conjunto de compuestos identificados siguiendo esta estrategia han sido los antagonistas de receptores de serotonina de tipo 1B. Se ha descrito que las LSCs, en especial, y las células de LMA, en general, expresan de forma aberrante estos receptores neuronales. De hecho, la expresión de los receptores de serotonina 1B es significativamente más baja en las poblaciones de células sanas hematopoyéticas. Es más, la expresión del receptor de serotonina 1B tiene valor diagnóstico, es decir, su expresión permite discriminar las muestras tumorales. Además, hay una relación entre la expresión del receptor y la historia clínica del paciente. A mayor expresión del receptor, más resistencia al tratamiento quimioterapéutico convencional y mayor sensibilidad a los antagonistas de receptores de serotonina 1B. La inhibición farmacológica del receptor de serotonina 1B produce la diferenciación y muerte de LSCs tanto *ex vivo* como *in vivo* en modelos de xenotrasplantes de ratón. El tratamiento con los inhibidores de serotonina de tipo 1B sinergiza en su efecto citotóxico con los quimioterapéuticos actuales. No se ha detectado ningún efecto significativo en la hematopoyesis sana ni en la funcionalidad de células sanguíneas maduras ni células madre hematopoyéticas (95). Es más, los estudios epidemiológicos ya publicados indicarían que los pacientes de Parkinson tratados con antagonistas de receptores de serotonina 1B tienen una menor incidencia de leucemia. El desarrollo clínico de los antagonistas de receptores de serotonina de tipo 1B está siendo realizada por la empresa Leukos Biotech (cofundada por la Dra. Risueño y el Josep Carreras Leukaemia Research Institute) y se espera empezar el ensayo clínico en pacientes de LMA en el primer trimestre del 2018.

Lista de abreviaturas

CSC: Célula madre del cáncer (*cancer stem cell)*

HSC: Célula madre hematopoyética (*hematopoietic stem cell)*

LMA: Leucemia mieloide aguda

LSC: Célula madre leucémica (*leukemic stem cell)*

Conflicto de intereses

La Dra. Risueño es inventora en varias patentes licencias a distintas empresas farmacéuticas relacionadas con el trabajo expuesto. Asimismo, es fundadora y accionista de Leukos Biotech.

Agradecimientos

Este trabajo hubiese sido imposible de realizar sin el apoyo constante de los miembros del Risueño Lab. RMR está financiada por el programa Ramón y Cajal (RYC-2011-07998) y el programa IEDI (IEDI-2016-00740).

10. REFERENCIAS

1. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. Science. 1976 Oct 1;194(4260):23-8.
2. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nat Rev Cancer. 2008 Oct;8(10):755-68.
3. Polyak K, Haviv I, Campbell IG. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. Trends Genet. 2009 Jan;25(1):30-8.
4. Bissell MJ, Hines WC. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. Nat Med. 2011 Mar;17(3):320-9.
5. Stratton MR. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. Science. 2011 Mar 25;331(6024):1553-8.
6. Takahashi T, Habuchi T, Kakehi Y, Mitsumori K,

Akao T, Terachi T, et al. Clonal and chronological genetic analysis of multifocal cancers of the bladder and upper urinary tract. Cancer Res. 1998 Dec 15;58(24):5835-41.

7. Cottu PH, Asselah J, Lae M, Pierga JY, Dieras V, Mignot L, et al. Intratumoral heterogeneity of HER2/neu expression and its consequences for the management of advanced breast cancer. Ann Oncol. 2008 Mar;19(3):595-7.
8. Boland CR, Sato J, Appelman HD, Bresalier RS, Feinberg AP. Microallelotyping defines the sequence and tempo of allelic losses at tumour suppressor gene loci during colorectal cancer progression. Nat Med. 1995 Sep;1(9):902-9.
9. Navin N, Krasnitz A, Rodgers L, Cook K, Meth J, Kendall J, et al. Inferring tumor progression from genomic heterogeneity. Genome Res. 2010 Jan;20(1):68-80.
10. Teixeira MR, Pandis N, Bardi G, Andersen JA, Heim S. Karyotypic comparisons of multiple tumorous and macroscopically normal surrounding tissue samples from patients with breast cancer. Cancer Res. 1996 Feb 15;56(4):855-9.
11. Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. Nat Rev Cancer. 2009 Apr;9(4):302-12.
12. Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. Nature. 2011 Apr 7;472(7341):90-4.
13. Anderson K, Lutz C, van Delft FW, Bateman CM, Guo Y, Colman SM, et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. Nature. 2011;469(7330):356-61.
14. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. Nature. 2007 Mar 8;446(7132):153-8.
15. Beroukhim R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. Nature. 2010 Feb 18;463(7283):899-905.
16. Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. Leukemia in twins: lessons in natural history. Blood. 2003 Oct 1;102(7):2321-33.
17. Park SY, Gonen M, Kim HJ, Michor F, Polyak K. Cellular and genetic diversity in the progression of in situ human breast carcinomas to an invasive phenotype. J Clin Invest. 2010 Feb;120(2):636-44.
18. Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. Cancer Cell. 2007 Mar;11(3):259-73.
19. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. Blood. 2008 Dec 15;112(13):4793-807.
20. Furth J, Strumia M. Studies on Transmissible Lymphoid Leucemia of Mice. J Exp Med. 1931 Apr 30;53(5):715-31.
21. Southam CM, Brunschwig A. Quantitative studies of autotransplantation of human cancer. Preliminary report. Cancer. 1961;14(5):971-8.
22. Kleinsmith LJ, Pierce GB, Jr. Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. Cancer Res. 1964 Oct;24:1544-51.
23. Shimada H, Chatten J, Newton WA, Jr., Sachs N, Hamoudi AB, Chiba T, et al. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. J Natl Cancer Inst. 1984 Aug;73(2):405-16.
24. Ogawa M, Fried J, Sakai Y, Strife A, Clarkson BD. Studies of cellular proliferation in human leukemia. VI. The proliferative activity, generation time, and emergence time of neutrophilic granulocytes in chronic granulocytic leukemia. Cancer. 1970 May;25(5):1031-49.
25. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nature medicine. 1997;3(7):730-7.
26. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature. 1994;367(6464):645-8.
27. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(7):3983-8.
28. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. Nature. 2007;445(7123):106-10.
29. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. Cancer research. 2007;67(3):1030-7.
30. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. Nature. 2004;432(7015):396-401.
31. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai H-C, Matei D, Schilder JM, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. Cancer research. 2008;68(11):4311-20.
32. Quintana E, Shackleton M, Foster HR, Fullen DR, Sabel MS, Johnson TM, et al. Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. Cancer Cell. 2010 Nov 16;18(5):510-23.
33. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. Nature. 2008 Dec 4;456(7222):593-8.
34. Chaffer CL, Marjanovic ND, Lee T, Bell G, Kleer CG, Reinhardt F, et al. Poised chromatin at the ZEB1

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. Cell. 2013 Jul 03;154(1):61-74.

35. Vermeulen L, De Sousa EMF, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. Nat Cell Biol. 2010 May;12(5):468-76.
36. Notta F, Mullighan CG, Wang JCY, Poeppl A, Doulatov S, Phillips LA, et al. Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. Nature. 2011;469(7330):362-7.
37. Kreso A, O'Brien CA, van Galen P, Gan OI, Notta F, Brown AMK, et al. Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. Science (New York, N Y). 2013;339(6119):543-8.
38. van Delft FW, Horsley S, Colman S, Anderson K, Bateman C, Kempski H, et al. Clonal origins of relapse in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2011;117(23):6247-54.
39. Perl AE, Carroll M. Exploiting signal transduction pathways in acute myelogenous leukemia. Curr Treat Options Oncol. 2007 Aug;8(4):265-76.
40. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 1999 Sep 30;341(14):1051-62.
41. Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. Blood. 2009 Jan 21;115(3):453-74.
42. Shipley JL, Butera JN. Acute myelogenous leukemia. Exp Hematol. 2009 Jun;37(6):649-58.
43. Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. Lancet. 2006 Nov 25;368(9550):1894-907.
44. Tallman MS. New agents for the treatment of acute myeloid leukemia. Best Pract Res Clin Haematol. 2006;19(2):311-20.
45. Taussig DC, Miraki-Moud F, Anjos-Afonso F, Pearce DJ, Allen K, Ridler C, et al. Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. Blood. 2008;112(3):568-75.
46. Taussig DC, Vargaftig J, Miraki-Moud F, Griessinger E, Sharrock K, Luke T, et al. Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. Blood. 2010;115(10):1976-84.
47. Risueno RM, Campbell CJ, Dingwall S, Levadoux-Martin M, Leber B, Xenocostas A, et al. Identification of T-lymphocytic leukemia-initiating stem cells residing in a small subset of patients with acute myeloid leukemic disease. Blood. 2011 Jun 30;117(26):7112-20.
48. Horton SJ, Huntly BJ. Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology. Haematologica. 2012 Jul;97(7):966-74.
49. Felipe Rico J, Hassane DC, Guzman ML. Acute myelogenous leukemia stem cells: from Bench to Bedside. Cancer Lett. 2013 Sep 10;338(1):4-9.
50. Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, et al. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. Cell. 2009 Jul 23;138(2):271-85.
51. Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs KD, Jr., et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. Cell. 2009 Jul 23;138(2):286-99.
52. Gentles AJ, Plevritis SK, Majeti R, Alizadeh AA. Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. JAMA. 2010 Dec 22;304(24):2706-15.
53. Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, Waldron L, Nilsson B, van Galen P, et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. Nat Med. 2011 Sep;17(9):1086-93.
54. de Jonge DM, Jones A, Phillips R, Chung M. Understanding the essence of home: older people's experience of home in Australia. Occup Ther Int. 2011 Mar;18(1):39-47.
55. Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. Blood. 2009 Aug 06;114(6):1150-7.
56. Pearce DJ, Taussig D, Zibara K, Smith LL, Ridler CM, Preudhomme C, et al. AML engraftment in the NOD/SCID assay reflects the outcome of AML: implications for our understanding of the heterogeneity of AML. Blood. 2006 Feb 1;107(3):1166-73.
57. Cheung AM, Wan TS, Leung JC, Chan LY, Huang H, Kwong YL, et al. Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. Leukemia. 2007 Jul;21(7):1423-30.
58. van Rhenen A, Feller N, Kelder A, Westra AH, Rombouts E, Zweegman S, et al. High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. Clin Cancer Res. 2005 Sep 15;11(18):6520-7.
59. Terwijn M, Feller N, van Rhenen A, Kelder A, Westra G, Zweegman S, et al. Interleukin-2 receptor alpha-chain (CD25) expression on leukaemic blasts is predictive for outcome and level of residual disease in AML. Eur J Cancer. 2009 Jun;45(9):1692-9.
60. Ran D, Schubert M, Pietsch L, Taubert I, Wuchter P, Eckstein V, et al. Aldehyde dehydrogenase activity among primary leukemia cells is associated with stem

cell features and correlates with adverse clinical outcomes. Exp Hematol. 2009 Dec;37(12):1423-34.

61. Gerber JM, Smith BD, Ngwang B, Zhang H, Vala MS, Morsberger L, et al. A clinically relevant population of leukemic CD34(+)CD38(-) cells in acute myeloid leukemia. Blood. 2012 Apr 12;119(15):3571-7.
62. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature. 2006;444(7120):756-60.
63. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. Nat Rev Cancer. 2005 Apr;5(4):275-84.
64. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. Nat Biotechnol. 2007 Nov;25(11):1315-21.
65. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. Nature. 2009 Apr 9;458(7239):780-3.
66. Colak S, Zimberlin CD, Fessler E, Hogdal L, Prasetyanti PR, Grandela CM, et al. Decreased mitochondrial priming determines chemoresistance of colon cancer stem cells. Cell Death Differ. 2014 Jul;21(7):1170-7.
67. Ma S, Lee TK, Zheng BJ, Chan KW, Guan XY. CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. Oncogene. 2008 Mar 13;27(12):1749-58.
68. Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Sep 22;106(38):16281-6.
69. Eramo A, Ricci-Vitiani L, Zeuner A, Pallini R, Lotti F, Sette G, et al. Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. Cell Death Differ. 2006 Jul;13(7):1238-41.
70. Ginestier C, Liu S, Diebel ME, Korkaya H, Luo M, Brown M, et al. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. J Clin Invest. 2010 Feb;120(2):485-97.
71. Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, et al. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. Cell Stem Cell. 2007 Oct 11;1(4):389-402.
72. Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, Chartier C, Raval J, Ngan L, et al. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. PLoS One. 2008;3(6):e2428.
73. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. Cell Stem Cell. 2007 Sep 13;1(3):313-23.
74. Oravecz-Wilson KI, Philips ST, Yilmaz OH, Ames HM, Li L, Crawford BD, et al. Persistence of leukemia-initiating cells in a conditional knockin model of an imatinib-responsive myeloproliferative disorder. Cancer Cell. 2009;16(2):137-48.
75. Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. Nat Rev Cancer. 2008 Jul;8(7):545-54.
76. Jawad M, Seedhouse C, Mony U, Grundy M, Russell NH, Pallis M. Analysis of factors that affect in vitro chemosensitivity of leukaemic stem and progenitor cells to gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in acute myeloid leukaemia. Leukemia. 2010 Jan;24(1):74-80.
77. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. Nat Med. 2006 Oct;12(10):1167-74.
78. Jin L, Lee EM, Ramshaw HS, Busfield SJ, Peoppl AG, Wilkinson L, et al. Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. Cell Stem Cell. 2009 Jul 02;5(1):31-42.
79. Kharas MG, Okabe R, Ganis JJ, Gozo M, Khandan T, Paktinat M, et al. Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice. Blood. 2010 Feb 18;115(7):1406-15.
80. Passegue E, Wagner EF, Weissman IL. JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. Cell. 2004 Oct 29;119(3):431-43.
81. Koo S, Huntly BJ, Wang Y, Chen J, Brumme K, Ball B, et al. Cdx4 is dispensable for murine adult hematopoietic stem cells but promotes MLL-AF9-mediated leukemogenesis. Haematologica. 2010 Oct;95(10):1642-50.
82. Guzman ML, Rossi RM, Neelakantan S, Li X, Corbett CA, Hassane DC, et al. An orally bioavailable parthenolide analog selectively eradicates acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. Blood. 2007 Dec 15;110(13):4427-35.
83. Gal H, Amariglio N, Trakhtenbrot L, Jacob-Hirsh J, Margalit O, Avigdor A, et al. Gene expression profiles of AML derived stem cells; similarity to hematopoietic stem cells. Leukemia. 2006 Dec;20(12):2147-54.
84. Koeffler HP. Is there a role for differentiating therapy in non-APL AML? Best Pract Res Clin Haematol. 2010 Dec;23(4):503-8.
85. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature. 2001 Nov 1;414(6859):105-11.
86. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. Annu Rev Cell Dev Biol. 2007;23:675-99.

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

87. Saito Y, Kitamura H, Hijikata A, Tomizawa-Murasawa M, Tanaka S, Takagi S, et al. Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. Sci Transl Med. 2010 Feb 3;2(17):17ra9.
88. Werbowetski-Ogilvie TE, Bosse M, Stewart M, Schnerch A, Ramos-Mejia V, Rouleau A, et al. Characterization of human embryonic stem cells with features of neoplastic progression. Nat Biotechnol. 2009 Jan;27(1):91-7.
89. Sachlos E, Risueno RM, Laronde S, Shapovalova Z, Lee JH, Russell J, et al. Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells. Cell. 2012 Jun 8;149(6):1284-97.
90. Bruserud O, Gjertsen BT. New strategies for the treatment of acute myelogenous leukemia: differentiation induction--present use and future possibilities. Stem Cells. 2000;18(3):157-65.
91. Lamb J, Crawford ED, Peck D, Modell JW, Blat IC, Wrobel MJ, et al. The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. Science. 2006 Sep 29;313(5795):1929-35.
92. Moreno-Martinez D, Nomdedeu M, Lara-Castillo MC, Etxabe A, Pratcorona M, Tesi N, et al. XIAP inhibitors induce differentiation and impair clonogenic capacity of acute myeloid leukemia stem cells. Oncotarget. 2014 Jun 30;5(12):4337-46.
93. Cornet-Masana JM, Moreno-Martinez D, Lara-Castillo MC, Nomdedeu M, Etxabe A, Tesi N, et al. Emetine induces chemosensitivity and reduces clonogenicity of acute myeloid leukemia cells. Oncotarget. 2016 Apr 26;7(17):23239-50.
94. Lara-Castillo MC, Cornet-Masana JM, Etxabe A, Banus-Mulet A, Torrente MA, Nomdedeu M, et al. Repositioning of bromocriptine for treatment of acute myeloid leukemia. J Transl Med. 2016 Sep 07;14:261.
95. Etxabe A, Lara-Castillo MC, Cornet-Masana JM, Banus-Mulet A, Nomdedeu M, Torrente MA, et al. Inhibition of serotonin receptor type 1 in acute myeloid leukemia impairs leukemia stem cell functionality: a promising novel therapeutic target. Leukemia. 2017 Mar 10.
96. D'Auria FD, Simonetti G, Strippoli V. [Antimicrobial characteristics of a tincture of dequalinium chloride]. Ann Ig. 1989 Sep-Oct;1(5):1227-41.
97. Della Casa V, Noll H, Gonser S, Grob P, Graf F, Pohlig G. Antimicrobial activity of dequalinium chloride against leading germs of vaginal infections. Arzneimittelforschung. 2002;52(9):699-705.
98. Sukhai MA, Prabha S, Hurren R, Rutledge AC, Lee AY, Sriskanthadevan S, et al. Lysosomal disruption preferentially targets acute myeloid leukemia cells and progenitors. J Clin Invest. 2013 Jan;123(1):315-28.

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
ISSN (Online) 1697-4298
Review
analesranf.com

The chromenopyrazole scaffold in the modulation of the endocannabinoid system: a broad therapeutic prospect

Title in Spanish: *Aproximación terapéutica a la contribución del esqueleto de cromenopirazol en la modulación del sistema endocannabinoide*

Paula Morales,[1] Pilar Goya,[1] Nadine Jagerovic[1,*]

[1] Instituto de Química Médica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Unidad Asociada I+D+i IQM/Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, España.

ABSTRACT: The endogenous cannabinoid system (ECS) has been recognized as one of the most important neuromodulatory systems. This system plays a crucial role in the regulation of numerous pathophysiological conditions such as pain, cancer, or neurodegeneration. Despite the vast effort focused on the development of drugs targeting the ECS, thus far, the clinical use of synthetic and phytogenic cannabinoids has been limited to pain, emesis and appetite due to their undesirable psychoactive properties. Therefore, novel strategies to therapeutically exploit the cannabinoids need to be developed to overcome these side-effects. Moreover, novel chemical tools to study the role of possible additional cannabinoid missing receptors, such as GPR55, need to be addressed to fully unravel the pharmacology of this complex system. In this scenario, the chromenopyrazole scaffold was recently discovered as a privileged structure in drug discovery targeting the ECS. In this review, the development of novel modulators of the ECS based on the chromenopyrazole scaffold will be thoroughly discussed. Pharmacological avenues for this novel chemotype, as well as future perspectives will be analyzed.

RESUMEN: El sistema endocannabinoide (SEC) ha sido reconocido por su gran relevancia a nivel neuromodulador. Este sistema juega un importante rol en la regulación de numerosos procesos fisiopatológicos tales como el cáncer, el dolor o la neurodegeneración. A pesar del amplio potencial terapéutico de los ligandos cannabinoides, su actual uso clínico se limita al tratamiento del dolor, la emesis y la mejora del apetito. El problema fundamental asociado al tratamiento con cannabinoides radica en la imposibilidad actual de separar los efectos terapéuticos de la acción psicoactiva. Por tanto, es de gran interés la identificación de nuevos cannabinoides sintéticos con efectos secundarios reducidos. Otros receptores acoplados a proteínas G, como GPR55, también se han propuesto como posibles miembros del sistema endocannabinoide. Sin embargo, esta categorización aún no ha sido confirmada debido a la falta de herramientas farmacológicas que permitan caracterizar apropiadamente las funciones biológicas de GPR55 y su relación con el SEC. En este contexto, se identificó el esqueleto de cromenopirazol como estructura privilegiada para el desarrollo de moléculas capaces de modular el sistema endocannabinoide. En esta revisión, se van a analizar la farmacología y las oportunidades terapéuticas ofrecidas por los diversos derivados de cromenopirazol descritos hasta la fecha. Posibles perspectivas y aplicaciones futuras así como nuevas aproximaciones serán también consideradas.

[*]**Corresponding Author:** nadine@iqm.csic.es
Received: March 21, 2018 **Accepted:** March 30, 2018
An Real Acad Farm Vol. 84, Nº 2 (2018), pp. 164-184
Language of Manuscript: English
Premio Colegio Oficial de Farmacéuticos en el Concurso Ciéntifico 2017 de la RANF.

1. INTRODUCTION

Over the centuries, the pharmacological effects of preparations from the plant *Cannabis sativa* have been utilized for recreational and medicinal purposes. Due to its psychoactive effects and despite its traditional medicinal use, cannabis did not gain a wide and lasting acceptance as a valuable drug. Different active substances isolated from *Cannabis sativa* were identified and characterized in the mid-last-century (1). Modern research studies on cannabis started with the structural characterization of tetrahydrocannabinol (Δ^9-THC, figure **1**) by Mechoulam in 1964 (2). More than 100 phytocannabinoids have been isolated from the plant. They all have in common typical C21 terpenophenolic skeleton o derivative chemical

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

structures that can be classified in 11 families: Δ^9-THC, Δ^8-THC, cannabigerol (CBG), cannabichromene (CBC), cannabidiol (CBD), cannabinodiol (CBND), cannabielsoin (CBE), cannabicyclol (CBL), cannabinol (CBN), and cannabitriol (CBT), miscellaneous-type cannabinoids. Whereas Δ^9-THC is the most abundant and main psychoactive constituent of cannabis, CBD, the second most abundant, is a non-psychotropic substance (3). However, Δ^9-THC has attracted much attention since its discovery. Thus, a considerable amount of pharmacological studies was done on its activity supporting its value as therapeutic agent and that, before the discovery of the endocannabinoid system (ECS).

Over the past three decades, the ECS has emerged as a promising therapeutic target. Two G-protein coupled receptors (GPCRs), the cannabinoid receptors type 1 (CB_1R) and type 2 (CB_2R), and their endogenous lipid ligands were identified in the 1990s as the main constituents of the ECS. CB_1R is highly expressed in the central nervous system (CNS) modulating numerous physiological processes such as cognition, emotion or pain control. This receptor is also localized in the peripheral tissue (liver, kidney, or lung among others) where it modulates energy balance and metabolism (4). On the other hand, CB_2R is mainly expressed in the immune system, the gastrointestinal tract and in certain neuronal subpopulations. Interestingly, the expression of CB_2R in the CNS is upregulated upon neuroinflammatory stimuli, what confers to this receptor an important role in the treatment of neurodegenerative disorders (5).

The orphan receptors GPR18 and GPR55 have also been proposed as potential members of the ECS (6). Unfortunately, the current lack of pharmacological tools to study these receptors is delaying the understanding of their relation with the cannabinoids.

It is widely demonstrated that compounds targeting the ECS have therapeutic potential for the clinical management of an ever growing number of disorders (7). These include inflammatory and neuropathic pain, neurological pathologies, metabolic syndrome, or cancer among others (8–10). The only cannabinoids on clinical use today are the phytocannabinoids Δ^9-THC and CBD, and the Δ^9-THC synthetic derivative nabilone, which are approved for pain, emesis and appetite disorders. Taking into account the fact that these compounds lack of CB_1R/CB_2R selectivity, identifying new synthetic selective cannabinoids is of great interest. These novel entities should be exempt of the undesirable psychotropic effects related to the activation of brain CB_1R to have greater opportunity to be explored as cannabinoid-based medicines.

Numerous cannabinergic ligands have been described thus far. Besides the phytocannabinoids previously detailed, other modulators of the cannabinoid receptors proceeding from endogenous or synthetic sources have been identified. These compounds present very different chemical structures and pharmacological profiles.

Endogenous cannabinoids, endocannabinoids, comprise a family of polyunsaturated fatty acids that structurally differ from phytocannabinoids. These molecules, are lipid neurotransmitters that mediate retrograde signal from postsynaptic neurons to presynaptic ones targeting CBRs (11). Among the most abundant endocannabinoids identified so far are anandamide [*N*-arachidonoylethanolamine (AEA), figure **1**], and 2-arachidonoylglycerol (2-AG, figure **1**).

In addition, the interest gained by the ECS as valuable target for drug discovery led to the synthesis of numerous cannabinoid ligands in the last years. The development of synthetic endocannabinoid and phytocannabinoid analogues, as well as chemically diverse scaffolds, offered novel pharmacological opportunities in this field. Among the most remarkable synthetic cannabimimetics discovered are the well-known aminoalkyindole *R*-(+)-WIN55,212-2 (figure **1**), and the synthetic phytocannabinoid CP55,940 (figure **1**). Both of them are very potent CB_1R/CB_2R agonists that have been extensively used to investigate the endocannabinoid system. Another compound that has significantly contributed to the understanding of the cannabinoid receptors is the arylpyrazole SR141716A (Rimonabant, figure **1**) (12). This compound is a potent CB_1R antagonist/inverse agonist which therapeutic potential was confirmed for the management of obesity (13), however, it also triggers undesired side effects.

Other classes of ligands that exhibit interesting cannabinoid activity have also been developed by pharmaceutical companies and academic research groups. For instance, indole-2-carboxamides, such as the CB_1R allosteric modulator ORG27569 (14), or CB_2R ligands derived from the 1,8-naphthyridine-3-carboxamide scaffold (15,16), were developped.

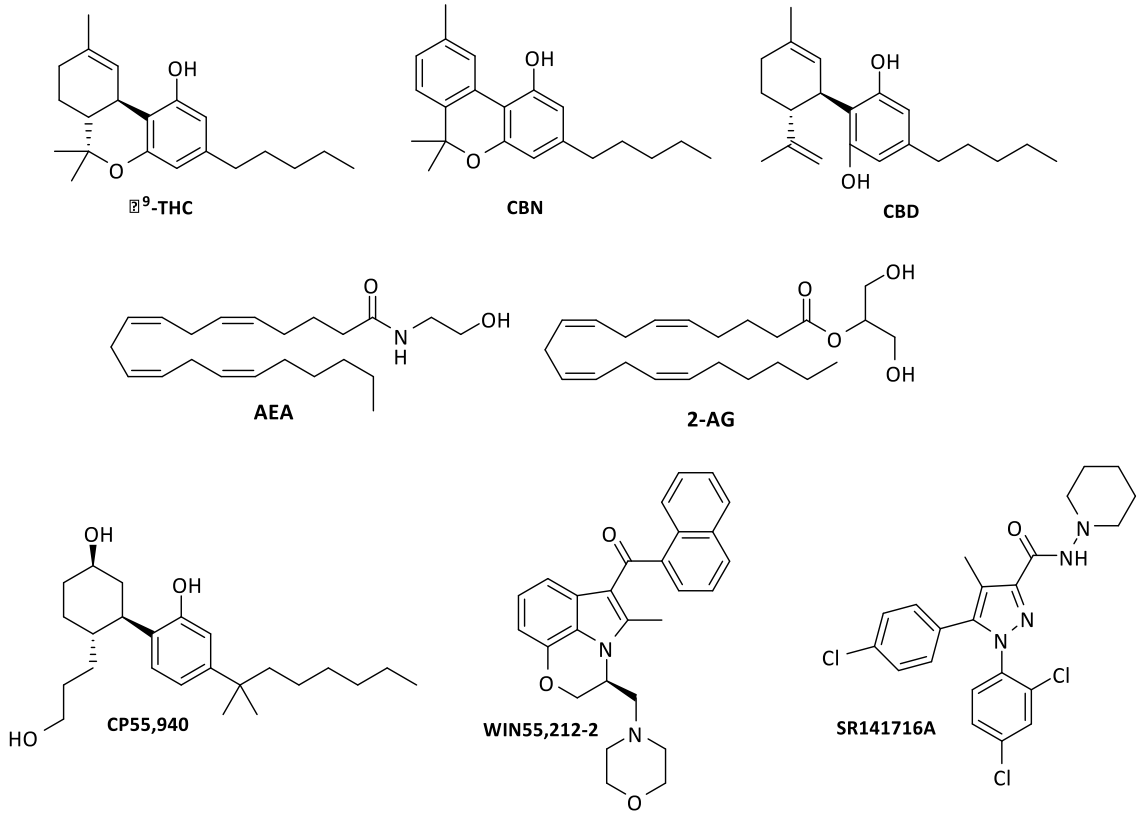
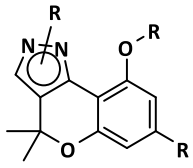


Figure 1. Structure of selected cannabinoid ligands: phytocannabinoids (Δ^9-THC, CBN, and CBD); endocannabinoids (AEA and 2-AG); synthetic derivatives (CP55,940, WIN55,212-2 and SR141716A).

The chromenopyrazole appears in the field of cannabinoid analogues in 1985, before the discovery of the cannabinoid receptors (17). The authors described them as heterocyclic-fused benzopyrans, reported their synthesis, and concluded that these compounds had no interesting levels of activity in the CNS. In 2012, the chromenopyrazole scaffold was re-explored as a cannabinoid chemotype taking advantage of the progress realized in the understanding of the ECS (figure **2**). This tricyclic structure was designed in analogy to the classical cannabinoid cannabinol (CBN), bearing a benzopyran moiety but exploring for the first time the contribution of a pyrazole ring in place of the CBN´s phenyl group.



Chromenopyrazole Scaffold

Figure 2. General structural features of the chromenopyrazole scaffold.

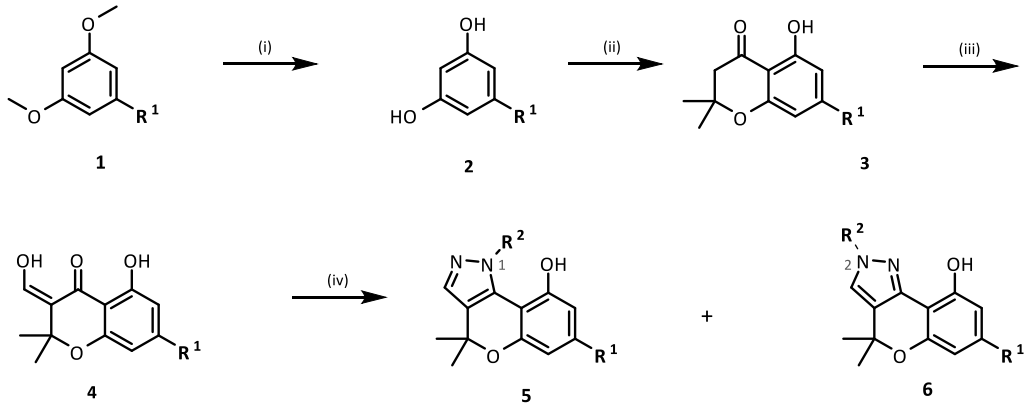
Since then, different strategies to target the ECS under diverse pathological conditions have driven the exploration of structural modifications of this tricyclic core. Structure-activity relationships as well as the rational understanding of ligand-receptor interactions helped fine-tuning the potential of the chromenopyrazole scaffold targeting diverse pathological conditions. This work, critically reviews the findings obtained so far offering future perspectives for the use of this versatile scaffold to continue unraveling the complex pharmacology of the ECS.

2. CB_1R SELECTIVE LIGANDS: APPLICATION IN PAIN

As previously mentioned, the psychotropic side-effects of cannabinoid receptor agonists have limited their exploitation as medications. These unwanted properties are mediated by the CB_1Rs located in the CNS, therefore, a strategy to selectively target CB_1Rs located outside the brain is the development of peripherally restricted ligands.

In an effort to identify novel cannabinoids, the chromenopyrazole scaffold was discovered by introducing a pyrazole ring to the benzopyran core of classical phytocannabinoids (18). The synthesis of these reported molecules is summarized in scheme **1**.

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain



Scheme 1. Synthesis of chromenopyrazoles. Reaction conditions: **(i)** BBr_3, CH_2Cl_2, overnight, 0 ºC-r.t.; **(ii)** 3,3-dimethylacrylic acid, methanesulfonic acid, P_2O_5, 8 h, 70 ºC, **(iii)** a) NaH, THF, MW, 25 min, 45 ºC; b) ethyl formate, MW, 25 min, 45 ºC; **(iv)** corresponding hydrazine, EtOH, 1-4 h, 40 ºC. R^1: pentyl or 1,1-dimethylheltyl; R^2: hydrogen, methyl, ethyl, or dichlorophenyl (18).

Briefly, these compounds were prepared from the resorcinol (**2**) previously obtained after demethylation of the corresponding 1,3-dimethoxybenzene (**1**) with boron tribromide. Chromanone **3** was obtained by treatment of the resorcinol with 3,3-dimethylacrylic acid in presence of phosphorous pentoxide (19). Subsequent α–formylation of the chromanones under microwave conditions using sodium hydride followed by the addition of ethyl formate yielded **4**. Finally, condensation of the β-ketoaldehyde (**4**) with the appropriate hydrazine gave the *N*1- and *N*2-substituted chromenopyrazoles regioisomers (**5** and **6**) with different relative ratios.

The synthesized compounds were evaluated *in vitro* for their ability to displace the radioligand [^{3}H]CP55,940 from human CB_1R and CB_2R (18). These affinity binding assays revealed that among the lipophilic alkyl chains tested at R^1, aliphatic pharmacophoric position in phytocannabinoids, the 1,1-dimethylheptyl group is clearly preferred. Pentyl alkyl side chains lead to weaker binders or compounds that do not have affinity at all for these receptors. However, the 1,1-dimethylheptyl analogues display significant to high affinity and selectivity for CB_1R (CB_1R K_i: 4.5–28.5 nM; CB_2R K_i: >40000 nM). In what concerns the substitution on the pyrazole ring or the nature of the R^2 substituents, the affinity values remained similar among 1,1-dimethylheptyl analogues (18). Figure **3** summarizes the structural features of this series of compounds in relation to their cannabinoid receptor affinity.

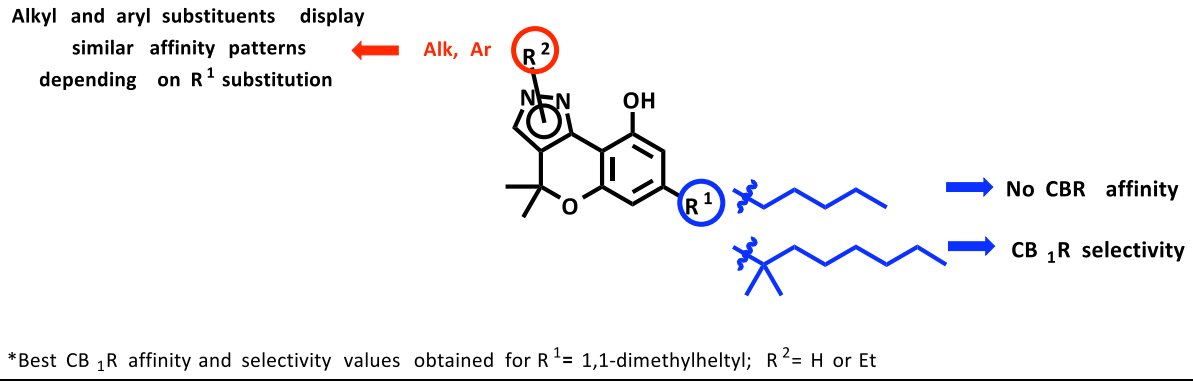
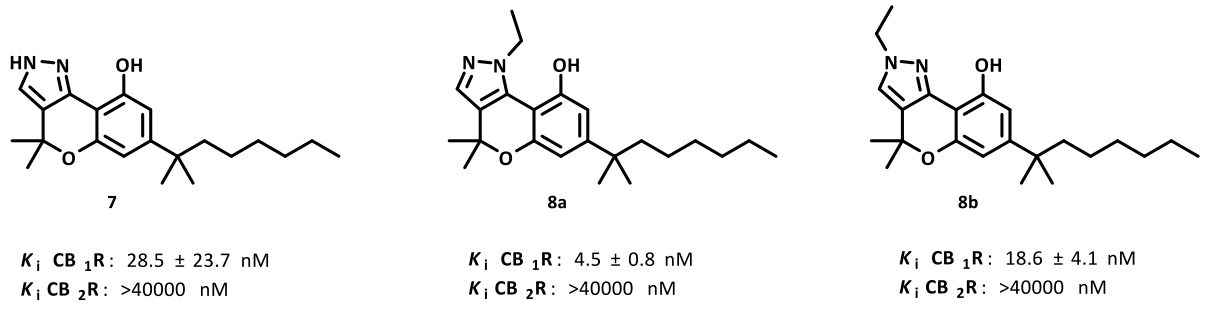


Figure 3. Summary of chromenopyrazole structural features related to CBR affinity.

Mouse vas deferens functional assays were performed with the compounds that exhibit higher binding affinities (**7**, **8a**, and **8b**, figure **4**). These chromenopyrazoles inhibited the electrically evoked contractile response of this tissue confirming their agonistic properties (18). The most potent and effective agonist (**8a**) was then tested in the cannabinoid mouse tetrad. This *in vivo* behavioral test indicates if a compound has CNS-mediated effects. Compound **8a** did not induce modifications in any of the tetrad parameters at doses up to 10 mg/kg which indicates that it is not acting in the brain, and thus, not readily crossing the blood–brain barrier.



K_i CB $_1$R: 28.5 ± 23.7 nM
K_i CB $_2$R: >40000 nM

K_i CB $_1$R: 4.5 ± 0.8 nM
K_i CB $_2$R: >40000 nM

K_i CB $_1$R: 18.6 ± 4.1 nM
K_i CB $_2$R: >40000 nM

Figure 4. Structure and affinity of the three more potent and selective CB_1R ligands of the first chromenopyrazole series (18).

In a further approach to evaluate the therapeutic potential of the peripheral CB_1R agonist **8a**, this chromenopyrazole was tested in a rat model of orofacial pain. Interestingly, compound **8a** showed a remarkable antinociceptive response probably mediated by peripheral mechanisms.

To sum up, in this study, the chromenopyrazole scaffold was reported for the first time opening new avenues in the cannabinoid chemistry scenario. Among this first series of chromenopyrazoles, non-psychoactive and selective CB_1R agonists with peripheral antinociceptive properties were identified (18).

3. TOWARDS CB_2R SELECTIVITY: APPLICATION IN NEURODEGENERATIVE DISEASES

A second approach to pursue the separation of the therapeutic effects of cannabinoids from their psychotropic effects is the search of CB_2R selective ligands. Although CB_1R is the main receptor of the CNS, the presence of CB_2R in microglia and neuronal cells as well as its role in the immune system (20–22), suggest the possibility to use CB_2R agonists to treat certain neurological conditions without psychotropic unwanted effects (23,24). The role of the CB_2R in the CNS is closely related to neuronal damage, particularly inflammatory. Therefore, as suggested by numerous studies, CB_2R represents a promising target for alleviating the neuronal deterioration and neuroinflammation triggered by neurodegenerative diseases (5,23).

In an attempt to target the CB_2R, different structural modifications on the chromenopyrazole scaffold were accomplished while retaining the 1,1-dimethylheptyl aliphatic chain that provided better results in the previous study. In this case, the conversion of the phenolic hydroxyl, a pharmacophoric moiety of classical cannabinoids, to different alkoxy groups was explored. Moreover, different pyrazole substituents as well as bioisosteric replacement of the pyrazole by an isoxazole were also intended for further fine-tuning of CBRs affinity and selectivity (25).

The synthesis of these chromenopyrazoles has been reported to be achieved by alkylation of the phenolic oxygen of the chromenopyrazoles described in the previous section with the corresponding alkyl halides. The bioisosteric replacement by an isoxazole moiety, was obtained upon condensation of the β-ketoaldehyde (**4**) with hydroxylamine hydrochloride (25).

Figure **5** provides an overview of the affinity trends that can be featured from the radioligand binding assays of these chromenopyrazoles at the cannabinoid receptors CB_1R and CB_2R (25). As detailed in the previous section, chromenopyrazoles bearing a free phenolic hydroxyl group display CB_1R affinity and selectivity. Phenolic alkylation of these compounds causes a drastic loss of CB_1R affinity, whereas high CB_2R selectivity was achieved with alkoxychromenopyrazoles derivatives. These results suggest that the phenolic hydroxyl may play a crucial role in CBR selectivity.

Another relevant conclusion extracted from reported structure-activity relationship (SAR) is that the nature of the pyrazole substituent influences the affinity for the cannabinoid receptors. In general, alkyl groups showed better affinity for CB_2R compared to aryl substituents. Bioisosteric replacement of the pyrazole by an isoxazole results in cannabinoid ligands with affinity in the nanomolar range. Upon phenolic alkylation, chromenoisoxazoles follow the same affinity pattern observed for the chromenopyrazoles.

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

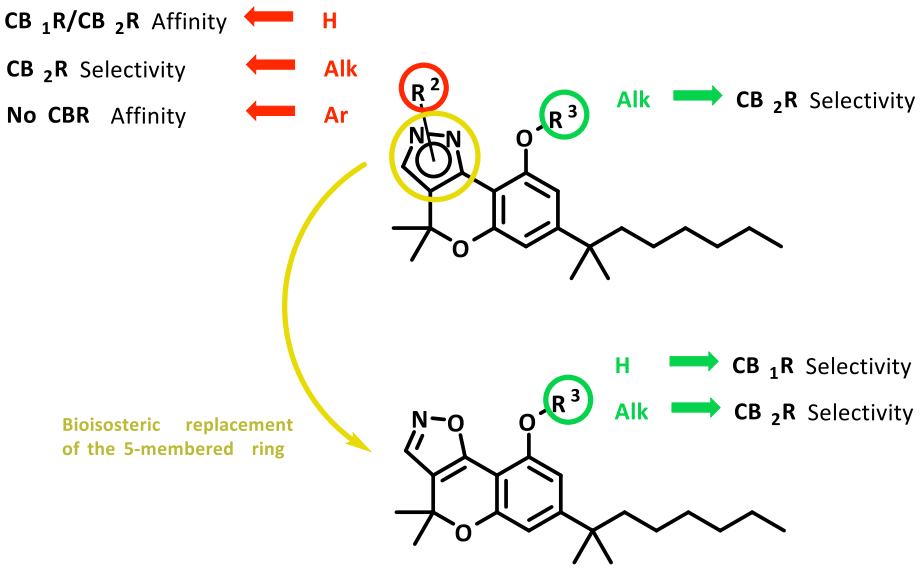
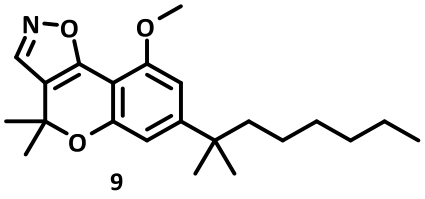


Figure 5. Summary of alkoxychromenopyrazole and chromenoisoxazoles structural features related to CBR affinity.

Among these novel compounds, CB_2R selective ligands with the best affinity values (K_i < 100 nM) were selected for functional appraisal. Most of these ligands showed CB_2R full agonism in forskolin-stimulated cAMP accumulation experiments and GTPγS binding assays exhibiting potency values in the nanomolar range. The most potent and efficacious ligand of this series is the chromenoisoxazole **9** (figure **6**), which displays higher CB_2R selectivity and potency than well-known cannabinoid agonists such as HU308 or JWH133 (25).



9

CB 2R Selective Agonist

K_i **CB 1R**: >40000 nM
K_i **CB 2R**: 12.8 ± 2.4 nM

cAMP assays : EC_{50}: 4.2 ± 1.5 nM; E_{max}: 101%
GTP γS assays : EC_{50}: 38.6 ± 6.7 nM; E_{max}: 98%

Figure 6. Cannabinoid receptor affinity and functional data of the most potent and efficacious CB_2R ligand of this series (chromenoisoxazole **9**).

Selected compounds of this series were investigated from a molecular modeling perspective in order to understand the governing ligand-receptor interactions that trigger CBR affinity and selectivity. Docking studies revealed that the presence of the pyrazole or isoxazole moiety as well as the phenolic oxygen play a crucial role in the binding mode of these compounds to the active state models of CB_1R and CB_2R. For CB_1R affinity, the phenolic lone pair need to be accessible to hydrogen bond with K3.28(192), as in phenols **7**, **8a** or **8b**. *O*-alkylation of the initial phenolic hydroxyl of the scaffold leads to selective CB_2R ligands (figure **5**). This might be due to the different orientation and low accessibility of the lone pair of electrons of the phenolic oxygen, essential for CB_1R activation. The steric hindrance generated by the *O*-substituent in the CB_1R binding site impacts their affinity towards this receptor; however, it clearly enables CB_2R activity. Substituted phenols align in the proper orientation in the CB_2R binding site leading to an interaction of S6.58(268) with the ligand pyran oxygen (25). These structural studies might lead to further fine-tuning of this versatile scaffold.

In order to evaluate the therapeutic potential of the promising CB_2R selective agonist, chromenoisoxazole **9**, additional *in vitro* and *in vivo* assays were performed. To evaluate its neuroprotective profile, **9** was tested in an *in vitro* model of neuronal death determining the cell viability of a neuronal cell line (M213-2O) upon neuroinflammatory stimuli (26). Interestingly, compound **9** showed a dose-dependent neuroprotective effect, and therefore, its potential was evaluated in an *in vivo* model based on mitochondrial damage and inflammation. This model, which is reminiscent of Huntington's disease (HD), is generated by intrastriatal application of malonate toxicity in rats. The administration of this chromenoisoxazole clearly decreased the volume of the striatal lesion as confirmed by histopathological studies (26). Moreover, it was demonstrated that these neuroprotective effects were mediated by the ability of **9** to activate CB_2R (effect reversed by administration of CB_2R

antagonists).

Additionally, chromenoisoxazole **9** was tested in a murine model of multiple sclerosis (MS) induced by TMEV. The Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) triggers a late-onset demyelinating disease which presents similar neuroinflammatory processes to human MS. During the acute inflammatory phase, compound **9** was intraperitoneally administered at a dose of 5 mg/kg during 7 days. Treatment with **9** led to a remarkable reduction of inflammatory events in TMEV-infected mice (25). All these studies demonstrate that chromenoisoxazole **9** has an outstanding neuroprotective profile due to its capacity to selectively activate CB_2R.

In summary, novel fully selective CB_2R agonists were identified through optimization of the chromenopyrazole scaffold. The lead compound of this series, chromenoisoxazole **9**, has shown antiinflammatory and neuroprotective properties *in vitro* and *in vivo* in various neurological disorders (murine and rat models of MS and HD) (25,26). This molecule presents a promising potential for further drug development, in particular, for the treatment of neurodegenerative pathologies.

4. A DUAL APPROACH: TARGETING CANCER WITH CANNABINOID-QUINONES

The development of new effective and safe antitumor treatments that improve the aggressive current chemotherapies remains an unmet clinical need. Cancer is one of the most prevalent diseases and its incidence is dramatically increasing (27). Within this pathological panorama, the endocannabinoid system emerges as a promising anticancer target involved in the modulation of the main hallmarks of this disease.

Δ^9-THC and its synthetic derivatives have long been known for their palliative effects in cancer patients. In the middle 1980´s, dronabinol (Marinol®) and nabilone (Cesamet®) were approved for the management of chemotherapy-induced nausea and emesis (28). Their orexigenic properties and their ability to alleviate pain associated with cancer have also been widely evidenced (29–34). However, nowadays, they are only prescribed in some countries after conventional anti-emetics fail (35,36).

Besides the aforementioned palliative potential of cannabinoids, more recent research revealed that these molecules exhibit antitumor effects in numerous *in vitro* and *in vivo* experimental models of cancer (37–39). The activation of cannabinoid receptors on cancer cells modulates signaling pathways implicated in cell proliferation and survival. Even though the underlying mechanisms are not fully unraveled, there is significant evidence for the involvement of at least four mechanisms: direct inhibition of transformed-cell growth through the suppression of mitogenic signal, induction of apoptosis, inhibition of tumor angiogenesis and metastasis (40).

The biological role of the ECS in cancer physiopathology is quite complex and far from being completely understood. In fact, this endogenous system is upregulated in neoplasms compared with non-tumor tissue (38,40–42). However, these observations are tumor type-specific and therefore, further research is needed to understand the regulation of cannabinoid receptor expression in each type of cancer (37,41).

With regard to the clinical translation of the antitumor properties of cannabinoids, a pilot clinical trial has been reported so far (43), whereas a few more are presently in progress. In this phase I pilot trial, the effects of intratumoral administration of Δ^9-THC were studied in nine patients with glioblastoma multiforme, who had failed surgical therapy and radiotherapy and exhibited clear evidence of tumor progression. The results obtained in this study suggested that cannabinoid treatment reduced tumor growth rate (43). Nonetheless, more extensive clinical studies are needed to extract significant conclusions that reinforce the potential utility of cannabinoids as anticancer therapeutics.

Among other pharmacological approaches for cancer treatment, cytotoxic quinones represent an important group of antineoplastic drugs. Antitumor properties of quinones have been widely reported and are still the focus of much research (44,45). The cytotoxic activity of quinoid derivatives can be accounted for their fast redox cycling potential and Michael acceptor properties (46–48). Even though their mechanism of action is not completely understood, several mechanisms have been suggested. Most investigations propose different combinations of DNA intercalation (49), topoisomerase inhibition (50), DNA alkylation (51,52), and induction of reactive oxygen species (ROS) (53) depending on the compound structural features.

Many of the drugs clinically approved or still in clinical trials against cancer are quinone-related compounds (figure **7**). The quinoid moiety is present in anthracyclines which are among the most used anticancer drugs ever developed (44). Daunorubicin (Cerubidine®) and doxorubicin (Adriamycin®), the most prominent members of this class of antitumor agents, are clinically used in the therapy of solid cancers as well as hematological malignancies (54). Likewise, mitoxantrone (Novantrone®), a dihydroxyanthracenedione, is approved for the treatment of certain types of neoplasms such as metastatic breast cancer, acute myeloid leukemia, and non-Hodgkin's lymphoma (55). Bioreductive alkylating agents such as mitomycin C and its derivatives also display remarkable antitumor effects. Mitomycin C, a potent DNA crosslinker, is a FDA approved drug for the treatment of solid tumors (56,57). Additionally, β-lapachone, an *ortho*-naphthoquinone, originally isolated from a tree, is also being evaluated for its cancer growth inhibitory properties in diverse tumors (44). Even though in many cases the antitumor mechanisms remain uncertain, it is unquestionable that the presence of the quinone moiety is exceptionally remarkable in the development of new anticancer drugs.

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

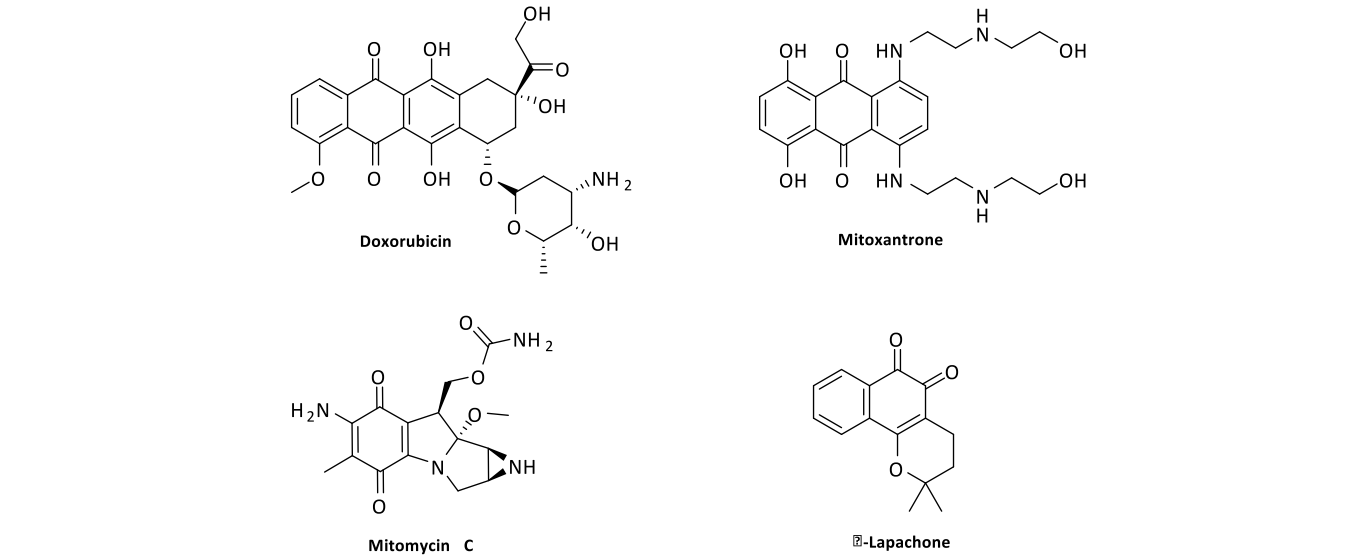


Figure 7. Some examples of quinoid compounds with antitumor activity.

Since cancer is a complex multifactorial disease, successful treatment of neoplasms often requires pharmaceutical intervention at multiple pathways. This is generally accomplished by using a combination of different drugs. However, a very attractive and promising approach is to target different anticancer modes of action in a single molecule (58–60). In this context, *ortho* and *para* cannabinoid-quinones were recently reported in the literature (61–64). They were designed using the chromenopyrazole scaffold as structural core (chromenopyrazolediones, figure **8**).

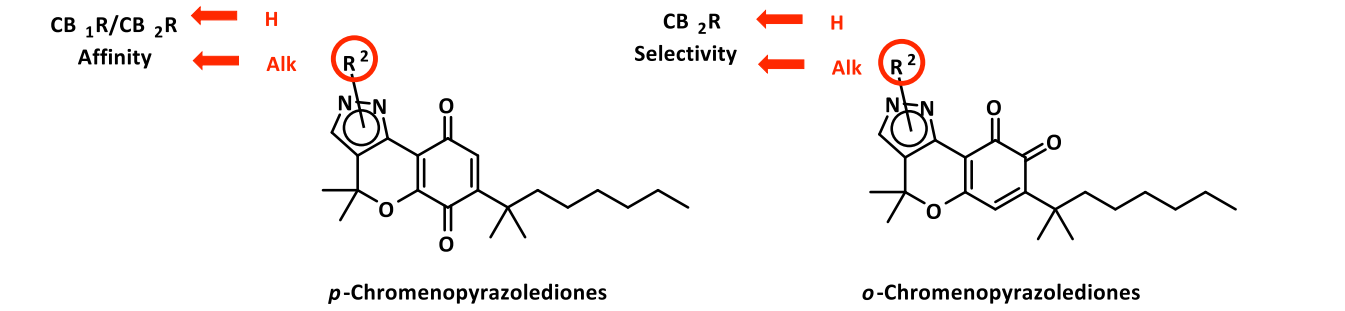


Figure 8. General structure of *ortho* and *para*-chromenopyrazolediones and their related CBR affinity.

The synthesis of these novel quinone derivatives was achieved by regio-controlled oxidation of the phenolic chromenopyrazoles (**5** and **6**, scheme **1**) to the corresponding 1,2- or 1,4-quinones using with hypervalent iodine reagents (63–65). The redox potential of selected chromenopyrazolediones was confirmed by cyclic voltammetry and electron spin resonance (63). In addition, as reported for previous chromenopyrazole derivatives (sections 2 and 3), their binding affinity to human CB_1R and CB_2R was tested. As summarized in figure **8**, *para*-chromenopyrazolediones display affinity for both receptors, CB_1R and CB_2R, in the low micromolar range. Interestingly, the unsubstituted pyrazole derivative (compound **11**, figure **10**) stands out showing better affinity values at both receptors. On the other hand, *ortho*-chromenopyrazolediones are fully selective towards CB_2R with affinity in the submicromolar range (63,64). Their lack of affinity for the CB_1R (higher than 40 µM) eliminates any psychotropic side effect that could be derived from activation of central CB_1R.

It is noteworthy that chromenopyrazolediones were the first cannabinoid structure-related quinones able to bind to the cannabinoid receptors. The only quinones related to cannabinoid structures (quinones of CBD, THC, and CBN) reported previous to the chromenopyrazole derivatives, did not display affinity for the cannabinoid receptors (66).

The biological activity of these phytocannabinoid quinones, was attributed to their quinoid structure (67,68) independently of their cannabinoid character, since they do not bind to CB_1R or CB_2R.

The antitumor potential and the mechanism of action of the reported chromenopyrazolediones derivatives were evaluated *in vitro* and *in vivo* in different cancer models. In particular, their antiproliferative activity was explored in two highly prevalent cancers: Triple Negative Breast Cancer (TNBC) and Prostate Cancer (PC). In both cases, the endocannabinoid system has been proved to be upregulated under these neoplastic conditions, and therefore, it represents an appropriate target.

4.1 Chromenopyrazolediones for Triple Negative Breast Cancer (TNBC)

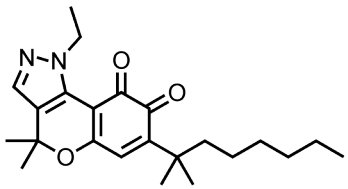
According to the World Health Organization, breast cancer is among the most common malignant diseases and the second leading cause of cancer death among Western women (69). Despite recent advances in earlier detection and adjuvant systemic therapies, mortality rates remain very high due to the emergence of refractory tumors associated with multidrug resistance.

From an immunopathological perspective, there are three main breast cancer subtypes: hormone receptor-positive, HER2-positive (human epidermal growth factor receptor 2) and triple-negative tumors. Triple-negative breast cancers (TNBC) are defined by the absence of immunohistochemical expression of estrogen, progesterone, and HER2 receptors. Although this molecular subtype of breast cancer accounts for a low percentage of all breast tumors, it represents a vast number of deaths (70). TNBC show aggressive clinical behavior, this fact, along with the lack of available targeted therapies, leave these patients with a bad prognosis (70–73). Chemotherapy with its well-known side effects is currently used as systemic treatment for this cancer (74). For that reason, the discovery of new targets and drugs for the treatment of this disease is an urgent and essential clinical challenge.

Recent evidence suggests that cannabinoid receptors are overexpressed in human breast cancer biopsies (42,75,76). Further insights into the endocannabinoid upregulation have demonstrated a correlation between CB_2R expression and tumor aggressiveness in triple-negative breast cancer cells (42). The putative novel cannabinoid receptor GPR55 is also highly expressed in these carcinomas (77). Consequently, the ECS represents a promising target for the treatment of TNBC (78,79).

In this context, the antiproliferative potential of the recently reported cannabinoid-quinones derived from the chromenopyrazole scaffold was explored in models of this highly aggressive breast cancer.

Cell viability, using a human derived triple-negative breast cancer cell line, MDA-MB-231, was evaluated after treatment with increasing doses of the novel *para* and *ortho*-chromenopyrazolediones. All the tested cannabinoid-quinones displayed growth inhibitory effects on triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells, displaying low micromolar IC_{50} values. The *para* and *ortho*-chromenopyrazolediones bearing an ethyl R substituent in the pyrazole (figure **8**) are the most potent inhibitors of cell proliferation with IC_{50} values of 2.5 and 2.8 μM respectively. Because of its antiproliferative capacity and its CB_2R selective profile, compound **10** (figure **9**) was selected for additional mechanistic and *in vivo* investigations (64).



10

K_i CB_1R: >40000 nM
K_i CB_2R: 529 ± 26 nM

Cell viability MDA-MB-231: IC_{50}: 2.8 ± 0.5 μM

Cell viability HMEC: IC_{50} >30 μM

Figure 9. Cannabinoid receptor affinity and half-maximum inhibitory concentrations (IC_{50}) in MDA-MB-231 of *ortho*-chromenopyrazoledione **10**.

Compound **10** was further tested in normal Human Mammary Epithelial Cells (HMEC). Interestingly, at doses up to 30 μM, this cannabinoid-quinone did not exhibit cytotoxicity in HMEC. This selective toxicity towards cancer cells versus non-transformed mammary cells is essential for the development of safer chemotherapies for TNBC.

Deeper studies into the antitumor mechanism of action of this compound were accomplished in MDA-MB-231 cells (64). According to these experiments, CB_2R activation and the generation of reactive oxygen species (ROS) are tightly involved in the antiproliferative action of compound **10**. Conversely, as expected, neither CB_1R nor GPR55 mechanisms seem to be involved in the cytotoxic effects of chromenopyrazoledione **10** (64).

Further evaluation of the cellular mechanism underlying the antiproliferative effect of compound **10** led to examine the involvement of caspase-3 in MDA-MB-231 cells. Western immunoblotting studies showed the procaspase-3 cleavage into caspase-3 confirming the proapoptotic effect of cannabinoid quinone **10** on this triple-negative breast cancer cell line (62,64).

Chromenopyrazoledione **10** was then evaluated in a murine model of TNBC. Tumor xenografts were generated in nude mice by subcutaneous inoculation of MDA-MB-231 human breast adenocarcinoma cells. After four weeks of intraperitoneal treatment with 2 mg/kg, compound **10** showed to effectively reduce the growth of triple-negative xenografts in this animal model. Histopathological analysis of treated mice revealed that compound **10** did not generate signs of toxicity in organs such as liver, spleen, lung, heart, or colon. Volume and weight of final tumors was significantly lower in all cases (64).

Summarizing, through this approach, the chromenopyrazole scaffold has been optimized following a dual target anticancer strategy focused on triple-negative breast cancer. Cannabinoid quinone **10** was discovered as a selective CB_2R agonist with potent antiproliferative

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

effects *in vitro* and *in vivo*. Its ability to selectively decrease viability in cancer *versus* normal cells, along with its striking antitumor capacity, open novel therapeutic avenues for the exploitation of the chromenopyrazole moiety in cancer physiopathology. In view of these results, chromenopyrazoledione **10** can be considered a new anticancer drug candidate offering hope for the treatment of TNBC.

4.2. Chromenopyrazolediones for Prostate cancer (PC)

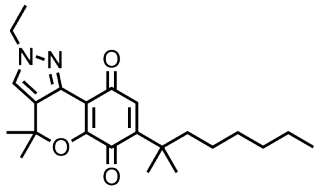
Prostate cancer (PC) is the second most common cancer worldwide for Western men. The rates are increasing in recent years since life expectancy is longer (80). Even though most prostate cancers grow slowly, aggressive cases are also diagnosed. These oncogenic cells may metastasize to other parts of the body such as bones and lymph nodes (81). Therefore, there are extensive ongoing efforts to develop new therapeutic strategies to treat prostate cancer (82).

The basis of medical treatment for advanced prostate cancer is androgen deprivation therapy (ADT), intended to lower testosterone levels. However, the reduction of clinical symptoms and tumor growth is accompanied by systemic consequences of testosterone deficiency such as osteoporosis, gynecomastia, anemia and insulin resistance among others (83,84). Androgen deprivation is associated with a gradual transition of prostate cancer cells through a spectrum of androgen dependence, androgen sensitivity, and ultimately androgen independence. Too often the appearance of hormone refractory cancer cells eventually leads to the recurrence of cancer which turns to a hormone-independent state. This type of prostate cancer has a more aggressive phenotype and is unresponsive to further hormonal therapy whereby prognosis is very poor. Therefore, to find a treatment which could reduce or block both types of prostate cancer would be a very good challenge to move forward.

The ECS is also deregulated on the course of this pathology. The expression of cannabinoid receptors has been studied in prostate cancer tissue. It was demonstrated that CB_1R expression is upregulated in these neoplasms (85). Indeed, high CB_1R immunoreactivity score in prostate cancer tissue is associated with prostate cancer severity and outcome (86). Moreover, expression of FAAH (87) and GPR55 (88) is demonstrated in some prostate carcinoma cell lines. In line with these observations, different endocannabinoids or cannabis-like compounds were evaluated exhibiting their ability to inhibit prostate cancer cell proliferation and produce apoptosis through cannabinoid receptor mechanisms (89). The dysregulation of this system correlates with prostate cancer grade and progression. Therefore, modulation of the ECS may offer novel therapeutic avenues for prostate cancer as well (90,91).

Because of the aforementioned expression patterns in prostate cancer, CB_1R agonists should provide a new therapeutic approach for this type of cancer. Therefore, among the series of chromenopyrazolediones previously described (figure **8**), the *para*-quinone derivatives, which bind to CB_1R, were selected for their evaluation in prostate cancer-derived cell lines (63).

Cell viability assays in androgen-dependent (LNCaP) and androgen-refractory (PC-3) prostate cancer cell lines revealed that these cannabinoid-quinones exhibit antiproliferative effects with IC_{50}s in the micromolar range. Compound **11** (figure **10**), which is the most potent among the derivatives tested, displayed an IC_{50} of 15 μM in both LNCaP and PC-3 prostate cancer cells.



11

K_i CB_1R: 324 ± 235 nM
K_i CB_2R: 134 ± 21 nM

Cell viability LNCaP: IC_{50}: 15 μM

Cell viability PC3: IC_{50}: 15 μM

Figure 10. Cannabinoid receptor affinity and half-maximum inhibitory concentrations (IC_{50}) in LNCaP and PC3 cancer cell lines of *para*-chromenopyrazoledione **11**.

Further analysis of chromenopyrazoledione **11** indicated that it induces cell death through apoptosis, being more efficient in the androgen-sensitive LNCaP cell line. At a molecular mechanistic level, the cytotoxicity of **11** was shown to be mediated through CB_1R, oxidative stress and modulation of the nuclear receptors PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptors) receptors (63).

In vivo studies of *para*-quinone **11** confirmed the results obtained *in vitro*. Treatment with **11** at a dose of 2 mg/kg totally inhibited the growth of androgen-dependent prostate tumor xenografts in mice.

The results obtained for *para*-chromenopyrazoledione **11** validated the antiproliferative capacity of chromenopyrazole-derived cannabinoid quinones, and therefore, the cannabinoid/ROS antitumor proof-of-concept.

4.2a *Porphyrin conjugate strategy*

In the field of cancer therapy, strategies have been explored during these last years in which porphyrins are conjugated to molecules showing preferential accumulation for tumor tissues or having affinity for receptors expressed in tumors (92).

Porphyrin derivatives constitute the central element of

an effective and minimally invasive cancer therapy called photodynamic therapy (PDT) (93,94). PDT uses a photosensitizing drug, generally a porphyrin derivative, in combination with visible light irradiation. In presence of the oxygen accumulated in tumors, the photoactive sensitizer triggers a series of photochemical processes that lead to direct cancer cell death and tumor microvascular damage (95,96). PDT is clinically used for the treatment of various types of malignant disorders such as bladder, lung or esophageal cancer (97). A particular interest of the use of these photosensitizers is their preferential accumulation by malignant cells due to the presence of high amount of collagen and lipids.

Strategies targeting photosensitizers covalently attached to molecules have been reported lately with different therapeutic approaches. The photosensitizer can be combined with a carrier showing affinity for neoplasia or to receptors expressed on specific tumors such as monoclonal antibodies, antibody fragments, peptides, proteins such as transferrin, epidermal growth factor and insulin, low-density lipoproteins, various carbohydrates, somatostatin, folic acid among others (98). Another strategy will be the conjugation of a therapeutic agent to a photosensitizer in view to obtain dual antitumor activity and/or to use the photosensitizer as carrier due to their ability to preferentially accumulate in cancer tissues (99). This strategy has been reported with conjugates such as temoporfin/ibuprofen as a non-steroidal anti-inflammatory drug (100), tetraphenylporphyrin/trilobolide as a cytotoxic agent (101), porphyrazine/doxorubicin (102).

Two studies on porphyrin/cannabinoid conjugates have been reported so far (103,104). The first conjugate involved a phthalocyanine named IR700DX-mbc94 with the CB_2R antagonist SR144528 (103). Phototherapy treatment using this complex greatly inhibited the growth of expressed CB_2R tumors but not tumors that were not expressing CB_2R. Considering that the CB_2R antagonist does not have antitumor properties, the strategy used its affinity for receptors expressed in tumors to increase the accumulation of photosensitizer in the tumor.

Photosensitizer/chromenopyrazoledione conjugates have been proposed recently (figure **11**) in which meso-tetraphenylporphyrin (TPP) was elected as photosensitizer and chromenopyrazoledione as antitumor agent (104).

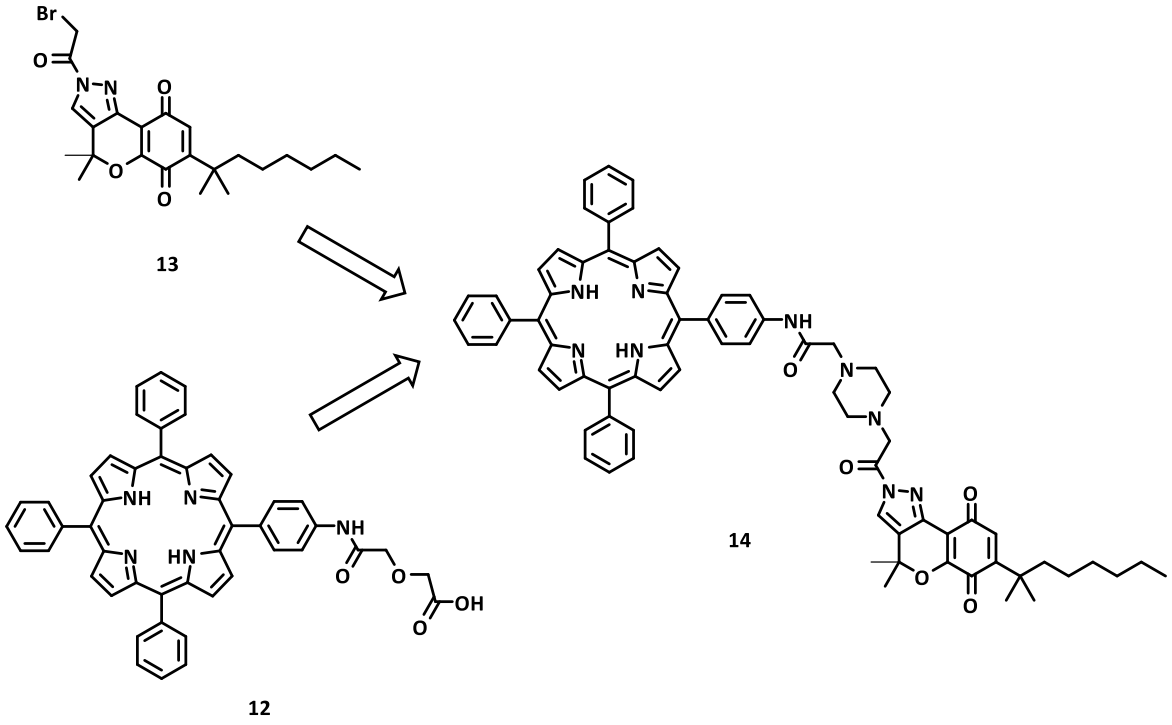


Figure 11. Photosensitizer/chromenopyrazoledione conjugate **14**, and the chromenopyrazole **13** and the TPP derivative **12** involved in its synthesis.

The synthesis of the porphyrin-chromenopyrazodione conjugate **14** was achieved from the porphyrin **12** and the chromenopyrazole **13**. TPP was regioselectively *para*-mononitrated with sodium nitrate to 5-(*p*-nitrophenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin that was then reduced with tin (II) chloride, and finally converted under diglycolic anhydride treatment to the carboxylic porphyrin **12**. The *NH*-chromenopyrazoledione was first acylated using bromoacetyl bromide, and then was allowed to react with the carboxylic porphyrin **12** affording the conjugate **14**. A complete conformational analysis of this chromenopyrazole conjugate performed using *ab initio* calculations indicated that the global minimum energy conformer adopts an expanded spatial conformation whereas folded conformers, where the chromenopyrazole and the porphyrin core lay paralleled, exert higher relative

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

energy values. Photophysical properties of the chromenopyrazole conjugate **14** showed stronger absorption intensity for both Soret (420 nm) and Q-bands than the free TPP (500-700 nm). These data are suitable for a photosensitizer considering that an ideal photosensitizer should have high absorption with wavelengths between 600 and 800 nm, no shorter than 600 nm for tissue penetration and no longer than 800 nm to provide enough energy to excite oxygen to its singlet state. In what refers to the cannabinoid properties of this porphyrin/chromenopyrazole conjugate, it has been described to bind weakly but selectively to CB_2R.

In summary, a porphyrin-chromenopyrazole conjugate has been designed and synthesized even though the syntheses of porphyrin derivatives are known to be tedious. The reported photophysical and pharmacological properties are suitable for a potential activity as antitumor agent.

5. CHROMENOPYRAZOLES AS GPR55 MODULATORS

The orphan G protein-coupled receptor GPR55 (105) has been proposed as one of the missing cannabinoid receptor types even though it shares low identity with CB_1R and CB_2R (106). GPR55 has been related to the endocannabinoid system since CB_1R and CB_2R ligands from diverse origins, endogenous, natural, and synthetic, can modulate this receptor. Over these last years, its complex cellular signaling pathways and biological functions have been the focus of numerous studies (107) that identified GPR55 as a promising target for the treatment of various pathologies such as inflammation, neuropathic pain, bone physiology, diabetes and cancer. However, GPR55 validation as a therapeutic target is far from being confirmed due to the complexity of GPR55 downstream signaling and the lack of potent and selective GPR55 agonists and antagonists. Effectively, GPR55 couples to different G-proteins, $G\alpha_{13}$, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_q$ /$G\alpha_{12}$ or $G\alpha_{12/13}$ depending on the cell type and GPR55 modulator. For instance, stimulation of the $G\alpha_q$ subunit involves the phospholipase C with intracellular calcium release with possible activation of the MAPK/ERK signaling, whereas the $G\alpha_{12/13}$ subunit preferably influences the RhoA/ROCK signaling pathway.

L-α-lysophosphatidylinositol (LPI) has been suggested to be a GPR55 endogenous ligand (108). GPR55 modulators from different origins have been reported in the literature. A structural update of these GPR55 ligands have been recently described in a review (107). GPR55 ligands include endogenous molecules such as 2-arachidonoyl-L-α-lysophosphatidylinositol (2-AGPI), *N*-arachidonyl glycine (NAGly) (109), and anandamide (AEA). The regulation of GPR55 activity by a range of phytocannabinoids and synthetic derivatives has been described but in some cases it is still controversial (107). For instance, Δ^9-THC was found to be effective activating GPR55 in [^{35}S]GTPγS binding, RhoA assays and intracellular calcium mobilization in transiently transfected *h*GPR55-HEK293 cells, whereas it was unable to stimulate ERK1/2 phosphorylation nor β-arrestin recruitment. Cannabidiol, reported as GPR55 antagonist in [^{35}S]GTPγS binding and Rho activation assays, resulted to be inactive in Ca^{2+} mobilization and β-arrestin recruitment experiments.

Among the large number of synthetic cannabinoids reported so far, some of them showed to have relevant activity at GPR55. Curiously, despite their structural diversity, in each family it has been possible to find GPR55 modulators (107). The CB_1R/CB_2 R agonist CP-55,940, a cyclohexylphenoxy derivative, displayed GPR55 agonism in [^{35}S]GTPγS evaluation and GPR55 antagonist in β-arrestin, ERK phosphorylation and calcium mobilization assays. Several diarylpyrazoles such as the CB_1R antagonist rimonabant, or aminoalkylindoles exemplified by WIN55,212-2 interact with GPR55. Coumarin and magnolol cannabinoids have also been proposed as GPR55 scaffold.

Few non-CB_1R/CB_2R-related GPR55 ligands have been reported so far (107). High throughput screening of a library of compounds from the Sandford-Burnham screening center of the Molecular Libraries Probe Production Centers Network (MLPCN) allowed the identification of different GPR55 scaffolds (110) exemplified by triazoloquinoline CID1172084, thienopyrimidine CID1434953, and pyrrolopyrazolone CID16020046 (figure **12**). Data resulting from this screening realized with β-arrestin assays in U2OS cells permanently expressing HA-GPR55E and βarr2-GFP, were confirmed by other biochemical tests from independent studies.

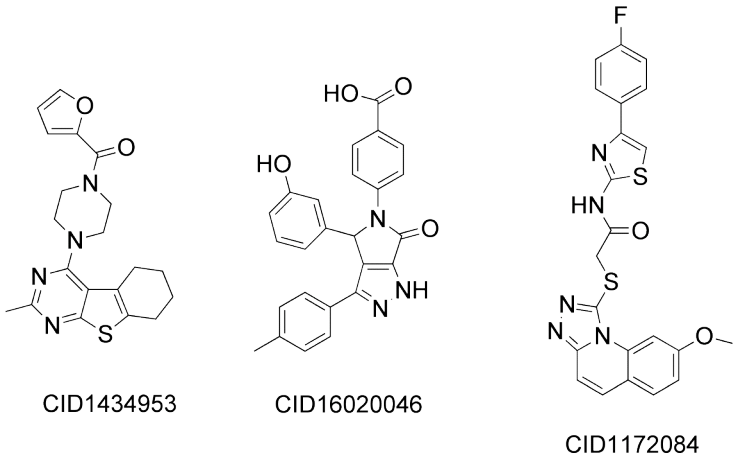


Figure 12. Some GPR55 ligands identified from a high throughput screening of a library of compounds from MLPCN.

Following the identification of the CID series as GPR55 modulators, *N*-(4-sulfamoylphenyl)thiourea-based GPR55 ligands have been described (111). Interestingly, the chromenopyrazole scaffold has also been developed as new GPR55 ligands (112). The design of these new molecules considered structural features of the GPR55 activity modulators described in figure **12**. Thus, two series of chromenopyrazoles (figure **13**) were synthesized from the 7-methoxy-*NH*-chromenopyrazole parent that was alkylated by the suitable phenylpiperazine in the first series, and that was alkylated by 1,3-dibromoethane then by the corresponding acylpiperazine in the second series. Preparation of the first series has been described with low yield due a tedious separation of both *N*-substituted isomers, whereas in the second series, the *N*-substituted isomers were separated at the stage of the *N*-bromoethyl substituted derivative.

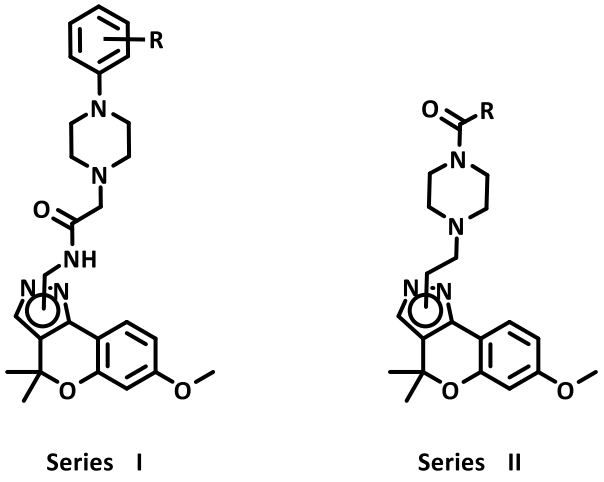


Figure 13. Two series of chromenopyrazoles as GPR55 ligands.

The novelty of the reported GPR55 chromenopyrazoles comes not only from new structures but also from the assay employed for the GPR55 evaluation. So far, the potential GPR55 compounds have been explored through different functional assays showing in some cases discrepancies in the resulting outcomes. These assays include β–arrestin recruitment, GTPγS binding, analysis of intracellular calcium levels, phosphorylation of ERK1/2, and the activation of the small GTPase proteins Rac1, RhoA and Cdc42. To overcome the complex signaling pathways related to GPR55 activation and the lack of GPR55 radioligand, the pharmacological evaluation of the chromenopyrazoles was accomplished in a cell-impedance-based assay. These label-free xCELLigence experiments detect cellular morphological changes triggered by ligand-dependent GPCR activation and coupling to downstream signaling pathways thus providing an integrative cellular response. The real-time cellular impedance response was monitored in a HEK293 cells stably expressing recombinant human GPR55 (*h*GPR55-HEK293). Most chromenopyrazoles of series II exhibited agonistic GPR55 profile whereas only one compound was active in series I. Compared to LPI, active compounds have been reported to display partial agonism in *h*GPR55-HEK293 cells with good potency showing EC_{50} values in the nanomolar range. One of these potent GPR55 partial agonists was selective *versus* classical CB_1R and CB_2R. The capacity of the chromenopyrazoles to antagonize LPI-

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

mediated GPR55 stimulation was also assessed and reported. Upon antagonist treatment, three of the chromenopyrazoles of series II inhibited LPI effect (1 μM), being one of them fully selective versus CB_1R and CB_2R. These studies allowed a tuning of compound properties that was achieved by small modifications of the substitution pattern.

Additional xCELLigence experiments performed in HEK293 cells with active chromenopyrazoles from both series allowed to confirm that the cellular responses observed in *h*GPR55-HEK293 cells were mediated through GPR55.

Administration, distribution, and metabolism (ADME) properties of the active chromenopyrazoles were predicted *in silico* using a set of 34 physicochemical descriptors computed by QikProp. According to this first approach, the predicted parameters suggest pharmacokinetic improvements compared to LPI that is very insoluble in water, air and light sensitive.

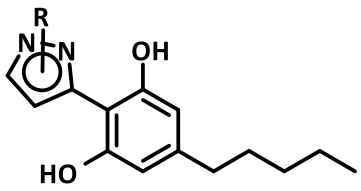
In summary, among the new proposed GPR55 scaffolds, chromenopyrazole was proposed to constitute a versatile scaffold for obtaining potent GPR55 modulators. Moreover, evaluation of these chromanopyrazoles at GPR55 was described in a cell-impedance-based assay integrating complex signaling pathways involved in GPR55 activation.

6. NOVEL CANNABIDIOL DERIVATIVES

Cannabidiol (CBD) (113) and Δ^9-THC are the two major phytocannabinoids isolated from *Cannabis Sativa*. CBD and Δ^9-THC are biosynthesized through the same metabolic pathway from cannabigerolic acid at the exception of the last step catalyzed by different enzymes, CBDA and THCA synthase respectively. Whereas there is a clear structural relationship between both structures, their pharmacology differs considerably. For instance, CBD does not induce the psychotropic effects associated to Δ^9-THC. Moreover, the complex pharmacology of CBD has not been fully elucidated yet. CBD shows only low affinity for the cannabinoid receptors CB_1R and CB_2R, but it modulates indirectly the endocannabinoid system through fatty acid-binding proteins (FABPs), transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1), 5-hydroxytryptamine subtype 1A receptor ($5\text{-}HT_{1A}$), peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR-γ), and the A_{1A} adenosine receptor (114).

The therapeutic potential of CBD for neurodegenerative diseases, inflammation-related diseases, epilepsy, anxiety disorders, and schizophrenia is highlighted by numerous preclinical studies (115). Clinical trials are already on going for treatment-resistant seizure disorders such as Lennox-Gastaut and Dravet syndromes and for the treatment of inflammatory bowel diseases among others (116).

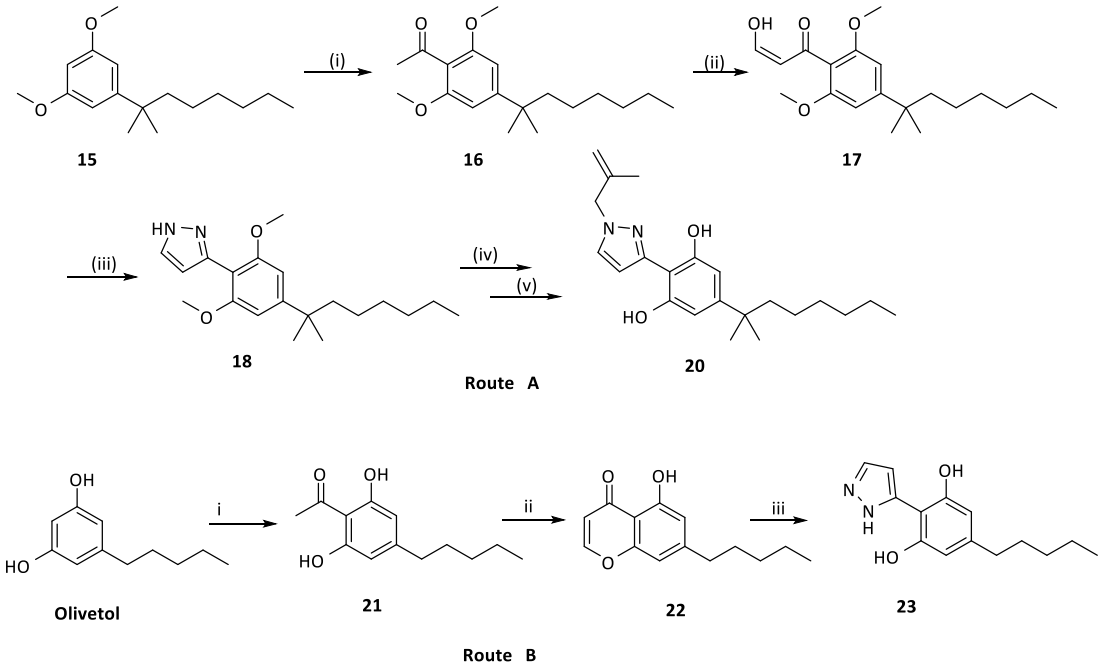
Despite the therapeutic interest of CBD, only few CBD derivatives have been reported (117). The structural modifications of CBD have been realized on the pentyl chain introducing heteroatoms or modifying the length of the alkyl chain, on the substituents of the cyclohexene, and on the cyclohexene itself using bioisosterism with cyclopentane or cyclohexane for instance. Replacement of the cyclohexene by a nitrogenated-heterocycle has been reported in 1983 with the synthesis of 5-pentyl-2-(pyrrolidin-2-yl)benzene-1,3-diol (118), and more recently with the preparation of 5-alkyl-2-(1*H*-pyrazol-5-yl)benzene-1,3-diols which are related to the chromenopyrazole scaffold (figure **14**) (117).



CBD derivatives

Figure 14. CBD derivatives based on chromenopyrazole scaffold.

Two synthetic route have been reported for the synthesis of these 5-alkyl-2-(1*H*-pyrazol-5-yl)benzene-1,3-diols illustrated in scheme 2. A Friedel-Crafts acylation of the appropriate 3,5-dimethoxyresorcinol followed by α–formylation and reaction with hydrazine constitutes the first synthetic route (scheme 2: Route A). In the second synthetic route, 5-dimethylheptyl-2-(1*H*-pyrazol-5-yl)benzene-1,3-diol **20** is prepared by reacting hydrazine with a chromone previously synthesized from the resorcinol olivetol by a succession of acylation and hydrolysis to 5-pentyl-2-(1*H*-pyrazol-5-yl)benzene-1,3-diol **23** (scheme 2: Route B). These two synthetic approaches led to new CBD derivatives which pharmacological evaluation has not been reported so far.



Scheme 2. Synthesis of 5-alkyl-2-(1*H*-pyrazol-5-yl)benzene-1,3-diols. Reagents and solvents: Route A: (i) $AlCl_3$, acyl chloride, CH_2Cl_2; (ii) NaH, ethyl formate, MW; (iii) Hydrazine, ethanol; (iv) NaH, 3- bromo-2-methylpropene; (v) Br_3B, CH_2Cl_2. Route B: i) $AlCl_3$, acyl chloride, CH_2Cl_2; ii) Perchloric acid, triethyl orthoformate ; iii) Hydrazine, ethanol.

This work shows that the chromenopyrazole experience inspired the design of 5-alkyl-2-(1*H*-pyrazol-5-yl)benzene-1,3-diols. So far, two synthetic routes have been proposed. With these compounds, the possibility of overcoming the psychotropic side effects related to Δ^9-THC still need to be confirmed before pharmacological prospection.

7. SUMMARY AND FUTURE PERSPECTIVES

The potential of cannabinoid receptor ligands has been preclinically explored in the treatment of diverse symptoms and diseases such as pain, inflammation, metabolic syndromes, cancer, hypertension, bone-related disorders or neurodegenerative processes. However, just a few of these diseases can be treated with cannabinoid-based medicines nowadays. Marinol® (dronabinol, synthetic Δ^9-THC) and Cesamet® (nabilone, a THC synthetic analogue) can be prescribed in several countries as antiemetic drugs for chemotherapy-induced nausea and vomiting (35,36), and for anorexia (119) treatment in patients with AIDS. Sativex® (nabiximols, a combination of Δ^9-THC and CBD, 1:1 ratio) is used for the symptomatic relief of neuropathic pain in adults suffering multiple sclerosis, and as an adjunctive analgesic treatment for adult cancer patients. Rimonabant (SR141716A), a CB_1R antagonist/inverse agonist, was commercialized in Europe in 2006 as Acomplia® for the management of obesity (13). Unfortunately, the beneficial effects were accompanied by a significantly increase of depression, anxiety, headache, and suicidal thoughts which forced its withdrawal from the market few years later.

Even though CB_1R/CB_2R agonists are currently in the forefront of clinical research (120) for different applications such as epilepsy (Epidiolex®), cancer and neuroprotection, there is an increasing interest in exploiting novel pharmacological strategies (121). For instance, CB_2R selective agonists or peripherally restricted CB_1R/CB_2R agonists may exhibit therapeutic potential for treating various pathologies while avoiding the adverse psychotropic effects related to the modulation of CB_1R in the brain (122). In addition, CB_1R and/or CB_2R antagonists or inverse agonist as well as allosteric cannabinoid ligands which are coming on the scene, may be useful in the treatment of certain diseases (121,123). Nonetheless, more preclinical and specially clinical research needs to be done in this field.

In this context, the chromenopyrazole scaffold emerges as a privileged structure in drug discovery targeting the endocannabinoid system. Several papers have been published describing the synthesis, the pharmacological and biological properties of chromenopyrazoles and derivatives. The first chromenopyrazoles, described in 1985, did not show significant activity in a neuroleptic evaluation. The discovery of the endocannabinoid system and specially the cannabinoid receptors, allowed exploring this scaffold as cannabinoid ligand. Structural modifications on the chromenopyrazole core allowed the development of cannabinoid drugs with a broad therapeutic prospect.

Strategies pursued so far in this field have been summarized in figure **15**. Phenolic chromenopyrazole derivatives were claimed in 2012 as non-psychoactive and selective CB_1R agonists with peripheral

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

antinociceptive properties (18). Structural modifications of the chromenopyrazole core allowed fine-tuning of cannabinoid receptor affinity and activity. Structural features required for CB_1R/CB_2R affinity and selectivity were determined using molecular modeling. These studies led to the identification of a potent and selective CB_2R agonist with confirmed neuroprotective properties in murine models of neurodegenerative disorders (25,26).

Further exploration of this scaffold allowed the design of multifunctional chromenopyrazoles. This strategy involved targeting different anticancer modes of action in a single molecule. The antitumor properties of cannabinoids and the redox properties characterizing quinones were fused in chromenopyrazolediones (figura **15**). The antiproliferative activity of these new compounds was successfully explored *in vitro* and *in vivo* in breast and prostate cancer models (63,64).

The chromenopyrazole scaffold was also exploited for the modulation of the putative cannabinoid receptor GPR55. Two series of compounds have been reported (112). Their ability to activate GPR55 was measured through an innovative label-free cell impedance assay allowing the discovery of novel chromenopyrazole GPR55 partial agonists and antagonists.

The last approach pursued in the exploration of this scaffold is the development of CBD-related chromenopyrazoles (117). Even though their therapeutic potential has not been reported yet, the nature of its resorcinol core may provide interesting antioxidant properties. Possible activity at cannabinoid related targets such as GPR3, GPR6, GPR12, GPR55 or GPR18 should be considered when evaluating this compound since CBD modulates all of them with moderate potencies (124–127).

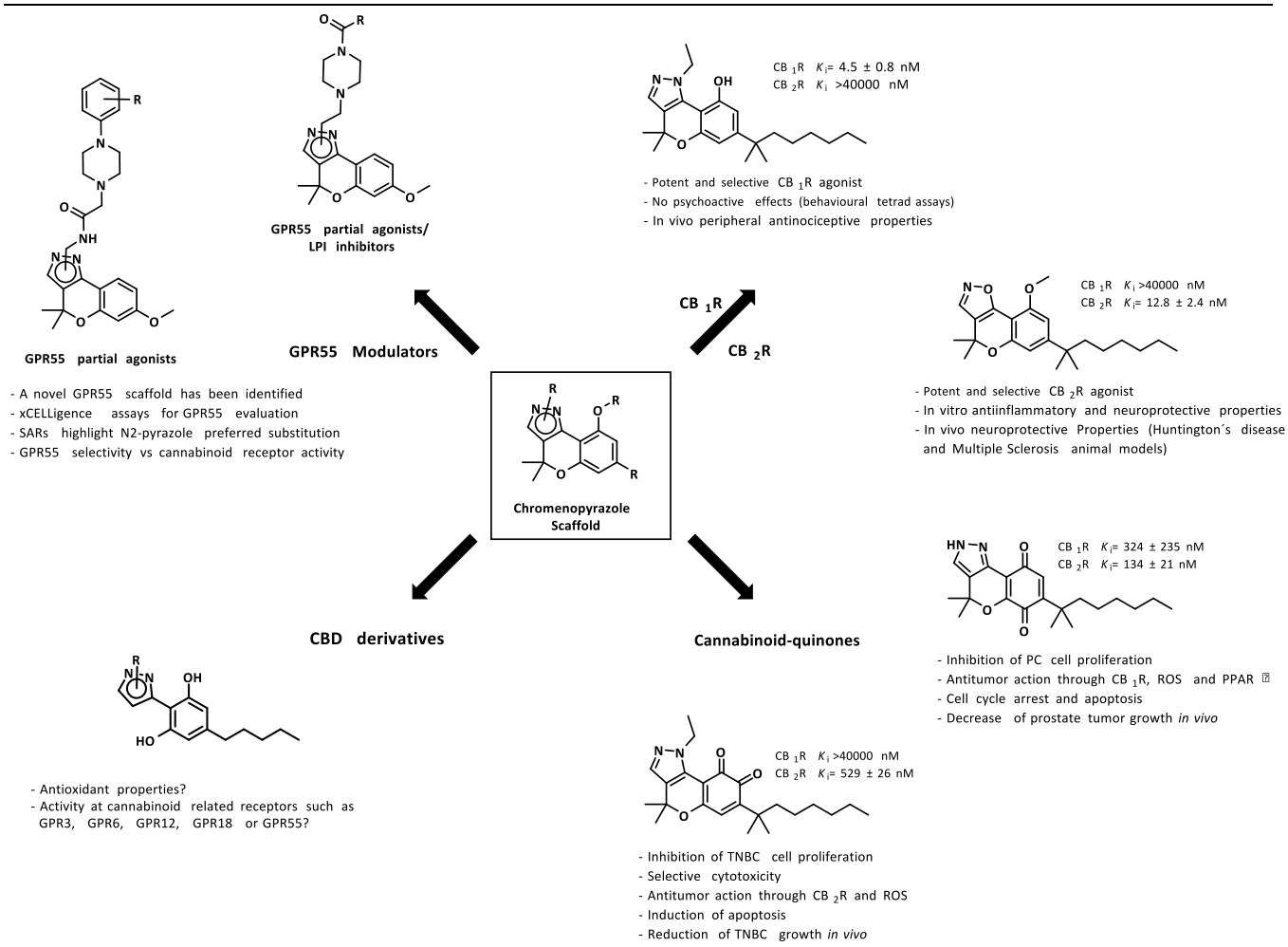


Figure 15. Summary of the chromenopyrazole derivatives reported so far and their pharmacological profile.

New chromenopyrazoles could be synthesized and screened against other relevant biological targets of the endocannabinoid system or related targets. Apart from the potential of chromenopyrazoles as therapeutic agents, they also should be considered tools to validate new biological targets.

Activation of the CB_1R and CB_2R has been shown to induce different cellular signaling cascades through coupling to different effector proteins: G-protein ($G\alpha_{i/o}$) and β-arrestins (1/2) (128–130). The search for a ligand that can induce specific receptor activation profiles resulting in specific subsets of signaling pathways (biased

signaling) has recently received a special attention in the field of GPCRs research (129,131–133). This is due to the possibility of attaining different therapeutic effects and/or avoiding untoward effects while targeting the same receptor protein (134). In this direction, a deeper functional analysis of the chromepyrazoles reviewed herein should also be pursued by evaluation of diverse signaling pathways using different readouts. Functionally profiling these compounds may lead to fine-tuning the chromenopyrazole chemotype in order to identify novel biased agonists of the cannabinoid receptors.

An important step to move forward in the drug discovery process is to evaluate the pharmacokinetic profile of the candidates. *In silico* ADME predictions suggested that chromenopyrazoles have a favorable druggability profile, however, *in vitro* and *in vivo* data of the most promising lead compounds is needed to confirm the pharmacokinetic properties of these novel derivatives.

Albeit more research is clearly needed to continue towards more preclinical evaluation, the efforts done for the development of modulators of the ECS based on the chromenopyrazole heterocycle open new avenues in the cannabinoid field. Novel pharmacological tools to study orphan receptors, as well as potential candidates for the treatment of diverse pathologies can be optimized using the outstanding starting point provided by the versatile chromenopyrazole chemotype.

Conflict of interest. The authors state that there are no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgments: Financial support was provided by Spanish Grants from the Spanish Ministry MINECO/FEDER and SAF2015-68580-C2. The authors acknowledge *Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid* and *RANF* for awarding this work.

8. REFERENCIAS

1 Mechoulam R, Hanus LO, Pertwee R, Howlett AC. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. Nat Rev Neurosci 2014; 15: 757–64.

2 Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. J Am Chem Soc 1964; 86: 1646–47.

3 Pertwee RG. Handbook of Cannabis. 1st ed. New York: Oxford University Press 2014.

4 Silvestri C, Di Marzo V. The Endocannabinoid System in Energy Homeostasis and the Etiopathology of Metabolic Disorders. Cell Metab 2013; 17: 475–90.

5 Navarro G, Morales P, Rodríguez-Cueto C, Fernández-Ruiz J, Jagerovic N, Franco R. Targeting Cannabinoid CB2 Receptors in the Central Nervous System. Medicinal Chemistry Approaches with Focus on Neurodegenerative Disorders. Front Neurosci 2016; 10: 1–11.

6 Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, *et al*. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB1 and CB2. Pharmacol Rev 2010; 62: 588–631.

7 Pertwee RG. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. Br J Pharmacol 2009; 156: 397–411.

8 Patel S, Hill MN, Cheer JF, Wotjak CT, Holmes A. The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic drugs. Neurosci Biobehav Rev 2017; 76: 56–66.

9 Velayudhan L, Van Diepen E, Marudkar M, *et al*. Therapeutic potential of cannabinoids in neurodegenerative disorders: a selective review. Curr Pharm Des 2014; 20: 2218–30.

10 Watt G, Karl T. In vivo Evidence for Therapeutic Properties of Cannabidiol (CBD) for Alzheimer's Disease. 2017; 8: 1–7.

11 Wilson RI, Nicoll R. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. Nature 2001; 410: 588–92.

12 Rinaldi-Carmona M, Barth F, Héaulme M, *et al*. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. FEBS Lett 1994; 350: 240–4.

13 Després J-P, Lemieux I, Alméras N. Contribution of CB1 blockade to the management of high-risk abdominal obesity. Int J Obes 2006; 30: 44-52.

14 Price MR, Baillie GL, Thomas A, *et al*. Allosteric Modulation of the Cannabinoid CB1 Receptor. Mol Pharmacol 2005; 68: 1484–95.

15 Lucchesi V, Hurst DP, Shore DM, *et al*. CB2-Selective Cannabinoid Receptor Ligands: Synthesis, Pharmacological Evaluation, and Molecular Modeling Investigation of 1,8-Naphthyridin-2(1H)-one-3-carboxamides. J Med Chem 2014; 57: 8777–91.

16 Manera C, Benetti V, Castelli MP, *et al*. Design , Synthesis , and Biological Evaluation of New 1, 8-Naphthyridin-4(1H)-on-3-carboxamide and Quinolin-4 (1H)-on-3-carboxamide Derivatives as CB 2 Selective Agonists. Society 2006; 4: 5947–57.

17 Press JB, Birnberg GH. Heterocyclic-fused benzopyrans as cannabinoid analogues. J Heterocycl Chem 1985; 22: 561.

18 Cumella J, Hernández-Folgado L, Girón R, *et al*. Chromenopyrazoles: non-psychoactive and selective CB1 cannabinoid agonists with peripheral antinociceptive properties. ChemMedChem 2012; 7: 452–63.

19 Morales P, Azofra LM, Cumella J, *et al*. Preparation of 2 , 2-dimethylchroman-4-ones from 5-alkyl-substituted resorcinols : microwave-assisted synthesis and theoretical calculations. Arkivoc 2014; 2: 319–32.

20 Gong J-P, Onaivi ES, Ishiguro H, *et al*. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. Brain Res 2006; 1071: 10–23.

21 Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, *et al*. Identification and functional characterization of

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

brainstem cannabinoid CB2 receptors. Science 2005; 310: 329–32.

22 Ashton JC, Friberg D, Darlington CL, Smith PF. Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. Neurosci Lett 2006; 396: 113–6.

23 Onaivi ES, Ishiguro H, Liu Q-R. Future perspectives: Cannabinoid CB2 receptor ligands and their therapeutic potential in mental diseases. In: Fattore L, Ed. Cannabinoids in Neurologic and Mental Disease. New York: Elsevier, 2015, pp 425–44.

24 Chung ES, Bok E, Chung YC, Baik HH, Jin BK. Cannabinoids prevent lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat substantia nigra in vivo through inhibition of microglial activation and NADPH oxidase. Brain Res 2012; 1451: 110–16.

25 Morales P, Gómez-Cañas M, Navarro G, *et al*. Chromenopyrazole, a Versatile Cannabinoid Scaffold with in Vivo Activity in a Model of Multiple Sclerosis. J Med Chem 2016; 59: 6753–71.

26 Gómez-Cañas M, Morales P, García-Toscano L, *et al*. Biological characterization of PM226, a chromenoisoxazole, as a selective CB2 receptor agonist with neuroprotective profile. Pharmacol Res 2016; 110: 205–15.

27 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011; 61: 69–90.

28 Tramèr MR, Carroll D, Campbell F, Reynolds DJ, Moore R, McQuay HJ. Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting: quantitative systematic review. Br Med J 2001; 323: 16–21.

29 Berry EM, Mechoulam R. Tetrahydrocannabinol and endocannabinoids in feeding and appetite. Pharmacol Ther 2002; 95: 185–90.

30 Jatoi A, Windschitl HE, Loprinzi CL, *et al*. Dronabinol versus megestrol acetate versus combination therapy for cancer-associated anorexia: a North Central Cancer Treatment Group study. J Clin Oncol 2002; 20: 567–73.

31 Walsh D, Nelson KA, Mahmoud FA. Established and potential therapeutic applications of cannabinoids in oncology. Support Care Cancer 2003; 11: 137–43.

32 Mantyh PW, Clohisy DR, Koltzenburg M, Hunt SP. Molecular mechanisms of cancer pain. Nat Rev Cancer 2002; 2: 201–9.

33 Campbell FA, Tramèr MR, Carroll D, Reynolds DJ, Moore RA, McQuay HJ. Are cannabinoids an effective and safe treatment option in the management of pain? A qualitative systematic review. BMJ 2001; 323: 13–6.

34 Iversen L, Chapman V. Cannabinoids: a real prospect for pain relief? Curr Opin Pharmacol 2002; 2: 50–5.

35 Sharkey K, Darmani N, Parker L. Regulation of nausea and vomiting by cannabinoids and the endocannabinoid system. Eur J Pharmacol 2014; 722: 134–46.

36 Abrams DI, Guzman M. Cannabis in cancer care. Clin Pharmacol Ther 2015; 97: 575–86.

37 Velasco G, Hernández-Tiedra S, Dávila D, Lorente M. The use of cannabinoids as anticancer agents. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2016; 64: 259–66.

38 Guzmán M. Cannabinoids: potential anticancer agents. Nat Rev Cancer 2003; 3: 745–55.

39 Chakravarti B, Ravi J, Ganju RK. Cannabinoids as therapeutic agents in cancer : current status and future implications. Oncotarget 2014; 5: 5852–72.

40 Velasco G, Sánchez C, Guzmán M. Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. Nat Rev Cancer 2012; 12: 436–44.

41 Malfitano AM, Ciaglia E, Gangemi G, Gazzerro P, Laezza C, Bifulco M. Update on the endocannabinoid system as an anticancer target. 2011; 15: 297–308.

42 Caffarel MM, Sarrió D, Palacios J, Guzmán M, Sánchez C. Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation. Cancer Res 2006; 66: 6615–21.

43 Guzmán M, Duarte MJ, Blázquez C, *et al*. A pilot clinical study of Delta9-tetrahydrocannabinol in patients with recurrent glioblastoma multiforme. Br J Cancer 2006; 95: 197–203.

44 Asche C. Antitumour Quinones. Mini-Reviews Med Chem 2005; 5: 449–467.

45 Lu J-J, Bao J-L, Wu G-S, *et al*. Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agents. Anticancer Agents Med Chem 2013; 13: 456–63.

46 Alcaín FJ, Villalba JM. NQO1-directed antitumour quinones. Expert Opin Ther Patents 2007; 17: 649–65.

47 El-Najjar N, Gali-Muhtasib H, Ketola RA, Vuorela P, Urtti A, Vuorela H. The chemical and biological activities of quinones: overview and implications in analytical detection. Phytochem Rev 2011; 10: 353–70.

48 O'Brien PJ. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. Chem Biol Interact 1991; 80: 1–41.

49 Vujčić MT, Tufegdžić S, Novaković I, Djikanović D, Gašić MJ, Sladić D. Studies on the interactions of bioactive quinone avarone and its methylamino derivatives with calf thymus DNA. Int J Biol Macromol 2013; 62: 405–410.

50 Wondrak GT. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. Antioxid Redox Signal 2009; 11: 3013–69.

51 Cabello CM, Bair WB, Wondrak GT. Experimental therapeutics: targeting the redox Achilles heel of cancer. Curr Opin Investig Drugs 2007; 8: 1022–37.

52 Gehrmann M. Drug evaluation: STA-4783--enhancing taxane efficacy by induction of Hsp70. Curr Opin

Investig Drugs 2006; 7: 574–80.

53 Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. Nat Rev Drug Discov 2013; 12: 931–47.

54 Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. J Pharm Pharmacol 2013; 65: 157–70.

55 Dunn CJ, Goa KL. Mitoxantrone: a review of its pharmacological properties and use in acute nonlymphoblastic leukaemia. Drugs Aging 1996; 9: 122–47.

56 Siegel D, Gibson NW, Preusch PC, Ross D. Metabolism of mitomycin C by DT-diaphorase: role in mitomycin C-induced DNA damage and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. Cancer Res 1990; 50: 7483–9.

57 Cummings J, Spanswick VJ, Tomasz M, Smyth JF. Enzymology of mitomycin C metabolic activation in tumour tissue: implications for enzyme-directed bioreductive drug development. Biochem Pharmacol 1998; 56: 405–14.

58 Anighoro A, Bajorath J, Rastelli G. Polypharmacology: Challenges and Opportunities in Drug Discovery. J Med Chem 2014; 57: 7874–87.

59 M. O'Boyle N, J. Meegan M. Designed Multiple Ligands for Cancer Therapy. Curr Med Chem 2011; 18: 4722–37.

60 Gediya LK, Njar VC. Promise and challenges in drug discovery and development of hybrid anticancer drugs. Expert Opin Drug Discov 2009; 4: 1099–111.

61 Jagerovic N, Morales P, Goya P, *et al*. Chromenopyrazolediones as cannabinoid quinone derivatives having anti-tumour activity. Patent WO2014013117. 2014 Jan.

62 Jagerovic N, Morales P, Goya P, *et al*. Nuevas cromenoquinonas moduladoras de receptores cannabinoides CB2 con actividad antitumoral. Patent WO2015140377. 2014 Mar.

63 Morales P, Vara D, Goméz-Cañas M, *et al*. Synthetic cannabinoid quinones: Preparation, in vitro antiproliferative effects and in vivo prostate antitumor activity. Eur J Med Chem 2013; 70: 111–19.

64 Morales P, Blasco-Benito S, Andradas C, *et al*. A selective, non-toxic CB2 cannabinoid o-quinone with in vivo activity against triple negative breast cancer. J Med Chem 2015; 58: 2256–64.

65 Wu A, Duan Y, Xu D, Penning TM, Harvey RG. Regiospecific oxidation of polycyclic aromatic phenols to quinones by hypervalent iodine reagents. Tetrahedron 2010; 66: 2111–18.

66 Kogan NM, Rabinowitz R, Levi P, *et al*. Synthesis and Antitumor Activity of Quinonoid Derivatives of Cannabinoids. J Med Chem 2004; 47: 3800–06.

67 Kogan NM, Bl C, Alvarez L, Gallily R, Schlesinger M, Guzman M *et al*. A Cannabinoid Quinone Inhibits Angiogenesis by Targeting Vascular Endothelial Cells. Mol Pharmacol 2006; 70: 51–9.

68 Kogan NM, Schlesinger M, Peters M, Marincheva G, Beeri R, Mechoulam R. A cannabinoid anticancer quinone, HU-331, is more potent and less cardiotoxic than doxorubicin: a comparative in vivo study. J Pharmacol Exp Ther 2007; 322: 646–53.

69 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA Cancer J Clin 2015; 65: 5–29.

70 Abramson VG, Lehmann BD, Ballinger TJ, Pietenpol JA. Subtyping of triple-negative breast cancer: Implications for therapy. Cancer 2014; : 1–9.

71 Hoeferlin LA, E.Chalfant CE, Park MA. Challenges in the Treatment of Triple Negative and HER2-Overexpressing Breast Cancer. J Surg Sci 2014; 1: 3–7.

72 Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-Negative Breast Cancer. N Engl J Med 2010; 363: 1938–48.

73 Hudis CA, Gianni L. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. Oncologist 2011; 16: 1–11.

74 Wahba HA, El-hadaad HA. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer Treatment modalities of TNBC. Cancer Biol Med 2015; 1: 106–16.

75 Caffarel MM, Andradas C, Mira E, *et al*. Cannabinoids reduce ErbB2-driven breast cancer progression through Akt inhibition. Mol Cancer 2010; 9: 196–206.

76 Perez-Gomez E, Andradas C, Blasco-Benito S, *et al*. Role of Cannabinoid Receptor CB2 in HER2 Pro-oncogenic Signaling in Breast Cancer. JNCI J Natl Cancer Inst 2015; 107: djv077.

77 Ford LA, Roelofs AJ, Anavi-Goffer S, *et al*. A role for L-alpha-lysophosphatidylinositol and GPR55 in the modulation of migration, orientation and polarization of human breast cancer cells. Br J Pharmacol 2010; 160: 762–71.

78 Shrivastava A, Kuzontkoski PM, Groopman JE, Prasad A. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. Mol Cancer Ther 2011; 10: 1161–72.

79 Caffarel MM, Andradas C, Pérez-Gómez E, Guzmán M, Sánchez C. Cannabinoids: a new hope for breast cancer therapy? Cancer Treat Rev 2012; 38: 911–28.

80 Gomella LG, Liu XS, Trabulsi EJ, *et al*. Screening for prostate cancer: the current evidence and guidelines controversy. Can J Urol 2011; 18: 5875–83.

81 Djulbegovic M, Beyth RJ, Neuberger MM, *et al*. Screening for prostate cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. BMJ 2010; 341: c4543.

82 Fu W, Madan E, Yee M, Zhang H. Progress of molecular targeted therapies for prostate cancers. Biochim Biophys Acta 2012; 1825: 140–52.

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

83 Darwish OM, Raj G V. Management of biochemical recurrence after primary localized therapy for prostate cancer. Front Oncol 2012; 2: 1–6.

84 Grossmann M, Zajac JD. Androgen deprivation therapy in men with prostate cancer: how should the side effects be monitored and treated? Clin Endocrinol 2011; 74: 289–93.

85 Czifra G, Varga A, Nyeste K, *et al*. Increased expressions of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1 in human prostate carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol 2009; 135: 507–14.

86 Chung SC, Hammarsten P, Josefsson A, *et al*. A high cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity is associated with disease severity and outcome in prostate cancer. Eur J Cancer 2009; 45: 174–82.

87 Thors L, Bergh A, Persson E, *et al*. Fatty acid amide hydrolase in prostate cancer: association with disease severity and outcome, CB1 receptor expression and regulation by IL-4. PLoS One 2010; 5: e12275.

88 Piñeiro R, Maffucci T, Falasca M. The putative cannabinoid receptor GPR55 defines a novel autocrine loop in cancer cell proliferation. Oncogene 2011; 30: 142–52.

89 Hohmann AG, Guindon J. The endocannabinoid system and cancer: therapeutic implication. Br J Pharmacol 2011; 163: 1447–63.

90 Díaz-Laviada I. The endocannabinoid system in prostate cancer. Nat Rev Urol 2011; 8: 553–61.

91 Orellana-Serradell O, Poblete CE, Sanchez C, *et al*. Proapoptotic effect of endocannabinoids in prostate cancer cells. Oncol Rep 2015; 33: 1599–608.

92 Agostinis P, Berg K, Cengel K, *et al*. Photodynamic Therapy of Cancer: an Update. CA Cancer J Clin 2011; 61: 250–81.

93 Allison RR, Moghissi K. Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action. Photodiagnosis Photodyn Ther 2013; 10: 331–41.

94 Benov L. Photodynamic Therapy: Current Status and Future Directions. Med Princ Pract 2015; 24: 14–28.

95 Wang W, Moriyama LT, Bagnato VS. Photodynamic therapy induced vascular damage: an overview of experimental PDT. Laser Phys Lett 2013; 10: 23001.

96 Kushibiki T, Hirasawa T, Okawa S, Ishihara M. Responses of cancer cells induced by photodynamic therapy. J Healthc Eng 2013; 4: 87–108.

97 Anand S, Ortel BJ, Pereira SP, Hasan T, Maytin E V. Biomodulatory approaches to photodynamic therapy for solid tumors. Cancer Lett 2012; 326: 8–16.

98 Weijer R, Broekgaarden M, Kos M, *et al*. Enhancing photodynamic therapy of refractory solid cancers: combining second-generation photosensitizers with multi-targeted liposomal delivery. J Photochem Photobiol C Photochem Rev 2015; 23: 103–31.

99 Lamberti MJ. Breast cancer as photodynamic therapy target: Enhanced therapeutic efficiency by overview of tumor complexity. World J Clin Oncol 2014; 5: 901.

100 Rogers L, Sergeeva NN, Paszko E, Vaz GMF, Senge MO. Lead Structures for Applications in Photodynamic Therapy. 6. Temoporfin Anti-Inflammatory Conjugates to Target the Tumor Microenvironment for In Vitro PDT. PLoS One 2015; 10: e0125372.

101 Tomanová P, Rimpelová S, Jurášek M, *et al*. Trilobolide–porphyrin conjugates: On synthesis and biological effects evaluation. Steroids 2015; 97: 8–12.

102 Trivedi ER, Blumenfeld CM, Wielgos T, *et al*. Multi-gram synthesis of a porphyrazine platform for cellular translocation, conjugation to Doxorubicin, and cellular uptake. Tetrahedron Lett 2012; 53: 5475–78.

103 Zhang S, Jia N, Shao P, Tong Q, Xie X-Q, Bai M. Target-selective phototherapy using a ligand-based photosensitizer for type 2 cannabinoid receptor. Chem Biol 2014; 21: 338–44.

104 Morales P, Moreno L, Fernández-ruiz J, Jagerovic N. Synthesis of a novel CB2 cannabinoid-porphyrin conjugate based on an antitumor chromenopyrazoledione. J Porphyr Phthalocyanines 2017; 21: 67–76.

105 Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, *et al*. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. Brain Res Mol Brain Res 1999; 64: 193–8.

106 Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson N-O, Leonova J *et al*. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. Br J Pharmacol 2007; 152: 1092–101.

107 Morales P, Jagerovic N. Advances towards the Discovery of GPR55 Ligands. Curr Med Chem 2016; 23: 2087–100.

108 Ross RA. The enigmatic pharmacology of GPR55. Trends Pharmacol Sci 2009; 30: 156–63.

109 Console-Bram L, Ciuciu SM, Zhao P, Zipkin RE, Brailoiu E, Abood ME. N-arachidonoyl glycine, another endogenous agonist of GPR55. Biochem Biophys Res Commun 2017; 490: 1389–93.

110 Heynen-genel S, Dahl R, Shi S, *et al*. Screening for Selective Ligands for GPR55-Antagonists. Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program; National Center for Biotechnology Information (U.S.): Bethesda, MD, 2010; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66153/. nih. .

111 Yrjölä S, Parkkari T, Navia-Paldanius D, *et al*. Potent and selective N-(4-sulfamoylphenyl)thiourea-based GPR55 agonists. Eur J Med Chem 2016; 107: 119–32.

112 Morales P, Whyte LS, Chicharro R, *et al*. Identification of Novel GPR55 Modulators Using Cell-Impedance-Based Label-Free Technology. J Med Chem 2016; 58: 1840–53.

113 Mechoulam R, Shvo Y. Hashish-I. The structure of cannabidiol. Tetrahedron 1963; 19: 2073–78.

114 Ibeas Bih C, Chen T, Nunn AVW, Bazelot M, Dallas M, Whalley BJ. Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders. Neurotherapeutics 2015; 12: 699–730.

115 Pisanti S, Malfitano AM, Ciaglia E, *et al*. Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. Pharmacol Ther 2017; 175: 133–50.

116 Fasinu PS, Phillips S, Elsohly MA, Walker LA. Current Status and Prospects for Cannabidiol Preparations as New Therapeutic Agents. Pharmacotherapy 2016; 36: 781–96.

117 Lago-Fernandez A, Redondo V, Hernandez-Folgado L, Figuerola-Asencio L, Jagerovic N. New Methods for the Synthesis of Cannabidiol Derivatives. In: Reggio PH, Ed. Cannabinoids and Their Receptors. London: Elsevier, 2017, pp 237–57.

118 Arnoldi A, Bizzozero N, Merlini L, Ragg E, Rossi AC. Analogs of cannabinoids. Synthesis of N-heterocyclic derivatives of olivetol. J Chem Res Synopses 1983; 1: 107.

119 Scherma M, Satta V, Fratta W, Fadda P. The endocannabinoid system: Anorexia nervosa and binge eating disorder. In: Fattore L., Ed. Cannabinoids in Neurologic and Mental Disease. New York: Elsevier, 2015, pp 389–413.

120 Clinical Trials Cannabinoids. https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=cannabinoids&pg=1 (accessed 28 Sep2017).

121 Picone RP, Kendall D. Minireview: From the Bench, Toward the Clinic: Therapeutic Opportunities for Cannabinoid Receptor Modulation. Mol Endocrinol 2015; 29: 801–13.

122 Dhopeshwarkar A, Mackie K. CB2 cannabinoid receptors as a therapeutic target - What does the future hold? Mol Pharmacol 2014; 86: 430–37.

123 Vemuri VK, Makriyannis A. Medicinal Chemistry of Cannabinoids. Clin Pharmacol Ther 2015; 97: 553–58.

124 Morales P, Hurst DP, Reggio PH. Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture. In: Kinghorn AD, Gibbons S, Eds. Phytocannabinoids Unraveling the Complex Chemistry and Pharmacology of *Cannabis sativa*. Cham: Springer International Publishing, 2017, pp 103–31.

125 Morales P, Reggio PH, Jagerovic N. An Overview on Medicinal Chemistry of Synthetic and Natural Derivatives of Cannabidiol. Front Pharmacol 2017; 8: 422.

126 Brown KJ, Laun AS, Song Z. Cannabidiol, a novel inverse agonist for GPR12. Biochem Biophys Res Commun 2017; 493: 451–54.

127 Laun AS, Song Z-H. GPR3 and GPR6, novel molecular targets for cannabidiol. Biochem Biophys Res Commun 2017; 490: 17–21.

128 Soethoudt M, Grether U, Fingerle J, *et al*. Cannabinoid CB2 receptor ligand profiling reveals biased signalling and off-target activity. Nat Commun 2017; 8: 13958.

129 Laprairie RB, Bagher AM, Denovan-Wright EM. Cannabinoid receptor ligand bias: implications in the central nervous system. Curr Opin Pharmacol 2017; 32: 32–43.

130 Laprairie RB, Bagher AM, Kelly MEM, Denovan-Wright EM. Biased Type 1 Cannabinoid Receptor Signaling Influences Neuronal Viability in a Cell Culture Model of Huntington Disease. Mol Pharmacol 2016; 89: 364–75.

131 Pupo AS, Duarte DA, Lima V, Teixeira LB, Parreiras-e-Silva LT, Costa-Neto CM. Recent updates on GPCR biased agonism. Pharmacol Res 2016; 112: 49–57.

132 Rankovic Z, Brust TF, Bohn LM. Biased agonism: An emerging paradigm in GPCR drug discovery. Bioorganic Med Chem Lett 2016; 26: 241–50.

133 Zhou XE, Melcher K, Xu HE. Understanding the GPCR biased signaling through G protein and arrestin complex structures. Curr Opin Struct Biol 2017; 45: 150–59.

134 Ibsen MS, Connor M, Glass M. Cannabinoid CB_1 and CB_2 Receptor Signaling and Bias. Cannabis Cannabinoid Res 2017; 2: 48–60.

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
ISSN (Online) 1697-4298
Review
analesranf.com

François-Antoine-Henri Descroizilles (1781-1825), démonstrateur royal de chimie, apothecary, inventor and industrial chemist: the father of titrimetric analysis. Part I

Title in Spanish: *François-Antoine-Henri Descroizilles (1781-1825), demostrador real de química, boticario, inventor y químico industrial: padre del análisis volumétrico. Parte 1ª.*

Julia Martín[1], Purificación-Sáez Plaza[2], Agustín García Asuero[2,*]

[1]Departamento de Química Analítica, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Sevilla. [2]Departamento de Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España.

ABSTRACT: In this contribution the life and work of François-Antoine-Henry Descroizilles is reviewed. He is recognized as a multifaceted person, and as a skilled and wise chemist by eminent scientists of his time. Descroizilles developed his professional career as a chemistry teacher, apothecary, and industrial chemist, contributing firstly to give a solution to the latent problem of cider in Normandy, and to the bleaching of tissues by the new method of Berthollet in the area of Rouen later. He proposes on this respect a (redox) titrimetric method of determining the concentration of chlorine, Gordian knot of the problem. Descroizilles can rightly on this way be considered as the father of titrimetric analysis, but his ingenuity goes much further, and his name can be associated to a variety of inventions. In the approach that is carried out here, emphasis is previously placed on the context of the new chloric bleaching, aspect that might not be always treated with enough depth in previous papers on Descroizilles. In the first part of this paper the boundary conditions of this topic will be located and studied, in a time, in which the intent of the study of the chemical arts rapidly acquires great importance. The development of the chlorine bleaching industry is influenced by the technical aspects of the processes involved, but also by the social and economic factors. Aspects of the life and work of Descroizilles, including topics such as the problem of cider, inventions, bleaching power and alum, as well as the contributions of Gay Lussac to titrimetry will be the subject of a future report (second part).

RESUMEN: En esta contribución se pasa revista a la vida y obra de François-Antoine-Henry Descroizilles, personaje polifacético, reconocido como un químico hábil y sabio por eminentes científicos de su época, que ejerce como profesor de química, boticario, y químico industrial. Descroizilles contribuye a dar una solución al problema de la sidra latente en Normandía primero y al blanqueo de los tejidos por el nuevo método de Berthollet en la zona de Rouen después. A este último respecto propone un método de determinar la concentración de cloro, nudo gordiano del problema. Descroizilles puede considerarse con todo justicia como padre del análisis volumétrico, pero su ingenio va mucho más allá y su nombre puede asociarse a una variedad de inventos. En la aproximación que se realiza se hace hincapié en el contexto del nuevo proceso de blanqueo por cloro, aspecto no contemplado siempre con suficientemente profundidad en trabajos previos sobre Descroizilles. En la primera parte de esta contribución vamos a situar y estudiar las condiciones de contorno de este tema, en una época en la que se despierta en las mentes el interés por las artes químicas. Sin embargo, en el desarrollo de la industria del blanqueo con cloro no solo ejercen influencia los aspectos técnicos de los procesos involucrados, sino también los factores sociales y económicos. Aspectos de la vida y obra de Descroizilles, incluyendo temas tales como la problemática de la sidra, inventos, polvos de gas, alumbre, y la contribución de Gay Lussac a la volumetría, serán objeto de un posterior estudio (segunda parte).

*Corresponding Author: asuero@us.es
Received: April 9, 2018 Accepted: May 23, 2018
An Real Acad Farm Vol. 84, Nº 2 (2018), pp. 185-203
Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

El término volumetría es familiar y se describe como el proceso analítico en el que un analito se determina por su capacidad de participar en un proceso químico (1). En dicho proceso, se añade reactivo valorante a una disolución hasta que se juzga que una reacción es completa (2-5). Las bases de este método subyacen en las observaciones de Richter sobre las disoluciones salinas, que abrieron el camino al descubrimiento de las leyes de las combinaciones químicas (6). La historia de la volumetría previa a 1806 ha sido magistralmente descrita por Rancke Madsen (7) en 1958. La necesidad de la industria de disponer de métodos rápidos para la determinación de ácidos, álcalis, carbonatos e hipocloritos se convirtió en el motor del desarrollo de la volumetría (8-12) en sus inicios. Numerosos farmacéuticos

han destacado en esta andadura por la naturaleza de sus contribuciones (13) al análisis volumétrico.

Antes de Dalton no existía la base de la teoría atómica sobre la que sustentar los principios del análisis volumétrico. Este hecho sin embargo no obró en contra de la idea imperante de que una cantidad particular de sustancia A podía reaccionar con una cantidad dada de sustancia B. Esto es, una especie de principio de equivalencia aceptado como un hecho de naturaleza y que no necesitaba justificarse sobre bases teóricas (14-16). Uno de los padres de la estequiometría, Carl Friedrich Wenzel (1740-1793), natural de Dresden y cuya formación transcurre primero en Hamburgo y después en Ámsterdam (17), donde estudia cirugía y farmacia, establece en su obra principal (18), impresa en letra gótica, y cuya tercera edición fue anotada por Hieronymus Grindel, un boticario de Riga (17):

"It is necessary that any possible combination of two bodies always be in the most exact relationship with every other one".

En este trabajo se pasa revista a la vida y obra de Descroizilles, farmacéutico, considerado padre del análisis volumétrico, aunque su genio va más allá y destaca en una variedad de campos diversos. El hecho de que Gay Lussac apostara por estos métodos, supuso un fuerte espaldarazo al desarrollo de la naciente volumetría. La aproximación al tema se lleva a cabo desde el contexto del nuevo procedimiento de blanqueo por cloro, que el genio de Berthollet idea. En este último contexto, los factores sociales y económicos son también determinantes junto a los aspectos propiamente técnicos de los procesos involucrados.

2. DEL RETO DEL BLANQUEO DE TEJIDOS

Carl Wilhelm Scheele (1742-1786) (Figuras 1 y 2), a instancias de Törbern Bergman (1753-1804), se dedica desde 1771 a 1774 al estudio del mineral sueco conocido con el nombre de "Brunsten" or "Mangenese", también como magnesia negra o de vidrieros (19-20), actual pirolusita o dióxido de manganeso. El nombre de manganeso se ha trasferido finalmente al metal que contiene el mineral, tras su aislamiento. En el transcurso de estas investigaciones, realizada con unos medios modestos, empleado como encargado de 1770 a 1775, en Uppland (Suecia) en la botica de Christian Ludwig Lock (que facilita su trabajo), que más tarde pasó a denominarse "Pharmacy at the Lion", descubre el cloro (gas ácido marino deflogisticado). Scheele hace reaccionar el ácido clorhídrico (ácido marino) con el dióxido de manganeso (magnesia negra), observando (21, p. 71), tras haber blanqueado el corcho de su frasco, la capacidad de destruir la materia colorante vegetal:

" b)...all vegetable red, blue and yellow flowers grew likewise White in a short time; the same thing happened to green vegetables…(c) the former colour of the flowers, or the green vegetables, could not be recovered either by alkalies, or acids…"

Bajo el título "De Magnesia Nigra" publica el trabajo en las Memorias de la Real Academia de Estocolmo, contribución que posee (20, 22-23, xxii) un gran valor añadido:

"Scheele, moreover, during his experiments on manganese discovered baryta, and differentiated between the green and purple compounds of manganese with potash, and was able to explain how manganese colour and decolorises glass".

Scheele interpreta conforme a la teoría de Georg Ernst Stahl (1660-1730), al que sigue, que separa el flogisto, hidrógeno en tiempos modernos (24, pp 15-16), del ácido clorhídrico, con ayuda del dióxido de manganeso, de ahí el nombre de ácido marino deflogisticado.

El procedimiento de blanqueo de los hilos y tejidos vegetales se llevaba a cabo entonces exponiendo las piezas a la luz solar (25-26) sobre los prados en el fondo de los valles, un proceso que detraía tierra para el cultivo y dependía además de las inclemencias del tiempo, no pudiendo por tanto llevarse a cabo (27) durante los meses de invierno:

"L'art de blanchir le coton est exercé en Normandie par beaucoup de personnes, indépendamment des curandiers qui en sont leur état. Presque tous y réussissent dans les saisons favorables ; c'est à-dire, depuis le premier d'avril jusqu'à la fin de septembre. Mais dans le deux trimestres d'octobre à décembre, ou de janvier à la fin de mars, les fabricans qui n'ont point eu les moyens de s'en pourvoir, sont obligés de surpayer cette main-ouvre, & d'employer des cotons dont le ners est altéré para des lessives corrosives, & dont les fils mêlés rendent le dévidage très-difficile, & occasionnent beaucoup de déchet."

Con tal motivo, la "Académie royale des Sciences, Belles Lettres et Arts" de Rouen, a propuesta de Louis-Alexandre Dambourney (1722-1795), saca a concurso en 1787 un premio de 200 libras:

"ou bien une médaille d'or de même valeur, à son choix, avec les éloges dus à ses efforts en faveur de cette portion du bien public"

destinado a solventar este problema. Las Memorias depositadas no respondieron al fin propuesto. El premio contemplaba los tres supuestos (27) que siguen, recibiendo difusión tanto en la prensa inglesa (28) como alemana (29) de la época:

1º. De blanchir le coton filé, dans le plus court intervalle de tems, entre le premier janvier & le 31 mars 1787, & au prix le moins onéreux.

2º. De lui conserver sa forcé, son élasticité, & de ménager la direction de ses fils, de sorte que le dévidage occasionne le moins de déchet.

3º. D'atteindre au plus beau blanc de neige.

Dambourney, intendente del Jardín Botánico de Rouen, advierte la presencia de colorantes en algunas plantas indígenas que estudia como sustitutos de productos exóticos. Fija un hermoso color rojo de una solidez extrema sobre terciopelo de algodón, por lo que el gobierno francés lo dota de una pensión de 1000 libras, amén de la publicación de su obra.

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

Figura 1 (izquierda). Estatua de Carl Wilhelm Scheele en el Parque Humlegården de Estocolmo (Suecia).
Figura 2 (derecha). Monumento a Carl Wilhelm Scheele en Köping (Suecia). Estatua de bronce de Milles (18 de Junio de 1912).

3. EL BLANQUEO POR CLORO DE BERTHOLLET

Claude Louis Berthollet (1748-1822) (Figura 3), tras la muerte de Macquer es designado Comisario químico, superintendente de las tintorerías estatales de los Gobelinos, en el Bureau du Commerce (30-33), órgano responsable de la política económica nacional, encargado de la implementación industrial. En palabras de Fourcroy (31), sin duda

"one of the best paid scientific post in the country"

Desde este puesto se supervisaba no solo los tintes y materias colorantes, sino también los productos químicos y materias manufacturadas. El propósito era principalmente económico, reducir las importaciones: el cristal se traía de Bohemia o Inglaterra, el acero de Alemania o Inglaterra, el amonio de Egipto, la sosa de Alicante, y el albayalde (carbonato básico de plomo) de Holanda.

Macquer estableció una relación estrecha con los artesanos y empresarios con el fin de mejorar los procesos, hecho que pone de manifiesto el entrecruzamiento de las culturas relacionadas con la química, que requiere no solo una comprensión práctica de saber hacer (know-how) y teórica, sino también un estrecho contacto (Leman, 2014) con el mundo industrial y comercial.

Da cuenta en un trabajo leído ante la Academia de Ciencias de París el 8 de abril de 1785, publicado en el "Journal de Physique", de la capacidad del cloro (34-36) para blanquear los tejidos. Ese mismo año el escocés Thomas Bell idea el cilindro de impresión de artículos de algodón, patentado (37) dos años antes. Berthollet publica posteriormente una versión más completa (38) de su trabajo original, con adiciones (39). Este acontecimiento como comenta Bailly (40) tuvo una especial trascendencia:

"Ce fut une véritable révolution, qui commença en 1784 pour ne finir qu'en 1830."

Se inicia así una tradición práctica que continúa hoy día con el uso de los blanqueadores domésticos a base de cloro.

Berthollet sostiene (con Lavoisier) que la nueva sustancia se trata de una combinación del ácido marino, (ácido muriático en la Nueva Nomenclatura) con oxígeno (que es lo que supuestamente le suministra el carácter ácido), pasando a denominarse ácido muriático oxigenado. Las disoluciones de cloro expuestas a la luz se descomponen originando oxígeno gaseoso, lo que en el marco conceptual de la época podía interpretarse como la descomposición del cloro en ácido marino y oxígeno. Según la teoría de Lavoisier se interpretaba la separación del flogisto como la adición de aire vital (oxígeno) extraído de la magnesia, y el oxígeno, se pensaba, era un constituyente de los ácidos. Desde una perspectiva moderna, la descripción de cloro de Scheele podría considerarse (24) como más apropiada. La naturaleza elemental del cloro es demostrada más tarde por Davy (41-42), sometiéndolo al test del carbón, entre otros ensayos, y bautizándolo con el nombre de "chlorine", debido a su color ya que cloro en griego significa amarillo verdoso, que Gay Lussac pasa al de cloro (23). Sir Humphry Davy (1778-1829) (Figura 4), sirvió en sus inicios como aprendiz de farmacia con M. Borlase, un boticario de Penzance en Cornwall, dirige sus estudios hacia la física y llega a ser Profesor de la "Royal Institution" en Londres. Las aportaciones del farmacéutico francés François-René Curaudau (1765-1813) a dicha naturaleza (25, 43) merecen tenerse en cuenta.

Lavoisier juzga el procedimiento suficientemente prometedor (44) para recomendarlo el 7 de Julio de 1986 al Comité Consultivo de Agricultura, creado por el gobierno en 1785, del que formaba parte (junto con Tillet, Desamrèts, Dailly, Lefévre, Thouin, Dupont de Nemours y Broussonnet). El Comité solicitó al gobierno una recompensa, pero Berthollet no recibió reconocimiento por el hallazgo ni antes ni después de la Revolución. La Sociedad de Agricultura en cambio le otorgó una medalla de oro (45) por su descubrimiento en 1791, y en 1793 el Liceo de Artes le otorga (46) una corona tras un informe de Lavoisier leído en sesión pública el 5 de mayo, suscrito también por Fourcroy.

Los principios expuestos por Berthollet eran acertados, más la puesta en escena compleja, al afrontarse una serie de problemas de elevado riesgo tecnológico, dadas las complicaciones inherentes a la construcción de las calderas y recipientes necesarios. Como todas las aplicaciones industriales requirió años de paciente ensayo y error antes de extrapolar las experiencias de laboratorio a escala en planta industrial (39, p. 255). El carácter toxico (47) del cloro

"suffocant, et qui dévore presque tout ce qu'ill touche"

y las dificultades de manejo del gas suponían factores limitantes para su empleo. Lo que reconoce Berthollet en carta dirigida a Jean François de Tolozan (1722-1802), al que Jacques Necker (1732)-1804), Director General de Finanzas y Ministro de Estado de Louis XVI otorga la supervisión de la Cámara de Comercio. Este órgano (48), al que se ha aludido anteriormente, se encargaba de otorgar subsidios para favorecer manufacturas, tras la decisión colegiada de los cuatro intendentes y del controlador general.

Se advierten (49), consecuencia del trabajo con cloro, síntomas evidentes como ataque a ojos y pulmones, dolor de cabeza y zona lumbar y hemorragia nasal, ideándose máscaras rudimentarias para mitigar su efecto nocivo. Las operaciones se transfieren a cobertizos dotados con corriente de aire, masticando algunos operarios (31) regaliz como paliativo. Había que dilucidar como conseguir el mejor contacto entre el gas y los materiales a blanquear, y como eliminar el olor del gas cloro de los artículos. El efecto corrosivo del cloro sobre las partes metálicas de la maquinaria de blanqueo suponía también una dificultad adicional. El coste del ácido muriático era tan elevado que ninguna factoría podía soportarlo por lo que Berthollet lo obtiene a partir de la sal común por tratamiento con vitriolo y la magnesia negra. Berthollet renuncia a la explotación industrial de su procedimiento (50), contentándose con darlo a conocer sin anhelar privilegio o recompensa alguna, al considerar su posición personal como Director de Tinturas, incompatible con dicho supuesto:

« Quant à la méthode du blanchiment, il fallut pas mal de tâtonnements pour y arriver. Elle es due moins à Berthollet lui-même, qu'an un certain nombre de praticiens qui, dès la publication de son invention, s'attachèrent à l'utiliser industriellement : Bonjour, Welter, Descroizilles, Widmer. »

La nueva sustancia permitía, dado su inmenso poder de blanqueo, privar a los tejidos de colores previamente impresos (51), incrementando así el número de combinaciones y repercusiones estéticas, y el valor añadido que dicha posibilidad tenía de cara a marcar tendencias en la moda en uso.

Figura 3 (izquierda). Claude Louis Berthollet (1748-1822). GALLICA: Bibliothèque nationale de France; BIU Sante, Banque d'images et de portraits. Autor de la imagen: Langlumé. Tècnica: Litografía;
http://www.biusante.parisdescartes.fr/histoire/images/index.php?refphot=anmpx10x0235

Figura 4 (derecha). Humphry Davy (1778-1829). Autor del grabado James Thomson, según un retrato de Henry Howard (National Portrait Gallery, London).

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

4. DIFICULTADES PLANTEADAS POR EL NUEVO METODO

Aparte de los inconvenientes citados, uno de los primeros obstáculos al desarrollo del nuevo sistema, al igual que la fabricación de sosa sintética (52-53) provenía de la gabela (impuesto sobre la sal), ya que la base de la fabricación (54, p. 82) del cloro era la sal:

"Unhappily for France, she laboured at that time under a system of financial disorder accompanied by heavy taxation, of which that of the gabelle, or tax on salt, was one of the most unequal and of the most severe. And as all the chlorine was extracted from this article, she was unable at once to avail herself of the full benefits which immediately acceded Britain for this discovery".

Las reticencias de los propios empresarios en contraposición a la postura adoptada por sus colegas ingleses se traducía en oposición (40, p. 8) a los nuevos avances:

"Les blanchisseurs français ne voulurent rien voir ni rien entendre…" " …nos industriels affectèrent plus que de l'indifférence: du dédain, et repoussèrent, de parti pris, les avances de Berthollet".

Bien por ignorancia o prejuicio (54, p.83):

"Besides, the arts had then made comparatively small progress with her; and ignorance, ever hostile to improvement as innovation, hindered for some time the general diffusion of the new process. Its inherent superiority was, however, too manifest to be slighted by prejudice, and too great to be destroyed by the note formidable obstacle o taxation."

O por desconocimiento del procedimiento que requería estar versado en química (55):

"Que ces blanchisseurs acquièrent quelques notions de chimie, et bientôt ces inconvénients seront remplacés par tous les avantages attachés au procédé berthollien"

lo que subraya también Guyton de Morveau (56, p. 590)

"La description de son procédé & le détails qu'il a donnés sur ce nouvel art dans les annales de chimie, seront voit quels succès on peut attendre des découvertes chimiques pour le perfectionnement des arts & combien il est important que les personnes qui sont à la tête des manufactures ou qui veulent en élever de nouvelles, prennent des connaissances étendues de chimie… "

y O'Reilley (57):

"Mais les difficultés que présentait l'emploi de l'acide muriatique oxygéné ont effrayé un grand nombre de manufacturiers, il fallait des connaissances chimiques, et les ouvriers ne sont pas des chimistes"

aunque también contribuyó a la suspicacia artículos en mal estado introducidos desde Inglaterra (55) en el mercado:

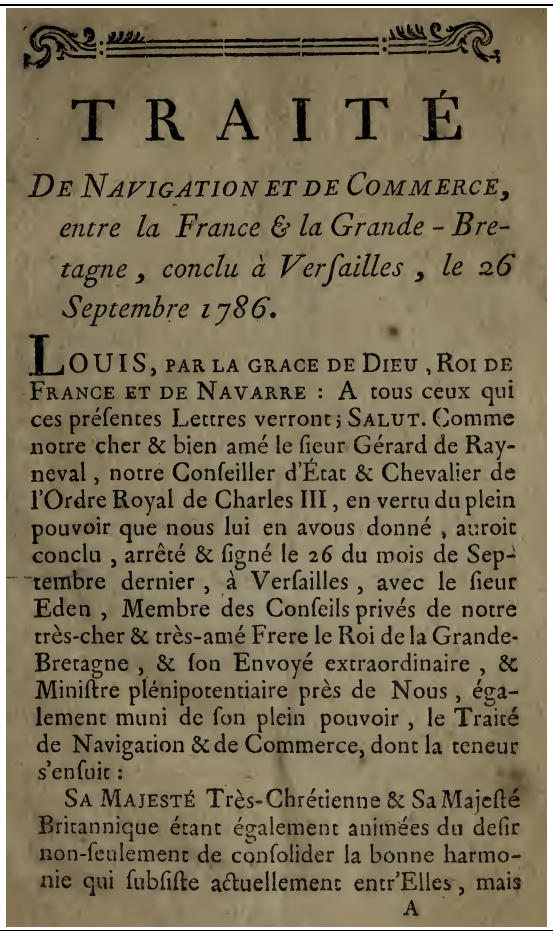
"Il est vrai qu'il a été répandu beaucoup de toiles mal blanchies dans le commerce; l'Angleterre en a surtout fait passer sur le continent de grandes quantités, qui étoient dans ce cas."

y el boicot, al que fue sometido por ejemplo Bonjour, discípulo de Berthollet, tras brillantes ensayos llevados a cabo en Valenciennes, temerosos los lugareños de verses privado de su negocio (58, p. 529), teniendo grandes dificultades para encontrar un terreno donde instalarse, lo que consigue en Aunay, a una legua de distancia, gracias al conde de Bellaing, interesado en su iniciativa. Estos movimientos pueden sólo entenderse en el marco del complejo terreno de la política, ya que Bonjour no consigue por parte de Tolozan una concesión (privilegio), ni siquiera tras la insistencia del propio Berthollet.

En 1786 la diplomacia desarma a la industria francesa frente a la competencia británica (59) al firmarse un tratado de libre comercio conocido con el nombre del negociador inglés, Edén. El 3 de septiembre de 1783, se pone fin a la guerra de la independencia norteamericana, firmándose el tratado de Versalles entre Gran Bretaña, Estados Unidos, Francia y España (Figuras 5 y 6). De forma temporal, se renuevan entre Francia y Gran Bretaña las disposiciones comerciales prevenidas en el tratado de Utrecht (1715), debiendo suscribirse antes del 1 de Enero de 1786, conforme al artículo decimoctavo del tratado de Versalles, un acuerdo de reajuste (60) sobre una base recíproca. Tras alguna dilación dada la falta de interés por parte inglesa y amagos de prohibiciones por parte francesa, se procede a la firma el 26 de septiembre.

El tratado reducía las barreras comerciales entre la industria textil británica y la importación de vinos franceses, fue objeto de una fuerte controversia (61) en Francia:

"En Angleterre, depuis plus d'un siècle, le système commercial est fixé ; il est national, les ministres m'y peuvent rien changer… En France, point de plan arrêté ; l'édifice élevé par un ministre est souvent renversé par son successeur…Point d'encouragement à l'exportation des fabriques nationales. Peu d'obstacles á l'importation des fabriques étrangères."



TRAITÉ

De Navigation et de Commerce, entre la France & la Grande-Bretagne, conclu à Verſailles, le 26 Septembre 1786.

LOUIS, par la grace de Dieu, Roi de France et de Navarre : A tous ceux qui ces préſentes Lettres verront; Salut. Comme notre cher & bien amé le ſieur Gérard de Rayneval, notre Conſeiller d'État & Chevalier de l'Ordre Royal de Charles III, en vertu du plein pouvoir que nous lui en avons donné, auroit conclu, arrêté & ſigné le 26 du mois de Septembre dernier, à Verſailles, avec le ſieur Eden, Membre des Conſeils privés de notre très-cher & très-amé Frere le Roi de la Grande-Bretagne, & ſon Envoyé extraordinaire, & Miniſtre plénipotentiaire près de Nous, également muni de ſon plein pouvoir, le Traité de Navigation & de Commerce, dont la teneur s'enſuit :

Sa Majesté Très-Chrétienne & Sa Majeſté Britannique étant également animées du deſir non-ſeulement de conſolider la bonne harmonie qui ſubſiſte actuellement entr'Elles, mais

A

Figura 5 (izquierda) Placa conmemorativa del reconocimiento de la Independencia de los Estados Unidos de América. Figura 6 (derecha). Tratado de navegación y de libre comercio de 1786 entre Francia y Gran Bretaña; https://archive.org/details/traitdenavigatio00fran

El tratado de Eden se considera a menudo como una de las causas que precipitó la Revolución Francesa, al sentirse el pueblo perjudicado (invasión de la mercadería inglesa *versus* artesanos sin oficio). La duración del mismo fue breve 1787-1793, dado el nuevo escenario surgido tras la Revolución, la ley de Extranjería promulgada por el Parlamento Británico el 8 de Enero de 1793, y el estallido de la guerra (Primera Coalición a la que se une Gran Bretaña).

En 1806 miembros de la Sociedad Libre de Rouen para el fomento del comercio y de la industria envían (62) a la Academia de Ciencias, Buenas Letras y Artes de Rouen cincuenta ejemplares de un informe realizado por la Sociedad acerca de la posibilidad de sustituir en Francia el algodón hilado y tejidos procedentes del extranjero, y sobre la necesidad de su prohibición. Las tasas aduaneras aplicadas a la postre a los tejidos procedentes del extranjero contribuyó a proteger el mercado nacional. Otras dificultades con las que tuvo que luchar la implantación del método las consideraremos en la segunda parte de esta contribución.

5. EL AGUA DE JAVEL

El método de Berthollet consistente en principio en el empleo de una disolución del gas cloro en agua era poco práctico, dado el olor insoportable de esta disolución y sus emanaciones, incómodas para los obreros empleados en los talleres y que a menudo originaban problemas de salud (llegando hasta escupir sangre), siendo forzados a trabajar con máscaras. Basta añadir potasa que entonces se llamaba álcali fijo para volver la disolución incolora, sin reducir su poder de blanqueo.

Bajo los auspicios del Conde de Artois (63), hermano de Louis XVI, y futuro Carlos X (rey de 1824 a 1830), se crea en 1777 una manufactura de productos químicos y sales minerales en la aldea de Javel a lo largo del margen izquierdo del Sena, al sur de la zona de Grenelle, sobre el emplazamiento de su famoso molino (desaparecido en 1771), antaño un famoso (64) cabaret (como otros molinos de la época).

"Vers ce temps le moulin de Javel était devenu une guinguette, réputée pour la licence qu'on y tolérait…"

que da origen a una comedia (65) en un acto estrenada en el Teatro Francia el 7 de junio de 1696. La factoría se construye sobre una parcela perteneciente a una comunidad religiosa de la parroquia de Van Ves, al negarse la Escuela Militar Real a ceder unos terrenos, por el recelo bien o mal fundado (66) que despertaban los vapores sulfurosos. Los químicos Léonard Alban y Mathieu Vallet, poseedores de un amplio conocimiento y experiencia acreditada en el tramo,

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

ejercen las labores de dirección. Se cuenta con la ayuda financiera de (67, p. 225) Antoine Bourboulon de Bonneuil (tesorero de la Casa del Conde de Artois), Jean Baptiste Buffault (tesorero de la ciudad de Paris) y Denis-Pierre Jean Papillon de La Ferté (Director de la Platería y Asuntos del Rey, tesorero de la Casa del conde de Provenza)

"capitalistes qui s'intéressaient aux progrès de l'art et à l'accroissement du royaume".

Esta factoría, situada a unos kilómetros de París, se beneficia de su relativo aislamiento, y viene a sustituir a otra creada por Alban y Vallet, en Agosto de 1777, en Epinay-sur-Seine, que dada la contaminación ambiental y vapores nocivos generados motivan su cierre tras las protestas de la vecindad, recibiendo a cambio [66] una generosa indemnización.

Esta industria floreciente, única (68) en su género:

"Cette manufacture est dirigée par deux personnes très instruites dans cette partie. Rien n'est mieux entendu que les fourneaux pour l'oeconomie du chauffage et rien n'est plus curieux que la chambre de rectification pour l'huile de vitriol. C'est un chef d'oeuvre de manufacture. Les entrepreneurs font un secret de leur manipulation et de la préparation de leurs terres, quoiqu'il soit bien connu."

se dedica primero a la fabricación de aceite de vitriolo (ácido sulfúrico), vitriolos (sulfatos), e.g. sal de Glauber, agua fuerte, espíritu de la sal (mezcla destilada de ácido sulfúrico y de sal marina), alumbre, y blanco de albayalde (céruse), y cloro (a partir de 1780) llega a emplear en 1875 doscientos obreros), integrando las manufacturas de ácido, álcali y de blanqueo, y convirtiéndose gracias a esta asociación, y a la protección de los poderes públicos, en la primera manufactura química de Francia. El balance comercial con respecto a los ácidos fuertes se torna (69) en esta nación favorable:

"L'année 1781 est la première qui nous soit favorable, c'est aussi l'époque du mouvement qui fut imprimé au esprits ver l'étude des arts chimiques".

Es con el ácido sulfúrico suministrado por Javel que Charles y Robert producen el hidrógeno (por reacción con hierro) necesario para sus vuelos, en 1783. En Octubre de 1784, Alban y Wallet, interesados también por los aerostatos, promueven una suscripción para la construcción de un gran globo de hidrógeno de 38 pies de diámetro, probablemente con el apoyo financiero del Conde de Artois, lo que explica haber sido bautizado con su nombre y decorado con su escudo de armas (70), que en el transcurso de 1785 efectúa múltiples ascensos.

Por dos veces acude Berthollet en 1786 a Javel para explicar su procedimiento de blanqueo de telas. En 1787, la manufactura se vuelca en un procedimiento de blanqueo de cloro a base de hipoclorito de potasa, popularizada con el nombre de agua de Javel, para atenuar el efecto sobre el público del término cloro. En Francia estos hipocloritos se volvieron populares quitamanchas a escala doméstica, mientras que en Inglaterra la mayoría de los hogares usaban ácido oxálico, a menudo con consecuencias funestas (31). Con un aparato de Woolf (balón de vidrio donde se obtiene el gas cloro, matraz lavador y cuba para lavar y disolver el gas) (31, 71) cerca de Paris se produce, en 1788, el agua de cloro fuertemente alcalina, añadiendo al agua la potasa antes que el cloro y no después como hacía Berthollet, constituyendo la prioridad de obtención del producto motivo de litigio, aunque (50, p. 276)

"they were right from a practical bleaching point of view".

El elevado coste de la potasa plantea otras alternativas

"si le coût de la potasse rendait le produit beaucoup plus onéreux il slavera plus tard qu'on pouvait la remplacer tout aussi bien par de la craie en suspension".

solución ya apuntada por Descroizilles, como reconoce (72) el propio Berthollet

"Pour diminuer l'odeur importune de l'acide muriatique oxigéné, Decroizille y fit un mélange de carbonate de chaux ou de craie. "

y que no perjudica las propiedades de blanqueo, aspecto sobre el que insistiremos mas adelante al tratar sobre la conexión inglesa, en la segunda parte de este trabajo. Thomas Henry, de Manchester, fue también uno de los primeros (16) en sugerir la acción de la cal.

En 1820 Antoine-German Labarraque (1777-1850), farmacéutico, sustituye (73) en el agua de Javel la potasa por la sosa, más barata, y estudia sus usos médicos y farmacéuticos, y en 1969 la NASA la utiliza para desinfectar el Apolo XI a su regreso de la luna (74), con objeto de evitar la contaminación de la tierra por posibles virus. Por otra parte, las reacciones de formación y descomposición del HOCl en la estratosfera han sido objeto (75) de investigación científica desde 1980s.

El agua de Javel pasa con mucha facilidad a Inglaterra, donde uno de los propietarios de la compañía, Bourboulon, acompañado por Mathiew Vallet, se había refugiado en marzo de 1787 tras presentir la bancarrota. Ambos establecen cerca de Liverpool una manufactura para producir su "lessive". Vallet, definitivamente instalado al otro lado de La Mancha, contribuye con un papel importante al desarrollo (76) en Lancashire de la nueva industria del blanqueo. Bourboulon retorna a Paris en 1795 (Año IV) y los hermanos Buffaultse hacen con todos los derechos de la empresa en 1800 (Año IX), quedando en posesión de su familia (77) hasta su venta en 1846. La factoría de Javel desaparece entre 1885 y 1889, dando paso paulatinamente a las acerías, a depósitos y almacenes generales de Paris, y desde 1915 a Citroen, destinada primero a la fabricación de obuses de guerra y después a la fabricación de automóviles. En este barrio de Javel, integrado en la ciudad de Paris en 1860, y actual distrito 15, situado frente al de Boulogne, completamente remodelado en los últimos decenios, la placa del Moulin-de-Javel recuerda desde 1993, esta aventura (78). En el 2003 una pequeña plaza situada en el barrio recibe el nombre de Plaza del Molino de Javel. Estación de metro Javel-Citroen.

Por disolución de cloro en disolución de potasa había obtenido Berthollet a comienzos de 1787, una nueva sal, el clorato de potasio (muriato suroxigenado), carente de poder

blanqueante y de carácter explosivo, ensayada en el Arsenal junto a Lavoisier, como base de una nueva pólvora explosiva, que culmina con un trágico accidente (dos muertes) en la fábrica de pólvora de Essonnes. Basta introducir un suficiente exceso de potasa en la disolución de cloro, como demuestra más tarde Balard, para hacer desparecer el clorato y obtener el hipoclorito, de forma eficaz y sin peligro. Las investigación de Bertholet sobre el ácido muriático convergió con otra ruta (54) bastante diferente de desarrollo de armas.

Figura 7. La orilla del Sena en Javel. Fuente : GALLICA, Bibliothèque nationale de France; http://gallica.bnf.fr

6. WATT EN PARIS

El uso del cloro como agente de blanqueo despertó un enorme interés en toda Europa, pero especialmente en las zonas carentes de sol en Gran Bretaña, donde la industria del algodón estaba llevando a cabo sus experimentos en mecanización durante esos años. James Watt (1736-1819) y Matthew Boulton (1728-1809) (Figura 8), miembros de la Lunar Society (79) llegan a Paris dos meses después de la firma del gran Tratado de Comercio firmado en 29 de septiembre de 1786. No hay duda de que este viaje debe haber estado en la mente de Sir Humpry Davy, cuando siguió sus pasos doce años más tarde, acompañado de Faraday como asistente, con un salvoconducto pues entonces era territorio enemigo, tras el estallido de la guerra.

La invitación corre a cargo del gobierno francés actuando Aimé Argand (1750-1803), compañero de Boulton y amigo de Watt como enlace por encargo de Charles Aleixandre de Calonne (1734-1802) Controlador General de Finanzas, y aprovechan la ocasión para visitar a sus hijos, en Francia por motivos de estudios. Argand, físico suizo, idea una lámpara en la que el farmacéutico parisino Antoine Arnoult Quinquet (1745-1803) introduce mejoras (76, 80), de ahí que se conozca con el nombre de este último (quinqué, en español). Las circunstancias políticas impidieron la materialización de negocios (exclusivos) concretos, uno de los propósitos del viaje de Watt y Boulton, junto con la supervisión de algunos ingenios. Calonne cae en 1787 tras el rechazo de la Asamblea de Notables a las medidas que propugna, dada la comprometida situación económica del país.

La recepción brindada a Watt y Boulton es excelente, especialmente por parte de los hombres de ciencia (Lavoisier, La Place, Monge, Berthollet, De Prony, Hassenfratz, Fourcroy, Delessert, y otros) que reconocen a Watt como uno de los suyos (76, 81-82)

"drunk from morning till night with Burgundy and undeserved praise"

estableciéndose lazos permanentes como acredita la correspondencia a lo largo de los años, al respecto. Watt es nombrado (83) uno de los ocho miembros asociado extranjero 1ª Clase (Ciencias Físicas y Matemáticas) de la Academia de Ciencias de Francia el 10 de octubre de 1814. Francisco Arago (1786-1853) pronuncia tras fallecer Watt su discurso de elogio (84), quizás el mejor que se hayan realizado, a pesar de provenir (85) de Francia y no de Gran Bretaña.

Durante su estancia en París Watt asiste con gran interés a los ensayos de laboratorio que Berthollet llevaba a cabo (38, p. 160; 72, p. 12) sobre un nuevo procedimiento de blanqueo de telas.

"Voilà à peu près le terme où en étaient mes expériences, l'orsque je fils des essais en présence du célèbre M. Watt. Un coup-d'oeil suffit à un physicien dont le génie s'est exercé si long-tems sur les arts"

Watt pasa por ser ingeniero mecánico, pero su talento químico es obvio (86) como reconoce Davy (87-89) en 1824 en el transcurso de un acto inaugural de un monumento en su memoria, presidido por el Primer Ministro Lord Liverpool, en presencia de los más distinguidos personajes del Reino:

"Those who consider James What only as a great practical mechanic form a very erroneous idea of his character: he was equally distinguished as a natural philosopher and a chemist, and his inventions demonstrate his profound knowledge of those sciences, and that peculiar characteristics of genius, the union of them for practical

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

applications...”

Watt intenta patentar el procedimiento en Inglaterrra con la anuencia de Berthollet quien declinó el ofrecimiento, al no desear éste verse envuelto en las aplicaciones industriales de sus descubrimientos (90) y hacerlos público libremente. Apenas un año después de su llegada a Inglaterra introduce en la práctica a su suegro Macgregor, dedicado al blanqueo de campo, supervisando las experiencias y se dirige (38, p. 212; 72, p.12) a Berthollet:

“qu’il était arrivé a faire blanchir 500 pièces chez Mac Grégor, industriel à Glasgow, et que dès maintenant on pouvait considérer sa méthode comme la meilleure, la plus expéditive et la plus économique”.

De la correspondencia entre Berthollet y Watt vamos a entresacar unos ejemplos que versan (91, p. 251) sobre los asuntos del blanqueo

“Watt a Berthollet (25 febrero 1787). MONSIEUR, - L’accumulation des affaires, suite nécessaire de notre longue absence de chez nous, m’a empêché jusqu'à présent de me préter à votre affaire de blanchiment, mais je n’ai pas oublie cette importante affaire, ni son plus nos promesses de vous aider tant qu’il nous serait possible.”

sobre la inquietud que manifiesta Berthollet en torno a los acontecimientos (92, p. 228) desencadenados con motivo de la Revolución

“Berthollet a Watt (Paris, 9 Août, 1789). MONSIEUR, - Pendant que vous vous occupez tranquillement des sciences et des arts, qui vous ont de si grandes obligations, nous avons été obligés de les perdre de vue. La férocité des grands, l’insurrection des citoyens, la fureur du people, le fléau de la famine, ont absorbé toute notre attention : cependant if faut revenir aux occupations paisibles, et l’on peut commencer à jouir des douceurs de l’étude. Je reprends mes expériences.”

y sobre la amistad duradera (92, p. 317) de ambos colegas a lo largo de los años

“Watt a Berthollet (Heathfield, near Birmingham, Dec. 26 th, 1810). MY DEAR SIR, - There is nothing more grateful to an old man like me, tan to find himself remembered by his old friends, and to be esteemed worthy of notice by such a person as you are.”

Figura 8. Matthew Boulton (1728-1809), James Watt (1736-1819), Richard Arkwright (1732-1792) y Josiah Wedgwood (1730-1795), pioneros de la Revolución Industrial (Royal Mail Postage, Great Britain).

7. EL CIRCULO INDUSTRIALL DE ROUEN Y LA CASA DE FONTENAY

Tras el éxito anunciado por Watt, uno de los discípulos de Berthollet, “Bodeau de Grancourt”, viaja a Rouen, provisto de cartas de recomendación para “de Crosne”, intendente de guerra, y para los notables de la cámara del comercio del lugar, con la finalidad de involucrar a los empresarios industriales de la región (36, p. 213) en la adopción del procedimiento de su maestro.

Rouen era entonces (93) un verdadero centro científico. John Holker (1719-1786), escocés, jacobino, huido de Inglaterra, acababa de crear en el barrio Saint-Sever, cerca de Rouen, en 1767, bajo el nombre de Châtel et Cie, la primera factoría de ácido sulfúrico del continente, que recibe el apoyo del Gobierno al liberar a Francia del (93) monopolio inglés, aunque no adapta el método de las cámaras de plomo de Roebuck y Garbet, bien establecido en Gran Bretaña, hasta unos años más tarde.

Holker, realiza una labor loable como responsable de la transferencia de la industria algodonera de Manchester a Rouen, incluyendo el espionaje industrial (94). Fija su residencia y la de su familia en Ruen. Funda la primera hilatura mecánica creada en el barrio de Saint-Server en 1751, gracias a los subsidios del duque de Choiseul, siendo

dotada por orden de 19 de septiembre de 1952 de un privilegio para la fabricación de terciopelo y sábanas de algodón con el anuncio de manufactura real. Su hijo Jean Louis Holker (1770-1844) descubrió el método de combustión continua en la manufactura del vitriolo, que llevó a cabo, en primer lugar en Rouen, y después cerca de Paris. Holker es nombrado Inspector General de Manufacturas extranjeras. El gobierno británico preocupado por su éxito le ofreció en 1764 el perdón y una pensión vitalicia de 600 libras para facilitar su regreso, oferta que Holker rechaza, obteniendo la nacionalidad francesa en 1766.

El resultado de la demostración antes comentada llevada a cabo por Grancourt, que tuvo lugar en la "12 Quai de Paris" de Rouen, no pudo ser peor, ya que unos hilos se blanqueaban tan solo de forma externa mientras que otros se quemaban invalidándose para su uso. François-Antoine-Henri Descroizilles (1751-1825), farmacéutico en Dieppe, uno de los primeros discípulos (95-97) del maestro boticario Hilario Martin Rouelle (hermano de Rouelle "el viejo" "Démonstrateur" del Rey en el Jardín de Plantas), y comisario de la demostración anteriormente descrita, se interesa por el problema.

Figura 9 (izquierda). Pierre-Nicolas de Fontenay (1743-1806):
https://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Pierre_Nicolas_de_Fontenay.JPG
Figura 10 (derecha) Busto de Pierre-Nicolas de Fontenay:
http://www.treboscvanlelyveld.com/portfolio-archive/deseine/

Gracias al sostén financiero del comerciante Alexandre de Fontenay (1784-1844), entonces Alcalde de Rouen y también comisario del evento, emprende a partir de 1789 ensayos industriales en Lescure (cerca de Rouen), en el emplazamiento donde son construidos más tarde (98) los establecimientos de indianas Keittinger conocidos en toda Francia.

La vida de la Casa Defontenay (99-111) constituye un ejemplo interesante de las condiciones de contorno en las que se desarrolla la época objeto de esta contribución.

Guilbert (99, 109) lo retrata en una triple vertiente como hombre de negocios -del comercio marítimo- y

Pierre Nicolas Defontenay (1743-1806) (Figuras 9 y 10), primogénito de una familia de comerciantes se dedica, tras estudiar en los jesuitas, al mundo de los negocios, al igual que lo hace su hermano Alexandre (1748-1833), mucho más longevo, mientras que el tercero se decanta por la carrera militar

"M. Defontenay a été du petit nombre d'hommes que son parvenus aux dignités sans intrigue, sans prôneurs et par la seule recommandation de leurs belles qualités".

fabricante (diligente, prudente y honrado), funcionario publico (comprometido, sagaz y desinteresado) y ciudadano ejemplar (ejemplo de sumisión, coraje y

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

virtudes sociales). Administrador de hospitales y presidente de la cámara de comercio de Rouen, antes de estallar la revolución. Elegido (100) diputado de las cortes generales en 1789, contribuyendo a la redacción de leyes y reglamentos en el comité de comercio de la asamblea constituyente. Se opone a la emisión de papel moneda lo que le acarrea no pocos inconvenientes. Ante la sugerencia de Alexandre de que evada capitales en previsión de salvaguardar el patrimonio de la familia, y de que se marche con sus hijos al extranjero comenta (99, p. 8; 109, p. 292):

"La spéculation que vous me proposez, peut être avantageuse; mais elle ne peut me convenir. Jamais je ne souscrirai a une opération que serait contraire aux intérêts de mon pays".

Alcalde de Rouen en 1792, sufre la insurrección (Figura 11), (encerrona) del 29 de agosto, que resuelve presentándose ante los insurgentes escoltado tan solo por el procurador de la comunidad. Rouen sentía entonces durante las 24 horas del día las sacudidas eléctricas de las conmociones acaecidas en París.

Figura 11. Escena en la vida pública (111) de Pierre-Nicolas de Fontenay, alcalde de Rouen en 1792. Museo de Bellas Artes de Rouen, inv. 1874.5. Pintor: L.L. Boilly.

Presidente del Departamento del Sena Inferior al año siguiente, que mejor muestra de reconocimiento público (100, p. 35)

"Heureux le mortel que ses concitoyens peuvent prendre pour modèle, et que leur estime, leur vénération accompagnent jusque dans la tombe¡ ".

Encarcelado durante el Terror en 1793, al ser acusado de moderantismo; toda Rouen se manifiesta a favor de su causa. Alexandre se ofrece a canjearse en su lugar y se sirve del comité de seguridad general para obtener la libertad de su hermano. En el año 1799 retoma su carrera administrativa siendo nombrado alcalde de Rouen, a propuesta del gobierno consular, siendo el primer alcalde de una gran ciudad que tuvo el honor de rendir honores al primer Cónsul (más tarde augusto Emperador) como jefe de estado, que aprecia sobre el terreno su mérito (108, p. 90)

"Il reçut aussi, le premier, une écharpe d'honneur, et une boîte ornée du chiffre du Peuple Français".

« Je vous envoie une écharpe d'honneur ; je désire que vous la portiez. Que les Rouennais y voient une preuve de la satisfaction que j'ai éprouvée, et du cas que je fais de votre personne »

Se declara partisano durante el golpe de estado del "Brumario", lo que le otorga nuevas dignidades (105). Miembro del Consejo general de manufacturas y comercio (año XI), recibe primero la Legión de honor (año XII) y ese mismo año se convierte en comandante de la orden, y un decreto del primer Cónsul lo eleva al Senado conservador de forma vitalicia.

El comercio al que se dedica consiste en hacerse en el extranjero con las materias primas, enviando de vuelta los productos elaborados, tarea en la que se empeña hasta 1783. Observa como la industria inglesa perfecciona sin cesar sus productos, disminuyendo los costes de la mano de obra, y se empeña en sacar a la industria francesa de la dinámica de rutina. Contribuye a sacar a flote una rama que proporciona nuevos medios de subsistencia, liberando al país del tributo que acostumbra a pagar a la nación rival. Accionista del establecimiento de la hilatura de Louviers, presta además fuertes sumas con objeto de que la empresa llegue a buen término, dotando a Francia de una nueva fuente de prosperidad general.

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

"La première-machine a filer le coton, établie a Louviers, a dû son existence à la maison de Fontenay (108)".

Alexandre se encuentra muy ligado a Pierre Nicolás. De diferentes caracteres, el reparto de roles se efectúa entre ellos de forma natural. El hermano mayor, esposo ejemplar, padre de familia, se aposenta en Rouen. Alexandre más vivo, más emprendedor, recorre (102) Francia, España e Italia para recabar clientes y aumentar la cartera de negocios

"Les laines destinées à l'approvisionnement de nos fabriques de draps, et les toiles envoyées à Cadix pour la consommation de l'Amérique espagnole, composaient les deux branches principales du commerce de la maison De Fontenay. Avant de partir pour l'Espagne, Alexandre avait étudié à fond la fabrication des draps en France, et aucun détail ne lui en était étranger. Il savait donc quelle espèce de laine était en particulier nécessaire à chaque manufacture ; facilement ensuite il allait choisir en Espagne les qualités qui étaient le mieux assorties à ces besoins…"

"Les mêmes moyens ne lui auraient pas réussi de l'autre côté des Pyrénées ; mais là, il s'était fait connaître et apprécier par le comte de Florida-Bianca, qui rêvait pour l'Espagne les améliorations qu'on n'a pas cessé de rêver depuis. Il s'était lié avec les Cabarus, les Isquiedos, les Moralès ; il fournit le tribut de ses lumières à l'utile entreprise du canal de Murcie, et y prit des actions…"

"Le premier emploi qu'il fit de son crédit en Espagne, fut de reconquérir pour sa maison le commerce des toiles destinées à l'approvisionnement de l'Amérique méridionale. Ces toiles, connues sous le nom générique de blancars, s'expédiaient de Rouen à Cadix ; et il faut le dire pour marquer d'un seul trait le commerce de cette époque, les maisons capitales de Rouen, les Le Couteulx, les Lefebure, les Ribard, les Fontenay, les Grandin, etc., expédiaient ces toiles en ballots, sous leur marque. Nul doute ne s'était élevé jamais sur la qualité ni sur la quantité des toiles que contenaient les ballots ; aussi ne songeait-on nulle part à les vérifier, et Mexico recevait avec une confiance aveugle, parce qu'elle n'avait pas encore été trahie, les marchandises que Rouen lui envoyait sous cordes…"

"Alexandre de Fontenay rappela la confiance des Espagnols par sa parole, à laquelle il ne donnait à personne le droit de ne pas croire. Il obtint des commandes considérables, et exécuta les ordres qu'on lui avait donnés avec une si scrupuleuse loyauté, que sa maison reprit à Cadix, et garda jusqu'à la révolution, l'ancien privilège que les marchandises qu'elle expédiait parvenaient aux colonies espagnoles dans l'état où elles étaient parties de Rouen".

La muerte de Holker en 1787 entraña (99, 111) la ruina de la manufactura de terciopelo de algodón establecida en Saint-Paul, encontrándose su hijo Jean Louis ausente en América. Los accionistas desanimados por las pérdidas que motiva el Tratado de Libre Comercio firmado con Inglaterra el año anterior, están resueltos al cierre. A pesar de la amenaza de ruina, la Casa Defontenay se hace con las acciones, y se convierte en propietaria. Los beneficios no responden a las expectativas transcurriendo durante los dos primeros años cuantiosas pérdidas, aunque a cambio se conserva una rama de la industria esencial, evitando que los obreros tengan que buscar refugio en talleres de caridad, al asegurar la subsistencia de las familias afectadas.

La familia DeFontenay saluda con la Revolución el alba de un orden nuevo no dudando en apostar por los cambios, tratando de abrir las vías que la revolución en sus inicios (102) viene a ofrecer al comercio. Pierre Nicolás suena es elegido (de forma casi unánime) como diputado, regresando al término de la asamblea constituyente, como primer magistrado de la ciudad. Las circunstancias son duras y para evitar el declive Aleixandre se interesa por otros temas, e.g. la explotación de los bosques del Conde d'Évreux, pertenecientes al duque de Bouillon, la introducción en la fabricación de hierro de procedimientos novedosos más potentes y expeditivos que los empleados tiempo atrás (lo que el gobierno requisa para el servicio de artillería, dificultando las transacciones comerciales o industriales, con pérdidas que reclama al correspondiente ministerio), o la compra en 1792 del dominio nacional de Saint-Paul, en el barrio de Rouen, donde establece un taller de tintes.

En este contexto, la industria debe estar agradecida a la Casa Fontenay por su contribución a la aplicación del método de blanqueo por el ácido muriático auspiciado por Berthollet, al comunicar Descroizilles (Figura 12) a Alexandre Defontenay su deseo (99) de probar fortuna y ponerse de acuerdo Alejandro y Nicolás en abordar los cuantiosos costes derivados de dicha empresa.

"Un de nos collègues, M. Descroizilles, l'aine, avait conçu le projet de tourner cette découverte au profit des fabriques. Pour y parvenir, il devenait, avant tout, indispensable de multiplier les essais. Jusque-là, on considérait cette découverte comme une brillante théorie dont les résultats n'étaient pas encoure prouvés, D'heureux résultats pouvaient seuls lever les incertitudes et triompher des préventions. Il était impossible enfin de réussir sans de expériences dispendieuses, sans les ustensiles, les apprêts et les bâtiments convenables. M. Descroizilles communique son dessein à M. Alexandre Defontenay. Ce citoyen en parle aussitôt à son frère, et tous deux tombent d'accord qu'il n'est point d'établissement plus propre à procurer de grands avantages aux manufactures du département. Tisserands, bonnetiers, teinturiers, apprêteurs, ne doivent bientôt plus être obligés de suspendre leurs travaux, même pendant les rigueurs de l'hiver. Les frères Defontenay se fient, sans hésiter, aux connaissances chimiques et au zele actif de M. Descroizilles. Bref, un blanc dont l'éclat l'emporte sur celui qui sont les curandiers dans la plus belle saison, sort du nouvel établissement. Les soins de M. Descroizilles redoublent. La maison Defontenay seconde efficacement cet habile chimiste de sa fortune et de son crédit. C'est donc, d'une part, au patriotisme de M.M. Defontenay, et à

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

la persévérance de M. Descroizilles que les fabriques sont redevables du succès du procédé de blanchîment par l'acide muriatique, maintenant pratiqué sur divers point de l'Empire".

"Alexandre de Fontenay releva le courage du chimiste qui avait construit la première blanchisserie, lui fournit des fonds, paya ses fautes, et fit des sacrifices jusqu'à ce que le procédé fût devenu usel ; et il le devint, en dépit de ce qui avait manqué de prudence à celui qui l'avait introduit".

Alexandre es elegido (106) para la cámara de los Cien-Días, y se le concede la Legión de Honor en 1831. Hombre de acción, pero siempre al corriente de las obras de economía política de la escuela de Edimburgo y de los escritores franceses. Contrario al establecimiento de barreras arancelarias mal entendidas, admite la necesidad de proteger las industrias incipientes frente a las extranjeras bien establecidas, y proyecta ventajosamente en circunstancias difíciles, las manufacturas de algodón, a pesar de la presión inglesa. Publica obras (102) sobre importantes materias, e.g., tratado de las diferentes maneras de hilar el algodón, o sobre las tarifas de aduanas, en donde establece le preferencia que le merece la de 1791 sobre la de 1832.

Saca a colación lo que paga en impuestos un ingles, en derechos feudales y por la tasa de los pobres, con lo que paga un francés en todo tipo de contribuciones, encontrando que el inglés paga el doble que el francés, lo que no puede explicarse más que por la extensión del comercio y de las manufacturas, tan vivamente perseguida a uno de los lados del estrecho como tan olvidada en el otro. Resume su doctrina en una simple proposición (102, p. 90)

"Enrichir pour imposer, voila l'art; ruiner en imposant, voila la folie".

Llama la atención sobre una observación hecha en Inglaterra por Pitt, uno de sus primeros hombres de estado (102, p. 91)

"que les deux tiers de ce que gagne un tisserand entrent au trésor public dans l'espace d'une année".

Alexandre no se limita a publicar; llama a la puerta de los ministros y personas influyentes, recabando la causa del interés público que con tanto ahínco y calor alienta. Alexandre De Fontenay, caballero de la Legión de Honor, miembro de la Sociedad libre de Fomento, fundador del primer establecimiento de gran hilatura establecido en Francia, decano de los fabricantes del departamento del Sena Inferior, fallece en el seno de un establecimiento industrial, Saint-Paul en el barrio de Rouen, con las botas puestas.

Volviendo a Bodeau de Grancourt, al dar a conocer a Descroizilles el dispositivo de Velter para la absorción del cloro (93), facilita mucho sus investigaciones. Descroizilles llega a una solución del problema que el blanqueo con cloro plantea añadiendo simplemente tiza al agua sobre la cual borboteaba la corriente de cloro gaseosa, como se ha indicado previamente (72) antes de que Berthollet encontrara su famosa agua de Javel.

Según Dubosc (93) acababa de inventar el cloruro de cal, al que da modestamente, como reconoce Bodeau de Grancourt en una carta dirigida al Journal de Normandie (112), el nombre de « Lessive de Berthollet »

"Encore deux mots, monsieurs et je finish. Je compte prover, sn réplique, que les fils tissus or non tissus, tant en coton qu'en lin et chanvre, blanchis par la lessive de Berthollet, son moins altérée que par la méthode ordinaire".

8. DESCROIZILLES PADRE DEL ANALISIS VOLUMETRICO

Descroizilles comprueba que la concentración de hipoclorito es el factor más importante que controla el proceso de blanqueo, e idea un método volumétrico para su determinación por valoración con una disolución de índigo, que publica en un periódico regional "Archives de Normandie" (113 p. 29). Se trata del primer ejemplo de una volumetría redox. Una descripción del procedimiento se encuentra en un trabajo de Berthollet (38, p. 162) (72, p. 15) publicado en los "Annales de Chimie":

"…mais un habile chimiste de Rouen, M. Décroisille qui faisait aussi des épreuves…"

Siempre interesado en los factores que afectan al rendimiento, Descroizilles encuentra que la producción de cloro se incrementa cuando se sustituye el ácido clorhídrico concentrado por el ácido sulfúrico en la proporción 1:1 (114, pp 517-518), y establece una manufactura en Rouen para suministrar el ácido sulfúrico necesario (115, p. 85; 26) para el procesos de blanqueo ideado por Berthollet. La innovación del procedimiento de blanqueo, primero de su tipo en Francia, y el montaje de la gran fábrica de hilado según los procedimientos d'Artkright, convierten pronto a Rouen en el centro de la industria textil del blanqueo (97, pp v-vi):

"Ces deux innovations ont plus que décuplé les produits de nos fabriques de coton, en quadruplant le nombre de leurs ouvriers, tandis que, malgré le renchérissement inévitable de la matière première, les tissus devenus beaucoup plus parfaits, on été réduits au-dessous du tiers de leurs prix antérieurs, et par conséquent mis a la portée d'un bien plus grand de consommateurs".

Sir Richard Arkwright (1732-1792), Figura 8, patenta el marco giratorio movido por agua en 1769 y funda la primera factoría hidráulica de algodón del mundo, en Cromford (Derbyshire, Gran Bretaña) en 1771, siendo uno de los catalizadores de la revolución industrial (116-119).

Dadas las mejoras que se aportan en el establecimiento de Lescure-lez-Rouen, se decide su adopción en todas las fábricas (120). Las ventajas del procedimiento son obvias « Les tisserands, bonnetiers, teinturiers ou apprêteurs ne devaient ainsi « plus être obligés de suspendre leur travaux, même pendant les rigueurs de l'hiver (27-29, 99, 102), y el método de Descroizilles, modificado (ya que sus resultados variaban dependiendo de cuanto cloro e índigo se mezclan), gana rápidamente popularidad en la industria del blanqueo (121) dentro y fuera (54, p. 85) de Francia:

"The nature of the advantages thus introduced was truly surprising. Persons acquainted only with the modern mode of bleaching are astonished when they are informed,

that what is now the work of few days, was formerly the work of a whole summer; that what is now done almost within doors, formerly required extensive tracts of meadow ground at present under the plough; and, finally, that what is now undertaken and accomplished at all periods of the year, was then attempted during only half the year, the wintry period being wholly incompatible with the old process".

"…The saving of time and of expense to the individual, -the redeeming of so much land to the country,- and in general the activity has been given to the rapid circulation of capital in the community, have altogether been a source of incalculable benefit to the commerce of England, and to the general comfort of mankind".

Recibe una medalla de Oro del Jurado (122-124) de la Exposición de Rouen "por haber creado una de las más perfectas instalaciones de blanqueo berthollido existentes en Francia".

Figura 12. Retrato de Descroizilles según una miniatura de Judelet (Museo de Rouen) [18]. En L. Simón, Le chimiste Descroizilles (François-Antoine-Henri) 1751-1825. Sa vie – son oeuvre, L. Wolf: Rouen, 1921.

9. COMENTARIOS FINALES

Tras el descubrimiento del cloro por Scheele y el estudio de sus propiedades de blanqueo por Berthollet se abre una nueva etapa en la industria química, que entre otras consecuencias origina el desarrollo del análisis volumétrico. Si los elementos químicos fueran personajes (125), el cloro sería una celebridad. La importancia del arte de teñir y las repercusiones económicas que conlleva se ponen de manifiesto en el prefacio del traductor Domingo García Fernández en los Elementos del Arte de Teñir (126). El trabajo previo de Francis Home, William Lewis y Joseph Black también directamente relacionados con el blanqueo no debe de pasarse por alto (25-26).

Hacia mitad del siglo XVIII se hace un uso común (7, 10, 16, 127) de métodos rutinarios de ensayo en las diferentes etapas del proceso de manufactura de álcalis. De hecho, algunos de estos métodos se habían diseñado en conexión con los procedimientos de blanqueo. Guyton de Morveau (128, pp 12-13) muestra en 1782 la vitalidad de esta actividad al afirmar

"Pour la retrancher, il faut la connoître ; il faut sur-tout pouvoir arriver à cette connaissance par des moyens simples, expéditifs, qui en peu de jours deviennent une routine aveugle mais sûre dans la main des Ouvriers les moins intelligents ; cest-là sans soute e point épineux du problème, je crois cependant pouvoir en offrir une solution satisfaisante".

Sin embargo, en esta época el significado de la información analítica rutinaria en una planta comercial y sus implicaciones en los procesos llevados a cabo por los artesanos era complejo, dada su heterogeneidad.

En esta contribución se ha afrontado el procedimiento de blanqueo teniendo en cuenta no solo los aspectos científicos o técnicos sino también otros factores, e.g. socioeconómicos. Desde su posición privilegiada como Comisario químico, Berthellot potencia el empleo de un método, que exige la solución de dificultades técnicas y que requiere de conocimientos químicos, recelando del mismo a este último respecto, en primera instancia, los comerciantes dedicados a los métodos de blanqueo tradicionales.

Watt, un químico escocés de primera clase jugó un importante papel (84) en la introducción del cloro como

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

agente de blanqueo en Inglaterra:

"Aussi, quoique dans l'art du filateur les moyens mécaniques aient été poussées à leur terme, un million et demi d'ouvriers trouvent aujourd'hui de l'emploi, là où, avant les inventions d'Arkwright et de Watt, on en comptait seulement cinquante mille".

El puerto de Rouen era desde hacía mucho tiempo uno de los almacenes de Europa, y sus habitantes han contribuido (109) con muchos nombres ilustres (Fontenelle, Lemery, Dulong, Corneille, Jouvenet) al comercio, ciencias y letras. Lanas destinadas a fábricas de telas y telas destinadas al suministro de América del Sur (lienzos conocidos con el nombre de Blancards) y México eran enviadas desde Rouen a Cádiz, dada su calidad y la confianza que los comerciantes españoles tenían depositada en la Casa Defontenay, que disponía en nuestro país (102) de distinguidas amistades (Cabarus, Izquiedos, Morales).

Conviene enfatizar a este respecto, que en una provincia cuya industria y fábricas rivalizaban con las de Inglaterra, la casa contribuyó (99-100, 102, 108-111) al sostén de la economía en Francia. En este contexto se incardina la obra de Descroizilles, padre del análisis volumétrico, cuyas investigaciones del nuevo método de blanqueo ideado por Berthollet fueron objeto del necesario apoyo económico y sostén. En la segunda parte de esta contribución abordaremos con detalle la vida y obra de Descroizilles, prestando al final atención a la contribución de Gay Lussac a la Volumetría.

10. REFERENCIAS

1. Asuero AG, Michalowski T. Comprehensive formulation of titration curves for complex acid-base system and its analytical applications. Crit Rev Anal Chem 2011; 41(2): 151-87.
2. Beck CM. Towards a revival of classical analysis. Metrologia 1997; 34(1): 159-66.
3. Felber H. Titrimetry at a metrological level. Metrología 2003; 40(5): 249-54.
4. Johansson A. The development of the titration methods, some historical annotations. Anal Chim Acta 1988; 206: 97-109.
5. Terra J, Rossi AV. Sobre o desenvolvimento da análise volumétrica e algumas aplicações atuais. Quimica Nova 2005; 28(1): 166-71.
6. Anon. On volumetrical analysis. Pharm J 1854; 13: 284-7.
7. Rancke Madsen E. The Development of Titrimetric Analysis Till 1806. Copenhagen: Gad 1958.
8. Page FG. Francis Home and Joseph Black: the chemistry and testing of alkaline salts in the early bleaching and alkaline trade. Bull Hist Chem 2002; 27(2): 107-13.
9. Page FG. The birth of titrimetry: William Lewis and the analysis of American potashes. Bull Hist Chem 2001; 26(1): 66-72.
10. Donnelly J. Consultants, managers, testing slaves: changing roles for the chemists in the British alkali industry,1850-1920. Technol Cult 1994; 35(1): 100-28.
11. Szabadváry F. History of Analytical Chemistry. Yverdon, Switzerland: Gordon and Breach 1992.
12. Campbell WA. Analytical chemistry of the leblanc soda trade. Proc Anal Div Chem Soc 1978; 15: 208-10.
13. Labrude P. Les pharmaciens et l'historie de la titrimétrie: Philippe Jaussaud, « Historie de la titrimétrie » in Les Actualités Pharmaceutiques nº 334, 1995, à nº 338, 1996. Rev Hist Pharm 1996; 84(309): 207-8.
14. Stephen WI. Early titrimetric analysis. Anal Proc 1980; 27 (3): 73-6.
15. Beck CM. Classical analysis. A look at the past, present, and future. Anal Chem 1994; 66(4): 224A-39A.
16. Page FG. Chemical and Analytical Aspects of the Early Alkali and Bleaching Industries in Britain. Leicester: PhD Thesis, University of Leicester 1999.
17. Winderlich R. Carl Friedrich Wenzel 1740-1793. J Chem Educ 1950; 27(2): 56-9.
18. Wenzel CF. Lehre von der Verwandtschaft der Körper. Dresden 1777, 1782, 1800.
19. Bergman. Elementos Físico-Químicos de la Analisis General de las Aguas. Madrid: Imprenta 1794 (adaptado a la Nueva Nomenclatura): p. 59.
20. Fors H. Mutual Favours. The Social and Scientific Practice Eighteenth- Century Swedish Chemistry. Uppsala: University of Upsala 2003: pp. 167-97.
21. Beddoes T. The Chemical Essays of Charles-William Scheele, translated from The Transactions of the Academy of Sciences of Stockholm, with additions. London: Scott, Greenwood 1901 (Edinburgh: J Murray, 1786).
22. M'Intosh JG. The life of Karl Wilhem Scheele. En *The Chemical Essays of Charles-William Scheele*. London: Scott, Greenwood 1901: p. xxii.
23. Asuero AG. Los halógenos ¿material mineral farmacéutica?. An R Acad Nac Farm 2008; 74(1): 51-64.
24. Ashbee R. The discovery of chlorine. A window on the chemical revolution. En *An Element of Controversy. The Life of Chlorine in Science, Medicine, Technology and War*. London: British Society for the History of Science, BSHC 2007: pp. 15-40.
25. Sáez-Plaza P, Martin J, Asuero AG. The contribution of Francis Home (1720-1813) and William Lewis, pharmaceutical authors, to the alkalis and bleaching. An R Acad Nac Farm 2017; 83(4): 403-20.
26. Sáez Plaza P. De los Álcalis del Comercio a los Métodos Iodométricos: Contribuciones Farmacéuticas al Desarrollo del Análisis Volumétrico. Sevilla: Tesis Doctoral, Departamento de Química Analítica, Universidad de Sevilla 2015.
27. Dambourney L. Prix des arts utiles pour l'année 1787. Journal de Normandie, du 29 novembre 1786; L'Esprit des Journaux, François et étrangers 1787:

Tome I, Seizième Année, 291-3.

28. Rouen Premiums. The Gentleman's Magazine: and Historical Chronicle. 1787; 57 (Part the First): 312.
29. V. Anzeigen von Gelehrten und Künstlern auch *Preisaufgaben*, Intelligenzblatt der Allgemeine Literatur-Zeitung vom Jahre 1787; 16: 64.
30. Cuvier, Eloge historique de M. Le Comte Berthollet, lu à la séance publique du 7 juin 1824. Mémoires de L'Académie Royale des Sciences de L'Institut de France, Tome VIII. Paris: Chez Firmin Didot Père et Fils 1829: pp. cxxix-ccx.
31. Smith JG. The Origen and Early Development of the Heavy Chemical Industry in France. Oxford: Clarendon Press 1979: p. 134.
32. Chung M, Farooqi S, Soper J, Brown O. Obstacles in the establishment of chlorine bleaching. En "An Element of Controversy. The Life of Chlorine in Science, Medicine, Technology and War. London: British Society for the History of Science, BSHC 2007: pp. 153-78.
33. Wisniak J. Bleaching. From antiquity to chlorine. Ind J Chem Technol 2004; 11: 876-87.
34. Berthollet. Mémoire sur l'acide marin déphlogistiqué. Mémoires de l'Académie Royale des Sciences (1785): 276-295, impreso en 1788. Mémoire sur l'acide marin déphlogistiqué. Lu à la Séance de l'Académie des Sciences du 6 Avril 1785. J Phys 1785; 26: 321-5.
35. Lemay P. Berthollet et l'emploi du chlore pour le blanchiment des toiles. Rev Hist Pharm 1932; 20(78): 79-86.
36. Poussier. De L'Origine du Blanchiment du Coton a Rouen. Les débuts du Blanchiment au Chlore des Fils et Tissus en Normandie. Bulletin de la Société Libre d'Emulation du Commerce et de l'Industrie de las Seine-Inférieure, Exercices 1922, 1923, Imprimerie Léon GY, Albert LAINÉ, Rouen 1924.
37. Eyre GE, Spottiswoode W. Descriptive catalogue of Machines, Models, &c. in the Museum of the Commissioners of Patents at South Kensington, 3th ed., 1859: p. 77.
38. Berthollet. Du blanchíment des Toiles & des Fils par l'acide muriatique oxigéné, & de quelques autres Propriétés de cette Liqueur relative aux Arts. Ann Chim 1789; 2: 151-290.
39. Berthollet. Additions a la description du Blanchiment, &c. Ann Chim 1790; 6: 204-9.
40. Bailly A. L'Industrie du Blanchissage et les Blanchisseries. Paris: Libraire J-B Baillière et fils 1896.
41. Davy H. Researches on the Oxymuriatic Acid, its Nature and Combinations; and on the Elements of the Muriatic Acid. With some Experiments on Sulphur and Phosphorous, made in the Laboratory of the Royal Institution. Phil Trans Roy Soc London 1810; 100: 231-57.
42. Scheidecker-Chevallier AM. Ampère et la découverte des halogènes. Act Chim 1994; (11): 101-4.
43. Chabot H. Qui a découvert le chlore?. Act Chim 2008; 316: 41-5.
44. Smeaton WA. Lavoisier's membership of the Société royale d'agriculture and the Comité d'agriculture. Ann Sci 1956; 12(4): 266-77.
45. Mémoires d'Agriculture, d'Economie rurale et domestique, publiés par la Society Royale d'Agriculture, Trimestre d'Automne, Paris 1791: p. xxi.
46. Rapport sur le procédé de BERTHOLLET, pour le Blanchiement des Toiles, lu a la Séance publique du 5 Mai, par C. Lavoisier. Journal du Lycee des arts Nº 3, 13 Mai, 1793, 3-8 (firmado por Fourcroi y Lavoisier).
47. Lettre du 2 février 1790 de M. Berthollet, membre de l'Académie de Sciences, à M. de Tolozan, lui envoyant un exposé de ses travaux, particulièrement en ce qui concerne la teinture, avec réponse à M. Berthollet, annonçant l'envoi de son mémoire sur les teintures aux commissaires de Bureau du Commerce 8 février 1790.
48. Parker HT. An Administrative Bureau during the Old Regime: the Bureau of Commerce and its Relations to French Industry from May 1781 to November 1783, London and Toronto: University of Delaware Press 1993.
49. Pajot-des-Charmes C. L'Art du Blanchiment des Toyles, fils et cotons de tout genre. A.J. Dugour et Durand 1798: p. 57
50. Musson AE, Robinson E. Science and Technology in the Industrials Revolution. Manchester: Manchester University Press 1969.
51. Nieto-Galan A. Colouring Textiles; a History of Natural Dyestuffs in Industrial Europe. Dördrecht: Kluver 2001.
52. Sáez Plaza P, Asuero AG. La barrilla y la sosa sintética (1ª Parte). Memorias de la Real Academia Sevillana de Ciencias 2016; 19: 125-46.
53. Sáez Plaza P, Martin J, Asuero AG. La sosa sintética (2ª Parte). Memorias de la Real Academia Sevillana de Ciencias 2016; 19: 147-67
54. Colquhou H. On the life and writings of Claude-Louis Berthollet. Ann Phil 1825; 1-18: 81-96; 162-85.
55. LBG. Sur le blanchîment par la lessive Bertholliene. Ann Chim 1806; 58: 324-5.
56. Guyton de Morveau. Encyclopédie Méthodique, Chimie, Pharmacie, Métallurgie, Tome Second, Paris: Chez Pankhoucke 1792: p. 590.
57. O'Reilley. Nouvelle manière de blanchir à la vapeur, le Coton, les Laines, etc, avec la description de l'appareil exécuté par le C. O'Reilly. Paris: Annales des Arts et manufactures, Tome IV, Blaise Jeune, Libraire 1818: pp. 61-76.
58. Ballot C. L'Introduction du machinisme dans l'Industrie Française. Genève: Slatkine Reprints 1978.
59. Donaghay M. Textiles and the Anglo-French Commercial Treaty of 1786. Text Hist 1982; 13(2): 205-24.

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

60. Bowden W. The English Manufactures and the Commercial Treaty 1786 with France. Am Hist Rev 1919; 25(1): 18-35.
61. Defontenay A. Quelques notices sur le Traité de Commerce de 1786, Sur les Manufactures d'Angleterre et de France; Sur les Causes de la prospérité de celle-là et de la Décadence de celle-ci. Paris: Imprimerie de Craignieau aîné 1802.
62. Anon. Economie politique, Précis analytique des travaux de l'Académie des Sciences, des belles-lettres et des arts de Rouen pendant l'année 1806. Rouen: 1807.
63. Correspondance des Propriétaires & Entrepreneurs de la Manufacture de Monseigneur COMTE D'ARTOIS pour les Acides & Sels minéraux, établie à Javel, près Paris, sur la Fabrication en grand de L 'ALUN-FACTICE. Le Journal de Paris 1780, Nº 302, 28 Oct.
64. L'Abbe Lebeuf. Histoire de la ville et de tout la diocèse de Paris. Paris: Ville de Paris et Ancienne Banlieue, Honore Champion, Libraire 1901: p. 601.
65. Dancourt. Le Moulin de Javelle, Chez Etienne Foulque, A La Haye 1705.
66. Le Roux T. Le Laboratoire des Pollutions Industrielles: Paris 1770-1830, Albin Michel 2011: p. 1765.
67. Baud P. Les débuts de l'industrie chimique en France. Annales de l'Université de Paris 1932; 7: 241-59.
68. Guille B. Documents sut l'art de l'industrie et du Commerce de Paris et du Département de Seine (1778-1810), Imprimerie municipale 1963.
69. Le Rédacteur Nº 794, Du 29 Pluviôse An 6 de la République, Samedi 17 Février 1798, vieux style, p. 2.
70. Alban & Vallet. Journal Politique ou Gazette des Gazettes, Juin, Seconde Quinzaine 1785: pp 54-55.
71. Dorveaux P. L'Invention de l'eau de Javel. Rev Hist Pharm 1919; 17(63): 286-7.
72. Berthollet CL. Description Du Blanchiment Des Toiles Et Des Fils, Par L'Acide Muriatique Oxygéné, Paris: Chez Fuchs 1795.
73. Bouvet M. Les grands pharmaciens: Labarraque (1777-1850). Rev Hist Pharm 1950; 38(128): 97-107.
74. Duhamel J. Grand Inventaire du Génie Français en 365 Object, A. Michel 1990: p. 133.
75. Nikiitin IV. Oxyacids of halogens HOHal. Russ Chem Rev 2004; 73(6): 609-16.
76. Belhoste B. Paris Savant, Parcours et rencontres au temps des Lumières, Paris: Armand Coton 2011.
77. Szramkiewicz R. Les Régents et Censeurs de la Banque de France nommés sous le Consulat et l'Empire, Genève: Libraire Droz 1974: p. 43.
78. Deustsch L. Métronone 2, Paris Intime au fil de ses rues, Michel Lafon 2016.
79. Burns DT. The Lunar Society and Midlands chemists. Anal Proc 1991; 28: 402-7.
80. Dorveaux P. Les grands pharmaciens: VII. Quinquet (1745-1803). Bull Soc Hist Pharm 1919; 7(21): 1-14.
81. Muirhead JP. The Life of James Watt with selections from this correspondence, London: John Murray 1858: p. 399.
82. Peter MJ. Industrial Enlightement: Science, Technology and Culture in Birmingham and the West Midlands 1760-1820, Manchester: Manchester University Press 2008: p. 204.
83. Potiquet A. L'Institut Nationale de France, ses diverses organisations, ses membres, ses associés, et ses correspondants, Paris: Didier 1871: p. 80.
84. Arago, Eloge Historique de James Watt, un des huit associes étrangers de l'Académie des Sciences. Lu à la séance publique du 8 de décembre de 1834. Mémoire de l'Académie royale des sciences de l'Institut de France, Tome XVII, Firmin Didot Frères 1840: pp. LXj-CLXXXVIIj.
85. Pugh JS, Hudson J. The chemical work of James Watt, F.R.S. Notes Rec Roy Soc London 1985; 40(1): 41-52.
86. Marsen B, Smith C. Engineering Empires: a Cultural History of Technology in Nineteenth Century, Palgrave MacMillan 2005: p. 85.
87. Davy J (Ed.). The Collected Works of Sir Humphry Davy, Vol VII, London: Smith, Elder and Co. Cornhill 1840: p. 141.
88. Arago, Historical Eloge of James Watt, traducido del francés por J.P. Muirhed, con notas adicionales y apéndice; Appendix No. III. Proceeding of the Public Meeting held at Freemasons' Hall, on the 18 th June, 1824 for erecting a monument to the late James Watt, pp 183-239, p. 191.
89. Craik GL, Mac Farlane C. The Pictorial History of England. Vol. 5, London: Charles Knight 1849: p. 580.
90. Dorn H, Watt J. Dictionary of Scientific Biography, Vol IX, Gillispie, C.C. (Ed.), New York: Charles Scribner's Sons 1976: pp. 196-9.
91. Mantoux P. La Révolution Industrielle au XVIIIe siècle. Essai sur les commencements de la grande industrie moderne en Angleterre, Société nouvelle de libraire et d'édition 1906: p. 251.
92. Muirhead JP. The Origin and Progress of the Mechanical Inventions of James Watt. Vol II. Extracts from correspondence 1854: p. 228.
93. Dubosc A. DÉCOUVERTE NORMANDE - L'industrie rouennaise d'autrefois - Le Curandiers - Descroizilles et le chlorure de chaux – Les créateur du Blanchiment – Watt a Rouen. Le Travailleur Normand, organe républicain de la Seine-Inferieure de l'Eure. Sixième Année, Nº 257, Dimanche 15 Mars 1806.
94. Harris JR. Industrial Espionage and Technology Transfer Britain and France in the Eighteen Century. Oxon: Routledge 2017 (1998 first).
95. Simon L. Le Chimiste Descroizilles (François-Antoine Henri) 1751-1825. Sa Vie. Son oeuvre, Rouen: L. Wolf 1921.
96. Descroizilles. Description et usages du berthollimêtre, ou instrument d'épreuves pour l'acide muriatique oxigené liquide, pour l'indigo et pour l'oxide de

manganese; avec des observations sur l'art de graver le verre par le gaz acide fluorique. J Arts Manufact 1794-1795; 1: 256-76.

97. Descroizilles. Notices sur l'alcali-mètre et autres tubes chimico-métriques, ou sur le polymètre-chimique, et sur un petit alambic pour l'essai des vins, Troisième Ed., Paris: Chez l'Auteur et chez CHEVALIER 1824.
98. Deschamps L. Allocution pour le centenaire de Descroizilles. Bulletin de la Société Libre d'Emulation du Commerce et de L'Industrie de la Seine Inferieure, Exercices 1924, 1925, Imprimerie Leo GY, Albert Lainé, Rouen 1926: pp. 165-172.
99. Guilbert PhJEV. Eloge nécrologique de Mr. Defontenay, lu les 1er et 15 ars de l'an 1806, dans la Séances de la Société Libre d'Emulation de Rouen. Rouen: Imp. de Vt Guilbert 1806.
100. Gourdin. Notice biographique sur M. de Fontenay, Précis analytique des travaux de l'Académie des Sciences, des Belles-Lettres et des Arts de Rouen Pendant l'Année 1806, Rouen 1807: pp. 31-5.
101. Perrée E. Les origines de la filature mécanique de Coton en Normandie, Précis analytique des travaux de L'Académie des sciences, belles-lettres et arts de Rouen pendant l'année 1922, Rouen 1923: pp. 83-101.
102. Le Comte Beugnot. Notice sur Alexandre de Fontenay, membre de la Société Libre d 'Émulation de Rouen, Séance Publique de la Société Libre d'Emulation de Rouen Tenue le 6 juin 1833, Rouen : F. Baudry, Imprimeur du Roi 1834: pp. 70-93.
103. Inauguration du Mémorial des Fondateurs de l'Industrie Cotonnière en Normandie érigé su la façade du Musée Industriel et Commercial de Rouen par les soins de la Société Libre de Emulation du Commerce et de l'Industrie de la Seine-Inferieure. Bulletin de la Société Industriel de Rouen, 1928: 218-230.
104. Fontenay, Alexandre de; http://worldcat.org/identities/viaf-39490362/
105. Defontenay (Pierre-Nicolas). Dictionnaire des Parlementaires Français. Tome II. Paris: Bourloton 1890: p. 292.
106. Defontenay (Alexandre). Dictionnaire des Parlementaires Français. Tome II. Paris: Bourloton 1890: p. 293.
107. Alexandre de Fontenay (1748-1833); http://data.bnf.fr/12543976/alexandre_de_fontenay/
108. Extrait de l'éloge de M.F. de Fontenay, membre du sénat conservateur, décédé le 14 février 11806, par M. François (de Neufchâteau), président du sénat. L'Honneur Français, Tome Second. Paris: Léopold Collin 1808: pp. 86-91.
109. Guilbert PhJEtVt, Defontenay. Mémoires biographiques et littéraires par ordre alphabétique. 1812: Tome Premier, pp. 286-92.
110. Gazette Nationale ou le Moniteur Universel, Vendredi, 14 février 1806, Interner, 13 février, Discurso del Presidente del Senado (S Exc. M. François (de Neufchâteau) con motivo del fallecimiento de M. Le Sénateur de Fontenay.
111. de Fontenay PM. Lettre à Babeth: Chroniques de l'Assemblée Nationale par un Normand (1789-1791), Kronos Nº 87, 2015 (French Édition).
112. Nº 30 au Journal de Normandie du samedi 12 avril 1788: pp. 122-3.
113. Christophe R. L'Analyse volumétrique de 1790 a 1860. Caractéristiques et importance industrielle. Evolution des instruments. Rev Hist Sci 1971; 24(1): 25-44.
114. Duval C. Francois Descroizilles, the inventor of volumetric analysis. J Chem Educ 1951; 28(10): 508-19.
115. Horn J, The Path Not Taken : French Industrialization in the Age of Revolution 1750-1830. Cambridge MA: The MIT Press 2006: p. 85.
116. Leduc MS-G. Sir Richard Arkwright, ou, Naissance De L'Industrie Cotonnière Dans La Grande-Bretagne (1760-1792). Paris: Guillaumin 1841.
117. Guest R, Arkwright R. A Compendious History of the Cotton Manufacture; with a disposal of the claim of Sir Richard Arkwright to the invention of its Ingenious Machinery. Manchester: Joseph Pratt 1823.
118. Espinasse F. Lancashire Worthies, Chap. XIII. Richard Ackwright. London: Simpkon, Marsall & Co. 1874: pp. 369-469.
119. Espinasse F. Lancashire Worthies, Chap. XII. John Kay and James Hargeaves. London: Simpkon, Marsall & Co. 1874: pp. 294-368.
120. Girardin MJ. Leçons de Chimie Elémentaire appliquée aux Arts Industriels, Quatrième édition, II Chimie Organique. Paris: Victor Masson et Fils 1861: pp. 370-371; 677.
121. Arvers, pharmacien, Discours sur les Etablissements de blanchisserie bertholliennne, lu a la Société d'Emulation de Rouen, dans sa séance publique du 9 juin 1818.
122. de Champagny ASEM. Rapport du Jury sur les produits de l'industrie Française, Paris: De L'Imprimerie Impériale 1806: p. 86.
123. Notices sur les Objets Envoyés a L'exposition des Produits de L'Industrie Française. Paris: De L'Imprimerie Impériale 1806: p. 311.
124. Exposition de 1806. Rapport du Jury sur les produits de l'industrie française, Paris: De L'Imprimerie Impériale 1806: Chapitre 11 Apprêts et Teintures, Section I, Blanchiment, Médailles d'Or. 281. M. DESCROISILLES l'aîné, à Lescure près Rouen: pp 86-87.
125. Chang H. Chlorine: undergraduate research on an element of controversy. J Chem Educ 2009; 86(4): 418-21.
126. Berthollet. Elementos del Arte de Teñir. Tomo I. Madrid: Imprenta Real 1795.

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

127. Donnelly JF. Chemical Education and the Chemical Industry in England from the Mid-Nineteenth to the Early Twentieth Century, University of Leeds, School of Education, November 1987.

128. Morveau. Sur les moyens de saturer les eaux mères du nitre, sans perde de l'alkali, & pour enter le mélange du muriate de potasse, ou sel de Sylvius, avec la salpêtre. Mem Acad Dijon 1782; 2º Semestre: 1-26.

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
ISSN (Online) 1697-4298
Article
analesranf.com

Effectiveness and pharmacogenetics in a deprescription protocol in chronic pain patients and iatrogenic opioid dependence

Title in Spanish: *Efectividad y farmacogenética en un protocolo de desprescripción en pacientes con dolor crónico y dependencia iatrogénica a opioides*

J. Muriel[1,*], C. Margarit[1,2], A. Flor[2], D.Morales[3], A.Peiró[1,2]

[1]Neurofarmacología aplicada al dolor (NED), Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL-FISABIO), Alicante, España. [2]Unidad del Dolor, Servicio de Anestesiología y Reanimación, Departamento de Salud de Alicante, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, España. [3]Centro de Investigación Operativa, Universidad Miguel Hernández de Elche, Elche, España.

ABSTRACT: Deprescription protocols should be part of chronic non-cancer pain patients' care in those cases where iatrogenic dependence is present. Our aim is to assess the implementation of a individualized deprescription protocol (IDP) including pharmacogenetic markers. An observational prospective study was carried out in patients presenting prescription opioid dependence (n=88) during 6 months of follow-up. Once the IDP was ended, patients were grouped in "responders" or "non-responders" to IDP. Genetic variants from OPRM1 (A118G), OPRD1 (T921C), COMT (G472A), ABCB1 (C3435T) and ARRB2 (C8622T) and CYP2D6 genes, were determined by real time PCR. At the end of the study, PDI achieved a 64 % of responders with a significant morphine equivalent daily dose (MEDD) reduction (basal visit vs. final, , 167 vs. 87 mg/day, p=0.007) without presenting opiate withdrawal syndrome, keeping a moderate pain intensity, pain relief, quality of life and functionality. Frequency of patients using buprenorphine or without opioids was significantly higher in the last visit than in basal visit (65 % vs. 22 %, p<0.001). Carriers of wild type genotype 118-AA OPRM1 required lower MEDD in the basal visit (dominant, p=0.018 and overdominant models, p=0.020) and in the final visit (codominant, p=0.032 and recessive models, p=0.032). Our IDP showed efectiveness and security in reducing MEDD with a good conversion to buprenorphine, even more in naïve 118-AA OPRM1 genotype.

RESUMEN: Los protocolos de desprescripción deberían formar parte del cuidado de pacientes con dolor crónico no oncológico que hayan desarrollado dependencia iatrogénica a opioides. Nuestro objetivo es evaluar la implantación de un protocolo de desprescripción individualizado (PDI) incluyendo marcadores farmacogenéticos. Se llevó a cabo un estudio observacional prospectivo, de 6 meses de seguimiento con pacientes con dependencia iatrogénica a opioides (n=88). Una vez finalizado el PDI, los pacientes se agruparon en "respondedores" o "no respondedores" al protocolo. Las variantes de los genes OPRM1 (A118G), OPRD1 (T921C), COMT (G472A), ABCB1 (C3435T), ARRB2 (C8622T) y CYP2D6 se determinaron por PCR a tiempo real. Al concluir el estudio, el PDI alcanzó un 64 % de respondedores con una reducción de dosis equivalente de morfina diaria (DEMD) significativa (visita basal vs. final, 167 vs. 87 mg/día, p=0.007) sin presentar síndrome de abstinencia, manteniendo un dolor, alivio, calidad de vida y funcionalidad moderados. El porcentaje de pacientes usando buprenorfina o sin opioides fue significativamente mayor en la visita final (65 % vs. 22 %, p<0.001). Los portadores del genotipo nativo 118-AA OPRM1 requirieron una DEMD menor en la visita inicial (modelo dominante, p=0.018 y superdominante, p=0.020) y en la final (modelo codominante, p=0.032 y recesivo, p=0.032). Nuestro PDI mostró efectividad y seguridad reduciendo la DEMD con una buena conversión a buprenorfina, especialmente en pacientes con genotipo 118-AA OPRM1.

[*]**Corresponding Author:** javi_bolt@hotmail.com
An Real Acad Farm Vol. 84, Nº 2 (2018), pp. 204-213
Received: March 6, 2018 **Accepted:** March 19, 2018
Language of Manuscript: Spanish
Premio ALCALIBER-IBEROAMÉRICA en el Concurso Científico 2017 de la RANF.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los profesionales de la salud han reconocido que hasta un 20 % de todos los pacientes sufren dolor de forma crónica en las poblaciones occidentales. Pese a que más de la mitad reciben tratamiento, el 64 % de estos pacientes no logra controlar satisfactoriamente su dolor (1, 2).

El presente trabajo se centra en el dolor crónico, (duración mayor de 6 meses), musculo-esquelético de origen no oncológico (DCNO), que representa

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

aproximadamente el 80 % de la consulta en nuestro medio. Se acepta que el dolor crónico es aquel que persiste durante más de 3 a 6 meses (más que el tiempo normal de curación previsto), no habiéndose resuelto con los tratamientos efectuados, incluso considerándose adecuados. Su persistencia se asocia con cambios de la personalidad y depresión convirtiéndose el dolor, no ya en un síntoma como en el caso del dolor agudo, sino en una enfermedad por sí misma.

Los analgésicos opioides constituyen un grupo de fármacos con un gran interés terapéutico debido a su afinidad selectiva por los receptores opioides (*mu* (μ), *delta* (δ), *kappa* (κ) y nociceptina), de cuya activación se deriva analgesia de alta intensidad.

El sistema opioide endógeno se encarga de diversas funciones fisiológicas, incluyendo la regulación del dolor (inhibiendo la respuesta al estímulo doloroso). A su vez, tiene un papel muy relevante en el circuito cerebral de recompensa produciendo un incremento de la liberación de dopamina en el *núcleo accumbens*, principalmente mediante la inhibición de las interneuronas GABAérgicas del área tegmental ventral (3).

Los fármacos opioides poseen propiedades analgésicas de alto interés terapéutico en el tratamiento del dolor crónico. Sin embargo, con cierta frecuencia (3-25 % de los casos) pueden generar cuadros de dependencia. Se trata de un fenómeno complejo en el que intervienen al menos tres factores que contribuyen a la vulnerabilidad individual a desarrollar dependencia: factores ambientales como el entorno familiar, social, agentes estresantes externos, etc.; Propiedades farmacológicas de los opioides (implicación el circuito dopaminérgico de recompensa); y genéticos, que tienen un peso aproximadamente entre el 40 % y 60 % en el riesgo a desarrollar dependencia (4).

1.1. Protocolo de desprescripción a opioides

El trastorno por dependencia se caracteriza por un síndrome específico de abstinencia a opioides (SAO) que se produce por el cese abrupto, reducción rápida de dosis, disminución de niveles en sangre del medicamento, y/o administración de un antagonista. En este contexto, los tratamientos de deshabituación son procesos terapéuticos destinados a conseguir la abstinencia del consumo del fármaco, mediante su interrupción brusca o gradual, utilizando un conjunto de medidas farmacológicas e higiénico-dietéticas que alivien la sintomatología derivada de la abstinencia (5). Con el objetivo de aliviar estos síntomas al máximo y así favorecer la motivación y adhesión de los pacientes a los tratamientos de deshabituación, se aconseja seguir un plan habitual de retirada del fármaco en combinación con el uso programado de fármacos coadyuvantes siguiendo la práctica clínica habitual (5), al que nosotros nos hemos referido como Protocolo de Desprescripción Individualizado (PDI) y que sigue el siguiente esquema: 1) Calcular las necesidades analgésicas de las 24 horas previas. 2) Convertir estas cantidades a las dosis equianalgésicas utilizando la tabla de conversión y diseñar el PDI de descenso del opioide previo en cada consulta médica. 3) Pautar medicación de rescate.

En nuestra unidad, según PDI, suele utilizarse de forma rutinaria buprenorfina en formulación transdérmica ya que tiene un mecanismo de acción dual (agonista/antagonista) y tramadol (6). El efecto analgésico de la buprenorfina se debe a su actividad de agonista parcial en los μ-receptores opioides y de antagonista en los κ (7). Debido a sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas, el riesgo de abuso es bajo.

1.2. Farmacogenética y dependencia iatrogénica a opioides

La farmacogenética estudia la relación entre la secuencia del ADN con la variabilidad interindividual de respuesta a un fármaco determinado. En el caso de los fármacos opioides, se ha reportado a menudo la existencia de una gran variabilidad de respuesta a su tratamiento, concretamente entre un 10-30 % de los pacientes no responden al tratamiento, ya sea por pérdida del efecto analgésico o por la aparición de reaccione adversas (8-10). En los últimos años, se ha demostrado que determinados polimorfismos genéticos de un solo nucleótido (SNP) en genes clave pueden tener un papel importante en la interacción, distribución y eliminación del fármaco opioide. El estudio farmacogenético de estos SNP ayudaría a ajustar la dosis en los tratamientos de mantenimiento en pacientes con dependencia a opioides, minimizando los efectos adversos y mejorando su eficacia (11-13).

1.2.a. Gen receptor opioide mu (OPRM1)

El *OPRM1* codifica para el receptor opioide mu, que es la diana principal de las moléculas opioides. El SNP más estudiado en el campo del dolor es el A118G (rs1799971), el cual conduce la pérdida de un sitio de N-glicosilación en la región extracelular del receptor (8, 14). Algunos estudios señalan que pacientes portadores del alelo G requieren significativamente más dosis de morfina o fentanilo para alcanzar la analgesia (15, 16).

1.2.b. Gen receptor opioide delta (OPRD1)

El gen *OPRD1* codifica el receptor opioide δ, que tiene a las endorfinas como principal ligando endógeno. El polimorfismo T921C (rs2234918) ha mostrado resultados dispares, desde su posible asociación con dependencia a heroína en poblaciones occidentales (17), hasta resultados negativos de análisis realizados en otras poblaciones (18).

1.2.c. Gen de la Glicoproteína-P (ABCB1)

La glicoproteína-P (P-gp) es un miembro de la subfamilia B perteneciente a la superfamilia ATP-Binding cassette, codificada por el gen *ABCB1* (19). La P-gp es una bomba de eflujo de fármaco que también funciona como un transportador en la barrera sangre-cerebro (20). El polimorfismo C3435T (rs1045642) provoca una mutación silenciosa (21), pudiendo influir en la regulación de la expresión y función proteica (22).

1.2.d. Gen catecol-o-metiltransferasa (COMT)

La catecol-O-metiltransferasa es una enzima codificada por el gen *COMT,* encargada de degradar las

catecolaminas (23). Uno de los SNP más estudiados es el G472A (rs4680), cuya presencia se ha asociado con una reducción de 3-4 veces la actividad de la enzima (24) y con un aumento de la densidad de receptores mu (25), necesitando menos dosis de morfina para aliviar el dolor (26).

Gen β-arrestina 2 (ARRB2)

El gen β-arrestina 2 (*ARRB2*) se expresa en múltiples tejidos y órganos, especialmente tiene un alto nivel de expresión en el cerebro. El SNP C8622T, podría contribuir a la variabilidad interindividual en la respuesta a la deshabituación con metadona (27).

1.2.e. Gen del citocromo p-450 CYP2D6 (*CYP2D6*)

Este gen codifica la enzima CYP2D6, perteneciente al citocromo P450 y que está implicada en el metabolismo de numerosos opioides (28). Según las alteraciones principales del gen (2D6*2, *4, *10, *3, *6, *10, *35, *41, *17, *29, *5, 2D6xN, *4x2) que presente un individuo, presentará un fenotipo metabólico concreto que se divide en: metabolizadores lentos, extensivos o ultra-rápidos. Un metabolismo excesivamente lento o rápido puede desencadenar la falta de eficacia del fármaco o la aparición de efectos adversos (29).

En base a lo comentado en la introducción y a los antecedentes sobre el tema, surgieron las hipótesis de si es efectivo el protocolo de deshabituación de opioides en pacientes con dolor crónico no oncológico que han desarrollado dependencia iatrogénica, y si los polimorfismos en genes clave de la farmacodinámica y farmacocinética de los opioides, pudieran tener una influencia en la respuesta al tratamiento opioide por parte del paciente, en términos de eficacia y seguridad.

1.3. Objetivos

El objetivo general fue evaluar la efectividad de la deshabituación de opioides por dependencia iatrogénica en pacientes con DCNO, de origen musculoesquelético, de nuestra unidad, analizando marcadores genéticos de respuesta a la deshabituación a opioides.

Objetivos específicos:

- Describir las variables demográficas, que nos permitirán realizar un análisis descriptivo de la población objeto de estudio.

- Analizar la intensidad y alivio del dolor, junto a la calidad de vida de los pacientes, los cuales nos indicarán si se ha realizado correctamente la rotación a buprenorfina sin SAO.

- Evaluar el grado de SAO y actividad global de los pacientes.

- Analizar las variables farmacológicas para evaluar la eficacia y seguridad del opioide

prescrito.

- Realizar un análisis genético de polimorfismos relacionados con un perfil de vulnerabilidad a desarrollar dependencia a opioides, utilizando un grupo control.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Diseño del estudio

Se trata de un estudio observacional, prospectivo, de evaluación de la vulnerabilidad genética en la efectividad del protocolo de desprescripción individualizado (PDI), en pacientes con dolor crónico no oncológico que han desarrollado dependencia iatrogénica a opioides (n=88) según los criterios del DSM-V. Para analizar la distribución de genotipos de nuestra población y relacionarla con la de la población general, se recogieron datos del genotipo de pacientes pertenecientes al grupo control de nuestra Unidad del Dolor (n=231).

Los criterios de inclusión fueron: 1. Pacientes con edad superior a 18 años; 2. Pacientes con dolor crónico no oncológico, remitidos a la consulta por dependencia a opioides iatrogénica, que van a seguir el procedimiento estándar según PDI de deshabituación de opioides; 3. Pacientes con capacidad para poder cumplimentar los formularios.

En cuanto a los criterios de exclusión, se consideraron: 1. Pacientes con edad inferior a 18 años; 2. Pacientes con dolor crónico oncológico; 3. Pacientes con patología psiquiátrica considerada significativa a criterio médico, que pudiera interferir con el normal desarrollo del estudio.

El PDI consta de varias visitas, incluyendo la visita de inclusión por parte de farmacología clínica y la confirmación del diagnóstico de dependencia a opioides por un facultativo de psiquiatría. Una vez confirmado, se realizó el seguimiento clínico por parte de farmacología clínica, con el soporte de investigadores y terapia ocupacional. Durante esta fase se llevó a cabo el proceso de desprescripción, incluyendo: retirada de opioides de liberación rápida, retirada de fármacos duplicados, rotación a buprenorfina ó tramadol y/o disminución gradual de dosis. Todo ello dependiendo de la evolución y el criterio clínico.

Según su respuesta, a los pacientes que finalizaron con éxito el PDI se les designó por "respondedores", mientras los que no finalizaron con éxito el PDI, se consideraron "no respondedores", basándose en: (i) el paciente abandona el PDI, (ii) el diagnóstico de dependencia a opioides persiste, (iii) la conducta de uso aberrante del opioide persiste o (iv) el paciente no ha logrado una reducción de al menos el 30 % de la dosis equivalente de morfina diaria de opioides.

2.2. Variables analizadas

Los datos de las diferentes variables se recogieron en el cuaderno de recogida de datos correspondiente a cada paciente para su posterior registro en la base de datos del proyecto.

2.2.a. Variables descriptivas.

Se procedió al registro de datos demográficos (edad, sexo, etnia), y se describió el perfil genético (nativo, heterozigoto, variante) de los pacientes, así como el fenotipo metabólico extraído del análisis de las variantes del gen *CYP2D6* (2D6*2, *4, *10, *3, *6, *10, *35, *41, *17, *29, *5, 2D6xN, *4x2).

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

2.2.b. Variables clínicas.

Para evaluar la situación clínica de cada paciente se utilizaron una serie de escalas validadas y cuestionarios que se cumplimentaron en cada consulta. Para evaluar la intensidad del dolor y el alivio, utilizamos la *Escala Visual Análoga* (EVA), donde el paciente señala sobre una línea de 100 mm, la intensidad de dolor y el alivio que siente con el tratamiento, respectivamente. Para valorar la calidad de vida que presenta el paciente, se emplea la escala EuroQol50, en la cual el paciente señala con un punto su estado de salud actual en cada consulta. Es una escala vertical que va desde 0 hasta 100 y donde el paciente señala con un punto su estado de salud actual en cada consulta, siendo 0 el peor estado de salud imaginable y 100 el mejor. Para evaluar el Síndrome de Abstinencia a Opioides, se emplea *la Opiate Withdrawal Scale* (OWS), que es una escala formada por 32 signos y síntomas característicos de la abstinencia a opioides. Cada ítem se valora como 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) o 3 (severo), dependiendo del grado con que se manifieste cada uno en el paciente.obteniéndose como resultado una puntuacion entre 0 y 96 puntos, en orden creciente de gravedad. Se utiliza la Escala de Evaluación de Actividad Global (EEAG), que evalúa la actividad psicológica, social y laboral sobre 100 puntos. A mayor puntuación, mejor nivel de actividad y de vida.

2.2.c Variables farmacológicas.

Se registra la medicación prescrita al paciente en cada consulta, incluyendo toda la medicación opioide del paciente, así como gabapentina, pregabalina, duloxetina, analgésicos, AINEs y benzodiacepinas. Se calcula las dosis diarias de opioides, expresadas en mg equivalentes de morfina (DEMD), en todas las visitas. También se registraron los efectos adversos (EA) que presentó el paciente en cada una de las visitas.

2.3. Estudio farmacogenético

La muestra de cada paciente se recogió coincidiendo con su visita inicial, una vez dentro del estudio. El paciente deposita en un tubo Falcon 2 ml de saliva. Una vez recogida la muestra, ha de mantenerse a -80ºC en congelador, hasta su procesamiento.

A partir de la muestra de saliva, se procedió a la extracción de ADN, mediante el kit

E.N.Z.A. Forensic DNA Kit (Omega bio-tek), siguiendo el protocolo del fabricante. Para su cuantificación se utilizó el espectofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Una vez medidas las concentraciones, las muestras fueron almacenadas en el congelador a -20.

Una vez extraído el ADN de las muestras, el genotipado de los 5 SNP del estudio se realizó mediante el sistema Real Time PCR Rotor Gene Q (Qiagen), empleando sondas específicas TaqMan MGB® (Applied Biosystems). Los genotipos se determinaron mediante esta técnica, que se trata de una reacción en cadena de polimerasa (PCR) a tiempo real, y que permite que la amplificación del ADN y la detección de los alelos específicos del SNP se produzcan simultáneamente. Se requiere un molde de ADN, una ADN polimerasa, primers específicos, dNTPs y un tampón de reacción. Se emplearon las sondas TaqMan MGB® (Applied Biosystems), un oligonucleótido marcados fluorescentemente con dos fluorocromos, para la detección de los alelos específicos mediante fluorescencia. Todas las muestras se analizan por duplicado y se emplearon controles negativos para cada SNP. Las Condiciones del termociclador, empleadas fueron las siguientes: 1.Tramo de pre-PCR: 60 ºC; 30 segundos; 2. Desnaturalización inicial; 3. Desnaturalización: 95 ºC; 15 segundos; 4. Anillamiento y elongación: 60 ºC; 1 minuto; 5. Elongación final, 72 ºC; 30 segundos.

2.4. Análisis estadístico

Se realizó un análisis univariante para la descripción de la muestra. Según la distribución que presentaron las variables del estudio, se realizaron pruebas paramétricas o no paramétricas. Las variables continuas con distribución normal, fueron descritas a través de medias y desviaciones estándar, mientras que las que no presentaron distribución normal se expresaron a través de su mediana y rango intercuartílico. Se calcularon frecuencias y porcentajes para las variables categóricas. Se analizaron las medidas mediante el test T de Student. Se utilizó la prueba Chi Cuadrado para el análisis de datos categóricos. Se realizó un análisis multivariante para analizar la variable principal respecto a los posibles factores o covariables. Los contrastes de hipótesis fueron bilaterales, con una significación de 0,05. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico R 3.2.0. y GraphPad Prism 5.

2.5. Aspectos éticos

Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron informados a través la hoja de información al paciente y firmado el consentimiento informado (CI). Los datos de los pacientes se anonimizaron y se procesaron de acuerdo con los requerimientos expresados en la Declaración de Helsinki (revisión de Seúl, Octubre de 2008), las directrices de buenas prácticas clínicas de la ICH así como la legislación vigente en España relativa a la realización de estudios observacionales.

2.6. Plan de trabajo

Se realizó una visita basal donde se revisaron los criterios de inclusión y exclusión, se informó debidamente al paciente, se firmó el CI y se obtuvo la muestra de saliva.

Durante las visitas de seguimiento (a los 7 y 14 días, 1 y 3 meses) y la visita final (5-6 meses), se realizó una revisión general, revisión del dolor y seguimiento de las variables clínicas mediante los cuestionarios del estudio. (Figura 1).

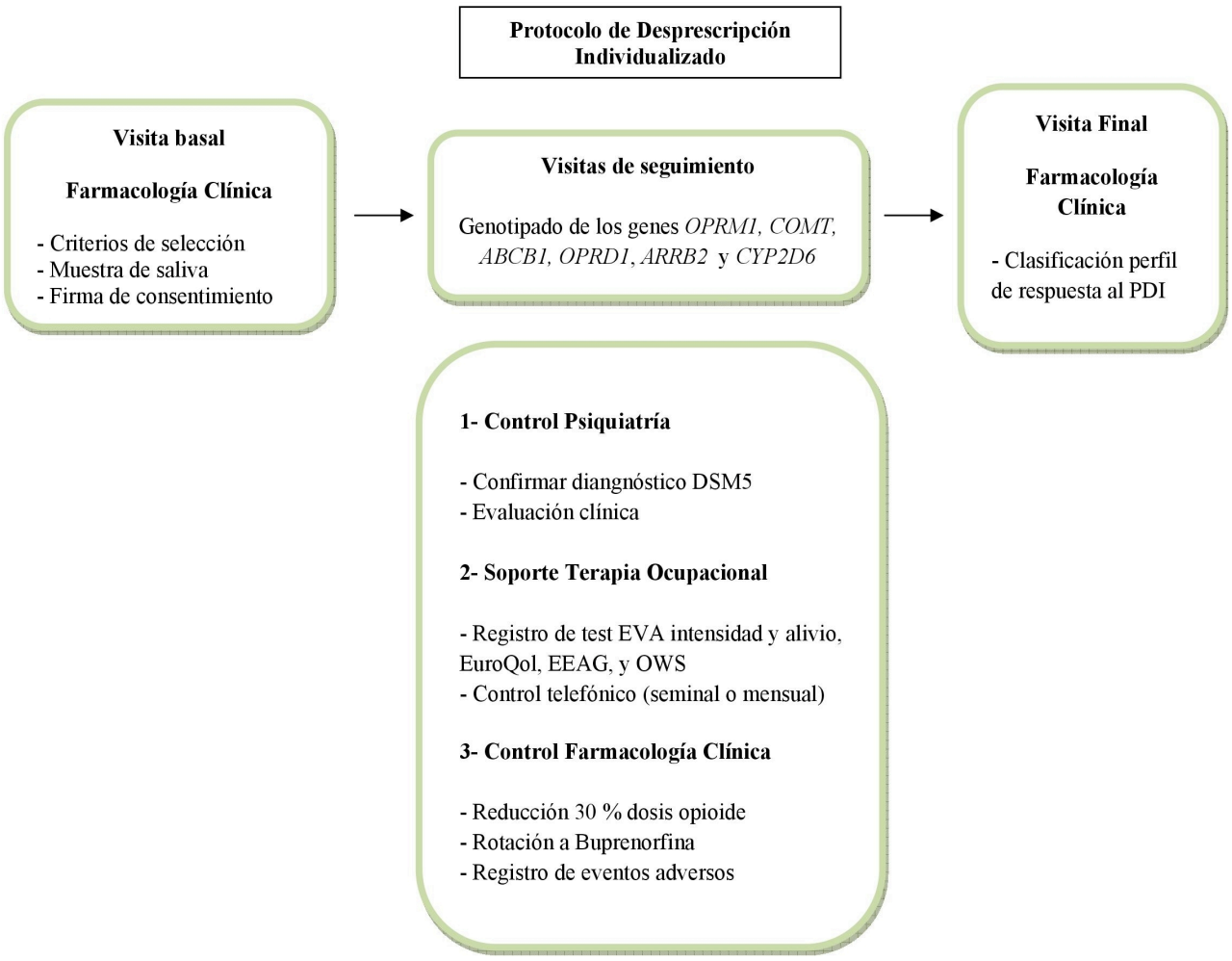


Figura 1. Diagrama de estudio desde la visita basal hasta la final a los 6 meses (EVA: Escala Visual Análoga, EEAG: Escala de Evaluación y Actividad Global, OWS: Opiate Withdrawal Scale).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante los 30 meses del estudio, un total de 2744 pacientes cond olor fueron atendidos en la unidad, de los cuales un 80 % presentaba DCNO y el 86 % recibieron tratamiento opioide. 88 pacientes (4.7 %) fueron diagnosticados de dependencia iatrogénica a opioides e incluidos en el estudio. Una vez finalizado el estudio, los pacientes fueron categorizados en respondedores (64 %) y no respondedores (30 %), no pudiéndose concluir en el 6 % de los pacientes por pérdida de seguimiento, dificultad para los cuestionarios, etc.

3.1. Datos descriptivos y clínicos

Los pacientes (edad media 53 ± 13, 64 % mujeres, 100 % caucásicos) presentaron un dolor moderado (55 ± 27 mm), bajo alivio del dolor (39 ± 30 mm), calidad de vida (47 ± 23 mm) y funcionalidad (71 ± 15 puntos). Ninguno de ellos mostró SAO (32 ± 19 puntos). .

En la visita final a los 6 meses, la intensidad del dolor fue significativamente menor en el grupo respondedor (50±30 mm) vs no respondedor (66±23 mm, p=0.027). La regresión lineal mostró una asociación significativa entre el SAO con la intensidad y el alivio del dolor, calidad de vida y funcionalidad en la población total y en el grupo respondedor, pero no con DEMD, edad, sexo o genotipo.

La DEMD basal fue de 167 ± 179 mg/día, con la mayoría de pacientes empleando fentanilo y oxicodona. Después de 6 meses de PDI, la DEMD se redujo hasta 87 ± 104 mg/day (p=0.007). En el grupo respondedor, la DEMD se redujo significativamente después del PDI (basal vs. final, 128 ± 118 vs. 50 ± 69 mg/día, respectivamente, p=0.004), siendo significativamente menor frente a no respondedores (176 ± 121 mg/día, p<0.001) en la visita final. El resumen de estos datos puede observarse en la tabla 1.

Tabla 1. Datos descriptivos y clínicos de la población total y por grupos de respuesta en visitas basal y final.

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

	Población Total		No respondedor		Respondedor	
Visita (Media±DE)	Basal (n=83)	Final (n=74)	Basal (n=25)	Final (n=21)	Basal (n=53)	**Final (n=52)**
Intensidad dolor (mm)	55±27	54±29	61±23	66±23+	53±27	**50±30+**
Calidad de vida (mm)	47±23	46±23	43±22	40±26	49±23	**48±21**
SAO (puntos)	32±19	33±21	36±22	35±26	30±18	**32±20**
DMED (mg/día)	**167±179***	**87±104***	**193±172**	**176±121++**	**128±118***	**50±69*++**

DEMD: Dosis Equivalentes de Morfina Diarias. DE: Desviación Estandard. *p<00.5, ** p<0.001 basal vs. final; +P<0.05, ++P<0.001 Basal no respondedor vs. Basal respondedor o Final no respondedor vs. Final respondedor.

3.2. Uso de fármacos y eventos adversos reportados por los pacientes

Al final del estudio, el porcentaje de pacientes usando buprenorfina o sin opioides fue significativamente mayor (22 % vs. 65 %, p<0.001), y menor para fentanilo (37 % vs. 11 %, p<0.001), oxicodona (18 % vs. 4 %, p=0.015), otros analgésicos simples (22 % vs. 6 % p=0.020) y pregabalina (39 % vs. 10 %, p=0.001) respecto a la visita basal. (Figura 2, 3 y 4).

En la visita final, el empleo de buprenorfina o ningún opioide fue significativamente mayor en los respondedores respecto a los no respondedores (Δ53 %, p<0.001) y menor para fentanilo (Δ25 %, p=0.007) y benzodiacepinas (Δ34 %, p=0.011). El uso de pregabalina disminuyó significativamente en ambos grupos: respondedor (Δ23 %, p=0.032) y no respondedor (Δ 45 %, p=0.005) en la visita final respecto a la inicial.

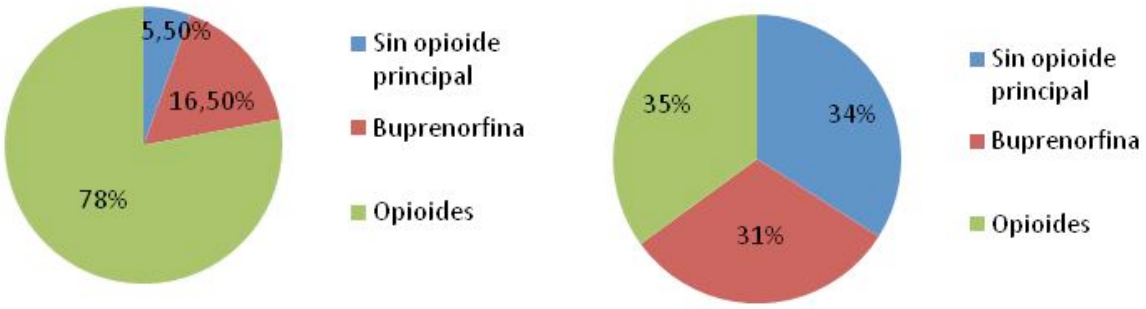


Figura 2. Porcentaje de pacientes sin opioide principal, con buprenorfina o con opioides en visita basal y final. *p<00.5, ** p<0.001 basal vs. final

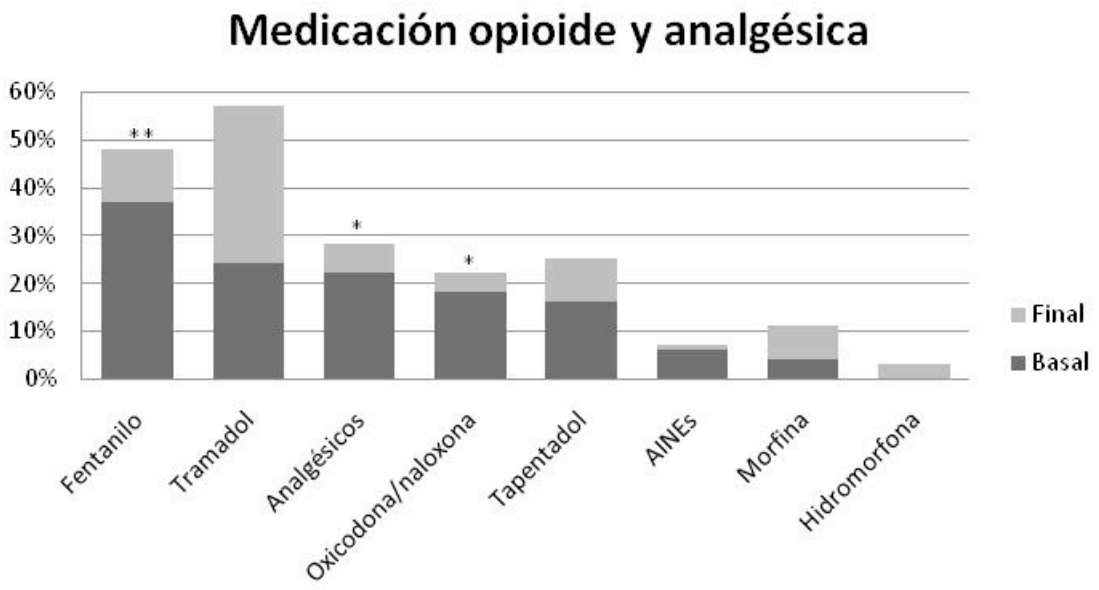


Figura 3. Porcentaje de pacientes que usan los diferentes fármacos opioides y otros analgésicos en visita basal y final. *p<00.5, ** p<0.001 basal vs. final.

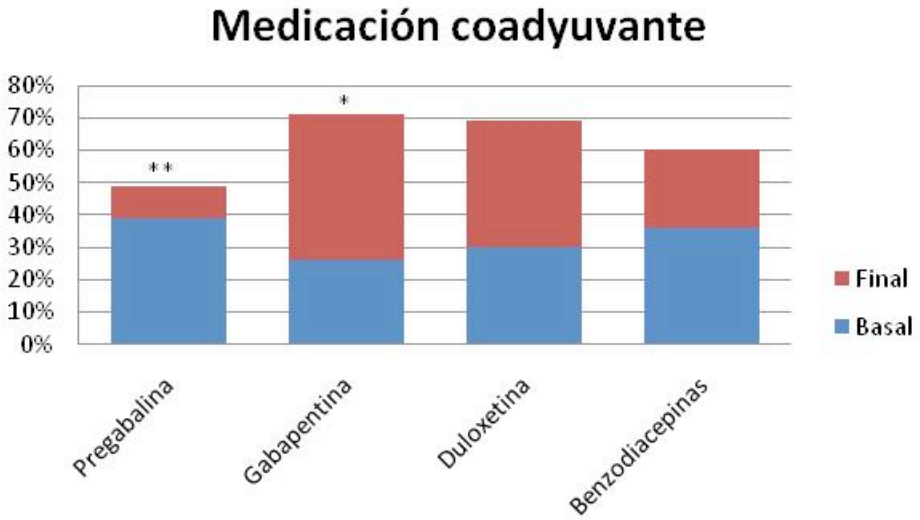


Figura 4. Porcentaje de pacientes que usan los diferentes fármacos coadyuvantes en visita basal y final. *p<00.5, ** p<0.001 basal vs. final.

Los pacientes reportaron un total de 1665 EAs durante un total de 359 visitas del estudio con una mediana de 6.5 por paciente. Los EAs más comunes fueron boca seca (66 %), insomnio (53 %), estreñimiento (51 %) y depresión (50 %). No se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos de respuesta ni entre las visitas inicial y final.

3.3. Genotipo

El equilibrio de Hardy-Weinberg se cumplió para todos los genes analizados excepto para el *ARRB2*. Para el gen *OPRM1*, se encontró un mayor requerimiento de DEMD en los genotipos A/G-G/G respecto a A/A según el modelo dominante (Δ 107 %, p=0.018) y A/G respecto a A/A-G/G en el modelo superdominante (Δ 103 %, p=0.020) en la visita inicial. A su vez, en la visita final, el modelo codominante mostró un aumento significativo de requerimiento de DEMD en los genotipos A/G (Δ 57 %) y G/G (Δ 326 %) respecto a A/A (p=0.032). En el modelo recesivo, el genotipo G/G requirió mayores DEMD respecto a A/A-A/G (Δ 266 %, p=0.032). (Figura 5)

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

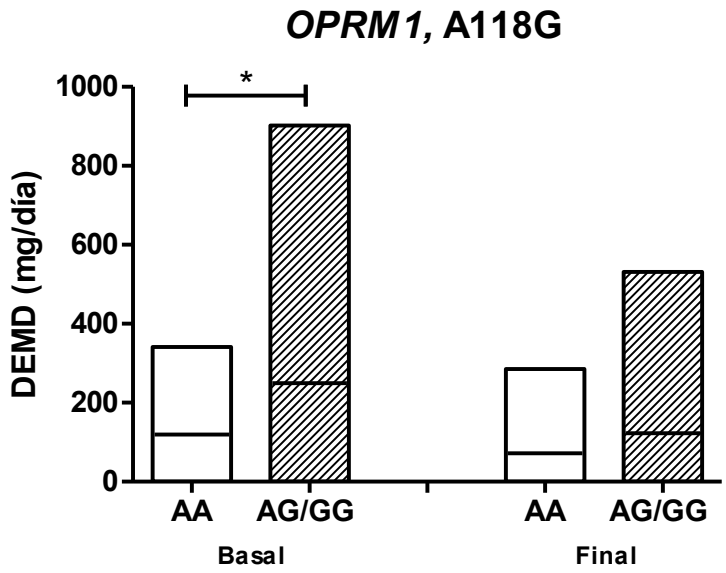


Figura 5. Dosis Equivalentes de Morfina Diaria (DEMD) para el modelo dominante del gen OPRM1 A118G en visita basal y final del Protocolo de Desprescripción Individualizado (PDI). *p<00.5, ** p<0.001.

En el análisis de regresión logística binaria, el alelo 118G no mostró capacidad de predicción de respuesta al PDI con y sin ajuste por edad y sexo (p=0.166, 95 % CI= -1.741 to 0.306).

La población del estudio presentó un fenotipo metabólico CYP2D6 similar al de la población control. La frecuencia de metabolizadores lentos fue del 6 %, de metabolizadores extensivos 83 % y de metabolizadores ultra-rápidos del 9 %. No se observaron diferencias en cuanto a la respuesta al PDI ni de DEMD en los diferentes fenotipos. Se observó una mayor feecuencia de dolor de cabeza en metabolizadores rápidos respecto a extensivos en la visita final (100 % vs. 33 %, p=0.008) y entre metabolizadores lentos, extensivos y ultra-rápidos para depresión en la visita final (0 %, 46 % y 83 % respectivamente, p=0.049).

Discusión

El estudio muestra que el PDI alcanza una reducción significativa de DEMD en pacientes con dependencia iatrogénica a opioides sin inducir SAO, manteniendo un dolor, alivio, calidad de vida y funcionalidad moderados. Las variantes genéticas que alteren la actividad funcional del gen OPRM1 podría explicar las diferentes respuestas interindiviudales en poblaciones con dependencia a opioides (30, 31) y también en el requerimiento de dosis en pacientes con cáncer (32). En nuestro estudio, los portadores del alelo 118-G del gen OPRM1, requirieron significativamente una mayor DEMD. Éste SNP es el más prevalente en este gen, resultando en una alteración de su expresión (33), habiéndose sugerido que la función del receptor se ve reducida en pacientes con estas variantes. Se hace necesario continuar con la investigación en este campo con el objetivo de optimizar los protocolos de deshabituación, teniendo en cuenta las características genéticas del paciente, lo que ayudría a una práctica clínica de precisión,en términos de eficacia y seguridad.

La implantación de un PDI efectivo en la práctica clínica habitual de pacientes con DCNO tratados con opioides, y que han desarrollado dependencia iatrogénica a opioides se hace indispensable. Estos pacientes pueden beneficiarse de un seguimiento más cercano que permite ajustar, reducir o retirar los fármacos opioides, sin aparición de SAO.

Por otra parte, aumentar el conocimiento farmacogenético en este campo podría permitir en un futuro su inclusión en la práctica clínica, pudiendo ajustar el tratamiento farmacológico de estos pacientes, teniendo en cuenta sus características genéticas, entre otros factores, mejorando la eficacia y la seguridad en el tratamiento de esta población de pacientes.

4. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, se establecen las siguientes conclusiones:

1. La dependencia iatrogénica a opioides estuvo presente en aproximadamente el 5 % de los pacientes de nuestro medio. El PDI se desarrolló manteniendo un nivel medio de analgesia (intensidad 54/100 mm, alivio 40/100 mm), calidad de vida (46/100 mm), funcionalidad (71 ± 15 puntos) y sin aparición de SAO (33 puntos).

2. La conversión a buprenorfina o la retirada de opioides al terminar el PDI se produjo en el 65 % de pacientes respecto al 22 % inicial, p<0.001. Además se logró reducir el uso de fentanilo (37 % vs. 11 %, p<0.001), así como el de oxicodona (18 % vs. 4 %, p=0.015).

3. El PDI consiguió disminuir significativamente la DEMD en la población general (167 mg/día vs. 87 mg/día, p=0.007).

4. Se observaron diferencias en el requerimiento de

dosis de opioides en función del genotipo de los pacientes, sin que existieran diferencias en la distribución de genotipos en los SNP estudiados entre pacientes con dependencia iatrogénica y sujetos con DCNO sin ella.

5. El polimorfismo A118G (rs1799971) del gen *OPRM1* condicionó un requerimiento significativamente mayor de DEMD en el modelo dominante (Δ107 %, p=0.018), superdominante (Δ 103 %, p=0.020), codominante (Δ 57 %, Δ 326 %, p=0.032) y recesivo (Δ 266 %, p=0.032).

Lista de abreviaturas

ABCB:. Gen de la Glicoproteína-P.

ADN: Ácido desoxirribonucléico.

ARRB:. Gen β-arrestina 2.

CI: Consentimiento Informado.

COMT: Gen catecol-o-metiltransferasa.

CYP2D6: Gen del citocromo p-450 CYP2D6.

DCNO: Dolor crónico no oncológico.

DEMD: Dosis Equivalentes de Morfina Diaria.

DSM-V: Manual diagnóstico y estadóstico de los trastornos mentales, edición quinta.

EA: Efectos adversos.

EEAG: Escala de Evaluación de la Actividad Global.

EVA: Escala visual análoga.

OPRD1: Gen receptor opioide delta.

OPRM1: Gen receptor opioide mu.

OWS: Escala de abstinencia opiácea (Opiate Withdrawal Scale).

PDI: Protocolo de Desprescripción Individualizado.

SAO: Síndrome de Abstinencia a Opioides.

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism).

Conflicto de intereses

El/Los autor/es del presente estudio declaran que no existe ningún conflicto de interés..

5. REFERENCIAS

1. Ballina J, Carmona L, Laffon A. Impacto del consumo de AINE en la población general española. Resultados del estudio EPISER. Revista Española de Reumatología. 2002;29(7):337-42.
2. Hutchinson K, Moreland AM, de CWAC, Weinman J, Horne R. Exploring beliefs and practice of opioid prescribing for persistent non-cancer pain by general practitioners. European journal of pain. 2007;11(1):93-8.
3. Volkow N, Li TK. The neuroscience of addiction. Nature neuroscience. 2005;8(11):1429-30.
4. Yuferov V, Levran O, Proudnikov D, Nielsen DA, Kreek MJ. Search for genetic markers and functional variants involved in the development of opiate and cocaine addiction and treatment. Annals of the New York Academy of Sciences. 2010;1187:184-207.
5. Fernández Miranda J. Guía para el tratamiento de la dependencia de opiáceos. Plan Nacional sobre Drogas (PNSD). 2009.
6. M A. Guia práctica de cuidados paliativos. Guías de práctica clínica en el Sistema Nacional de Salud. 2008.
7. Rodríguez R, Daza P, Rodríguez MF. Uso de buprenorfina transdérmica en el alivio del dolor por cáncer. Revista Colombiana de Anestesiología. 2006;34:253-7.
8. Kadiev E, Patel V, Rad P, Thankachan L, Tram A, Weinlein M, et al. Role of pharmacogenetics in variable response to drugs: focus on opioids. Expert opinion on drug metabolism & toxicology. 2008;4(1):77-91.
9. Somogyi AA, Coller JK, Barratt DT. Pharmacogenetics of opioid response. Clinical pharmacology and therapeutics. 2015;97(2):125-7.
10. Ross JR, Rutter D, Welsh K, Joel SP, Goller K, Wells AU, et al. Clinical response to morphine in cancer patients and genetic variation in candidate genes. The pharmacogenomics journal. 2005;5(5):324-36.
11. Lotsch J, Skarke C, Liefhold J, Geisslinger G. Genetic predictors of the clinical response to opioid analgesics: clinical utility and future perspectives. Clinical pharmacokinetics. 2004;43(14):983-1013.
12. Tremblay J, Hamet P. Genetics of pain, opioids, and opioid responsiveness. Metabolism: clinical and experimental. 2010;59 Suppl 1:S5-8.
13. Janicki PK, Schuler G, Francis D, Bohr A, Gordin V, Jarzembowski T, et al. A genetic association study of the functional A118G polymorphism of the human mu-opioid receptor gene in patients with acute and chronic pain. Anesthesia and analgesia. 2006;103(4):1011-7.
14. Klepstad P, Rakvag TT, Kaasa S, Holthe M, Dale O, Borchgrevink PC, et al. The 118 A > G polymorphism in the human mu-opioid receptor gene may increase morphine requirements in patients with pain caused by malignant disease. Acta anaesthesiologica Scandinavica. 2004;48(10):1232-9.
15. Wu WD, Wang Y, Fang YM, Zhou HY. Polymorphism of the micro-opioid receptor gene (OPRM1 118A>G) affects fentanyl-induced analgesia during anesthesia and recovery. Molecular diagnosis & therapy. 2009;13(5):331-7.
16. Zhang W, Yuan JJ, Kan QC, Zhang LR, Chang YZ, Wang ZY. Study of the OPRM1 A118G genetic polymorphism associated with postoperative nausea and vomiting induced by fentanyl intravenous analgesia. Minerva anestesiologica. 2011;77(1):33-9.
17. Mayer P, Rochlitz H, Rauch E, Rommelspacher H, Hasse HE, Schmidt S, et al. Association between a delta opioid receptor gene polymorphism and heroin dependence in man. Neuroreport. 1997;8(11):2547-50.
18. Xu K, Liu XH, Nagarajan S, Gu XY, Goldman D. Relationship of the delta-opioid receptor gene to heroin abuse in a large Chinese case/control sample. American journal of medical genetics.

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

2002;110(1):45-50.

19. Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. Journal of lipid research. 2001;42(7):1007-17.
20. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. Journal of the National Cancer Institute. 2000;92(16):1295-302.
21. Brambila-Tapia AJ. MDR1 (ABCB1) polymorphisms: functional effects and clinical implications. Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion. 2013;65(5):445-54.
22. Wang J, Guo, X., Yu, S., Zhang, J., Song, J., Ji, M., . . . Dong, W. MDR1 C3435T polymorphism and inflammatory bowel disease risk: a meta-analysis. Mol Biol Rep. 2014;41:2679-85.
23. Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, et al. Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. American journal of human genetics. 2004;75(5):807-21.
24. Diatchenko L, Slade GD, Nackley AG, Bhalang K, Sigurdsson A, Belfer I, et al. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. Human molecular genetics. 2005;14(1):135-43.
25. Kambur O, Mannisto PT. Catechol-O-methyltransferase and pain. International review of neurobiology. 2010;95:227-79.
26. Rakvag TT, Klepstad P, Baar C, Kvam TM, Dale O, Kaasa S, et al. The Val158Met polymorphism of the human catechol-O-methyltransferase (COMT) gene may influence morphine requirements in cancer pain patients. Pain. 2005;116(1-2):73-8.
27. Oneda B, Crettol S, Bochud M, Besson J, Croquette-Krokar M, Hammig R, et al. beta-Arrestin2 influences the response to methadone in opioid-dependent patients. The pharmacogenomics journal. 2011;11(4):258-66.
28. Smith HS. Opioid metabolism. Mayo Clinic proceedings. 2009;84(7):613-24.
29. Govoni S, Regazzi M, Ranzani GN. Pain and the pharmacogenetics at the fuzzy border between pain physiopathology and pain treatment. European Journal of Pain Supplements. 2008;2(S1):5-12.
30. Befort K, Filliol D, Decaillot FM, Gaveriaux-Ruff C, Hoehe MR, Kieffer BL. A single nucleotide polymorphic mutation in the human mu-opioid receptor severely impairs receptor signaling. The Journal of biological chemistry. 2001;276(5):3130-7.
31. Fang J, Wang X, He B. Association between Common Genetic Variants in the Opioid Pathway and Smoking Behaviors in Chinese Men. Behavioral and Brain Functions : BBF. 2014;10:2-.
32. Gong XD, Wang JY, Liu F, Yuan HH, Zhang WY, Guo YH, et al. Gene polymorphisms of OPRM1 A118G and ABCB1 C3435T may influence opioid requirements in Chinese patients with cancer pain. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. 2013;14(5):2937-43.
33. Zhang Y, Wang D, Johnson AD, Papp AC, Sadee W. Allelic expression imbalance of human mu opioid receptor (OPRM1) caused by variant A118G. The Journal of biological chemistry. 2005;280(38):32618-24.

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
ISSN (Online) 1697-4298
analesranf.com

Mesa Redonda sobre Interacciones Fármaco-nutrientes. RANF 15 de marzo de 2018

Francisco José Sánchez Muniz
Catedrático de Nutrición y de Ciencias de los Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia
e-mail: frasan@ucm.es

El pasado quince de marzo tuvo lugar una sesión científica titulada Relevancia Clínica de las interacciones de los Alimentos en la Farmacoterapia en la que actuaron como ponentes D. Mariano Madurga Sanz y el Dr. D. José Manuel Martínez Sesmero.

El Académico de Número autor de esta breve reseña, después de agradecer a la sección V de la Real Academia y a la Junta de Gobierno su designación como moderador y presentador de los ponentes, comentó brevemente algunos aspectos centrales de sus *curricula,* insistiendo en la calidad científica y docente de ambos y agradeciendo su aceptación a participar en la citada Mesa redonda.

En particular, respecto a Madurga Sanz, se destacó que es licenciado en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid, Diplomado en Sanidad por la Escuela Nacional de Sanidad y Diplomado en Farmacoepidemiología y Farmacovigilancia por la Universidad Autónoma de Barcelona. Desde 1975 a 1981 dirigió en su 1ª etapa la revista de farmacoterapia "Mundo Farmacéutico"; creó y dirigió el Centro de Información de Medicamentos (CIM) del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid; editó el Catálogo de Especialidades Farmacéuticas del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacia. Él es Exjefe del Área de Coordinación del Sistema Español de Farmacovigilancia de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Desde 2000 hasta 2016, participó en 13 programas formación de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo en sus Centros Iberoamericanos. Profesor en Cursos y Másteres sobre Farmacovigilancia, en la Escuela Nacional de Sanidad y en su Máster de Salud Pública, en los de Organización Panamericana de Salud y los de Farmacoepidemiología y Farmacovigilancia de las Universidades de Alcalá y de Barcelona. Es Experto de la Organización Panamericana de Salud. Diseñador del Proyecto FACEDRA - adaptación del sistema FEDRA español- a la red de 8 Centros Nacionales de Farmacovigilancia de Centroamérica y República Dominicana. D. Mariano Madurga habló de la Reacciones Adversas de Alimentos y medicamentos- Impacto, conocimiento y actualización.

En cuanto a Martínez Sesmero, se indicó que es Doctor en Farmacia con sobresaliente cum laude por la Universidad Complutense de Madrid, que ha realizado diferentes Masters en Estados Avanzados, en métodos cuantitativos y analíticos para Medicina basada en la Evidencia. Ha recibido los cursos de Postgrado sobre Manejo Clínico, Dirección de servicios de salud; Hospital Pharmacoeconomics. También ha realizado cursos, entre los que me gustaría destacar el realizado en la Universidad de Harvard "Leadership Strategies for Evolving Health-Care Executive". Ha colaborado como profesor asociado en la Universidad Alfonso X El Sabio, universidad Complutense, etc. En la actualidad es Director de Investigación e Innovación de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria y Jefe del Servicio de Farmacia del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. El Dr. Manuel Martínez Sesmero impartió sobre Interacciones fármaco-nutriente en el soporte nutricional artificial.

Después de dar la bienvenida a ambos ponentes, se indicó que disertarían sobre un tema de gran transcendencia en lo que hoy conocemos como atención farmacéutica, de gran importancia para la nutrición clínica y para esta Academia. "La interacción de los alimentos o de sus ingredientes con los medicamentos y sus principios activos" y se señaló que desafortunadamente generalizamos e incluso aconsejamos el hábito de tomar la medicación en las tres comidas principales, olvidando que existen muchos aspectos que modifican la idoneidad de este hecho al exacerbar o frenar la eficacia del tratamiento farmacológico, obteniéndose resultados inesperados o incluso adversos o graves.

Estas interacciones entre el alimento y el medicamento atañen a su farmacocinética y farmacodinamia, pero no debe olvidarse que puede también modificar la utilización normal de los nutrientes y por tanto el estatus nutricional del paciente. También se insistió que debe considerarse que existe un abanico tremendo de situaciones que hacen el estudio de estas interacciones muy complejo. Baste imaginar diferentes situaciones como polimedicación, distintos tipos de formulaciones

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

galénicas para administración oral del mismo medicamento, diferentes hábitos alimentarios (horarios, ingestas de dietas hipocalóricas o superabundantes acompañadas o no de diversos tipos de bebidas alcohólicas o estimulantes), el ayuno prolongado, las pérdidas de nutrientes que se producen en el proceso de elaboración o cocinado de los alimentos, la cantidad y tipo de fibra dietética con capacidad formadora de geles o de capacidad adsorptiva que pueden retrasar el vaciamiento gástrico, reducir la liberación y absorción de fármacos. También en esta presentación se citó como factores muy importantes la desnutrición *per se* (malnutrición por ayuno, Anorexia y bulimia), o a la desnutrición asociada a ciertas enfermedades crónicas que condicionan la velocidad de liberación y cantidad de fármaco libre (pacientes trasplantados, VIH positivos, pacientes con antirretrovirales e inmunosupresores, etc.), sin dejar de mencionar como factores determinantes el consumo de fármacos en pacientes con síndrome de dependencia al alcohol, consumo de drogas, alteraciones renales, hepáticas, cardiacas, digestivas.

Se resaltó el papel multidisciplinar en el tratamiento farmacológico, pero también que el farmacéutico debe tener una actuación relevante, tanto a nivel de optimización de la dietoterapia como del tratamiento farmacológico. A través de la genética nutricional será preceptivo conocer que algunas personas, por su susceptibilidad genética tienen mayor probabilidad de sufrir una determinada interacción alimento-fármaco, ya que la actividad y características de proteínas, y enzimas y sus isoformas que condicionan el metabolismo de los nutrientes y los fármacos están determinadas genéticamente en cada individuo, influyendo en todo el proceso LADME (liberación, absorción, distribución, metabolización y excreción). Un claro ejemplo de este tipo de interacción lo constituyen los polimorfismos de las isoformas del citocromo P450 y donde la interacción entre algunos alimentos y fármacos son mucho más importantes en individuos metabolizadores rápidos que lentos, y esto adquiere especial importancia en pacientes que por su situación peculiar requieren alimentación artificial. Se indicó textualmente (sic) “Es por ello que la mesa redonda de hoy no puede ser más que el principio de otras muchas que desglosen el problema de la interacciones alimento-medicamento (IAM) y la del medicamento o medicamentos con los alimentos (IMA) y que nos lleven poco a poco a conocer muchos aspectos de esta problemática y que hagan visible la voz de esta Real Academia en este tema de gran trascendencia para la salud”. El autor de esta introducción terminó su presentación señalando textualmente “Valga mi compromiso, Sr. Presidente, para seguir participando y colaborando con otros compañeros de esta Real Corporación en este tema de tanta relevancia e interés para la sociedad y en particular para los farmacéuticos y para la Real Academia Nacional de Farmacia”.

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
ISSN (Online) 1697-4298
Review
analesranf.com

Food and drug adverse interactions: types, identification and update

Title in Spanish: *Interacciones adversas de alimentos y medicamentos: tipos, su identificación y actualización*

Mariano Madurga Sanz[1,*], Francisco Sánchez Muniz[2]

[1]Consultor en Farmacovigilancia. [2]Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Farmacia, Plaza Ramón y Cajal, s/n. Universidad Complutense de Madrid. 28040-Madrid.

ABSTRACT: In this publication some central aspects to consider about interactions between food or nutrients and drugs are reviewed. In the clinical investigation of a new drug the possible interactions with food, both physicochemicals and pharmacokinetics (in absorption, metabolic pathways, transport and excretion) and pharmacodynamic (in particular those relevant due to the severity of their effects) should be studied. Its evidence must be collected and described in the drug information (summary of product characteristics and patient information leaflet). It is essential that any patient in treatment with any of the drugs in which food interactions have been observed receives accurate information on the type of food whose consumption should be avoided or reduced. The healthcare pharmacist must provide this information, reinforced by the Doctor Prescriber and contained in the leaflets of the respective medicinal products. Therefore, any effort to avoid adverse interactions will be futile if a fatal episode is not avoided. Oral intake of medicines mouth should be recommended for ingestion with water, in a generous amount (a glass of 200 mL). Ingestion with milk or fruit juices should not be recommended, except for the physician's express indication, depending on the type of medication. Knowledge of food interactions with drugs should be supplemented with pharmacovigilance activities. Thus, the attentive action of the health professional, in general, and the pharmacist and nurse, in particular, should allow identifying new interactions with food, and avoiding the already known ones, since they are the professionals closest to the patient.

RESUMEN: En esta publicación se revisan aspectos centrales a considerar sobre los diferentes tipos de interacciones entre alimentos y/o nutrientes y fármacos. En la investigación clínica de un nuevo medicamento se deben estudiar las posibles interacciones con alimentos tanto fisicoquímicas como farmacocinéticas (en la absorción, vías metabólicas, transporte y excreción) y farmacodinámicas, en particular aquellas más relevantes por la gravedad de sus efectos. Sus evidencias deben recogerse y describirse en la información del medicamento (fichas técnicas y prospecto). Es fundamental que todo paciente en tratamiento con alguno de los fármacos en los que se hayan observado interacciones con alimentos reciba información precisa sobre aquellos alimentos que debe evitar/reducir consumir. El farmacéutico asistencial debe proporcionar esta información, reforzando la trasmitida por el médico prescriptor y la contenida en los prospectos de los medicamentos respectivos. Por ello, todo esfuerzo que se haga para evitar las interacciones adversas será inútil si no se consigue evitar un episodio fatal. En las tomas de medicamentos por vía oral debe recomendarse su ingestión con agua, en cantidad generosa (un vaso de 200 mL). No se debe recomendar la ingestión con leche o con zumos de frutas, excepto indicación expresa del médico, según el tipo de medicamento. El conocimiento de las interacciones de alimentos con medicamentos se debe complementar con las actividades de farmacovigilancia. Así, la atenta actuación del profesional sanitario, en general, y del farmacéutico y enfermero, en particular, debe permitir identificar nuevas interacciones con alimentos y evitar las ya conocidas, ya que son los profesionales más cercanos al paciente.

[*]**Corresponding Author:** mmadurgasanz@gmail.com
Received: March 13, 2018 **Accepted:** March 20, 2018
An Real Acad Farm Vol. 84, Nº 2 (2018), pp. 216-225
Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

Las interacciones farmacológicas constituyen un elemento de distorsión en los resultados de la farmacoterapia. Hay sustancias farmacológicas que impiden o potencian los efectos de otros fármacos cuando se utilizan simultáneamente. Por ello, en casi todos los manuales de farmacoterapia existe un capítulo sobre las interacciones entre medicamentos. En algunos casos, se aprovechan los efectos sinérgicos, como ocurre con la administración oral de levodopa conjuntamente con carbidopa, un inhibidor de la DOPA-descarboxilasa, o la de amoxicilina junto con ácido clavulánico, inhibidor de beta-lactamasas bacterianas.

Sin embargo, aunque ya se describieron hace años, no está tan extendido el conocimiento de las interacciones entre los alimentos y los medicamentos. Igual que sucede con las interacciones fármaco-fármaco, entre las interacciones alimento-medicamento (IAM) algunas son

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

útiles bajo el punto de vista de la farmacoterapia ya que puede reducirse la dosis de un fármaco. Un ejemplo lo constituye la administración conjunta de ciclosporina con zumo de pomelo No obstante, existe el riego de incrementar los efectos farmacológicos a niveles tóxicos. También, en muchos casos, las interacciones pueden afectar negativamente a la respuesta terapéutica, reduciendo o anulando los efectos terapéuticos.

Desde los años 60 del pasado siglo se conoce una de las interacciones farmacológicas más conocidas y potencialmente más graves. De las IAM que se conocen desde entonces son los efectos negativos que resultan de combinar un tratamiento de inhibidores de la mono-amino-oxidasa mitocondrial (IMAO) con alimentos ricos en tiramina. La tiramina es una sustancia que puede actuar por sí misma como mediador adrenérgico, y también puede ser recaptada por las terminaciones nerviosas postganglionares y producir la liberación del neurotransmisor. En ocasiones, cuando se inhibe su metabolismo, se puede producir una crisis hipertensiva de letalidad elevada. Este fenómeno se conoce como la "reacción del queso", por encontrarse la tiramina en grandes cantidades en los quesos, en particular, en los muy curados (1). No sólo los antidepresivos de antaño, tipo pargilina o fenelzina, son los únicos fármacos con efecto IMAO, también se conoce desde los años 60 los que acompañan al antituberculoso isoniazida (2).

En los años 90 se describieron las primeras interacciones referentes a los cítricos amargos, en particular al pomelo, las cuales podían incrementar el área bajo la curva (AUC) hasta casi un 300 % de fármacos tomados simultáneamente. Por aquel entonces se describieron los efectos diferenciales en seis pacientes con hipertensión leve que tomaron 5 mg de felodipino con agua, con zumo de pomelo o con zumo de naranja. La biodisponibilidad media de felodipino con zumo de pomelo fue del 284 % (IC95 % 164-469) respecto al grupo que empleó agua. También se redujo la relación de AUC de dehidrofelodipino/felodipino, la presión sanguínea diastólica y la frecuencia cardiaca en los pacientes con zumo de pomelo respecto a los que tomaron agua. Los efectos adversos de tipo vasodilatación fueron más frecuentes. Por el contrario, el zumo de naranja no afectó a la biodisponibilidad. Adicionalmente seis voluntarios sanos tomaron 10 mg de nifedipino con agua o con zumo de pomelo y la biodisponibilidad en el grupo de zumo de pomelo fue de 134 % (IC95 % 108-169) respecto al grupo que consumió agua (3).

2. DEFINICIÓN Y TIPOS DE INTERACCIONES DE ALIMENTOS CON MEDICAMENTOS

Pueden definirse dos tipos de interacciones entre alimentos y medicamentos: aquellas que resultan en la aparición de un efecto farmacológico tóxico o terapéutico, de intensidad menor o mayor de la esperada, como consecuencia de la acción o presencia de un alimento (IAM) (4) y las que se originan entre los fármacos o medicamentos y alimentos (IMA) (5), reduciendo la biodisponibilidad y por tanto los efectos fisiológicos de los nutrientes contenidos en los alimentos. En esta revisión nos centraremos en las IAM (4), dejando para futuros trabajos profundizar sobre las IMA.

Resulta por ello trascendente que un alimento pueda provocar un incremento de los niveles plasmáticos de un medicamento, induciendo síntomas de toxicidad. Pero, también es un efecto adverso la disminución de la respuesta terapéutica, como sucede con un antinfeccioso al interaccionar con un alimento y provocar la formación de un complejo insoluble que impide la absorción del antinfeccioso, como sucede con la leche y varios medicamentos, como tetraciclinas, ampicilinas, fluoroquinolonas.

3. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LAS INTERACCIONES DE ALIMENTOS Y MEDICAMENTOS

Las interacciones entre alimentos y medicamentos pueden considerarse como el resultado de las interferencias posibles entre los tres agentes presentes en cada ocasión que se aplica farmacoterapia: el medicamento, el alimento o nutriente y el paciente.

3.1. Factores dependientes de los medicamentos

Entre ellos destacaremos la forma farmacéutica y las características farmacológicas. Respecto a las formas farmacéuticas sólidas (comprimidos, cápsulas, etc) presentan más interacciones potenciales que las formas orales líquidas. Entre las primeras, las formulaciones tipo retard o de liberación prolongada, pueden ser más susceptibles de ocasionar interacciones por sus requerimientos del medio para poder liberar adecuadamente el principio activo, como sucede con las teofilinas retard.

Dependientes de sus características farmacológicas, sobresalen, por ejemplo, un margen terapéutico estrecho (definido como la proporción entre la Dosis Tóxica 50/ Dosis Eficaz 50) o una curva dosis-respuesta de pendiente pronunciada. En este tipo de fármacos, como digoxina, antidiabéticos orales, anticoagulantes orales, carbamazepina o teofilina, pequeñas variaciones en las concentraciones plasmáticas se acompañan de grandes modificaciones en la respuesta terapéutica, llegando a ser tóxicas si los alimentos inducen un incremento.

3.2. Factores dependientes de los alimentos

Tanto la composición de la dieta, en cuanto al contenido y proporción de grasas, proteínas e hidratos de carbono, como el volumen de líquido que se ingiere, son los factores decisivos en las interacciones de los alimentos y los medicamentos. Existen componentes en la dieta que tienen una gran importancia en la inducción de interacciones con medicamentos. Así, sucede con los alimentos con alto contenido en tiramina, o abundante concentración de sodio y potasio, o ricos en fibra, con la leche y derivados lácteos (por el efecto quelante del calcio), con los zumos de frutas (tanto por efecto inhibidor sobre ciertos citocromos, como por el incremento de pH de la orina que favorece la reabsorción de ciertos

medicamentos, prolongando así sus efectos), con el café (por su contenido en cafeína, estimulante del sistema nervioso central , y a la vez diurético), etc.

3.3. Factores dependientes del paciente

La respuesta farmacológica puede variar en función de la edad y género, de factores genéticos del paciente, de estados fisiológicos (embarazo, lactancia), de estados carenciales de la nutrición, o patológicos que afecten a la función renal o hepática, entre otros. Cada día es más conocida la influencia de los polimorfismos (6) en diferentes genes que codifican la expresión de los transportadores de fármacos, o de las enzimas metabolizadoras, en particular de las isoenzimas del citocromo P450 (p.ej. CYP2C9, CYP2C19 y CYP2D6), que explican la variabilidad interindividual de la respuesta a la terapia farmacológica.

4. INTERACCIONES ADVERSAS DE RELEVANCIA CLÍNICA ENTRE ALIMENTOS Y MEDICAMENTOS

Las interacciones de alimentos con medicamentos pueden ocasionar diferentes efectos. Si el "efecto farmacológico es de intensidad mayor" del habitual, o esperado, se identifica como reacción adversa, que puede ser de diferentes tipos, por ejemplo, insomnio, nerviosismo, irritación, arritmias cardíacas. Pero puede resultar en un "efecto farmacológico de intensidad menor" del esperado, o nulo, como por ejemplo, un embarazo no deseado como resultado de la interacción entre un anticonceptivo hormonal oral y el uso simultáneo de un antidepresor como la planta medicinal *Hypericum perforatum* L. (hipérico o "hierba de San Juan") al ocasionar esta planta una respuesta terapéutica disminuida del anticonceptivo oral. Este tipo de casos de inefectividad o falta de eficacia, también se incluyen entre las reacciones adversas graves, tal como se ha informado por parte de las agencias reguladoras (7).

Las interacciones entre alimentos y medicamentos se definen (4) de relevancia clínica "cuando la actividad terapéutica y/o toxicidad de un fármaco se modifica de tal manera que se necesite un reajuste en la posología del medicamento u otra intervención médica". Por ejemplo, si se simultanea ciclosporina con zumo de pomelo, puede requerirse tomar la mitad de dosis del inmunodepresor, ya que el zumo de pomelo, inhibidor del CYP3A4, reduce su metabolismo e incrementa los niveles plasmáticos de ciclosporina. También se catalogan de relevancia clínica las interacciones "cuando exista la posibilidad de usar simultáneamente dos fármacos o un fármaco con un alimento que interaccionan, en las condiciones terapéuticas recomendadas". Por ejemplo, el caso de un uso concomitante de ciprofloxacino (inhibidor del CYP1A2) junto con teofilina (substrato del CYP1A2) en un proceso broncopulmonar.

Las IAM se pueden clasificar también por el tipo de mecanismo que explica la interacción: farmacéuticas (o fisicoquímicas), farmacocinéticas y farmacodinámicas.

4.1. Interacciones adversas de tipo farmacéutico.

Se definen así las IAM que implican reacciones fisicoquímicas, que se presentan en dispositivos de administración como en los tubos de alimentación enteral o en la luz gastrointestinal. Como ejemplo hay que citar las incompatibilidades entre medicamentos y componentes presentes en las mezclas de nutrición parenteral, por ello se conocen como "interacciones *in vitro*". Graves han sido los casos adversos de bezoares, o impactaciones en el esófago con el antiulceroso sucralfato, que puede unirse a los componentes proteicos de la dieta, por lo que debe administrarse con el estómago vacío, al menos 1-2 horas antes de las comidas. Por ello debe evitarse su utilización simultánea con nutrición enteral a través de la misma sonda ya que se han notificado casos de bezoares o impactaciones en el esófago, que provocan su obstrucción y que en algunas ocasiones han requerido intervención quirúrgica, tal como se notificaron al Sistema Francés de Farmacovigilancia en los años 90 (8).

4.2. Interacciones adversas de tipo farmacocinético

Los alimentos pueden modificar la farmacocinética de los medicamentos, por diferentes mecanismos, pudiendo ocasionar reacciones adversas que alteraren su absorción, distribución, metabolismo y/o excreción (ADME) (Tabla 1).

Entre las terapias antirretrovirales utilizadas en la infección por los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), destacan dos interacciones con alimentos que tienen significación clínica: la dieta con alto contenido en grasas reduce la absorción de indinavir y zidovudina. Asimismo, la didanosina, un antirretroviral ácido-lábil, cuando se administra por vía oral debe ingerirse en ayunas, ya que el alimento reduce su biodisponibilidad al aumentar el tiempo de contacto con el ácido gástrico.

También se han publicado casos de interacciones de dietas ricas en ajo (*Allium sativum* L.) con tratamientos de antirretrovirales como saquinavir, un inhibidor de la proteasa del VIH. El ajo actúa reduciendo los niveles plasmáticos de saquinavir por un mecanismo no bien definido aún, aunque se baraja la posibilidad de actuación del sistema enzimático del citocromo P450, ya que tanto saquinavir como el ajo utilizan esta ruta metabólica (9). Posiblemente, este efecto sea extensivo a otros inhibidores de proteasa como indinavir, nelfinavir, ritonavir.

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

Tabla 1. Interacciones farmacocinéticas más relevantes entre alimentos y medicamentos.

Fármaco	Nutriente	Efecto en el fármaco	Recomendaciones
Antirretrovirales: zidovudina, indinavir, didanosina	Alimentos ricos en grasas	Reduce la absorción hasta el 50 %, y sus efectos.	Tomar en ayunas o 1 hora antes de las comidas. Separar las tomas de los antirretrovirales entre sí y con las comidas.
Antirretroviral: saquinavir y posiblemente otros inhibidores de la proteasa	Ajo en cantidades abundantes	Reduce la biodisponibilidad al reducir su absorción y/o incrementar su metabolismo	El saquinavir incrementa la colesterolemia y el ajo se utiliza como anticolesterolemiante. Evitar la toma de preparados con ajo junto con medicamentos anti-VIH
Fluoroquinolonas: ciprofloxacino, enoxacino, norfloxacino y ofloxacino	Leche, sales de hierro	Reduce la absorción y sus efectos.	Espaciar 2 horas la toma del medicamento y de alimentos
Bifosfonatos: alendronato, clodronato, etidronato	Leche, sales de hierro	Reduce la absorción y sus efectos.	Espaciar 2 horas las tomas de medicamento y de alimentos.
Anticoagulantes orales: warfarina, acenocumarol	Aguacate (elevado contenido en grasa)	Disminuye sus efectos al reducir su absorción e inducir su metabolismo	Evitar la ingestión simultánea de grandes cantidades de aguacates. Controlar el tiempo de protrombina de forma periódica
Anticoagulantes orales: warfarina, acenocumarol	Crucíferas (p. ej. coles de Bruselas, coliflor, repollo, brócoli, etc) (ricas en indoles)	Disminuye su eficacia al inducir su metabolismo hepático.	Evitar la ingestión simultánea de grandes cantidades de crucíferas (coles de Bruselas, repollo, brécol, coliflor). Controlar el tiempo de protrombina de forma periódica.
Antagonistas canales de calcio: felodipino, nifedipino, nimodipino, amlodipino, verapamilo, etc.	Zumo de pomelo	Incrementa los niveles plasmáticos (felodipino hasta un 330 %) y su toxicidad	Evitar las tomas con zumo de pomelo. Ingerir con agua.
Fármacos anti-rechazo de trasplantes: ciclosporina, tacrolimus.	Zumo de pomelo	Incrementa niveles plasmáticos de ciclosporina hasta un 60 %	Evitar las tomas con zumo de pomelo. Ingerir con zumo de naranja, con leche o batidos de chocolate. ¡Monitorizar las concentraciones plasmáticas!
Terfenadina, astemizol, cisaprida, pimozida	Zumo de pomelo	Incrementa los niveles plasmáticos y su cardiotoxicidad (arritmias, torsades de pointes)	Evitar las tomas con zumo de pomelo, o hacerlo con 4 horas de intervalo. Ingerir con agua o con otros zumos
Carbamazepina, saquinavir, midazolam, alprazolam, triazolam	Zumo de pomelo	Incrementa los niveles plasmáticos.	Evitar las tomas con zumo de pomelo, o hacerlo con 4 horas de intervalo. Ingerir con agua o con otros zumos
Clozapina, haloperidol, olanzapina, cafeína, fenitoína, tacrina, celecoxib, AINE, zafirlukast, warfarina	Soja	Se incrementan los niveles plasmáticos de los medicamentos y sus efectos adversos	Evitar la ingestión concomitante
Levotiroxina	Soja	Se puede disminuir la absorción intestinal de levotiroxina	Puede ser necesario ajustar la dosis de levotiroxina, particularmente al inicio o una vez finalizado el período en que el paciente tome suplementos a base de soja

AINE: antinflamatorios no esteroides; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

Uno de los tipos de IAM resulta de la interacción química directa con los nutrientes, conocida como reacción de quelación o de formación de complejos, que resultan inactivos. De forma similar a lo que sucede con las tetraciclinas (excepto doxiciclina y minociclina), y con las penicilinas orales (derivados de ampicilina, excepto la amoxicilina) las sales de calcio y la leche pueden alterar la absorción de las fluoroquinolonas, como ciprofloxacino, ofloxacino, enoxacino o norfloxacino. En estudios se ha comprobado que al ingerir los comprimidos de

norfloxacino con leche se reducían un 11 % las concentraciones plasmáticas del fármaco a los 30 minutos de la toma, con respecto a los valores obtenidos al tomarse con agua. Por lo tanto, es importante advertir a los pacientes para que eviten la ingestión simultánea de quinolonas con alimentos ricos en calcio. La absorción de bifosfonatos orales como alendronato, clodronato, etidronato disódico para el tratamiento de enfermedades con resorción ósea como la osteoporosis y el cáncer con metástasis ósea, también se ve reducida si se ingiere junto con alimentos ricos en calcio, como la leche o los productos lácteos.

Entre los fármacos con un margen terapéutico muy estrecho están los anticoagulantes orales, como warfarina y acenocumarol. Se han notificado algunos casos de interacciones de tipo farmacocinético con alimentos ricos en grasas. El efecto terapéutico de los anticoagulantes se ha reducido en pacientes con una dieta rica en aguacates, fruta cuya fracción lipídica es elevada entre (del 11 al 25 %), que causa una disminución en la biodisponibilidad de los anticoagulantes, bien por una disminución en la absorción, bien por un aumento del metabolismo. Similares resultados se han notificado con dietas ricas en vegetales de la familia de las crucíferas (coles de Bruselas, coliflor, brócoli, remolacha, repollo, etc.) que contienen indoles. Estos compuestos presentan una importante capacidad para inducir el metabolismo oxidativo (citocromo P450 1A2, o CYP1A2). En conclusión, se debe evitar la ingestión de cantidades abundantes de estos alimentos simultáneamente con anticoagulantes orales.

Los alimentos también pueden inducir un incremento en la biodisponibilidad de un fármaco cuando reducen su metabolismo. Este es el caso de las interacciones que induce el zumo de pomelo (*grapefruit juice*) a través de algunos de sus componentes (10). Este zumo contiene un flavonoide denominado naringina, de sabor amargo, que se transforma en el cuerpo humano en naringenina. Este metabolito parece ser uno de los posibles responsables de la inhibición del metabolismo de primer paso de fármacos que se metabolizan por distintos isoenzimas del citocromo P450 (CYP450), principalmente por el 3A4 (CYP3A4) y el 1A2 (CYP1A2). También se especula que un componente del zumo, derivado de las furanocumarinas, denominado 6',7'-dihidroxibergamotina, esté implicado. Entre los antagonistas de los canales de calcio, felodipino, nifedipino, nimodipino, nisoldipino, nitrendipino, amlodipino y verapamilo ven elevadas sus concentraciones plasmáticas al asociarse con zumo de pomelo (10). Este efecto se ha identificado también con otros cítricos amargos como las naranjas amargas (*Seville oranges*). Sin embargo, parece que el zumo de pomelo no tiene efecto en las concentraciones plasmáticas de diltiazem y solo incrementa ligeramente su semivida. Este efecto se explica por una inhibición en el metabolismo de primer paso en la pared intestinal, de CYP3A4, y también por cierta inhibición sobre la glicoproteína-P, que en la pared del enterocito provocaría un aumento de la biodisponibilidad de algunos fármacos. El mecanismo de la glicoproteína-P, bombeando hacia fuera de la célula se compensa con el efecto de proteínas transportadoras que hay en la membrana como los OATP (de sus siglas en inglés *Organic Anion Transporting Polypeptide*). Del efecto combinado de inhibiciones sobre la glicoproteína-P y sobre OATP resultan los diversos efectos de los zumos cítricos, no solo amargos (p. ej. pomelo, lima), que pueden afectar a la biodisponibilidad final de los fármacos que se ingieren junto con estos zumos (11-13).

El inmunosupresor ciclosporina ha conseguido duplicar el número de pacientes cuyos hígados trasplantados eran viables durante el primer año crucial. Para facilitar que la ingestión de ciclosporina resulte agradable se recomienda realizarla junto con zumo de naranja o, preferentemente, con leche o batidos de chocolate, a temperatura ambiente. El zumo de pomelo aumenta su biodisponibilidad al reducir su metabolismo, ya que inhibe el CYP3A4, lo que incrementa un 60 % el AUC de este fármaco. Además, teniendo en cuenta la alta variabilidad de la biodisponibilidad de ciclosporina entre individuos (del 5 % al 90 %) se deben controlar de forma periódica sus concentraciones plasmáticas (p. ej. 2 veces a la semana) (10, 14, 15).

Adicionalmente, la interacción del zumo de pomelo con antihistamínicos como la terfenadina o el astemizol, o con cisaprida puede resultar nociva, ya que el zumo incrementa las concentraciones plasmáticas y, consecuentemente, la incidencia de posibles efectos cardiotóxicos (prolongación del intervalo QT, *torsades de pointes*) que pueden producir estos medicamentos. Últimamente se ha detectado el mismo efecto con pimozida, un neuroléptico. Similares efectos se han comprobado con benzodiacepinas (p. ej. carbamazepina, triazolam, alprazolam y midazolam) y el antirretroviral, saquinavir, a través del efecto inhibidor del CYP3A4, que incrementa sus concentraciones plasmáticas.

El CYP3A4 es el responsable de la metabolización de aproximadamente el 50 % de los fármacos utilizados actualmente en terapéutica. Más de 85 fármacos son metabolizados por el CYP3A4. Por ello es fácil comprobar la gran trascendencia que puede llegar a tener las interacciones que afectan a esta isoenzima en general y del zumo de pomelo en particular (13-15).

A partir de 2001, se han publicado casos de interacciones con los preparados de soja (*Glycine max*) (16). Esta fabaceae, cultivada por sus semillas y sus productos (aceite y harina) se utilizan en la alimentación de humanos y animales, contiene fitoestrógenos de estructura química flavonoide, principalmente la ipriflavona. Esta isoflavona actúa como inhibidor de las isoenzimas CYP1A2 y CYP2C9. La inhibición del CYP1A2 puede provocar un incremento de las concentraciones plasmáticas de compuestos tan diferentes como cafeína, clozapina, haloperidol, olanzapina y tacrina. La inhibición del CYP2C9 puede inducir un incremento de las concentraciones plasmáticas de celecoxib y otros antiinflamatorios no esteroideos (AINE), de fenitoína, warfarina, zafirlukast. También se conoce que los

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

productos que contienen soja pueden disminuir la absorción intestinal de levotiroxina. En niños se ha observado un aumento del nivel sérico de la hormona tirotrofina (TSH) cuando toma una dieta rica en soja junto con levotiroxina para el tratamiento del hipotiroidismo congénito. En estos casos, puede ser necesario ajustar la dosis de levotiroxina (Dexnon®, Eutirox® y genéricos EFG) particularmente al inicio o una vez finalizado el período en que el paciente tome suplementos a base de soja.

4.3. Interacciones adversas de tipo farmacodinámico

El último grupo de IAM adversas está constituido por las interacciones que resultan en modificaciones de la farmacodinámica de los medicamentos. Debe insistirse que aunque el número de IAM de tipo farmacodinámico que resultan con significación clínica es menor de los de tipo farmacocinético, la gravedad de sus efectos para el paciente es mayor (Tabla 2).

Tabla 2: Interacciones farmacodinámicas más relevantes entre alimentos y medicamentos.

Fármaco	Nutriente	Efecto en el fármaco	Recomendaciones
Anticoagulantes orales: warfarina, acenocumarol	Crucíferas, como coles de Bruselas, coliflor, repollo, brócoli, etc (contenido alto de vitamina K)	Disminuye su eficacia al antagonizar el efecto.	Evitar la ingestión simultánea de grandes cantidades de crucíferas (coles de Bruselas, repollo, brécol, coliflor). Controlar el tiempo de protrombina de forma periódica
Antihipertensivos: diuréticos tiazídicos, beta-bloqueadores	Regaliz o su extracto	La acción mineral-corticoide del regaliz antagoniza el efecto antihipertensivo	Evitar el uso de alimentos o derivados con regaliz o su extracto en pacientes con hipertensión arterial
Inhibidores de la Mono-Amino-Oxidasa (IMAO): tranilcipromina, selegilina, procarbazina, isoniazida.	Alimentos ricos en tiramina, como patés, arenques, quesos curados, salami, etc.	Crisis hipertensivas. Desde 1964, se han publicado casos de hemorragias cerebrales con antidepresivos IMAO.	Evitar alimentos ricos en tiramina durante el tratamiento e incluso durante las 3 semanas después de concluir un tratamiento con uno de estos fármacos
Antiestrógenos: tamoxifeno	Soja	Sus fitoestrógenos antagonizan la acción antiestrogénica del fármaco	Evitar la ingestión conjunta.
Anticoagulantes orales: warfarina, acenocumarol	Ajo en cantidades altas	Potencia el efecto anticoagulante ya que el ajo tiene efecto antiagregante	Evitar la ingestión en pacientes anticoagulados ya que puede haber sangrados y hemorragias.

Los alimentos con alto contenido en vitamina K pueden ocasionar modificaciones en la respuesta a la terapia anticoagulante con warfarina o acenocumarol. Entre estos deben citarse algunas crucíferas (p. ej., brécol o brócoli, repollo, coles de Bruselas, coliflor) y otros vegetales con hojas verdes, como remolacha, lechuga, y otros alimentos como el té verde, hígado de cerdo o de vaca y los guisantes verdes. El aporte de vitamina K debido al consumo de estos alimentos, incrementa la síntesis de factores de la coagulación dependientes de vitamina K que induce un antagonismo de los anticoagulantes orales y ocasiona una disminución de la eficacia terapéutica anticoagulante. Por ello, se recomienda a los pacientes con tratamientos de anticoagulantes orales no realizar cambios bruscos en la dieta, en particular relacionados con el aporte de alimentos ricos en vitamina K.

El regaliz (*Glycyrrhiza glabra* L.) posee propiedades demulcentes, expectorantes y laxantes. Se utiliza como agente saporífero, y se usaba frecuentemente para enmascarar el sabor amargo de sustancias medicinales de origen vegetal (p.ej., áloe) o químico (p.ej., quinina). El regaliz contiene glicirrizina (ácido glicirrícico o ácido glicirricínico), una saponina de estructura similar a la aldosterona, con efectos similares a los mineralcorticoides, con retención de agua y sodio e hipopotasemia (potasio sérico <3,5 mmol/L). En las industrias alimentarias se agrega regaliz a las gomas de mascar, bombones de chocolate, cigarrillos, mezclas de tabaco; agregado a la cerveza la hace más espumosa; adicionado a las bebidas no alcohólicas y a la cerveza, mejora su sabor. Ya en 1968 se describió un caso de hipertensión arterial grave al ingerir 100g diarios de regaliz (17). En nuestro medio, publicamos un episodio de respuesta insuficiente a una terapia antihipertensiva como consecuencia de la interacción con un preparado farmacéutico (Pastillas Juanola®) con extracto de regaliz (18). Por lo tanto, se debe indagar la posibilidad de una ingestión importante de productos que contengan regaliz en pacientes tratados de hipertensión aguda o crónica con insuficiente respuesta a los antihipertensivos Por cierto, el regaliz es uno de los

alimentos cuyo etiquetado en Europa presenta restricciones de uso en individuos hipertensos si se supera el aporte diario de 100mg de extracto de regaliz (19).

Las IAM mejor conocidas son las que inducen los alimentos ricos en aminas como la tiramina, dopamina, histamina, etc. Desde 1964 se han notificado (1) decenas de episodios de hemorragias cerebrales, de las que muchas resultaron mortales. Todas se produjeron en pacientes tratados con antidepresivos IMAO, algunos de ellos (p. ej., fenelzina) ya han sido retirados del mercado, al ser desplazados por los antidepresivos tricíclicos. Más recientemente, debido al auge de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) como fluoxetina y similares, que son más seguros en su utilización. También pueden interaccionar con alimentos ricos en tiramina, al inhibir la monamino oxidasa (MAO) que metaboliza estas aminas, fármacos como tranilcipromina, que es un IMAO irreversible y no selectivo, e incluso la selegilina, un inhibidor irreversible de la MAO-B, utilizado en el parkinsonismo. El resultado de esta interacción puede originar unos niveles tóxicos de tiramina en la circulación sistémica, que ocasionarán hipertensión arterial junto con cefalea, insuficiencia cardíaca y hemorragia cerebral.

Los alimentos nocivos son aquellos con un alto contenido proteico y que han sufrido un proceso de envejecimiento, maduración y/o fermentación, escabechado, ahumado o contaminación bacteriana. También se incluyen vinos, tipo Chianti, algún tipo de cerveza (sin alcohol), levaduras y habas o judías. Los alimentos con bajo contenido en tiramina pueden resultar seguros si se ingieren frescos y en cantidad moderada. Por el contrario, debe evitarse tomar simultáneamente cualquier alimento que contenga una concentración elevada de tiramina. Esta recomendación de no tomar simultáneamente alimentos con tiramina se extiende durante todo el tratamiento, e incluso durante 3 semanas después de finalizar la terapia con fármacos IMAO.

Las mismas recomendaciones deben hacerse con otros fármacos con actividad inhibidora sobre la MAO, tales como el antituberculoso isoniazida y el citotóxico alquilante procarbazina (2). Uno de los últimos antidepresivos comercializado es moclobemida, que inhibe la MAO-A de forma reversible y selectiva frente a noradrenalina y serotonina que, si bien debe tenerse precaución, presenta un menor riesgo de interacción con estos alimentos ricos en tiramina.

Es fundamental que todos los pacientes en tratamiento con alguno de estos fármacos IMAO, reciban información sobre el tipo de alimentos que deben evitar en su dieta. Debe proporcionarse esta información por parte del farmacéutico, reforzando la trasmitida por el médico prescriptor y la contenida en los prospectos y fichas técnicas de estos medicamentos (2). Aunque, hoy en día, la utilización de este tipo de antidepresivos no es elevada, todo esfuerzo que se haga para evitar estas interacciones será de poca utilidad si no se consigue evitar un episodio fatal.

Desde 2001, se han publicado algunos casos de interacción entre preparados de soja (*Glycine max*) y tratamientos con tamoxifeno (16). Esta leguminosa, como ya hemos comentado, contiene fitoestrógenos como la ipriflavona. Esta isoflavona actúa como antagonista de tamoxifeno, con actividad antiestrogénica en la prevención o tratamiento del cáncer de mama.

También se ha constatado el efecto antiagregante del ajo (*Allium sativum* L.), al provocar hemorragias post-quirúrgicas y hematoma epidural espinal de forma espontánea (16). Por este motivo debe evitarse la ingestión desmedida de ajo en pacientes en tratamiento con anticoagulantes orales.

5. INVESTIGACIÓN DE LAS INTERACCIONES POTENCIALES CON ALIMENTOS

Cada día se otorga más importancia a las interacciones entre fármacos, en general, y en particular a las IAM. Desde 1998, tanto en la Unión Europea (4) como en EE.UU. (20), se han publicado guías para investigar las interacciones de los medicamentos entre sí y con alimentos, y otros factores ambientales como el tabaco y alcohol, durante las fases previas a la comercialización. Se han desarrollado directrices para identificar las posibles interacciones y proponer medidas para prevenirlas y evitarlas. Es posible identificar estos riesgos potenciales durante el desarrollo de los nuevos medicamentos, una vez que se identifican las vías metabólicas por las que se metaboliza el nuevo fármaco.

5.1. Directrices europeas de investigación sobre interacciones

En 1996, el grupo europeo de trabajo sobre eficacia de medicamentos (*Efficacy Working Party*) del Comité Europeo de Medicamentos de uso Humano (CHMP) de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) comenzó la elaboración de una guía (4) para investigar las interacciones farmacológicas, que finalmente entró en vigor en 1998. En esta guía se establecieron las bases terminológicas sobre los tipos de interacciones y su relevancia clínica, y se articularon los pasos necesarios para identificar las posibles interacciones por parte de los laboratorios farmacéuticos durante la investigación y desarrollo de todo nuevo fármaco. Así, solo con la comprobación fisicoquímica (*in vitro*) e *in vivo* de la ruta metabólica y el tipo de enzimas que participan en su metabolización, dentro de la caracterización de la farmacocinética, pueden preverse las interacciones. Una vez que se constatan los datos relativos a la absorción, distribución, metabolismo y excreción, en el desarrollo farmacocinético de la nueva molécula, se permite orientar, planificar y probar las interacciones.

Después de más de 15 años de utilización de esta guía (4), se ha actualizado en 2012 el texto para incorporar todos los conocimientos que, se han ido reuniendo, sobre este tema, en los últimos años. Si bien las interacciones farmacológicas pueden ser tanto farmacodinámicas como farmacocinéticas, éstas últimas son las que suponen el objetivo principal de esta directriz. En la versión actual se reúne toda una batería de pruebas entre las que destaca la

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

mención expresa de aquellas dirigidas a comprobar los efectos de la ingesta de alimentos sobre la farmacocinética del medicamento en investigación. Se enfoca en las fases II y III de los ensayos clínicos para conseguir una adecuada dosificación, mientras se estudian las distintas formulaciones galénicas. Una prueba elemental es la comprobación de que la ingesta rica en grasas modifica o no la absorción del medicamento en desarrollo: una dosis única del medicamento se administra con 240 mL de agua después de un periodo de ayuno de 10 horas, y después de 30 minutos de iniciar la toma de comida; las pruebas se hacen con una "comida normal" (con 400-500 kcal, de las que la grasa cubra 250-300 kcal) y una "comida rica en grasa" (con 800-1000 kcal, de las que 500-600 kcal se aporten como grasa y 250 kcal como hidratos de carbono). En el caso de que el medicamento presente una farmacocinética no lineal, lo recomendable es comprobar el efecto de la comida con la dosis más alta y con la dosis más baja. Si se constatan efectos clínicos significativos de los alimentos, se recomienda realizar más estudios sobre la posible IAM.

En función de la frecuencia de administración y de las recomendaciones de ingesta en ayunas o con alimentos (4), se deben planificar estudios acordes para comprobar la influencia de los alimentos:

a) si se recomiendan las tomas junto con alimentos, se debe comprobar el efecto de una "comida normal".

b) si se recomiendan las tomas en ayunas por las mañanas, se debe comprobar el tiempo necesario de ayuno entre la toma del medicamento y la ingesta de alimentos.

c) si se recomienda tomar el medicamento con el estómago vacío, o varias veces al día, o en otro momento distinto de la mañana, se deben realizar estudios para establecer el intervalo de tiempo antes y después de una comida en el que no se debe tomar el medicamento.

d) si se recomienda administrar el medicamento junto con una comida o con alimentos específicos, y está indicado para uso pediátrico, se debe especificar si es relevante para el uso pediátrico (especialmente en recién nacidos y en lactantes) cuya dieta está preferentemente basada en leche materna o leches de iniciación.

Si bien la revisión de las publicaciones puede servir para la identificación de las interacciones entre alimentos específicos como el zumo de pomelo y diversos medicamentos, no se pueden extrapolar estos efectos a otros medicamentos sin antes comprobar las sustancias que interaccionan y la magnitud de tal efecto. Para esta constatación se utilizan tipos especiales de alimentos como el zumo de pomelo, y fármacos llamados de prueba o sondeo ("*probe drugs"*) que se utilizan como patrones.

En el apéndice VII de la Guía de la EMA (4) se describen los fármacos de prueba atendiendo al tipo de isoenzima de los citocromos por los son específicamente metabolizados. Los resultados de estas pruebas deben complementarse con inhibidores específicos de estas isoenzimas. Tal como se describe en el apéndice VII de la Guía de la EMA (4), se utilizan inhibidores potentes *in vivo* de las actividades enzimáticas para constatar las interacciones potenciales. Así, si se producen elevaciones de niveles plasmáticos de un nuevo medicamento con un inhibidor potente del CYP3A4, como el ketoconazol, ya se puede indicar la interacción potencial con el zumo de pomelo, y con otros zumos de cítricos amargos (12) .

Deben complementarse estas investigaciones de inhibición enzimática con estudios sobre inhibición de transportadores, del tipo de la glicoproteína-P, del OATP 1B1 (OATP1B1), OATP1B3, OCT2 (de la siglas en inglés *Organic Cation Transporter type 2*), OCT1, OAT1 (de sus siglas en inglés *Organic Anion Transporter type 1*), OAT3, entre otros.

Por tanto, el objetivo de la información incluida en la ficha técnica y en el prospecto de los medicamentos, debe ser permitir establecer información clara y orientadora para el mejor uso del nuevo medicamento, una vez se autorice y se ponga en el mercado.

6. DATOS DE INTERACCIONES ALIMENTO-MEDICAMENTO EN LA INFORMACIÓN DE LOS MEDICAMENTOS (FICHA TÉCNICA Y PROSPECTO)

Los detalles y trascendencia de las interacciones deben describirse en la ficha técnica del medicamento en la que se resumen las características farmacoterapéuticas del medicamento, a modo de "manual de usuario" para los profesionales sanitarios (en inglés, *Summary of Product Characteristics, SmPC*). En la guía de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) (4) en su apéndice IX se describe la normalización del texto para exponer esta información en los párrafos correspondientes de la ficha técnica, en el *4.2. Posología y forma de administración*, y en el *5.2. Propiedades farmacocinéticas*. Este tipo de información, se adaptará a cada caso, según las pruebas que existan de las interacciones adversas:

- [*Medicamento*] puede tomarse con o sin comidas.

- [*Medicamento*] debe tomarse con el estómago vacío, al menos X horas antes o X horas después de una comida.

- [*Medicamento*] debe tomarse con el estómago vacío una hora antes del desayuno.

- [*Medicamento*] debe tomarse junto con la comida.

- [Medicamento] debe tomarse con una comida ligera.

Donde [*Medicamento*] representa la denominación del medicamento (marca comercial).

Esta misma información debe incorporarse en el texto del prospecto incluido en el envase, y que va dirigido al paciente. Como ejemplo de este tipo de información se adjunta el texto relativo a la interacción de medicamentos con isoniazida con la ingestión de alimentos ricos en histamina y aminas biógenas, que se recoge en sus fichas técnicas (2), en el párrafo *4.5. Interacción con otros medicamentos y otras formas de interacción*. El efecto IMAO que tiene la isoniazida, antituberculoso, puede bloquear la metabolización de estas aminas y producir efectos adversos:

"INTERACCIONES CON ALIMENTOS: Debido a la

actividad inhibidora de la monoamino-oxidasa que tiene la isoniazida, puede aparecer una interacción con los alimentos que contienen tiramina (queso, vino tinto). Como también puede inhibir la diamino-oxidasa, ante ciertos alimentos que contienen histamina (p.ej.: atún u otros pescados tropicales) se produce una respuesta exagerada (p.ej.: cefalea, sudoración, palpitaciones, enrojecimiento, hipertensión). Por ello los pacientes que estén recibiendo tratamiento con rifampicina/isoniazida deben evitar tomar alimentos que contengan tiramina e histamina."

7. NUEVA INFORMACIÓN SOBRE INTERACCIONES ADVERSAS: PAPEL DE LA FARMACOVIGILANCIA

Todos los farmacéuticos, como profesionales sanitarios expertos en medicamentos, y cualquiera que sea su especialización, están llamados a colaborar en la detección, notificación, información y prevención de las posibles reacciones adversas que resulten de la interacción de alimentos con medicamentos. La importancia de la farmacia comunitaria, en particular, radica en tener una visión completa de todos los tratamientos que recibe el paciente, así como otros productos que aunque no se consideran medicamentos pueden tener efectos farmacológicos (zumos de cítricos, preparados de regaliz, alimentos con tiramina, alimentos con soja, ajo, nutracéuticos, etc.) mediante el Seguimiento Farmacoterapéutico (SFT).

La farmacovigilancia como actividad de salud pública que tiene por objetivo la identificación, cuantificación, evaluación y prevención de los riesgos asociados al uso de los medicamentos una vez comercializados, ofrece la posibilidad de reunir nuevas experiencias adversas con el uso de medicamentos. Ya hemos comentado que en los años sesenta se identificaron interacciones, como las de los IMAO con alimentos ricos en tiramina (desde 1964), y la de los extractos de regaliz (desde 1968) impidiendo el efecto de fármacos hipotensores. En estos 50 años, otros ejemplos de interacciones fármaco-fármaco se han identificado durante la práctica habitual, como la de la "hierba de San Juan" o hipérico con los anticonceptivos hormonales orales (21), que puede interaccionar con el efecto anticonceptivo y provocar un embarazo no deseado: esta planta medicinal presenta un efecto inductor de la isoenzima CYP3A4, con lo que se metabolizan las hormonas más rápidamente y se reduce su efecto anovulatorio. Pero a tenor de la escasa información recogida a través de los programas de notificación espontánea de sospechas de reacciones adversas a medicamentos (RAM) por interacciones con los alimentos cabría pensar que desafortunadamente se da poca importancia a este tipo de problemas. Por esta razón se debe hacer hincapié en la posibilidad de que aparezcan estas interacciones adversas, y en la necesidad de notificarlas al Sistema Español de Farmacovigilancia de medicamentos de uso Humano (SEFV-H).

Actualmente existen iniciativas que se enfocan en predecir y prevenir interacciones entre ingredientes químicos de los alimentos y los fármacos de uso en terapéutica, como estrategias proactivas (22), ya que debemos recordar que en el caso de presentarse una RAM durante cualquier tratamiento farmacológico, siempre se ha de tenerse en cuenta la posibilidad de una IAM. En caso afirmativo, debe notificarse preferentemente las RAM que resulten de posibles interacciones entre alimentos y medicamentos de reciente autorización. Son los llamados "medicamentos de seguimiento adicional", marcados con un triángulo negro invertido (▼) delante de su nombre comercial, en la ficha técnica, prospecto y material informativo, de los que se solicita que se notifiquen todas las sospechas de RAM que se identifiquen durante los primeros 5 años de comercialización (23). Por tanto, si se sospecha tal IAM, todos los profesionales sanitarios tienen la obligación de notificar al SEFV-H la RAM que se haya identificado, mediante las tarjetas amarillas a través de los Centros Regionales, existentes en cada una de las 17 Comunidades Autónomas, según donde trabaje (directorio en:

https://www.aemps.gob.es/vigilancia/medicamentosUsoHumano/docs/dir_serfv.pdf). También puede notificarse a través del formulario electrónico disponible en: www.notificaRAM.es. Con la nueva normativa europea que entró en vigor desde julio 2012, se solicita la notificación de sospechas de RAM, con o sin interacciones, también a los ciudadanos o pacientes, directamente a su médico, farmacéutico o enfermero. En los nuevos prospectos se recomienda, la posibilidad de notificar RAM mediante vía electrónica directa al SEFV-H a través de la web www.notificaRAM.es.

En conclusión, la participación del farmacéutico en la detección de nuevas IAM adversas, así como en la prevención de las conocidas, evitando riesgos a los pacientes, debe constituir el estímulo para conseguir una máxima seguridad del paciente con un uso razonado de los medicamentos, objetivo de todo profesional sanitario.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

8. REFERENCIAS

1. Shee JC. Pargyline and the Cheese Reaction. BMJ 1964; 1 (5395): 1441.
2. AEMPS: Ficha técnica de Rifater® comprimidos recubiertos. Disponible en: (https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/58299/FT_58299.html)
3. Bailey DG, Spence JD, Muñoz C, et al. Interaction of citrus juices with felodipine and nifedipine. Lancet 1991; 337: 268-9
4. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on the investigation of drug interactions. CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2. EMA, London, 21 June 2012. Disponible en: (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/07/WC500129606.pdf)

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

5. Bermejo Vicedo T, Hidalgo Correas FJ, Pérez Menéndez Conde C. Interacciones entre fármacos y nutrientes. En Tratado de Nutrición. Tomo IV. Nutrición Clínica. Gil A (Ed.). Editorial Médica Panamericana: Buenos Aires. 2010, pp. 343-66.
6. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on the use of pharmacogenetic methodologies in the pharmacokinetic evaluation of medicinal products. Ref. EMA/CHMP/37646/2009. EMA, London, 12 Decembre 2011. Disponible en: (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/02/WC500121954.pdf).
7. EMEA Public Statement on the risk of drug interactions with *Hypericum perforatum* (St John's wort) and antiretroviral medicinal Products. Ref EMEA/6321/00. London, 28 February 2000. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Public_statement/2010/08/WC500095655.pdf).
8. Guy C, Ollagnier M. Sucralfate and bezoars: data from the system of pharmacologic vigilance and review of the literature. Therapie 1999; 54(1): 55-8.
9. Madurga M. Farmacovigilancia: Los suplementos de ajo anulan los efectos de saquinavir (Fortovase®, Invirase®). Panorama Actual Med 2002; 26 (251): 210-1.
10. Spence DJ. Drug interactions with grapefruit: Whose responsibility is it to warn the public? Clin Pharmacol Ther 1997; 61: 395-400.
11. Ötles S, Senturk A. Food and drug interactions: a general review. Acta Sci Pol Technol Aliment 2014; 13(1): 89-102.
12. Saito M, Hirata-Koizumi M, Matsumoto M, Urano T, Hasegawa R. Undesirable effects of citrus juice on the pharmacokinetics of drugs. Focus on recent studies. Drug Safety 2005; 28(8): 677-94.
13. Bailey DG, Dresser G, Arnold JMO. Grapefruit-medication interactions: Forbidden fruit or avoidable consequences? CMAJ 2013; 185(4): 309-16.
14. Tatro DS. Update: Drug interactions with grapefruit juice. Drug Link 2004; 8(5): 35-8.
15. University of Indiana. School of Medicine, Department of Medicine, Clinical Pharmacology. Cytochrome P450 Drug Interaction Table. Disponible en: (http:// http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/main-table)
16. Scott GN, Elmer GW. Update on natural product-drug interactions. Am J Health-System Pharmacy 2002; 59(4): 339-47.
17. Lefebvre RE, Marc-Aurele L. Licorice and hypertension. Can Med Ass J 1968; 99: 230-1.
18. Madurga M, Rodríguez Silva MJ, Abajo FJ de. Regaliz: ¿fármaco o alimento? Atención Primaria 1995; 16(4): 233-4.
19. Directiva 2004/77/CE de la Comisión, de 29 de abril de 2004, por la que se modifica la Directiva 94/54/CE en lo que respecta al etiquetado de determinados productos alimenticios que contienen ácido glicirrícico y su sal amónica. Diario Oficial de la Unión Europea, n° L 162, de 30/04/2004: 0076–0077. Disponible en: (http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32004L0077:ES:HTML)
20. FDA. Clinical Pharmacology Section of Labeling for Human Prescription Drug and Biological Products — Content and Format. Guidance for Industry. December 2016. Disponible en: (https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM109739.pdf)
21. Hall SD, Wang Z, Huang SM, Hamman MA, Vasavada N, Adigun AQ, y col. The interaction between St John's wort and an oral contraceptive. Clin Pharmacol Ther 2003; 74: 525-35.
22. Jensen K, Ni Y, Panagiotou G, Kouskoumvekaki I. Developing a molecular roadmap of drug-food interactions. PLoS Comput Biol 2015; 10(2): e1004048.
23. Medicamentos sujetos a seguimiento adicional. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Disponible en: (https://www.aemps.gob.es/vigilancia/medicamentosUsoHumano/seguimiento_adicional.htm)

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
ISSN (Online) 1697-4298
Review
analesranf.com

Drug-nutrient interactions in artificial nutritional support

Title in Spanish: *Interacciones fármaco-nutriente en el soporte nutricional artificial*

Helena Quirós Ambel[1,*], José Manuel Martínez Sesmero[2]

[1]Servicio de Farmacia Hospitalaria, Hospital Virgen de la Salud, Toledo. [2] Servicio Farmacia Hospitalaria. Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

ABSTRACT: The drug-nutrient interaction is defined as an alteration of the kinetics and/or dynamics of a medicine or nutrient, and/or the deterioration of the nutritional status caused by the administration of the drug. Kinetics refers to the quantitative description of a drug or its availability, and the dynamics characterizes the clinical or physiological effects of the drug. In order to carry out this review, a total of 21 articles cited in the PubMed database were selected and consulted together with the reports of different Spanish Society Societies' guides on clinical practice related to these interactions. They contain different types of interactions and negative effects that are induced both at the level of enteral nutrition (EN) and parenteral (NP). Therefore, the availability of nutrients can be affected by the drug and the effect of the drug can be modified by the nutrient, including the risk of adverse effects. This interaction becomes even more relevant, when we speak of artificial nutritional support, therefore, patients that require the use of enteral or parenteral nutrition, in general, are not usually subjected exclusively to this medical intervention, but it is only one more part of their pharmacological therapy, increasing the risk of interactions and causing a loss of effectiveness of the pharmacological treatment, obstruction of the feeding tube, incompatibility and destabilization of the NP emulsion, appearance of adverse reactions or alteration of the nutritional status among others. The clinical consequences, derived from this, will depend on the type of drug and the characteristics of the patient, being more susceptible chronic polymedicated patients, elderly, and in critical conditions. In conclusion, it is essential to know the main types of interactions, as well as the appropriate administration techniques, to help minimize these incompatibilities and promote the success of good pharmacotherapy.

RESUMEN: La interacción fármaco-nutriente se define como una alteración de la cinética o dinámica de un medicamento o nutriente, y/o el deterioro del estado nutricional causado por la administración del fármaco. La cinética se refiere a la descripción cuantitativa de un medicamento o su disponibilidad, y la dinámica caracteriza el efecto clínico o fisiológico de la droga. Para la realización de esta revisión se han seleccionado y consultado un total de 21 artículos citados en la base de datos PubMed junto con los informes de diferentes guías de Sociedades Científicas españolas sobre práctica clínica relacionadas con dichas interacciones. En ellos se recogen diferentes tipos de interacciones y efectos negativos que se inducen tanto a nivel de la nutrición enteral (NE) como de la parenteral (NP). La disponibilidad de nutrientes puede verse afectada por el fármaco y el efecto terapéutico del fármaco puede ser modificado por el nutriente, incluido el riesgo de efectos adversos. Esta interacción se hace aún más relevante, cuando hablamos de soporte nutricional artificial, pues, los pacientes que requieren el uso de NE o NP, por lo general, no suelen estar sometidos exclusivamente a esa intervención médica, sino que solo es una parte más de su terapia farmacológica, aumentando el riesgo de interacciones y pudiendo ocasionar una pérdida de efectividad del tratamiento farmacológico, obstrucción de la sonda, incompatibilidad y desestabilización de la emulsión de NP, aparición de reacciones adversas o alteración del estado nutricional entre otros. Las consecuencias clínicas, derivadas de ello, dependerán del tipo de fármaco y de las características del paciente, siendo más susceptibles, los pacientes crónicos polimedicados, ancianos, y en estado crítico. Se concluye en la necesidad de conocer los principales tipos de interacciones, así como las técnicas de administración adecuadas, para ayudar a minimizar estas incompatibilidades y favorecer el éxito de una buena farmacoterapia.

[*]**Corresponding Author:** quiros.helena@gmail.com
Received: March 13, 2018 **Accepted:** May 3, 2018

An Real Acad Farm Vol. 84, Nº 2 (2018), pp. 226-237

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

La terapia nutricional artificial constituye un conjunto de procedimientos destinado a mantener o restablecer el estado nutricional del paciente mediante la administración artificial de alimentos (1). Los enfermos que van a beneficiarse de esta práctica, suelen ser pacientes portadores de una enfermedad crónica o crítica que van a ser sometidos a técnicas de diagnóstico y tratamiento agresivas, no siendo posible, en la mayoría de los casos, mantener un adecuado aporte de nutrientes mediante

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

alimentación oral, existiendo un decalaje entre los aportes y los requerimientos nutricionales. Para tratar de minimizar el estrés fisiológico y los efectos adversos del catabolismo proteico relacionados con este proceso, muchos de estos pacientes van a requerir la utilización de un soporte nutricional artificial, bien por vía enteral (sonda u ostomía) o por vía parenteral, condicionado por la funcionalidad del tracto gastrointestinal y/o el tiempo estimado del uso del mismo. Es una característica común de estos pacientes, el empleo de una amplia variedad de fármacos. En el año 2016, el 19,9% de la población española tenía 65 o más años y se calcula que este valor ascenderá al 30-35% en 2050 con más de 4 millones de octogenarios (2). Este aumento de la edad media de la población llevará asociado un incremento significativo en la prevalencia de enfermedades crónicas, y como consecuencia, un aumento de la polifarmacia, la cual se define como la utilización de un número elevado de medicamentos, generalmente más de 5 de forma crónica, en un mismo paciente. Muchos de los pacientes crónicos polimedicados pueden precisar la administración de nutrición enteral (NE) o de nutrición parenteral (NP), por lo que resulta imprescindible tener en cuenta no solo la alta probabilidad de interacciones entre fármacos, sino también las interacciones con la nutrición artificial, que puedan producir una pérdida de efectividad del tratamiento farmacológico, obstrucción de la sonda, incompatibilidad y desestabilización de la emulsión de NP, aparición de reacciones adversas o alteración del estado nutricional (2).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una revisión bibliográfica de artículos de la base de datos PUBMED-NCBI (National Center for Biotechnology Information). Se utilizaron descripciones en ciencias de la salud: DECS y MeSH (medical Subjetct heading) en inglés: “Food-Drugs Interactions” “Drugs Interactions” “Nutritional support”. Este último término, engloba “enteral nutrition” y “parenteral nutrition”, acotando los estudios a los diez últimos años (desde 1 de Enero de 2008 a 1 de Enero de 2018). También se revisaron documentos oficiales de hospitales a nivel nacional y las guías de práctica clínica de la Sociedad Española de Nutrición Enteral y Parenteral (SENPE), de la Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (SEGHNP) y de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH) relacionadas con el tema a estudio, de los últimos diez años.

3. RESULTADOS

Siguiendo los criterios de búsqueda anteriormente mencionados, se localizaron un total de 27 artículos. Se descartaron 6 de ellos, ya que en 4 el texto completo no estaba disponible y 2 de ellos no cumplían con los objetivos de la revisión. Por lo tanto, finalmente se seleccionaron 21 artículos para la discusión presentada en esta revisión. En ellos se aborda el tema de las interacciones medicamentosas, interacciones de nutrientes con medicamentos, estabilidad de la NE y NP, y recomendaciones para el manejo de estas incompatibilidades.

4. DISCUSIÓN

4.1. Antecedentes

Las interacciones farmacológicas se definen como la alteración del nivel del fármaco o sus efectos por el uso concomitante de otros agentes (drogas, alcohol, tabaco, nutrientes, pruebas de diagnóstico). Esta interacción puede dar como resultado una baja eficacia del medicamento o toxicidad del mismo. El riesgo de interacciones farmacológicas aumenta con la polifarmacia, que se observa especialmente en pacientes de edad avanzada. Sin embargo, el riesgo de la interacción no solo se observa entre los medicamentos, sino también entre la NE o NP y los medicamentos (3). A pesar de que las interacciones entre fármacos se conocen ya desde hace mucho tiempo, hasta hace no mucho, las interacciones fármaco - nutriente eran un tema totalmente ajeno a la práctica clínica. Poco a poco se ha incrementado la evidencia y conocimiento debido a las las manifestaciones clínicas que producen.

La primera sospecha de una interacción fármaco-nutriente fue en el año 1927, cuando Burrows y Farr (4) evidenciaron que los aceites minerales utilizados como laxantes reducían la absorción de las vitaminas liposolubles; más tarde, en 1939, Curtis y Balmer (4) confirmaron que el aceite mineral disminuía la absorción de los β-carotenos. Treinta años después se describió por primera vez la interacción entre inhibidores de la monoaminooxidasa y las aminas biógenas contenidas en distintos alimentos y bebidas sometidos a procesos de fermentación, maduración o deterioro, que por acumulo de estas últimas desencadenaban en el organismo crisis convulsivas (4). Sin embargo, no ha sido hasta el año 2000 cuando han empezado a publicarse artículos e informes relacionados con este tema, aunque en ningún caso existen datos sobre la prevalencia real de este problema. En la actualidad, se sabe que los alimentos contienen nutrientes y otras sustancias que pueden afectar en diferente grado a la farmacocinética y la farmacodinamia de los medicamentos y, de igual manera, los medicamentos causan impacto sobre el estado nutricional, ya sea produciendo una deficiencia nutricia o interfiriendo en el proceso natural de la alimentación (generando hambre o anorexia, vómitos o náuseas, etc.). Estas interacciones, además de ser bidireccionales, pueden resultar muy graves e incluso mortales, por lo que no deben subestimarse.

La aparición de interacciones entre fármacos y nutrientes depende de las características del paciente, del medicamento y del soporte nutricional (3). Los pacientes no suelen presentar la misma respuesta a un tipo de interacción y las diferencias son mayores en pacientes desnutridos, geriátricos, con cáncer o trasplantados. Se han descrito numerosos factores de riesgo que se asocian con la aparición de interacciones, como son la polimedicación, formas farmacéuticas determinadas, dietas ricas en fibra o grasas, ayuno, desnutrición y situaciones clínicas como insuficiencia hepática y renal.

Por tanto, los pacientes crónicos polimedicados suelen

tener un alto riesgo de presentarlas, ya que además de que pueda existir una desnutrición de base, se debe modificar en numerosas ocasiones la forma farmacéutica para la administración por sonda o enterostomía, lo que puede aumentar el riesgo de aparición de este tipo de interacciones. Desde una perspectiva clínica, estas interacciones resultan significativas si alteran la respuesta terapéutica o comprometen el estado nutricional del paciente. (3).

4.2. Clasificación de las interacciones entre fármacos y nutrición

Las interacciones entre fármacos y nutrición pueden agruparse en dos áreas fundamentales: Interacción nutriente-medicamento (INM) e interacción medicamento-nutriente (IMN). No obstante, esta revisión se centrará fundamentalmente en la INM.

a) Interacción nutriente-medicamento. Debido a la presencia de alimento en el tracto gastrointestinal en el momento de la administración de un medicamento. Esto altera la farmacocinética (se altera la absorción, distribución, metabolismo o excreción del fármaco) y farmacodinamia (se altera la acción del fármaco).

La interacción farmacocinética más frecuente es la que se produce por alteración del proceso de absorción del fármaco. Los cambios en la cantidad de fármaco absorbido, consecuencia de su administración con alimentos, pueden tener importancia clínica, especialmente en aquellos que presentan un margen terapéutico estrecho. Los cambios en la velocidad de absorción son raramente importantes, siempre que no se requiera un inicio de acción rápido. Las interacciones farmacodinámicas pueden tener como consecuencia una potenciación excesiva o un antagonismo del efecto del fármaco: dietas ricas en vitamina K pueden contrarrestar el efecto anticoagulante de la warfarina o el acenocumarol; alimentos ricos en tiramina pueden provocar crisis hipertensivas en pacientes que siguen tratamiento con fármacos inhibidores de la monoamino-oxidasa.

b) Interacción medicamento-alimento. Estas interacciones se originan cuando el medicamento produce una deficiencia nutricional, ya sea porque impide la absorción o porque induce la eliminación acelerada de uno o varios nutrientes de un alimento o de un módulo dietético. En este apartado podríamos incluir fármacos tales como algunos diuréticos que pueden ocasionar hiponatremia, hipokalemia, hipernatremia y deshidratación. Así, la anfotericina B, origina hipokalemia e hipomagnesemia, los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECAS) relacionados con hiperkalemia o los esteroides que pueden ser causantes de cambios séricos en los niveles de potasio, sodio y glucosa (3).

También se incluyen aquí las modificaciones en el consumo de alimentos que ocasiona la terapia farmacológica, por ejemplo, los medicamentos oncológicos que producen náuseas, vómito o disgeusia y, por lo tanto afectan negativamente al comportamiento alimentario generando deficiencias, el estreñimiento ocasionado por analgésicos opioides, o los antibióticos y agentes inflamatorios que originan erosión y otras alteraciones importantes en la estructura del epitelio digestivo y de la composición de la microbiota intestinal (3).

4.3. Interacción entre fármacos y nutrición enteral

Las interacciones entre fármacos y NE suelen producirse con bastante frecuencia en nuestro entorno y están muy presentes en la práctica clínica diaria. Es una regla general verificar la compatibilidad y estabilidad del fármaco cuando se agregan fármacos a la mezcla de NP o se administran medicamentos a través del mismo catéter. Sin embargo, no se presta la misma atención cuando se administran medicamentos con la NE. Así, entre un 5 y un 43 % de los profesionales realizan enjuagues de la sonda con agua antes y después de la administración del fármaco, del 32 al 51 % administran los medicamentos por separado, entre el 44 y 64 % administran los medicamentos diluidos en líquidos y entre el 75 y 85 % de los profesionales dice que presta atención a la hora de triturar fármacos con cubiertas de liberación modificada. Pero por otro lado, se ha demostrado que el 74% de los profesionales comete al menos dos errores al administrar el medicamento a través del tubo de alimentación (5). Por ello puede concluirse que la concienciación del personal sanitario sobre este problema no es suficiente, siendo necesaria la implantación de protocolos con recomendaciones para la administración de fármacos por sonda nasoentérica o enterostomía, tal y como indican las recomendaciones tanto a nivel nacional como internacional (5). Un aspecto a tener en cuenta es el significado clínico que presentan Así, se consideran clínicamente significativas si comprometen el estado nutricional del paciente o modifican la respuesta farmacoterapéutica, representando en este caso, un número relativamente pequeño.

Hasta el momento, la documentación disponible sobre la gravedad e importancia clínica de estas interacciones es escasa y la mayoría hacen referencia a series reducidas de personas sanas, existiendo escasa información en pacientes reales. En la tabla 1 se resumen los factores que pueden producir o están implicados en la interacción fármaco – NE. Puede observarse que las interacciones entre los fármacos y la NE dependen tanto de factores característicos del propio paciente, del medicamento y del tipo de nutrición.

4.3.1. Factores implicados en las interacciones entre medicamentos y la nutrición enteral

Las interacciones entre los fármacos y la NE dependen de diferentes factores que se resumen en la Tabla 1.

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

Tabla 1. Factores que influyen en el desarrollo de interacciones entre medicamentos y nutrición enteral.

Características del paciente	Características del fármaco	Características del soporte nutricional
Edad	Forma farmacéutica	Tipo de sonda
Estado nutricional	Características farmacocinéticas	Localización de la sonda
Embarazo	Margen terapéutico	Características de la fórmula
Lactancia	Efectos farmacológicos	Técnicas de administración
Determinadas patologías	Efectos secundarios	

a) Características del paciente. Dentro de los factores dependientes del paciente, las edades extremas y el aumento de los requerimientos nutricionales, como en el caso del embarazo o en la lactancia, pueden influir en la aparición de interacciones. El estado nutricional resulta imprescindible, pues una reducción de las proteínas plasmáticas debido a un estado de malnutrición puede alterar la distribución de los fármacos que se unen a las proteínas plasmáticas en altas proporciones, dando como resultado una metabolización de los fármacos acelerada y no efectiva, que favorece un aumento de los efectos secundarios del mismo. También cambios significativos en los fluidos corporales por deshidratación o hiperhidratación, pueden afectar a la distribución del medicamento.

La presencia de determinadas patologías como es un estado de malabsorción, enfermedad hepática o renal, incrementa el riesgo de aparición de interacciones. De hecho, en pacientes hemodinámicamente inestables con sepsis, hemorragia, hipovolemia, politraumatismo y shock cardiogénico, que requieren agentes vasoactivos como la noradrenalina, la epinefrina, la fenilefrina, la dopamina y la dobutamina para mantener el flujo sanguíneo a órganos vitales como el corazón y el cerebro, debe evitarse la utilización de NE. En tales casos, el flujo sanguíneo gastrointestinal está disminuido, y es imprescindible un flujo suficiente que permita la absorción y la utilización de nutrientes. El uso de la NE aumenta la demanda de oxígeno por parte del intestino, que si no llega, puede producir isquemia intestinal y, en raras ocasiones, necrosis intestinal con alto riesgo de mortalidad. La Sociedad Estadounidense de Nutrición Parenteral y Enteral recomienda la interrupción de la NE en pacientes hemodinámicamente inestables que reciben altas dosis de catecolaminas hasta que se logra la estabilidad del paciente; y en aquellos que reciben dosis bajas de catecolaminas, se debe buscar una administración cuidadosa de NE (5, 6).

b) Características del fármaco. Respecto a la forma farmacéutica, la mayoría de los comprimidos o cápsulas son productos de liberación inmediata convencionales. Estos productos están diseñados para liberar el contenido del fármaco en cuestión de minutos después de alcanzar el estómago tras la administración oral. Sin embargo, hay numerosos medicamentos con formas de liberación modificada que nunca deben ser triturados si se administran a través de la sonda de alimentación (7). La trituración de tales fármacos puede provocar una disminución notable de su actividad o puede inducir efectos secundarios tóxicos como resultado de una liberación repentina de una dosis planificada para 24 horas. Lo mismo sucede con los comprimidos con cubierta pelicular o recubrimiento entérico. La trituración de los mismos puede provocar cambios en su biodisponibilidad y favorecer la obstrucción del tubo. Existe una lista completa de drogas que no se deben triturar, y que están disponibles en "Institute for Safe Medication Practices" (3,21). Respecto a las cápsulas, algunas de ellas pueden administrarse a través de la sonda, mediante la apertura de la cápsula y mezclado de su contenido en agua. Sin embargo, si las cápsulas contienen gránulos de recubrimiento entérico nunca deben ser triturados. Las cápsulas de gelatina blanda, se pueden administrar por la sonda, aspirando el contenido de la misma a través de una jeringa, sin embargo, hay probabilidad de que exista una reducción de la dosificación, por lo que muchas guías recomiendan disolver la cápsula en agua caliente, con el fin de administrar toda la mezcla. En este caso habrá que tener cuidado con no administrar la porción de la gelatina que quede sin disolver para evitar que eso ocasione la oclusión del tubo (8). En las formas de dosificación líquidas, habrá que tener en cuenta la viscosidad y osmolaridad, ya que no todos son adecuados para una administración directa a través de la sonda. Por ello, en términos generales se recomienda que sean diluidos con agua antes de su administración (3). Quedan exentos de estas recomendaciones los fármacos con propiedades teratogénicas, carcinogénicas o citotóxicas como antineoplásicos, hormonas y análogos de prostaglandinas que, durante su preparación, un contacto directo o una exposición con el tracto respiratorio pueden causar efectos perjudiciales para el personal implicado (8).

En este sentido, es importante tener en cuenta que, no todas las soluciones orales y su correspondiente fármaco en formulación sólida oral, ya sea comprimido, cápsula, etc., siempre van a tener la misma biodisponibilidad, pudiendo requerir diferentes regímenes de dosificación en función de la forma farmacéutica utilizada (3). Por tanto, en el caso de pacientes que requieran en un momento concreto usar el fármaco en forma líquida, por haberse demostrado que la fórmula sólida no puede administrarse por sonda, se tendrá que comprobar también su equivalencia, considerando fundamentalmente, los términos farmacocinéticos de Cmax y AUC. Esto es muy característico de los fármacos antirretrovirales. Por ejemplo la biodisponibilidad para la emtricitabina en cápsulas de 200 mg, dosis diaria habitual, es del 93% frente al 75% para la solución oral (9).

Las interacciones que pueden dar lugar con mayor

frecuencia a manifestaciones clínicas importantes son aquellas en las que se afectan medicamentos con un margen terapéutico estrecho, como los anticoagulantes orales, hipoglucemiantes orales, depresores del Sistema Nervioso Central (SNC), glucósidos cardiotónicos, antiarrítmicos, antihipertensivos, antiepilépticos y antineoplásicos. Por ello, es necesario conocer el riesgo de interacciones que podrían presentarse con los fármacos considerados de alto riesgo. En un estudio español del año 2017, donde se aborda el tema de los medicamentos de alto riesgo, podemos encontrar recomendaciones útiles en la práctica clínica diaria, para la administración por sonda de estos fármacos (10).

c) Características del soporte nutricional. Es importante conocer el tipo de sonda (diámetro, material, localización, etc.). Un diámetro de sonda pequeño (5-12 French) favorece la probabilidad de obstrucción ante la administración de medicamentos y/o productos de nutrición enteral viscosa, densa o concentrada. La administración de medicamentos o nutriciones enterales viscosas a través de sondas más grandes (≥14 French) tienen un riesgo mucho menor de obstrucción. De hecho, se ha comprobado que en el 15% de los pacientes en los que se produce una obstrucción en el tubo de alimentación son por lo general porque son de pequeño calibre, con una mayor tendencia a la obstrucción en relación al aumento de medicamentos utilizados. También es importante el material de fabricación de la misma, ya que puede producir interacciones con algunos medicamentos. Así, se ha descrito interacción con la fenitoína o suspensiones de carbamazepina con el policloruro de vinilo (PVC) de las sondas (11). En el caso de la carbamazepina, se ha observado que el lavado de la sonda antes de la administración disminuye su adherencia al material de la sonda. También es necesario tener en cuenta la localización distal de la sonda. Aunque la localización gástrica es más fisiológica que la duodenal o yeyunal ya que permite utilizar la mayoría de las funciones gastrointestinales, puede cambiar el pH y la osmolaridad del medio gastrointestinal, condicionado el tipo de fórmula y el modo de administración de la misma.

Respecto a las características de la formulación, se ha informado que las nutriciones con productos con concentración reducida de proteínas reducen el efecto del sistema enzimático que es responsable del metabolismo de los fármacos. Por el contrario, las nutriciones con productos ricos en proteínas y bajo en hidratos de carbono, inducen el sistema enzimático, aumentando el aclaramiento de determinados fármacos, como en el caso de la teofilina. El aumento del aclaramiento conduce a una reducción en la eficacia del fármaco. Además, los productos enterales que contienen proteína y fibra no hidrolizada generalmente son incompatibles con los medicamentos, por lo que cuando se utilizan este tipo de productos, la NE debe suspenderse antes y después de la administración del medicamento.

Respecto a la técnica de administración de la NE, esta puede hacerse en forma de infusión continua, en bolo o en infusión intermitente. La infusión continua proporciona a los pacientes alimentación durante más de 24 horas y se suele reservar con mayor frecuencia para pacientes más delicados. Este régimen está asociado con un mayor riesgo de interacciones fármaco - nutriente y también puede aumentar el pH intragástrico que conduce a un sobrecrecimiento bacteriano. La alimentación por bolo describe la administración de 200 a 400 mL de alimento durante 15 a 60 minutos periódicamente durante todo el día, lo que permite que los medicamentos puedan administrarse libremente en momentos diferentes a la nutrición. Esto puede producir en mayor proporción distensión abdominal y diarrea. Por último, las infusiones intermitentes proporcionan nutrientes durante un tiempo más prolongado que la administración en bolo, utilizando una infusión para bombear, minimizando así los síntomas adversos y permitiendo descansos para los pacientes a diferencia de la alimentación continua (3).

4.3.2. Mecanismos de interacción medicamentos-nutrición enteral

A continuación se detallan los diferentes tipos de interacciones fármaco–NE.

1. Interacción físico-química.
2. Interacción farmacéutica.
3. Interacción fisiológica.
4. Interacción farmacológica.
5. Interacción farmacocinética.
6. Interacción farmacodinámica.

1. Interacción físico-química. Se produce cuando la combinación del medicamento con el preparado nutricional conduce a una alteración de las características físico-químicas (cambios en la viscosidad o formación de precipitados) del preparado o de la forma farmacéutica. El resultado puede ser la oclusión de la sonda, alteraciones en la biodisponibilidad del fármaco y/o nutrientes, o bien inactivación de los mismos. La incompatibilidad físico-química puede producirse por diferentes mecanismos:

a) Fenómenos de adsorción del fármaco a algún componente del preparado nutricional (frecuentemente fibra) o a la sonda de alimentación. Para aumentar la efectividad del medicamento y evitar que quede retenido parte del mismo en la sonda se recomienda lavar la sonda después de la administración del fármaco.

b) Formación de complejos insolubles entre el fármaco y minerales presentes en el preparado de nutrición enteral. Los cationes divalentes o trivalentes (calcio, hierro, aluminio, etc.) que están presentes en las dietas o que son aportados como suplementos de forma exógena también disminuyen la absorción de determinados fármacos, mediante la formación de complejos insolubles, como es en el caso de la tetraciclinas o de las fluorquinolonas (8). Se ha descrito una reducción del 44% en la biodisponibilidad cuando se administra el ciprofloxacino concomitantemente con la nutrición enteral, favoreciendo el fracaso de la terapia antimicrobiana o la sobreinfección con bacterias resistentes (18) (11). En el estudio de

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

Williams y cols (12) la administración de eltrombopag junto con un desayuno rico en calcio disminuye el AUC y la Cmax en un 59% y un 65%, respectivamente, motivo por el que esta medicación debe tomarse o 4 horas antes o 4 horas después de cualquier producto lácteo, antiácidos o suplementos minerales.

c) Alteraciones en el pH por la administración de soluciones de fármacos con valores de pH extremos (inferiores a 4 o superiores a 10) junto con la NE. Como consecuencia, puede incrementarse la viscosidad del preparado o formarse un precipitado, con riesgo de oclusión de la sonda.

2. Interacción farmacéutica. Se produce cuando la manipulación de la forma farmacéutica para su administración a través de la sonda tiene como consecuencia una modificación de la eficacia y/o de la tolerancia del fármaco. Este tipo de incompatibilidad es especialmente relevante en el caso de formas farmacéuticas especiales tales como formas de liberación sostenida, cubiertas entéricas, etc.

3. Interacción fisiológica. En este tipo de interacción, y como consecuencia de un efecto no farmacológico del principio activo o alguno de sus componentes, se produce un descenso en la tolerancia al soporte nutricional. Se trata, en general, de alteraciones gastrointestinales como diarrea o distensión abdominal. Este tipo de interacción con frecuencia no se diagnostica, de modo que se atribuyen los síntomas a intolerancia a la nutrición enteral y conduce frecuentemente a la suspensión del soporte nutricional (13).

Las causas más frecuentes son:

Osmolalidad elevada: La osmolalidad es una de las características físicas que más determinan la tolerancia del individuo a una disolución. Valores de osmolalidad próximos al de las secreciones intestinales (100-400 mOsm) son mejor tolerados. No obstante, hay formas farmacéuticas que presentan valores de osmolalidad muy superiores (hasta 6000 mOsm), que cuando se administran sin diluir pueden provocar intolerancia, especialmente si se realiza a gran velocidad o si la sonda se localiza en duodeno o yeyuno. En general, si la sonda se localiza en el estómago, las soluciones de elevada osmolalidad se toleran mejor, ya que se diluyen en el estómago antes de pasar al duodeno. No se recomienda administrar soluciones con osmolalidades elevadas en el duodeno o yeyuno, ya que se produce una secreción importante de agua en el tracto gastrointestinal que puede originar distensión, náuseas, espasmos, diarrea o desequilibrios electrolíticos. Aunque hay discrepancia en la literatura en torno al límite máximo de osmolalidad para administración gástrica y duodenal, algunos autores recomiendan que la osmolalidad deseada para la administración gástrica debe ser <700 mOsm, y en el caso de administración yeyunal no debe superar los 300 mOsm. Cuando estamos ante formas farmacéuticas con mayor osmolalidad, podemos reducir la misma, hasta niveles aceptables diluyendo con agua, para ello habrá que seguir la siguiente fórmula (13):

$$\frac{mOsm\ droga}{mOsm\ deseada} \times volumen\ de\ la\ dosis = volumen\ final\ diluido$$

Cuando no se disponga de información acerca de la osmolalidad, se recomienda la dilución con al menos 15-30 mL de agua siempre que el estado de hidratación del paciente lo permita (8).

Contenido en sorbitol. Esta sustancia se utiliza como excipiente habitual en formulaciones líquidas, ya que actúa como saborizante y estabilizante. Sin embargo, cantidades elevadas del mismo (>10g/día) pueden provocar aerofagia y distensión abdominal, e incluso si la cantidad es superior a 20g/día, espasmos abdominales y diarrea (8). En este escenario, los farmacéuticos pueden tener un papel clave en la evaluación de la carga osmótica y en la evaluación del contenido en sorbitol.

4. Interacción farmacológica. Aparece una interacción de este tipo cuando, como consecuencia de un efecto farmacológico del medicamento, se produce alguna alteración a nivel gastrointestinal (pH, motilidad o secreciones gastrointestinales) que puede alterar la tolerancia o absorción de la nutrición enteral.

Se encuentran entre ellos:

a) Fármacos que retrasan el vaciado gástrico o disminuyen la motilidad gastrointestinal: Anticolinérgicos, como los antihistamínicos, antidepresivos tricíclicos, fenotiacinas y antiparkinsonianos. Opiáceos, antiácidos (que contengan aluminio).

b) Fármacos procinéticos: Antagonistas dopaminérgicos: Metoclopramida, Domperidona

c) Fármacos que originan cambios en la flora intestinal

d) Otros fármacos, causantes de náuseas, vómitos o diarrea: Levodopa, opiáceos, citostáticos.

5. Interacción farmacocinética. Se produce cuando se alteran las propiedades farmacocinéticas (absorción, distribución, metabolismo o excreción). La más frecuentemente descrita en la administración de NE es la alteración del proceso de absorción, destacando las interacciones que pueden producirse con NE con alto contenido en fibra, que podría retener en la matriz fibrosa algunos principios activos impidiendo su absorción. Una incompatibilidad de este tipo que ha sido ampliamente descrita es la interacción que se produce entre la fenitoína y la NE, por la que disminuye significativamente la biodisponibilidad de la fenitoína. La disminución de la absorción de fenitoína que se produce cuando el fármaco se administra por sonda va a dificultar que se alcancen niveles terapéuticos y por lo tanto podría aumentar el riesgo de convulsiones (8). En este sentido, cabe también mencionar la interacción entre los preparados de nutrición enteral y los anticoagulantes orales antagonistas de la vitamina K, como la warfarina y el acenocumarol. Distintas NEs pueden reducir la absorción de estos anticoagulantes a través de un mecanismo de unión a proteínas, y por tanto, complicando significativamente la terapia. Por lo general, estos fármacos presentan una elevada unión a proteínas plasmáticas, por lo que no parece extraño que puedan unirse en gran proporción a las

proteínas de la NE. De hecho se ha demostrado en varios estudios las alteraciones en el International normalized ratio (INR) o Relación Normalizada Internacional cuando se administran conjuntamente. Por ello se recomienda suspender la NE una hora antes y reiniciarla una hora después de administrar el medicamento. No obstante, es conveniente no realizar grandes variaciones en el aporte de la nutrición y la monitorización y vigilancia estrecha del efecto terapéutico del fármaco (8,14,15).

Estas interacciones farmacocinéticas pueden variar en función del estado de gravedad del paciente. En pacientes críticamente enfermos o postoperatorios que requieren la aplicación de sonda nasogástrica, la biodisponibilidad de los fármacos administrados a través del tubo de alimentación puede disminuir debido a la ralentización del vaciamiento gástrico. Así, se ha demostrado en estos pacientes, que la biodisponibilidad del paracetamol y el atenolol disminuye significativamente cuando se administra a través del tubo de alimentación.

6. Interacción farmacodinámica. Tiene lugar cuando se producen alteraciones en la acción farmacológica del medicamento o bien en las propiedades nutritivas del preparado sin una modificación en la farmacocinética del primero o en la biodisponibilidad del segundo. En este tipo de interacciones influyen principalmente dos mecanismos: el antagonismo farmacológico o la alteración de sistemas de transporte celular. Uno de los ejemplos de este tipo de esta interacción es el antagonismo que el contenido en vitamina K de la NE puede originar sobre la acción terapéutica de los anticoagulantes orales. Por lo tanto, el empleo de NE y antagonistas de la vitamina K de forma conjunta nunca estaría recomendado, ya que, tal y como hemos comentado, existe tanto una reducción de la absorción por la unión a las proteínas de la nutrición, como un efecto antagónico con el contenido en vitamina K que contienen las NE (3, 16).

Referente a la alteración de los sistemas de transporte celular, cabe mencionar la interacción levodopa/carbidopa con las proteínas de la NE. Se han descrito ya varios casos en la literatura de pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos que han desarrollado síndrome neuroléptico maligno a consecuencia la administración conjunta de este fármaco con la nutrición. El mecanismo de esta interacción, parece estar relacionado con el transporte saturable del intestino, que permite la absorción de la levodopa, de tal manera que, la presencia de proteína en la dieta, disminuiría la absorción de este fármaco. El riesgo de interacción aumenta en pacientes con infusión continua de NE. De hecho, cuando en estos pacientes se cambia la infusión continua por la administración en bolos, evitando la administración conjunta, remite la fiebre y la rigidez del paciente (17).

4.3.3. Opciones para evitar administrar medicamentos por sonda enteral o enterostomía

Para pacientes que no pueden tomar medicamentos por vía oral es fundamental valorar la necesidad de la terapia farmacológica, así como buscar rutas alternativas de administración de medicamentos, antes de aportarlos a través de un tubo de alimentación enteral. En pacientes críticamente enfermos, en tratamiento domiciliario con terapia de reemplazo hormonal o agentes hipolipemiantes, se puede valorar suspender temporalmente hasta que el paciente pueda reanudar la ruta oral, ya que estos medicamentos pueden ser interrumpidos durante un periodo concreto de tiempo sin ocasionar un daño notable al paciente. Sin embargo, para aquellos medicamentos que son considerados necesarios, hay que tratar de buscar una ruta alternativa de administración como la vía transdérmica, sublingual o bucal, rutas rectales o inyectables. Desafortunadamente, no todos los medicamentos están disponibles a través de estas formas farmacéuticas ni tampoco están exentos de complicaciones. Otra opción sería tratar de intercambiar un fármaco concreto por otro similar que permita el cambio de ruta de administración. Sin embargo, en estos casos, puede ser modificar la dosis para obtener efectos equivalentes (8).

4.3.4. Recomendaciones generales para la administración de medicamentos por sonda enteral o enterostomía y nivel de evidencia

Parte de la información descrita en esta sección está recogida por Ekincioğlu y Demirkan (5). De ella destacamos que si el fármaco es necesario, y no existe otra ruta de administración alternativa, entonces los medicamentos se pueden administrar por el tubo de alimentación de la NE (87) , siguiendo las siguientes recomendaciones:

a) No añadir medicación directamente a una fórmula de alimentación enteral. (Nivel de evidencia B)

b) Evitar la mezcla de medicamentos para la administración a través de un tubo de alimentación enteral dados los riesgos de incompatibilidades físicas y químicas, la obstrucción del tubo, y una alteración de las respuestas de drogas terapéuticas. (Nivel de evidencia B)

c) Administrar cada fármaco por separado.

d) Las formas de dosificación líquidas deben utilizarse siempre que estén disponible y si es apropiado para su uso por esta vía. Sólo las formas de dosificación sólidas de liberación convencional pueden administrarse por la sonda, siempre que se compruebe previamente tal posibilidad. Para ello triturar el comprimido hasta convertirlo en un polvo fino, a continuación, se mezcla con agua estéril. Las cápsulas de gelatina dura se pueden administrar después de abrirlas y mezclar su contenido con agua estéril. (Nivel de evidencia B)

e) Si se comprueba previamente que no es correcto administrar por la sonda, detener la alimentación y enjuagar el tubo con al menos 15 mL de agua. Diluir el medicamento sólido o líquido adecuado y administrar usando una jeringa oral limpia (≥30 mL de tamaño). Enjuagar el tubo de nuevo con al menos 15 mL de agua teniendo en cuenta el estado del volumen de líquido del paciente. Repetir el proceso para el siguiente medicamento. Finalmente, lavar el tubo de nuevo con al

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

menos 15 mL de agua. La cantidad de dilución o de lavado debe ser reducida para las dosis o el estado de restricción de líquidos pediátricos. (Nivel de evidencia A). Se debe evitar la solución salina como agente de enjuague, ya que existe un riesgo potencial de cristalización dentro del tubo, con la consiguiente oclusión del mismo.

f) Reiniciar la alimentación de una manera oportuna para evitar comprometer el estado nutricional. Mantener parada la alimentación durante más de 30 minutos sólo cuando la separación esté indicada para evitar la alteración de la biodisponibilidad del fármaco. (Nivel de evidencia A)

g) Utilizar jeringas orales marcadas con "para un solo uso" para medir y administrar medicamentos a través de un tubo de alimentación enteral. (Nivel de evidencia B)

h) En caso de duda consultar siempre con un farmacéutico.

4.4. Interacción de fármacos y nutrición parenteral

La NP es una forma de administrar, en forma de infusión intravenosa, los nutrientes necesarios para el mantenimiento de la vida, cuando el sistema gastrointestinal es ineficiente, no funcional o inaccesible. Considerando que el perfil de un paciente que se alimenta por vía parenteral, no está exclusivamente sometido a esa intervención médica, sino que solamente constituye una parte de toda la enfermedad subyacente del paciente, que implica también el uso de más farmacoterapia, es común que puedan existir interacciones severas no solamente entre los medicamentos sino también, entre estos y los ingredientes de la NP (18).

4.4.1. Mecanismos de interacción

Un suministro simultáneo de medicamentos y NP puede causar no solo interacciones en la fase farmacéutica, sino también de tipo farmacocinéticas y farmacodinámicas, dando como resultado un cambio en el grado de unión del fármaco a la proteína, una modificación de la actividad del citocromo P450, o una alteración en el volumen de distribución de drogas a través de un flujo modificado del fluido extracelular. Tales incompatibilidades son difíciles de predecir si no han sido investigadas adecuadamente.

1. Interacción físico-química. En pacientes sometidos a NP, el problema farmacológico más frecuentemente encontrado es la compatibilidad de los medicamentos a administrar conjuntamente con la nutrición. La incompatibilidad es la formación de un precipitado o una reacción ácido-base debido a cambios en las propiedades físicas o químicas que resultan de la administración simultánea de diferentes medicamentos parenterales. Dado que las mezclas de NP incluyen numerosos macro y micronutrientes, es frecuente que estos elementos nutricionales interaccionen química y/o físicamente con las moléculas del fármaco, agravándose tal hecho en pacientes con dificultades de acceso venoso. Esto puede ocasionar repercusiones clínicas negativas para el paciente, tanto por la pérdida de eficacia del fármaco como por la formación de precipitados que, de alcanzar el torrente sanguíneo, puedan originar una situación que comprometa la seguridad del paciente. Estas incompatibilidades pueden darse en las siguientes situaciones (5):

1.a. Adición de fármacos a la Nutrición Parenteral. Agregar medicamentos a la bolsa de nutrición, en ocasiones es una práctica frecuente entre el personal sanitario, debido a sus diversas ventajas, incluida la falta de fluidos adicionales en pacientes con restricción de líquidos, menor requerimiento de accesos venosos y menores tiempos de administración. Sin embargo, los riesgos de estabilidad y problemas de incompatibilidad son muy elevados debido a la presencia de varios nutrientes en las mezclas de la NP (emulsión lipídica, aminoácidos, glucosa, oligoelementos, vitaminas, electrolitos), por lo tanto, la adición de medicamentos en soluciones de nutrición no está recomendada. Un ejemplo típico de interacción entre fármacos y NP, es la administración conjunta de ceftriaxona con mezclas de nutrición que contengan calcio. La ceftriaxona es un medicamento que tiene una alta tendencia a unirse el calcio. Se han informado de reacciones fatales debido a la formación de precipitados de ceftriaxona-calcio en población pediátrica, cuando se administran conjuntamente. Esta situación se observa incluso cuando el medicamento y la mezcla nutritiva se infunden a través de lúmenes separados. Como resultado de estos estudios, el uso concomitante de ceftriaxona con una mezcla intravenosa que contenga calcio en lactantes de menos de 28 días se considera una contraindicación absoluta. En todos los demás grupos de edad, su administración a través del mismo catéter, incluso desde diferentes lúmenes, o la administración posterior sin lavado del catéter no se recomienda (5).

Cuando no hay alternativa, y se requiere añadir un fármaco, deben considerarse siempre las siguientes cuestiones (19):

La estabilidad de ese fármaco en infusión durante 24 horas.

La estabilidad y compatibilidad del fármaco con la nutrición.

Las propiedades farmacocinéticas del fármaco en infusión continua.

La estabilidad del fármaco a la velocidad de infusión de la nutrición.

Para ello el farmacéutico tendrá un papel clave en la resolución de estas cuestiones. Sin embargo, si no existe evidencia en la literatura, nunca deberá adicionarse ningún fármaco a la mezcla de nutrición. Basándonos en la información disponible, algunos de los medicamentos se pueden incorporar a estas formulaciones. Como es el caso de los antagonistas H2. Una infusión continua de antagonistas de H2 en pacientes en unidad de cuidados intensivos ha demostrado ser más eficaz en el ajuste del pH gástrico, por lo que la adición de estos fármacos en las mezclas de NP ha ganado amplia aceptación en la práctica clínica. En general, si se añaden a estas mezclas fármacos antagonistas H2, la solución de nutrición no debe exceder

más de 24 horas de almacenamiento en nevera antes de su administración. Lo mismo sucedería con la administración en Y de fármacos con la NP. Por ello según Ekincioğlu y Demirkan (5) resulta imprescindible una búsqueda bibliográfica que avale la posibilidad de administrar los fármacos por esta vía que garantice la estabilidad y compatibilidad con la nutrición (ver tabla 2).

1.b. Formulación de la Nutrición Parenteral. Las mezclas de NP pueden ser de dos tipos: "Todo en uno" o "Dos en uno". Las formulaciones "Todo en uno", también conocidas como NP total (NPT), contienen los tres macronutrientes: Aminoácidos, glucosa y lípidos; mientras que las formulaciones "Dos en uno" no contienen lípidos. Las incompatibilidades en estos últimos, dan como resultado la formación de precipitados grumosos o amarillos, lo que causa opacidad o decoloración. Por otro lado, las incompatibilidades en las mezclas "todo en uno" son causadas fundamentalmente por el daño estructural de la emulsión y la formación de grasa libre. En este último caso el precipitado producido es invisible debido al efecto enmascarante de los lípidos.

Según el proceso de fabricación, un mismo medicamento puede diferenciarse de otro con el mismo principio activo, ante cualquier diferencia en el proceso de formulación. Esto puede traer consigo diferencias en el pH u otras propiedades, y pueden asociarse con un impacto significativo en la estabilidad y compatibilidad. También, en función del tipo de fabricante, existen múltiples tipos de mezclas de NPs con diferente contenido en macro y micronutrientes. Por ello la compatibilidad de medicamentos con mezclas de nutrición nunca puede ser totalmente garantizada y, en ocasiones, la consulta o revisión de la literatura relacionada puede inducir a error en la práctica real (5).

En un estudio realizado por Trissel y cols. (5) se inspeccionó visualmente la incompatibilidad en nueve mezclas diferentes de nutrición parenteral "Todo en uno" con 106 fármacos de uso común y se descubrió que 23 de ellos eran incompatibles. Considerando la diferencia en el contenido de las mezclas de NP, tres de las nueve mezclas se usaron para administración periférica, tres para administración central y las otras tres restantes se prepararon para su utilización en trasplante de médula ósea. Entre los fármacos incluidos, se observó precipitación en seis de ellos (aciclovir, anfotericina B, dopamina, fluorouracilo, ganciclovir, ciclosporina) y se observó disolución y adiposidad en la emulsión en 17 (doxorrubicina, doxiciclina, droperidol, fenobarbital, haloperidol, heparina, hidromorfona, levorfanol, lorazepam, midazolam, minociclina, sulfato de morfina, nalbufina, ondansetrón, pentobarbital, fosfato de potasio, fosfato de sodio).

La Tabla 2 presenta la compatibilidad de algunos fármacos administrados en Y con diferentes formulaciones de NP. Aunque gentamicina se expresa como compatible en esta tabla con formulaciones "Dos en uno", algunos estudios indican que es incompatible debido a posibles diferencias en el contenido de la mezcla.

Tabla 2. Compatibilidad de fármacos administrados en Y con la nutrición parenteral.

FÁRMACO	NP "Dos en uno"	NP "Todo en uno"
Aciclovir 7 mg/mL D5W	-	-
Amikacina 5 mg/mL D5W	+	+
Amfotericina B 0.6 mg/mL D5W	-	-
Ampicilina 20 mg/mL 0,9% NaCl	+	+
Dopamina 3200 μg/mL D5W	+	-
Dobutamina 4 mg/mL D5W	+	+
Famotidina 2 mg/mL D5W	+	+
Fentanilo 2,5μg/mL D5W	+	+
Fentanilo 50 μg/mL (no diluido)	+	+
Ganciclovir 20 mg/mL D5W	-	-
Gentamicina 5 mg/mL D5W	+	+
Haloperidol 0,2 mg/mL D5W	+	-
Heparina 100 units/mL (no-diluida)	+	-
Insulina 1 U/mL D5W	+	+
Midazolam 2 mg/mL D5W	-	-
Morfina 1 mg/mL D5W	+	+
Morfina 15 mg/mL (no diluida)	None	-
Ofloxacino 4 mg/mL D5W	+	+
Ondansetron 1 mg/mL D5W	+	-
Fosfato potásico 3 mmol/mL (no diluido)	-	-
Ranitidina 2 mg/mL D5W	+	+
Cefazolina 20 mg/mL D5W	-	+
Ceftazidima 40 mg/mL D5W	+	+
Ciprofloxacino 1 mg/mL D5W	-	+

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

Ciclosporina 5 mg/mL D5W	-	-
Bicarbonato sódico 1 mEq/mL (no diluido)	-	+
Tacrolimus 1 mg/mL D5W	+	+
Ticarcillina/clavulanatoa 30/0,1 mg/mL D5W	+	+
Tobramicina 5 mg/mL D5W	+	+
Trimetoprim/Sulfametoxazol 0,8/4 mg/mL D5W	+	+
Vancomicina 10 mg/mL D5W	+	+

+: Compatible; -: Incompatible. Adaptado de Ekincioğlu y cols (5).

1.c. Efecto de los lípidos en la emulsión. Las emulsiones de lípidos disponibles en el mercado generalmente se obtienen de aceites vegetales que son fuente natural de vitamina K. La soja, las semillas de uva y los aceites de oliva son alimentos que contienen vitamina K. La cantidad en las emulsiones de lípidos de esta vitamina varía según los tipos de aceite. El nivel más alto de vitamina K (150-300 µg/100 g) se encuentra en el aceite de soja, con un nivel más bajo (6-12 µg/100 g) en aceite de azafrán. Al administrar una nutrición parenteral, un paciente recibe indirectamente vitamina K multivitamínica mediada por lípidos dentro de la mezcla. Por lo tanto, un paciente en tratamiento con anticoagulantes orales antagonistas de la vitamina K como la warfarina o el acenocumarol, que requiera NP, necesitará una dosis más alta de estos anticoagulantes para lograr el objetivo terapéutico de INR (5).

También es interesante saber que, la formulación de propofol utilizada para la sedación contiene un 10% de emulsión de lípidos, que proporcionan a los pacientes 1.1 kcal/mL de infusión. Cuando el propofol se administra a pacientes que reciben soporte mediante NP, se debe considerar su contribución a la ingesta diaria de energía, tratando de evitar la administración de kcal adicionales. Además, estos pacientes deberán ser estrechamente monitorizados, ya que tendrán más riesgo de sufrir alteraciones en los niveles de triglicéridos en sangre. Se ha propuesto que la cantidad de lípidos en la mezcla de NP, se reduzca en función de la cantidad de propofol administrada (5).

1.d. Efecto del material de la bolsa. Para las mezclas de nutrición que contienen lípidos, se requieren bolsas de etilvinilacetato (EVA) o materiales no plásticos tales como poliolefinas El uso de bolsas plásticas como el cloruro de polivinilo (PVC) puede producir la interacción de los lípidos de la NP con este material. Así, la eficacia de los fármacos lipofílicos (diazepam, nitroglicerina, dihidropiridinas, etc.) se reduce notablemente debido a una adsorción sustancial del fármaco en la bolsa. Los medicamentos proteicos (albúmina, insulina, etc.) también pueden adsorberse en la superficie de la bolsa. Por tanto es importante no agregar dichos medicamentos en bolsas de NP a fin de evitar pérdidas terapéuticas (5).

2. Interacciones farmacocinéticas y farmacodinámicas. Las IMN en el ámbito de la NP se circunscriben solo a los procesos de distribución, metabolismo y excreción de los medicamentos, ya que lógicamente, la fase de absorción al no existir en la NP no participa de estas interacciones. Estos tipos de interacciones, sólo tendrán consecuencias clínicas importantes cuando, como consecuencia de las mismas, se modifiquen de forma significativa, los parámetros cinéticos del fármaco; es decir, aclaramiento y/o volumen de distribución. Estas modificaciones, a su vez, provocarán cambios en la concentración plasmática, que pueden generar respuestas farmacológicas no deseadas.

2.a. Efecto de los nutrientes en la distribución de fármacos. Los nutrientes pueden influir en el proceso de distribución de los fármacos, si bien los datos existentes sobre este efecto y sus mecanismos son limitados. Algunos estudios han demostrado que una ingesta diaria elevada de proteínas reduce de forma significativa la respuesta clínica a L-dopa. El mecanismo propuesto para explicar este hecho ha sido la competencia, entre los aminoácidos neutros de cadena larga (AANL) (fenilalanina, leucina e isoleucina) procedentes de la digestión de las proteínas y la L-dopa, para utilizar los transportadores de la barrera hematoencefálica. En este sentido se acepta que cuando la nutrición parenteral total aporta más de 0,8 mg/kg/día de proteínas, puede verse afectada la respuesta farmacodinámica a L-dopa sin modificar sus concentraciones plasmáticas.

Por otra parte, se ha sugerido que la competencia entre L-dopa y AANL, por los transportadores de la membrana hematoencefálica, puede ser el mecanismo responsable de los fenómenos de "on-off " frecuentemente observados en pacientes con enfermedad de Parkinson y en tratamiento con L-dopa. Así, a los pacientes con fluctuaciones de la respuesta farmacológica, y sin mejoría tras la individualización posológica, se les puede recomendar una disminución del aporte proteico para aumentar los efectos de la L-dopa. Sin embargo, hay que tener precaución en pacientes con riesgo de desnutrición, ya que una reducción de los aportes proteicos no parece ser la solución más correcta.

También podemos encontrar en la literatura numerosas referencias en relación al efecto de los nutrientes sobre la unión de los fármacos a las proteínas plasmáticas. Tras el aporte de emulsiones de lípidos en NPT, se produce un incremento significativo de las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos libres. Cuando la relación ácidos grasos libres/albumina es superior al valor de 2 (valores poblacionales entre 0,4 y 2), se produce un desplazamiento de las uniones a proteínas plasmáticas de muchos fármacos. Aunque en principio las consecuencias clínicas de esta interacción son inciertas, se ha evidenciado que las emulsiones de lípidos utilizadas en NP provocan

cambios en el grado de unión de los fármacos a las proteínas plasmáticas en aquellos que presentan elevada unión como clofibrato, ácido valproico, ácido salicílico y fenitoína (20)

Además, uno de los principales parámetros en la farmacocinética de los fármacos es su volumen de distribución en los tejidos y fluidos corporales. Los fluidos de NP son mezclas hiperosmolares; por lo tanto pueden aumentar el volumen total y el volumen de líquido extracelular. Por tanto ante esta situación, los fármacos que se distribuyen especialmente en los fluidos extracelulares (aminoglicósidos, los antibióticos beta-lactámicos, etc.) pueden aumentar su volumen de distribución, originando un descenso de sus concentraciones séricas.

2.b. Efecto de los nutrientes en la metabolización de fármacos. Los principales factores derivados de la NP que pueden afectar a la transformación metabólica de los medicamentos son la alteración del flujo sanguíneo hepático, la modificación de la capacidad metabólica intrínseca por inducción o inhibición y la alteración del grado de unión de fármaco a las proteínas plasmáticas, por lo que los fármacos que se van a ver más afectados por nutrientes serán sobre todo aquellos de alto aclaramiento hepático y aquellos con elevada unión a las proteínas plasmáticas. Las nutriciones con alto aporte de proteínas se han asociado a un aumento en el metabolismo oxidativo, mientras que un alto aporte de hidratos de carbono lo disminuye. Además, es sabido, que a medio-largo plazo la NPT ocasiona cambios anatómicos y funcionales, especialmente sobre el hígado, tanto en animales como en el hombre, lo que se pone fácilmente de manifiesto por ciertos signos como elevaciones en las aminotransferasas séricas, bilirrubina y sales biliares, así como por diversos síntomas clínicos como hepatitis colestásica y fibrosis portal. Obviamente, estas alteraciones en la función hepática pueden producir cambios en su capacidad de eliminar diversos fármacos que sufren metabolismo hepático.

2.c. Efecto de los nutrientes en la excreción de fármacos. Un aspecto ampliamente debatido, en el campo de las interacciones fármaco nutriente, es la influencia del aporte de aminoácidos, o el aporte proteico, sobre la función renal. Se ha documentado que las proteínas de la dieta y el aporte de aminoácidos de forma parenteral incrementan el flujo plasmático renal (FPR) y la velocidad de filtración glomerular (VFG). El glucagón, liberado por el páncreas tras la administración de aminoácidos por vía parenteral, ha sido propuesto por diversos autores como el posible responsable de estos cambios ya que incrementa el flujo renal y la VFG. Lo que parece evidente es que la liberación del glucagón tras la ingesta de proteínas y sus efectos renales indirectos se debe a la estimulación del metabolismo hepático vía citocromo P-450. Cualquiera que sea el mecanismo implicado (glucagón, insulina, hormona del crecimiento, renina, aldosterona, kininas, concentración plasmática de aminoácidos, óxido nítrico, etc.) parece claro que la ingesta o la administración de aminoácidos y proteínas puede tener graves repercusiones en la función renal. En cualquier caso, la existencia de este mecanismo y su potencial implicación demanda una mayor investigación clínica.

4.4.2. Recomendaciones generales para una administración segura de fármacos en pacientes que reciben nutrición parenteral

Para el aporte seguro de fármacos durante la NP devben seguirse las siguientes recomendaciones:

a) La información disponible sobre la compatibilidad debe ser evaluada de acuerdo a la concentración del fármaco utilizado y el contenido de las formulaciones nutricionales (“dos en uno” o “todo en uno”).

b) La información adquirida debe basarse en fuentes fiables o recomendaciones del fabricante.

c) En ausencia de datos de compatibilidad o en caso de duda, los medicamentos y la NP deben ser administrados a través de catéteres separados. Si esto no es posible, y no hay información disponible sobre su empleo a través del mismo catéter pero en diferente luz (administración en Y), se deberá interrumpir la NP y aportar el fármaco lavando la vía antes y después de su aporte.

d) Es recomendable utilizar catéteres de múltiples luces en pacientes que reciben NP.

e) Debe considerarse que fármacos con el mismo agente activo, pero de diferentes casas comerciales pueden tener propiedades diferentes, influyendo sobre la compatibilidad/estabilidad.

f) La seguridad en la adición del fármaco en la bolsa de la NP o seguridad en la infusión concomitante mediante la administración en Y, debe ser evaluada y aprobada por el farmacéutico.

Puede por tanto concluirse que el papel del farmacéutico es fundamental para garantizar la seguridad terapéutica de la NP en todos sus aspectos, incluyendo la preparación de la mezcla, la elección de la vía de administración apropiada y forma de administración de la farmacoterapia en curso, la aplicación de métodos de tratamiento alternativos, seguimiento terapéutico y efectos tóxicos, tratando de instruir al personal sanitario sobre las posibles interacciones de los fármacos con la nutrición parenteral (18, 19).

5. CONCLUSIONES

A pesar del aumento en los últimos años de la literatura sobre las interacciones entre fármacos y nutrición, el uso conjunto de soporte nutricional y la administración de medicamentos siguen siendo a día de hoy prácticas clínicas comunes, que ocasionan con relativa frecuencia problemas de incompatibilidad y estabilidad tanto para el medicamento como para el producto de NE. El riesgo potencial de interacción se ve aumentado en pacientes crónicos polimedicados. Es por ello, que antes de administrar un fármaco por la misma sonda por donde se aporta la NE, debe considerarse la posibilidad de que el tubo pueda obstruirse, que la biodisponibilidad del fármaco o del producto enteral varíe y que la función del

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

tracto gastrointestinal pueda cambiar como resultado de dicha administración. Prestar poca atención a las formas de dosificación de los fármacos durante la administración de los mismos puede causar alteración en la eficacia del fármaco y la posibilidad de no lograr un apoyo nutricional adecuado. En el caso de las mezclas de NP, estas contienen una amplia variedad de macro y micronutrientes, por lo que su estabilidad puede verse alterada cuando se administran junto con medicamentos debido a interacciones o incompatibilidades físico-químicas. Hasta el momento, existen pocos estudios sobre la incompatibilidad de las soluciones de NP con la mayoría de los medicamentos; sin embargo, a la hora de evaluar los resultados de la bibliografía disponible y extrapolarlo a la práctica real hay que tener en cuenta que, las soluciones de nutrición parenteral pueden diferir en términos de contenido y métodos de mezcla pudiendo encontrar diferencias de estabilidad. En este sentido, de forma prioritaria debe concienciarse a los profesionales de salud de los problemas potenciales de la co-adminstración de fármacos y soporte nutricional artificial para implementar una buena práctica (3). Es por ello que los farmacéuticos deben formar parte del equipo de atención médica en las unidades de apoyo nutricional, proporcionando ayuda y soporte profesional en cuestiones de estabilidad del fármaco, incompatibilidad, idoneidad de las formulaciones y formas de dosificación, ajuste de la dosis, evaluación de las interacciones y la conveniencia de la administración.

Lista de abreviaturas

FPR**,** flujo plasmático renal; IMN, interacción medicamento-nutriente; INM, interacción nutriente-medicamento; INR, international normalized ratio; NE, nutrición enteral; NP, nutrición parenteral; NPT, nutrición parenteral total; PVC, policloruro de vinilo; SNC, sistema nervioso central; VFG, velocidad de filtración glomerular; INR, Ratio internacional normalizado; EVA, etilvinilacetato.

6. REFERENCIAS

1. Ferreira Silva R, Carvalho Garbi Novaes MR. Interactions between drugs and drug-nutrient in enteral nutrition: a review based on evidences. Nutr Hosp 2014; 30(3): 514-8.
2. Romero Jiménez RM, Ortega Navarro C, Cuerda Compés C. La polifarmacia del paciente crónico complejo y la nutrición enteral. Nutr Hosp 2017; 34(1): 57-76.
3. Kurien M, Penny H, Sanders DS. Impact of direct drug delivery via gastric access devices. Expert Opin. Drug Deliv. 2014. 12 (3).
4. Montoro Ronsano B, Suñer Martin P, Salgado Remigio A. Interacciones medicamentos nutrición enteral. 1ª edición. Novartis Consumer Health S.A, Barcelona, 2003.
5. Ekincioğlu AB, Demirkan K. Clinical nutrition and drug interactions. Ulusal Cer Derg 2013; 29: 177-86.
6. Allen JM. Vasoactive substances and their effects on nutrition in the critically ill patient. ASPEN Nutr Clin Pract 2012; 27: 335-9
7. Demirkan K, Bayraktar-Ekincioglu A, Gulhan-Halil M, Abbasoglu O. Assessment of drug administration via feeding tube and the knowledge of health-care professionals in a university hospital. Eur J Clin Nutr 2017;71: 164–8.
8. Williams NT. Medication administration through enteral feeding tubes. Am J Health-Syst Pharm 2008; 65: 2347-57.
9. Fulco P. Administering antiretroviral medication through enteral tubes. Am J Health-Sys Pharm 2013; 70(12): 1016-7.
10. Romero Jiménez RM, Ortega Navarro C, Cuerda Compés C. La polifarmacia del paciente crónico complejo y la nutrición enteral. Nutr Hosp 2017; 34(1): 57-76.
11. Wohlt PD, Zheng L, Gunderson S. Recommendations for the use of medications with continuous enteral nutrition. Am J Health Syst Pharm 2009; 66: 1458-67.
12. Fort Casamartina E, Arribas Hortiguela L, Bleda Pérez C, Muñoz Sánchez C, Peiro Martínez I, Perayre Badía M, y col. Interacción entre tratamientos oncológicos y soporte nutricional. Nutr Hosp 2016; 331: 50-7.
13. Klang M, McLymont V, Ng N. Osmolality, pH, and compatibility of selected oral liquid medications with an enteral nutrition product. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2013; 37(5): 689-94.
14. Krajewski KC, Butterfoss K. Achievement of Therapeutic International Normalized Ratio Following Adjustment of Tube Feeds. J Clin Pharmacol 2011;51: 440-3.
15. Heldt T, Loss SH. Drug-nutrient interactions in the intensive care unit: literature review and current recommendations. Rev Bras Ter Intensiva. 2013; 25(2): 162-7.
16. Dickerson RN, Roads JE. Lecture 2012: Improving patient care with practice based research. ASPEN 2012; 36(5): 562-73.
17. Whitman CB, Ablordeppey E, Taylor B. Levodopa withdrawal presenting as fever in a critically ill patient receiving concomitant enteral nutrition. J Pharm Pract 2016; 29 (6): 574-8.
18. Cook AM, Peppard A, Magnuson B Nutrition considerations in traumatic brain injury. Nutrition in Clinical Practice 2008; 23 (6): 608-20.
19. Stawny M, Olijarczyk R. Pharmaceutical point of view on parenteral nutrition. The scientific World Journal .2013: 1-9.
20. Salih MRM, Bahari MB, Abd AY. Selected pharmacokinetic issuesof the use of antiepileptic drugs and parenteral nutrition in critically ill patients. Nutr J 2010; 9: 71.
21. Mitchell JF. Oral dosage forms that should not be crushed. Institute for safe medication practices. PSNet, Agency for Healthcare Research and Quality; U.S. Department of Health and Human Service. 2012.

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
ISSN (Online) 1697-4298
Books Criticism
analesranf.com

Francisco GONZÁLEZ LARA, Antonio RAMOS CARRILLO. *Sevilla y el oficio del arte del medicamento. MDXCI*. Sevilla: Real e Ilustre Colegio Oficial de Farmacéuticos de la Provincia de Sevilla, 2017. 50 p. ISBN: 978-84-697-4620-2.

Antonio González Bueno[1]

[1]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid
Corresponding author: agbueno@ucm.es
An Real Acad Farm Vol. 84, Nº 2 (2018), p. 238
Received: April 10, 2018 **Accepted:** May 23, 2018 **Language of Manuscript**: Spanish

"… que este tal tenga carta de examen de boticarios hecha por los protomédicos del rey nuestro señor (…) tenga veinticinco años cumplidos, el cual haya estado o residido en boticas de esta ciudad o de otras partes más tiempo de seis años (…) sea hábil y suficiente, fiel y legal, y de confianza y de buena vida y fama (…)sea hombre rico y que tenga caudal de más cantidad de quinientos ducados, para que pueda comprar las drogas y drabas y otras hierbas (…) haya información de cómo tiene el dicho caudal (…) sea cristiano viejo y de limpia generación…" Tales son los requisitos que el Cabildo de la ciudad de Sevilla estableció, en 1591, para los boticarios que quisieran establecerse en Hispalis; el documento, firmado por Orellana de Alarcón, Diego Ramírez de Madrid y Luis Gómez, en uno de marzo de 1591, ha visto la luz, junto a un amplio estudio introductorio, gracias al trabajo de Francisco González Lara y Antonio Ramos Carrillo y al patrocinio del Real e Ilustre Colegio Oficial de Farmacéuticos de la Provincia de Sevilla, coincidiendo con el 425 aniversario de la promulgación de estas Ordenanzas de Boticarios.

El estudio introductorio, férreamente documentado con 125 notas a pie de página, se organiza en dos grandes apartados: el primero ofrece una reflexión sobre los orígenes de la profesión farmacéutica y sus primeras regulaciones, generando así el marco teórico sobre el que se desarrolla la segunda parte, más extensa, dedicada al análisis minucioso del contenido del documento objeto de esta edición.

Las *Ordenanzas…* sevillanas de 1591 son analizadas en relación con la situación económica, social y cultural del ámbito territorial donde éstas son dictadas; los autores realizan un recorrido histórico que nos lleva a conocer la ciencia y la sociedad de la Sevilla del XVI y la terapéutica renacentista; abordan luego el ámbito y extensión de estas *Ordenanzas*…, los derechos y obligaciones en ellas establecidas y los organismos que procuraban su regulación para proceder, por último, a tratar de la distribución y el utillaje de las boticas sevillanas del XVI, de los farmacéuticos que dejaron su impronta en la ciudad durante este siglo y esbozar los inicios del propio Colegio de boticarios hispalense.

El texto se cierra con la reproducción facsimilar de las *Ordenanzas…* y su transcripción al castellano; las últimas páginas quedan dedicadas a indicar la bibliografía empleada en este estudio.

Las *Ordenanzas…* sevillanas de 1591 responden a la necesidad de regular el intrusismo profesional; pero también se ocupan del control de su actividad: "Otrosi, mandamos y ordenamos que todas y cualesquier medicinas que se hubieren de vender en las boticas de esta ciudad y su tierra sean buenas y bien hechas y sazonadas (…) y no sean dañosas a la salud, y sean vistas y examinadas por los médicos que el cabildo y regimiento de esta ciudad tienen diputados para las visitas de dichas boticas, y que no siendo tales dichas medicinas, sean quemadas públicamente para que el pueblo no reciba daño ni engaño por ellas y que el boticario que las tuviere caiga e incurra en las penas sobredichas…"

En definitiva, un magnífico ejemplo de historia local, que representa una significativa contribución para el análisis global del ejercicio profesional farmacéutico en la España del siglo XVI.

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
ISSN (Online) 1697-4298
analesranf.com

Información académica

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

Durante el segundo trimestre del año 2018, hemos realizado un total de quince sesiones científicas, de la cuales cinco fueron conferencias; otras cinco fueron Mesas Redondas; dos Sesiones Necrológicas; un curso avanzado sobre Inmunonutrición; así como una serie de actos organizados en colaboración con diversas instituciones.

El 5 de abril se impartió, en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF, la conferencia titulada "Desarrollo Sostenible, responsabilidad intergeneracional" a cargo del Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza, Académico de Número de la RANF.

Con la mirada puesta exclusivamente en los beneficios económicos a corto plazo, se siguen aplicando a los desafíos de hoy fórmulas de ayer, ya periclitadas e ineficaces, en lugar de cuidar con toda la atención que merecen las condiciones de vida de las "generaciones venideras", como con tanta clarividencia se inicia el inigualable texto de la Carta de las Naciones Unidas.

Alcemos nuestra voz en favor de la transición desde una economía de especulación, deslocalización productiva y guerra a una economía de desarrollo global sostenible y humano. La seguridad planetaria no puede asegurarse de otro modo. Hagamos posible que el consumo de carburantes sea atemperado por un gran desarrollo de las fuentes renovables de energía. Y limpiemos el mar, que ocupa el 70% de la piel de la Tierra y es su gran pulmón... y el de las generaciones venideras.

"Les despreciaba, porque pudiendo tanto se atrevieron a tan poco" manifestó Albert Camus. ¿Las generaciones que llegan a un paso de la nuestra podrán decir que esperaron en vano que las presentes generaciones cumplieran el compromiso supremo que es, en palabras del Presidente Nelson Mandela, actuar de tal modo que nuestro legado intelectual y material no signifique un retroceso? ¿Qué la habitabilidad de la Tierra no sea peor que la que nosotros hemos vivido? ¿Qué los puntos de referencia, los principios y asideros éticos no les permitan iniciar su amanecer con esperanza?

La solidaridad intergeneracional exige de modo especial abordar aquellas cuestiones potencialmente irreversibles en las que el tratamiento debe aplicarse a tiempo, antes de que sea demasiado tarde y se hayan alcanzado puntos de no retorno. Las prioridades, vale la pena reiterarlo, son: alimentación; acceso al agua; servicios de salud para todos; cuidado del medio ambiente; educación; energías renovables; paz.

Pensemos en nuestras responsabilidades intergeneracionales.

Ahora podemos. ¿Nos atreveremos?

El 12 de abril tuvo lugar la Sesión Necrológica en memoria del Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Villanueva (1928-2017). Presidente de Honor de la RANF, Académico de Número Medalla nº 24 y Catedrático de Microbiología.

La apertura del acto corrió a cuenta del Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF e intervinieron como ponentes los Excmos. Sres. Académicos de Número de la RANF, D. Rafael Sentandreu Ramón, Catedrático de la Universidad de Valencia: "Julio R. Villanueva, el investigador y académico"; D. José Miguel Ortiz Melón, Catedrático de la Universidad de Cantabria: "Julio R. Villanueva: inspirador de trayectorias científicas"; D. Federico Mayor Zaragoza, Catedrático de la Universidad Autónoma de Madrid: "Julio R. Villanueva, ciencia y conciencia"; D. César Nombela Cano, Catedrático de la Universidad Complutense de Madrid: "Julio R. Villanueva: el impacto de una escuela científica y académica"; el Profesor D. Gregorio Nicolás Rodrigo, Catedrático de la Universidad de Salamanca: "Julio R. Villanueva, maestro, rector y compañero de claustro"; y el Excmo. Sr. D. Alberto Ramos Cormenzana, Presidente de la Academia Iberoamericana de Farmacia y Catedrático de la U. de Granada: "Julio R. Villanueva en la consolidación de la Microbiología en España".

El 19 de abril la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación José Casares Gil, de amigos de la RANF, tuvieron

el honor de celebrar la II Mesa Redonda sobre el Balneario de Archena, en Murcia, en la que intervinieron como ponentes varios Doctores pertenecientes a la Comisión de Aguas Minerales y Mineromedicinales.

El Dr. Antonio López Lafuente, nos expuso las "Características generales de los suelos circundantes al Balneario". El Balneario de Archena se encuentra en el noroeste de la ciudad de Murcia, situado en el Paraje Natural de Valle de Ricote, en el margen derecho del río Segura. Presenta un paisaje hacia el oeste caracterizado por relieves de pendientes escarpadas y escasa densidad de cubierta vegetal, y hacia el este formado por las fértiles huertas regadas por las aguas del río Segura. Los suelos situados en la Sierra de Ricote tienen escasa evolución, tipo AC, desarrollados a partir de materiales sedimentarios constituidos fundamentalmente por calizas y yeso. Se caracterizan por tener pHs básicos, texturas gruesas y escasa acumulación de materia orgánica en superficie. Los suelos de la huerta situados en la terraza del Segura son suelos fértiles con alta proporción de materia orgánica a lo largo del perfil.

Los Dres. Juan Antonio López Geta y Juan José Durán Valsero, hablaron sobre el "Estudio Hidrogeológico de las aguas del Balneario". El Balneario de Archena se encuentra situado en el extremo oriental de la Cordillera Bética, en la denominada Cuenca Terciaria de Mula. Sus aguas, de una temperatura en superficie en torno a los 50ºC, están relacionadas con el drenaje de un acuífero confinado, constituido por varios centenares de cientos de rocas carbonáticas jurásicas y triásicas, cubiertas por sedimentos margosos terciarios. La fracturación en el entorno del balneario es muy importante, con la presencia de algunos accidentes tectónicos de escala regional, como la Falla Norbética, la Falla de Crevillente y otras de ámbito local, que condicionan la circulación y ascenso del agua subterránea termal. La facies hidroquímica de las aguas del balneario es clorurada sódica, condicionada por la presencia de materiales evaporíticos en profundidad.

La Dra. Esperanza Torija Isasa disertó sobre el "Estudio físico-químico de las aguas del Balneario". Las aguas del balneario de Archena fueron declaradas de utilidad pública en 1869, lo que fue confirmado según Real Decreto Ley de 25 de abril de 1928. Al realizar los análisis de las aguas de este Balneario, se observó un ligero olor a huevos podridos debido a la presencia de ácido sulfhídrico. Se obtuvo una temperatura de 49ºC. El pH es próximo a 8,0. Se caracterizan por un residuo seco, a 180ºC, superior a 3500 mg/L y la conductividad eléctrica, a 20ºC, es superior a 5000 µS/cm. Debido a esto, podemos considerar el agua de mineralización fuerte (RD 1798/2010) y por la conductividad, de mineralización excesiva según Rodier. La dureza es superior a 1000 mg de CaCO3/L; domina el calcio con un valor de 305 mg/L y el contenido de magnesio es de 67 mg/L. El contenido de sodio también es muy elevado, llegando a superar los 700 mg/L. De los aniones, destacan claramente los cloruros superando los 1600 mg/L. El contenido de sulfatos también fue importante y el de bicarbonatos bastante inferior. A la vista de los resultados obtenidos, las aguas del Balneario de Archena se pueden considerar: hipertermales, de mineralización fuerte y extremadamente duras; así como sódicas, cálcicas, magnésicas, cloruradas y sulfatadas (RD 1798/2010), y sulfuradas.

Las Dras. Mª Antonia Simón Arauzo y Beatriz Romero del Hombrebueno, expusieron su trabajo sobre "Análisis de la Radiactividad en las aguas del Balneario". En el estudio de la radiactividad en las aguas del balneario de Archena (Murcia) las muestras se han tomado en los puntos de surgencia Madrid y Monolito. Inicialmente se han determinado los índices de actividad alfa total, beta total y la concentración de 222Rn. Los resultados obtenidos fueron concordantes en los dos puntos y se detectaron 1,3 Bq/L de actividad alfa total, 2,5 Bq/L de actividad beta total y 13 Bq/L de 222Rn. Para determinar el origen de los altos niveles emisores de emisores alfa y beta, se han analizado los isótopos específicos de las series naturales del ^{238}U, ^{235}U y ^{232}Th y el ^{40}K. El ^{226}Ra y sus hijos ^{222}Rn, ^{218}Po y ^{214}Po son los contribuyentes de las emisiones alfa, mientras que el ^{40}K, el ^{214}Pb y el ^{214}Bi los serian de las emisiones beta. Los valores de ^{222}Rn son más elevados que los de alfa total y se deben al radón disuelto procedente de la exhalación de las rocas. Su valor es menor de 67,3 Bq/L por lo que no se pueden clasificar como radiactivas.

Por último, las Dras. Josefina San Martín Bacaicoa e Inés Martínez Galán, nos informaron sobre el "Estudio de la acción terapéutica de las aguas del Balneario". Expusieron las posibles acciones terapéuticos de la utilización de las aguas mineromedicinales de este balneario, derivadas de su composición y otras características. Son aguas hipertermales, de fuerte mineralización, cloruradas sódicas y sulfuradas y se administran por vía oral, inhalatoria y tópica. Las diferentes técnicas utilizadas con aguas y peloides (propios de Archena), se adaptan a la afección a tratar e individualmente a cada usuario. Se estudiaron las patologías más frecuentemente tratadas y su evolución, indicando edad, género, procedencia, etc. Se mencionaron las instalaciones y al funcionamiento del balneario bajo la dirección médica con personal paramédico cualificado y sus auxiliares.

El 3 de mayo se celebró en colaboración de la Fundación José Casares Gil, de amigos de la RANF, la conferencia titulada: "Nuevas aportaciones para la Historia social de la Farmacia" a cargo de la Excma. Sra. Dña. Rosa Basante Pol, Académica de Número de la RANF.

El 10 de mayo la Real Academia Nacional de Farmacia con el patrocinio de la Cátedra Extraordinaria UIMP-MSD de Salud, Crecimiento y Sostenibilidad, celebraron la Mesa Redonda titulada: "Medicina de precisión: una perspectiva de futuro". La presentación corrió a cargo del Excmo. Sr. D. César Nombela Cano, Académico de Número de la RANF y Catedrático de Microbiología y contó con las Intervenciones de los Doctores: D. Ramón Colomer, Hospital de la Princesa de Madrid: "Medicina de precisión en el abordaje del cáncer"; D. Fernando Carballo, Universidad de Murcia y Presidente

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

de FACME: “Genómica y Medicina de Precisión”; D. José Augusto Silva, de MSD: “Medicina de precisión y desarrollo farmacéutico”; y D. Juan Oscar Lobera, de AstraZeneca: “La Medicina de precisión y las nuevas terapias”.

La Medicina de Precisión plantea integrar los avances del conocimiento en Genómica Humana para la prevención y el tratamiento de enfermedades, basados en un enfoque más preciso que tenga en cuenta la variación individual. La aplicación de este concepto se beneficia de la disponibilidad de datos masivos (big data), de las tecnologías biómicas (genómica, proteómica, metabolómica, etc.) y de la computación en gran escala. La farmacogenómica y el desarrollo farmacéutico en general se verán claramente influenciados por estos nuevos horizontes. El Senado Español ha puesto en marcha una ponencia sobre “Medicina Genómica” para elaborar una estrategia de Medicina de Precisión.

El 16 de mayo se celebraron en nuestra Sede las “III Jornadas sobre Inmunología RANF-USPCEU”, presentadas por el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF y el Dr. José Ángel Navarro Gallo, Profesor de la USPCEU y Académico Correspondiente de la RANF. Actuaron como ponentes: el Dr. Rafael Delgado Vázquez, Hospital Universitario 12 de Octubre: “Virus Ébola: Qué es y Cómo produce enfermedad”; la Dra. Ana Isabel Negredo Antón, Centro Nacional de Microbiología (CNM) - Instituto de Salud Carlos III (ISCIII): “Alerta Sanitaria por el Virus Ébola”; el Dr. Juan García-Arriaza, Centro Nacional de Biotecnología (CNB) - Consejo Superior Investigaciones Científicas (CSIC): “Desarrollo de nuevas vacunas frena a Ébola basadas en vectores poxvirales”.

El 17 de mayo se celebró en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF, la Conferencia titulada: "Desarrollo de vacunas frente a enfermedades emergentes" a cargo del Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las vacunas constituyen el mejor procedimiento de control frente a enfermedades, salvando millones de vidas. Los programas de vacunación en nuestro país están siendo implementados frente a enfermedades para las que ya hay vacunas, a la vez que se están introduciendo nuevos programas para nuevas vacunas como la meningococo B y la del virus del papiloma humano. Sin embargo existen otras enfermedades para las que no hay vacunas eficaces, como frente al VIH/sida, hepatitis C, tuberculosis, malaria, leishmaniasis, a la vez que van apareciendo enfermedades producidas por nuevos virus como chikungunya, ébola, zika. Por ello es necesario desarrollar procedimientos de vacunación que permitan de forma eficaz controlar dichas enfermedades. El común denominador de las vacunas es el de la utilización de agentes que mediante su vehiculización y administrados de forma profiláctica o terapéutica producen respuestas inmunes, humorales y celulares, que eliminan el patógeno del organismo. Existen distintos procedimientos de desarrollo de vacunas y en esta conferencia expondremos ejemplos sobre el diseño de candidatos vacunales basados en vectores virales, desde el concepto de la vacuna, modo de acción celular, ensayos preclínicos en modelos experimentales (ratón y mono), hasta su aplicación en ensayos clínicos. Se hará énfasis en los tipos de respuestas inmunes celulares y de anticuerpos producidos por la vacunación. Como ejemplos, revisaremos los datos que hemos obtenido en vacunas frente al VIH, chikungunya, ébola, junto al estado actual de vacunación frente a estas y otras patologías.

El 24 de mayo tuvo lugar la Sesión Necrológica en memoria del Excmo. Sr. D. Manuel Ortega Mata, Académico de Número en la Medalla nº 5.

La apertura del acto corrió a cuenta del Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF e intervinieron como ponentes los Excmos. Sres. Académicos de Número, Dña. Rosa Basante Pol: “D. Manuel Ortega Mata: Una persona Singular”; D. Benito del Castillo García: “D. Manuel Ortega Mata: El sabio profesor, maestro y erudito farmacéutico”; D. Vicente Vilas Sánchez: “D. Manuel Ortega Mata: El maestro amigo”; D. Fidel Ortega Ortiz de Apodaca: “Manuel Ortega Mata: El Académico y el Científico en familia”; y la Prof. Dra. María del Carmen Martínez Para, Universidad de Alcalá de Henares: ”Manuel Ortega Mata: “Promotor y alma de la Facultad de Farmacia de Alcalá”.

El 31 de mayo la Real Academia Nacional de Farmacia en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF celebraron la conferencia titulada: “Biogeografía y bioclimatología de Cabo Verde y Marruecos" a cargo del Excmo. Sr. D. Salvador Rivas Martínez, Académico de Número de la RANF.

El 4 de junio comenzó el II curso avanzado sobre Inmunonutrición, organizado por la Real Academia Nacional de Farmacia en colaboración con la Fundación José Casares Gil de amigos de la RANF, bajo la dirección de los Académicos Dres. Ascensión Marcos Sánchez y Francisco J. Sánchez Muniz.

La Inmunonutrición es un área de conocimiento emergente y transversal que estudia la interacción entre la nutrición y la inmunidad.

Con el fin de mantener un buen estado de salud, el cuerpo humano desarrolla una serie de complejos sistemas de defensa naturales para protegerse de patógenos y factores ambientales nocivos. Situaciones de malnutrición, bien por exceso o por defecto, ocasionan alteraciones importantes del sistema inmunitario, sin olvidar el impacto que originan los determinantes del estilo de vida (dieta, actividad física, balance neuroendocrino, estrés) que influyen sobre la interacción nutrición-

inmunidad. Este segundo Curso Avanzado sobre Inmunonutrición pretende profundizar en el conocimiento de esta ciencia nueva y de los mecanismos de la interacción entre la nutrición y la inmunidad en la preservación de la salud y la prevención y el desarrollo de muchas patologías

El 7 de junio se celebró la Mesa Redonda titulada: "Probióticos y Prebióticos. Evidencia científica", presentada por el Excmo. Sr. D. Francisco J. Sánchez Muniz y moderada por la Ilma. Sra. Dña. Ascensión Marcos, Académica Correspondiente de la RANF, que supuso el cierre del II curso avanzado sobre Inmunonutrición. Actuaron como ponentes los Doctores: D. Guillermo Álvarez-Calatayud: "Aplicaciones clínicas de los Probióticos"; Dña. Mónica de la Fuente: "Los probióticos en el envejecimiento"; y Dña. Teresa Requena: "Prebióticos y su impacto en la microbiota intestinal".

El 13 de junio la Real Academia Nacional de Farmacia en colaboración con Farmaindustria celebraron la Sesión Científica titulada: "**Los retos de la industria farmacéutica en el nuevo entorno europeo".** La presentación corrió a cargo del Excmo. Sr. D. Mariano Esteban, Presidente de la RANF, de la Excma. Sra. Dña. Rosa Basante, Académica de número de la RANF y de D. Antoni Esteve, Vicepresidente de Farmaindustria. El tema a tratar fue "El nuevo escenario del Brexit", en el que intervinieron D. César Hernández de AEMPS, y Dña. Iciar Sanz de Madrid, de Farmaindustria. A continuación se realizó una Mesa de debate, cuyo moderador fue D. Emili Esteve, de Farmaindustria, y en la cual participaron D. César Hernández, de AEMPS; D. Humberto Arnés, de Farmaindustria; Dña. Cristina Henríquez de Luna, de GSK; y D. Ignasi Biosca, de Reig Jofre.

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 Conferencia titulada: "Farmacotecnia en la Farmacia Hospitalaria Española. Evolución Asistencial, Docente e Investigadora 1962-2012". Experiencia personal a cargo del Excmo. Sr. D. Isaac Arias, Académico Correspondiente de la RANF, quien fue presentado por la Excma. Sra. Dña. Rosa Basante Pol, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

En este trimestre han tenido lugar dos de las sesiones sobre el pacto de Estado por la Sanidad, celebradas conjuntamente por la Real Academia Nacional de Farmacia y la Asociación Española de Derecho Farmacéutico (ASEDEF).

La VII Sesión del pacto de Estado por la Sanidad: "Perspectiva de los Medios de Comunicación", se celebró el 16 de abril y fue presidida por el Vicepresidente de la RANF, Excmo. Sr. D. Benito del Castillo y el Presidente de ASEDEF, D. Mariano Avilés y contó con las intervenciones de importantes personalidades como D. Francisco Marhuenda, Director de la Razón, Doctor en Derecho; D. José Luis de la Serna, Doctor en Medicina y Cirugía. Presidente de Wakeapphealth; D. Carlos Dávila, Director del Programa "El Ojo Clínico"; D. Alipio Gutiérrez, Director de Onda Madrid.

La VIII Sesión del pacto de Estado por la Sanidad se celebró el 28 de mayo y trató sobre la "Perspectiva desde una Comunidad Autónoma"

En cuanto a los honores que han recibido nuestros Académicos, hay que destacar:

La Excma. Sra. Dña. Mª Teresa Miras Portugal ingresó como Académica Correspondiente de la Academia de Farmacia de Galicia, pronunciando su discurso de ingreso: "Señalización por nucleótidos: neurogénesis, neuroprotección y reparación del sistema nervioso", y fue presentada por nuestra Académica de Número, Excma. Sra. Dña. María José Alonso Fernández.

La Excma. Sra. Dña. Mª del Carmen Francés Causapé ha recibido la Estatuetta Antonina Lesniewska por Ia Dra Iwona Arabas, Profesora del Museo de la Farmacia de Varsovia (Polonia).

El Excmo. Sr. D. Vicente Vilas Sánchez ingresó en la Academia de Farmacia Reino de Aragón.

La Excma. Sra. Dña. María José Alonso, ha sido galardonada con la Medalla Castelao en su edición de este año 2018.

A la Excma. Sra. Dña. María Vallet Regí se le ha otorgado el premio Rey Jaime I de Investigación Básica.

El Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza será nombrado, el próximo 13 de septiembre, Presidente de Honor de la SEBBM.

El Excmo. Sr. D. César Nombela Cano, ha sido nombrado nuevo presidente de Fundación Quaes, entidad sin ánimo de lucro dedicada a fomentar la difusión de los avances médicos y científicos entre la sociedad.

El Ilmo. Sr. D. José María Sánchez Montero, Académico Correspondiente de la RANF, ha conseguido la plaza de catedrático de Química Orgánica y farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la UCM.

El Excmo. Sr. D. José Antonio Rodríguez Montes, Académico Correspondiente de la RANF, ha sido elegido nuevo Académico Electo de la RANM y ocupará el sillón nº 21 de Cirugía General, como Académico de Número de esta Academia.

En cuanto a los convenios firmados por la RANF, destacamos el firmado el 26 de abril entre la RANF, representada por su Presidente, D. Mariano Esteban Rodríguez y la Fundación OTIMES (Oficina Técnica Internacional del Medicamento y la Salud), representada por su Presidente, D. José Tomás García Maldonado. Se trata de un acuerdo en forma de Convenio Marco de colaboración. Al mismo asistieron una representación conjunta de ambas instituciones.

@Real Academia Nacional de Farmacia. Spain

La RANF tiene como objetivo "lograr un mejor conocimiento sobre la medicina en general y el medicamento en particular en la sociedad española".

La Fundación OTIMES tiene la MISION como: "Centro de estudios (think tank), por la pro cultura del medicamento y la salud, para el análisis integral y multidisciplinar de cuantos factores afectan a la praxis del medicamento. Su conocimiento y comunicación con la participación para su desarrollo de todos sus agentes, en favor del paciente".

El objeto del Convenio es promover y fomentar sus líneas de actuación en una cooperación reciproca en actividades de interés común, que convenientemente estructuradas darán lugar a un amplio campo de colaboración. En un proceso renovador como primer think tank en la praxis del medicamento. OTIMES está llamado a desarrollar un papel esencial en su propia praxis vinculándose en su proyección y servicio a la RANF. Se celebrará próximamente en la RANF el FORO FARMA – PRAXIS, para un análisis integral de la praxis del medicamento, que marcara el rumbo de diversos estudios y publicaciones en el pro del paciente y sus actores. Constituido el Consejo Asesor Iberoamericano de OTIMES ambas instituciones colaborarán en la proyección e internacionalización de sus actividades. Oportunamente se anunciará el Plan conjunto de sus principales actuaciones. A su vez OTIMES como think tank facilitará los estudios que la RANF considere en concordancia con sus fines. El nivel científico, técnico y profesional en el ámbito del medicamento alcanza los mayores niveles de eficiencia y resultados, pero estos se diluyen y aminoran ante los millones y millones de pacientes por su cultura en el medicamento y su aplicación. Mejorar esta cultura y la praxis del medicamento es determinante para los plenos beneficios de los resultados del medicamento en el orden sanitario, su incidencia social y económica. Ambas corporaciones estrechan lazos y unen sus fuerzas para conseguir así, un mayor empuje en la pro-cultura del medicamento a favor del paciente y de todos los actores implicados, en formas muy diversas, pudiendo llegar al mayor número de personas.

El 10 de mayo se firmó otro convenio entre la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación ASISA estrechando de esta manera lazos por a la Ciencia y la Investigación.

La RANF tiene como objetivo la enseñanza, divulgación y fomento de las Ciencias farmacéuticas y afines, mediante la celebración de Mesas Redondas, promoción de Cursos y Seminarios avanzados, Jornadas y Congresos especializados del más alto nivel científico orientados a los alumnos de grado, master y doctorado, investigadores, y profesionales de la salud y el medicamento. Asesorar al Gobierno de la Nación, Administraciones públicas, Organismos públicos, Agencia Española del Medicamento, agencias científicas y tecnológicas y a cuantas instituciones públicas o privadas lo soliciten, en todo lo que se refiera a las Ciencias Farmacéuticas y al Medicamento, y cuanto se relacione con ellas y con la promoción de la Salud.

La Fundación ASISA es una entidad sin ánimo de lucro creada por el Grupo ASISA para dar respuesta a su compromiso social, el impulso de la salud y su vocación de contribuir al desarrollo del conocimiento mediante sus programas y acuerdos con universidades y comunidad científica e investigadora. La Fundación ASISA tiene el compromiso con el Mundo Académico de ofrecer apoyo y colaboración en la difusión del conocimiento, la innovación y la transferencia de tecnología en beneficio de la Sociedad.

En el capítulo de Obituarios, hemos de lamentar el fallecimiento, el pasado 12 de junio, de nuestro compañero el Excmo. Sr. D. Manuel Domínguez Carmona, Medalla nº 4.

Nacido en Cartagena (Murcia), 11 de agosto de 1925. Doctor en Medicina. Catedrático de Medicina Preventiva de la U.C.M.. Profesor Emérito de la U.C.M.. Experto de Naciones Unidas para la Guerra Química. Premio del Instituto de Medicina Experimental en 1949. Premio Semprum al mejor trabajo científico, 1957. Cruz de la Real y Militar Orden de San Hermenegildo. Placa de la Real y Militar Orden de San Hermenegildo con antigüedad del 11-X-1979. Encomienda con Placa de la Orden Civil de Sanidad con nombramiento del 17-VII-1971. Cruz de la Orden del Mérito Militar de primera clase con distintivo blanco. Distinción del Excmo. y Magnífico Sr. Rector de la Universidad Complutense de Madrid, por haber dirigido más Tesis y Tesinas en los Cursos 1986-88. Invitado de Honor del V Congreso Nacional de Higiene y Medicina Preventiva Hospitalaria 1989. Diploma de UNICEF por la colaboración en pro de la problemática sanitario-social de la infancia, Marzo 1989. Distintivo de Profesorado, Orden 362/132/83 (BOD núm. 71). Académico Numerario de la Real Academia de Galicia. Tomó posesión del sillón correspondiente en 1981. Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina. Académico Honorario de las Academias de Medicina de Lugo, Pontevedra y Orense.

A sus familiares enviamos en nombre de toda nuestra Corporación nuestro más profundo y sentido pésame.

Jesús J. Pintor Just
Académico Secretario RANF