

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

VOLUMEN 89. NÚMERO 3 (2023) · JULIO-SEPTIEMBRE

ACCESO ABIERTO





SUMARIO

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

NUTRIGENÓMICA Y FUNCIONAMIENTO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS, UN EFECTO DEPENDIENTE DE LA INGESTA MATERNA DE FRUCTOSA

DISEÑO Y EVALUACIÓN COMPUTACIONAL DE LYTACS PARA LA DEGRADACIÓN SELECTIVA DE MMP-2. ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

VALOR TERAPÉUTICO DE LA RESTAURACIÓN DE MICROARNs SUPRESORES TUMORALES EN EL DESARROLLO DE CÁNCER DE PULMÓN

FORMULAE OF OATH AND LICENSING OF PHARMACISTS DURING THE NAPOLEONIC ITALIAN REPUBLIC AND THE NAPOLEONIC KINGDOM OF ITALY

COMERCIO ILEGAL DE MEDICAMENTOS, PROBLEMÁTICA ENFOCADA EN PUNTOS DE DISTRIBUCIÓN Y DESTRUCCIÓN: UNIDADES DE ELIMINACIÓN DE MEDICAMENTOS E INSUMOS

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

JEAN IRVINE AND LESLEY YELLOWLEES, FIRST FEMALE PRESIDENTS OF THE ROYAL PHARMACEUTICAL SOCIETY AND OF THE ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, RESPECTIVELY. ARTICULO DE REVISION

LA NEURODEGENERACIÓN DESDE UN PUNTO DE VISTA HOLÍSTICO

LA SOMBRA DE BUFFON: EN TORNO A LA ICONOGRAFÍA ZOOLOGICA DE LA BOTICA DEL HOSPITAL DE SAN JUAN BAUTISTA DE ASTORGA

EPISTEMOLOGÍA Y ONTOLOGÍA EN CIENCIA: EL RETO DE LA INTELIGENCIA ARTIFICIAL.

EL QUÍMICO FARMACÉUTICO JUAN JOSÉ OLIVERO, REFERENTE DE LA CIENCIA Y LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA URUGUAYA

NOTICIAS

FÁRMACOS NOVEDOSOS AUTORIZADOS RECIENTEMENTE POR EMA Y FDA (30 TRIMESTRE DE 2023)

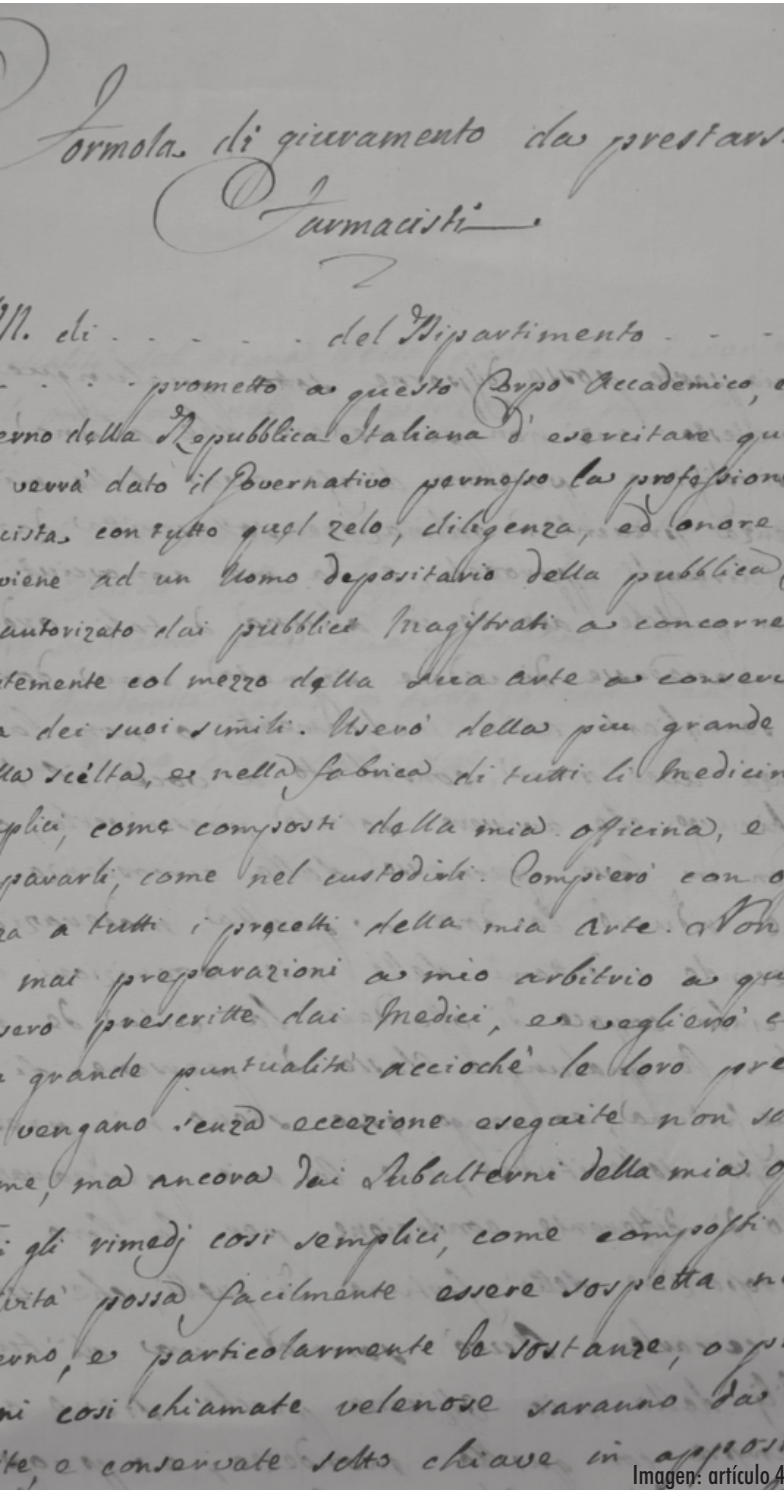


Imagen: artículo 4

Revista editada por:

REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Calle de la Farmacia, 9-11 (Madrid)

Teléfonos: 91 531 65 51

I.S.S.N 1697-428X

DOI: <https://doi.org/10.53519/analesranf>.



Presidente Comité Editorial

Doadrio Villarejo, Antonio L.

Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia

Directora Ejecutiva

Salaices Sánchez, Mercedes.

Vicesecretaria de la Real Academia Nacional de Farmacia

Editor Científico

Menéndez Ramos, José Carlos

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Consejo Editorial

Avendaño López, Carmen

Ribas Ozonas, Bartolomé

Villar del Fresno, Ángel María

Lacadena Calero, Juan Ramón

Rodríguez-Boto, Gregorio

Salinas Sánchez, Jesús

Académicos de la Real Academia Nacional de Farmacia

Coordinación

Edición online RANF

Manuel Tirado Juárez

Coordinación ARP

Luis Javier Aróstegui Plaza

Diseño web

Montse López Ferres

Diseño revista

M. Nieves Gallardo Collado

Consejo Editorial

Tamargo Menéndez, Juan

Mayor Zaragoza, Federico

Rodríguez Artalejo, Antonio

Puerto Sarmiento, Javier

García Sacristán, Albino

Vilas Sánchez, Vicente

del Castillo García, Benito

Sentandreu Ramón, Rafael

Sánchez Muniz, Francisco José

Abelló Gallo, Juan

Ortega Ortiz de Apodaca, Fidel

Basante Pol, Rosa

Alonso Fernández, María José

Ortiz Melón, José Miguel

Medina Jiménez, José M^a

Barcina Angulo, Yolanda

Domínguez-Gil Hurlé, Alfonso

Esteban Rodríguez, Mariano

Cabezas Fernández del Campo, J. Antonio

Sanz Pérez, Bernabé

Guinovart Cirera, Joan J.

Vallet Regí, María

Martínez Fernández, Antonio Ramón

Manzanares Robles, Jorge

Gómez-Serranillos Cuadrado, M^a Pilar

González Bueno, Antonio I.

Molina Martín, María

Martínez Lanao, José

de la Cruz Sánchez Mata, Daniel P.

Girbes Juan, Tomás

Marcos Sánchez, Ascensión

García Asuero, Agustín

Martínez Hernández, José Alfredo

Comité Científico Internacional

Prof. Aquiles Arancibia Orrego (Chile)

Prof. Lucette Bardet (Francia)

Kazuhiro Imai (Japón)

Vicenzo Tortorella (Italia)

Bernard Portha (Francia)

Joaquim Alexandre Ribeiro (Portugal)

Herbert Zimmermann (Alemania)

Adolfo Pérez Miravete (Méjico)

Carl - Göran Eden (Suecia)

ÍNDICE

p. 245

NUTRIGENÓMICA Y FUNCIONAMIENTO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS, UN EFECTO DEPENDIENTE DE LA INGESTA MATERNA DE FRUCTOSA

CARLA MARCUCCINI, ELENA FAUSTE, MADELÍN PÉREZ, ANTONIO CANOVRA, CRISTINA DONIS, MARÍA ISABEL PANADERO, PAOLA OTERO Y CARLOS BOCOS

p. 265

DISEÑO Y EVALUACIÓN COMPUTACIONAL DE LYTACS PARA LA DEGRADACIÓN SELECTIVA DE MMP-2

LAURA MÁRQUEZ CANTUDO, CRISTINA VALVERDE LÓPEZ-GALLEGU, CLAIRE CODERCH BOUÉ Y BEATRIZ PASCUAL-TERESA FERNÁNDEZ

p. 287

VALOR TERAPÉUTICO DE LA RESTAURACIÓN DE MICROARNs SUPRESORES TUMORALES EN EL DESARROLLO DE CÁNCER DE PULMÓN

PEDRO MEDINA VICO

p. 297

FORMULAE OF OATH AND LICENSING OF PHARMACISTS DURING THE NAPOLEONIC ITALIAN REPUBLIC AND THE NAPOLEONIC KINGDOM OF ITALY

ENRICO CEVOLANI

p. 307

COMERCIO ILEGAL DE MEDICAMENTOS, PROBLEMÁTICA ENFOCADA EN PUNTOS DE DISTRIBUCIÓN Y DESTRUCCIÓN: UNIDADES DE ELIMINACIÓN DE MEDICAMENTOS E INSUMOS

JORGE HUMBERTO RESTREPO , ADRIANA BARRERA , KIARY D.HEREDIA DIOSA, PAOLA A. OSPINA ATEHORTUA Y BRENDA A. SALAZAR DELGADO

p. 315

JEAN IRVINE AND LESLEY YELLOWLEES, FIRST FEMALE PRESIDENTS OF THE ROYAL PHARMACEUTICAL SOCIETY AND OF THE ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, RESPECTIVELY

AGUSTÍN GARCÍA ASUERO Y JUAN NÚÑEZ VALDÉS

p. 327

LA NEURODEGENERACIÓN DESDE UN PUNTO DE VISTA HOLÍSTICO

JOSÉ CLERIGUÉ LOUZADO Y OLMO MARTÍN-CÁMARA

p. 365

LA SOMBRA DE BUFFON: EN TORNO A LA ICONOGRAFÍA ZOOLOGICA DE LA BOTICA DEL HOSPITAL DE SAN JUAN BAUTISTA DE ASTORGA

JOAQUÍN SÁNCHEZ DE LOLLANO, MANUEL GARCÍA-ESPANTALEÓN, NURIA BENÍTEZ-PRIAN Y ANTONIO GONZÁLEZ-BUENO

p. 379

EPISTEMOLOGÍA Y ONTOLOGÍA EN CIENCIA: EL RETO DE LA INTELIGENCIA ARTIFICIAL

SANTIAGO CUÉLLAR RODRÍGUEZ

p. 387

EL QUÍMICO FARMACÉUTICO JUAN JOSÉ OLIVERO, REFERENTE DE LA CIENCIA Y LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA URUGUAYA

ROBERTO OLIVERO

p. 395

FÁRMACOS NOVEDOSOS AUTORIZADOS RECIENTEMENTE POR EMA Y FDA (3º TRIMESTRE DE 2023)

SANTIAGO CUÉLLAR RODRÍGUEZ

NUTRIGENÓMICA Y FUNCIONAMIENTO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS, UN EFECTO DEPENDIENTE DE LA INGESTA MATERNA DE FRUCTOSA

NUTRIGENOMICS AND THYROID HORMONE FUNCTIONING, A DEPENDENT EFFECT OF MATERNAL FRUCTOSE INTAKE

Carla Marcuccini, Elena Fauste, Madelín Pérez, Antonio Canoyra, Cristina Donis, María Isabel Panadero, Paola Otero y Carlos Bocos

Facultad de Farmacia. Universidad San Pablo – CEU. CEU Universities, Montepríncipe, Boadilla del Monte, Madrid.

correspondingauthor: c.marcuccini@usp.ceu.es

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Premio Raffaella Pagani del Concurso Científico RANF 2022

RESUMEN

El consumo de fructosa se ha asociado con el desarrollo de síndrome metabólico. También se ha demostrado que la ingesta de fructosa durante la gestación puede provocar efectos perjudiciales en los descendientes (1). Además, otros autores han descrito cómo la nutrición puede afectar al funcionamiento de las hormonas tiroideas, las cuales están implicadas en diversas enfermedades metabólicas.

Por ello, se determinaron el efecto del consumo materno de fructosa durante la gestación sobre el metabolismo de las hormonas tiroideas en sus descendientes, y los efectos de la suplementación de los descendientes con distintas dietas (fructosa, tagatosa, fructosa con colesterol).

La tagatosa aumentó los niveles plasmáticos de T4 libre y la expresión hepática de DIO1 solamente en descendientes de madres fructosa. Sin embargo, la expresión hepática de UCP2 mostró un perfil más similar a la de THRa.

En íleon y TAL los perfiles de expresión para DIO1 y UCP están correlacionados y se ven afectados por el consumo de fructosa (efecto dependiente de la ingesta materna). La adición de colesterol a la dieta potenció el efecto de la fructosa en íleon (para DIO1 y UCP2).

Por tanto, el consumo materno de fructosa afecta al metabolismo de las hormonas tiroideas de la descendencia, tanto en respuesta a una dieta rica en fructosa como a la asociación de fructosa y colesterol ("Western diet"). Este trabajo pretende alertar a la población, en especial mujeres embarazadas del papel relevante que ejerce la nutrición, con posibles consecuencias negativas para la salud de sus hijos.

ABSTRACT

Fructose consumption has been associated with the development of metabolic syndrome. It has also been shown that fructose intake during pregnancy can cause detrimental effects on offspring (1). In addition, other authors have described how nutrition can affect the function of thyroid hormones, which are involved in various metabolic diseases.

Therefore, we determined the effect of maternal fructose consumption during pregnancy on the metabolism of thyroid hormones in their offspring and the effects of the supplementation with different diets (fructose, tagatose, fructose with cholesterol) in the offspring.

Tagatose increased plasma free T4 levels and hepatic DIO1 expression only in the offspring of fructose-fed mothers. However, the hepatic expression of UCP2 showed a profile more similar to that of THRa.

In ileum and TAL, the expression profiles for DIO1 and UCP are correlated and affected by fructose consumption (effect dependent on maternal intake). The addition of cholesterol to the diet potentiated the effect of fructose in ileum (for DIO1 and UCP2).

Thus, maternal fructose consumption affects the metabolism of thyroid hormones in the offspring, both in response to a fructose rich diet and a combination of fructose and cholesterol ("Western diet").

This work aims to alert the population, especially pregnant women, of the relevant role of nutrition, leading to possible negative consequences for the health of their children.

Palabras Clave:

fructosa
tagatosa
colesterol
programación fetal
hormonas tiroideas

Keywords:

fructose
tagatose
cholesterol
fetal programming
thyroid hormones

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Fructosa

La fructosa es un monosacárido que se encuentra de forma natural en frutas, otros vegetales o en la miel. Sin embargo, durante las últimas décadas su uso a nivel industrial ha experimentado un aumento significativo, ya sea en forma de jarabe de maíz rico en fructosa (JMAF) o sacarosa, para edulcorar multitud de alimentos altamente procesados, refrescos y bebidas azucaradas. Por ello, la fructosa se ha convertido en una de las principales fuentes de azúcares añadidos en la dieta en países desarrollados. Además, es importante destacar que la ingesta diaria de azúcares añadidos en EE.UU. supera la cantidad recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2018) (2).

El JMAF se desarrolló y empezó a producirse de forma industrial en la década de 1960. En el mercado existen distintos tipos de JMAF, siendo los más utilizados el HFCS-42 y el HFCS-55, que contienen un 42% y 55% de fructosa, respectivamente (3). Estos JMAF se introdujeron en sustitución de otros edulcorantes, principalmente la sacarosa, que es un disacárido formado por una fructosa y una glucosa utilizado como endulzante tradicional. Las ventajas del JMAF frente a la sacarosa son su elevada solubilidad en alimentos procesados y un menor coste de producción (4).

Todos estos factores han promovido un aumento exponencial en el consumo de fructosa. Según el Departamento de Agricultura de EEUU, el consumo de JMAF aumentó > 1000% entre 1970 y 1990 y en 2004 representaba > 40% de los edulcorantes calóricos en refrescos en EEUU. Aunque esta tendencia creciente hoy en día se está atenuando (5).

1.2. Enfermedades relacionadas con el consumo de fructosa

En las últimas décadas, el estilo de vida, el nivel socioeconómico y los hábitos higiénico-dietéticos han experimentado

cambios en la población mundial que han promovido la adquisición de hábitos poco saludables, un estilo de vida sedentario y una occidentalización de la dieta. La dieta occidental o *Western diet* se caracteriza por una ingesta alta de sal, azúcares añadidos y ácidos grasos saturados (6), además de un bajo consumo de verduras y frutas frescas (7,8).

Utilizando como valor de referencia el índice de masa corporal (IMC), la OMS determinó en 2016 que las tasas de sobrepeso y obesidad se habían triplicado desde 1975, estimando que el 39% de la población mundial adulta padece sobrepeso y el 13% obesidad. Estos datos lógicamente varían entre países, siendo EE.UU. el que encabeza la lista (9).

En múltiples estudios epidemiológicos se ha demostrado que el aumento significativo del consumo de fructosa en forma JMAF como edulcorante es un factor etiológico y está relacionado con el aumento de la obesidad y alteraciones metabólicas asociadas a una respuesta inflamatoria y estrés oxidativo (10) o deterioro cardíaco (11). Además, es un factor de riesgo potencial para el desarrollo de enfermedades como el síndrome metabólico.

El síndrome metabólico (MetS) o síndrome X es un conjunto de cinco factores clínicos y metabólicos de riesgo para la salud como son la resistencia a la insulina o hiperglucemia, dislipemia (hipertrigliceridemia), hipertensión arterial, obesidad abdominal y disminución de colesterol en las HDL. Para el diagnóstico de MetS se requiere la presencia de al menos tres de las cinco alteraciones anteriormente descritas. La presencia de síndrome metabólico a su vez incrementa significativamente el riesgo de enfermedades a largo plazo como la diabetes tipo II o enfermedades cardiovasculares (12, 13).

Por otra parte, el consumo de fructosa también se ha relacionado con el desarrollo de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) ya que estimula la lipogénesis *de novo* y aumenta el contenido de grasa hepática. Esta NAFLD se caracteriza

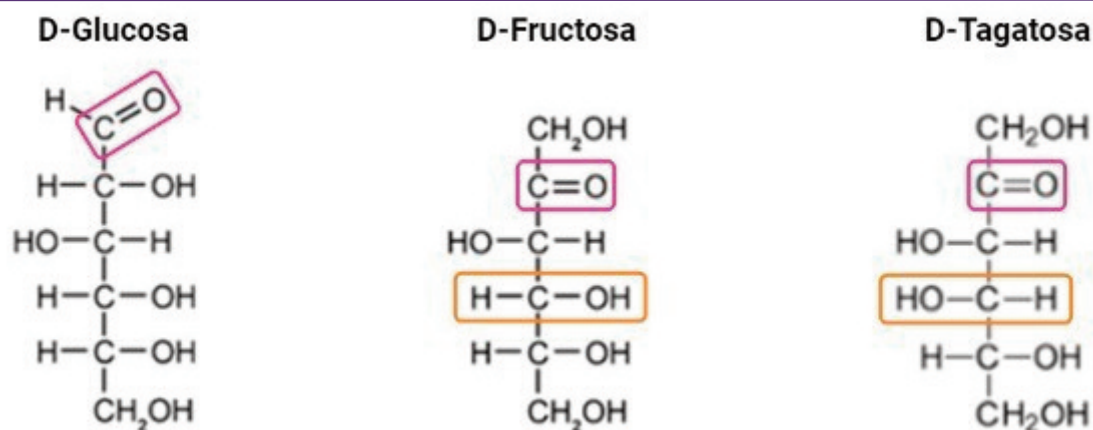


Figura 1. Estructura de la D-glucosa, D-fructosa y D-tagatosa. En morado se señalan la diferencia entre el grupo aldehído de la glucosa y el grupo ceto de la fructosa y la tagatosa. En naranja se señala la diferencia en la conformación espacial en el C4 quiral entre la fructosa y la tagatosa.

por la acumulación de triglicéridos hepáticos, puede conducir a fibrosis hepática, cirrosis o carcinoma hepatocelular y, además, también está asociada al síndrome metabólico (8,9).

1.3. Tagatosa

La tagatosa es una cetohexosa, epímero de la fructosa, que tiene un aporte calórico menor a esta y que por ello, se utiliza como edulcorante bajo en calorías en bebidas, yogures y dulces dietéticos, entre otros (11). Tras la realización de estudios de toxicidad y seguridad en humanos y otros animales, la tagatosa fue declarada como una sustancia "Generalmente Reconocida Como Segura (GRAS)" por parte de la FDA, lo que permitió su uso a nivel industrial (14,15).

El poder edulcorante de la tagatosa equivale a un 92% del de la sacarosa (16,17). Sin embargo, posee un índice glucémico bajo y tiene un efecto hipoglucemiante si es administrada antes de una ingesta oral de glucosa (14,18,19). Además, estudios previos sugieren claramente que el consumo crónico de tagatosa no induce las mismas alteraciones metabólicas nocivas que las provocadas por el consumo crónico de fructosa, como las relacionadas con el estrés oxidativo y el efecto proinflamatorio selectivo (20). También se ha demostrado que la exposición crónica a la tagatosa produce una menor susceptibilidad del miocardio a lesión por I/R (Isquemia/Reperfusión) en comparación con la fructosa (11).

1.4. Estructura y metabolismo de la fructosa, glucosa y tagatosa

La glucosa, la fructosa y la tagatosa comparten el mismo peso molecular y fórmula química. Sin embargo, su conformación estructural es distinta (Figura 1). La fructosa es un isómero estructural de la glucosa y difieren en su grupo carbonilo. Mientras que la fructosa presenta un grupo cetona en el Carbono número 2, la glucosa presenta un grupo aldehído en el carbono número 1. Por otro lado, la tagatosa es un epímero de la fructosa que cambia su configuración espacial en el cuarto carbono, que es quiral.

Pese a que los tres monosacáridos presentan una conformación similar (Figura 1), sus diferencias estructurales condicionan distintas vías de absorción a través del intestino y, además, distintas vías de metabolizarse en el organismo (Figura 2).

En primer lugar, la glucosa se absorbe a nivel intestinal en los enterocitos a través de SGLT1, que es un cotransportador sodio-glucosa localizado en la membrana apical y que es dependiente de un gradiente de sodio generado por una $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa. Una vez pasa a circulación mediante GLUT2 se distribuye a distintos tejidos, donde se va a llevar a cabo la glucólisis para metabolizar la glucosa a dos moléculas de piruvato / generar ATP. La primera reacción de esta ruta está catalizada por una hexoquinasa que fosforila la glucosa en la posición 6 utilizando ATP.

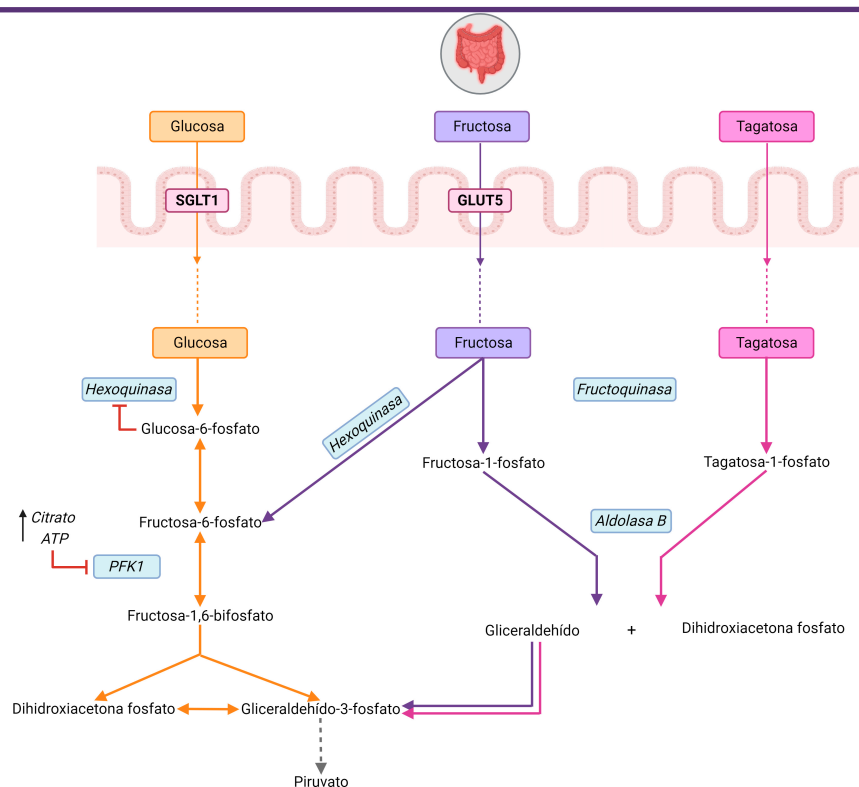


Figura 2. Ruta metabólica y absorción de la D-glucosa, D-fructosa y D-tagatosa en el organismo. La vía de color naranja corresponde a la vía metabólica de la glucosa, la vía de color morado al de la fructosa y la vía de color rosa al de la tagatosa. Las enzimas están señaladas en un recuadro azul en cursiva y los transportadores de glucosa y fructosa en un recuadro rojo. Figura creada con BioRender.com



Esta reacción está muy desplazada hacia la formación de G6P y se considera irreversible, esto hace que sea un punto de regulación de la ruta, aunque no el principal.

La segunda reacción la lleva a cabo la glucosa fosfato isomerasa, transforma a la glucosa 6-P en fructosa-6-P. A continuación, este azúcar vuelve a fosforilarse en el primer carbono para dar lugar a la fructosa-1,6-bisfosfato gracias a la acción de la enzima PFK1 (fosfofructoquinasa 1), cuya reacción es irreversible y es el punto principal de regulación de la glucólisis ya que se inhibe por ATP (producto de la vía glucolítica) y por citrato (intermediario del ciclo del ácido cítrico, CAC). A partir de aquí, la fructosa-1,6-bisfosfato se escinde en dihidroxiacetona fosfato (DHP) y gliceraldehído-3-fosfato (GAP) por una aldolasa. Pese a que la reacción no está favorecida energéticamente, el hecho de que el GAP se use inmediatamente tras la escisión hace que la reacción esté favorecida hacia la ruptura de la fructosa-1,6-bisfosfato. El gliceraldehído-3-fosfato posteriormente se convertirá en piruvato tras una serie de reacciones (21, 22) (Figura 2).

Por otro lado, la fructosa se absorbe en el intestino a través del transportador GLUT 5, el único transportador específico para la fructosa sin capacidad para transportar glucosa o galactosa (23, 24). Accede a la circulación sistémica gracias a través de la membrana basolateral gracias a GLUT2, al igual que la glucosa. Cuando la fructosa llega a los distintos tejidos se metaboliza de forma distinta a la glucosa, mediante la fructólisis, que se limita principalmente al hígado, no como la glucólisis que se lleva a cabo en todas las células del organismo, aunque comparte enzimas e intermediarios metabólicos con esta.

La primera reacción que experimenta la fructosa en su metabolismo a través de la fructólisis es la fosforilación a fructosa-1-fosfato a través de una cetohecoquinasa (KHK), conocida también como fructoquinasa en el hígado. Esta fructosa-1-fosfato a través de la aldolasa B se escinde en dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído (GA). Tanto la DHAP como el GA se pueden metabolizar mediante una vía compartida con la glucólisis a gliceraldehído-3-fosfato (GA3P). Por otra parte, el GA se puede reducir y fosforilar para dar lugar al glicerol-3-fosfato (G3P), que sirve de sustrato para la síntesis de lípidos o transporte de equivalentes reductores a las mitocondrias a través de la lanzadera de G3P (25, 26).

Además, la fructosa en los tejidos extrahepáticos puede introducirse en la glucólisis fosforilándose a F6P a través de una hexoquinasa, saltándose el primer punto de regulación de la vía glucolítica. No obstante, en su vía metabólica mayoritaria a través de la cetohecoquinasa (KHK) o fructoquinasa se salta además el punto principal de regulación de la glucólisis, catalizado por la PFK1, enzima limitante de velocidad de la vía glucolítica y regulada, tanto

por altos niveles de ATP como de citrato (26). La KHK es una enzima presente sobre todo en intestino e hígado y, por tanto, la fructólisis es una vía típica en esos tejidos, mientras que la otra ruta alternativa del metabolismo de la fructosa es más habitual en el resto de los tejidos extrahepáticos (Figura 2).

Por último, de la tagatosa ingerida por vía oral se absorbe aproximadamente un 20% y se metaboliza principalmente a través del hígado (17, 19). La tagatosa a la hora de metabolizarse sigue la misma vía que la fructosa (27), se transforma a tagatosa-1-fosfato (T1P) a través de la fructoquinasa, y, del mismo modo, la aldolasa B hidroliza la tagatosa-1-fosfato a gliceraldehído y dihidroxiacetona fosfato (Figura 2).

Al igual que la fructosa-1-fosfato, el aumento de tagatosa-1-fosfato actúa como activador de la glucoquinasa (la hexoquinasa de la glucólisis hepática), lo que conlleva una mayor transformación de glucosa a glucosa-6-fosfato y esto activa aún más a la glucógeno sintasa. Así mismo, hay estudios que sugieren que la tagatosa-1-fosfato, de forma similar a la fructosa-1-fosfato, inhibe a la glucógeno fosforilasa. De tal forma que la presencia tanto de fructosa-1-fosfato como de tagatosa-1-fosfato aumenta la síntesis de glucógeno y disminuye su utilización (27).

1.5. Hormonas tiroideas

Las hormonas tiroideas son esenciales para el correcto desarrollo, crecimiento, diferenciación celular o regulación metabólica del organismo (28). La glándula tiroides es la encargada de la producción de las hormonas tiroideas. Esta glándula consta de folículos en los que la hormona se sintetiza a través de la adición de yodo a residuos de tirosina de la tiroglobulina (29). Así se producen y liberan tanto triiodotironina (T3) como tiroxina (T4), todo ello regulado por la hormona de la hipófisis estimuladora del tiroides o TSH. La mayoría de la T4 producida por la glándula tiroides circula en sangre unida a una proteína transportadora (TGB, del inglés *Thyroxine-binding globulin*), y solo una pequeña fracción circula libre. Esta pequeña proporción de hormona libre regula mediante un mecanismo de feedback negativo la secreción de TSH (30, 31).

La acción molecular y unión a los receptores nucleares de hormonas tiroideas (THR) está íntimamente relacionada con la cantidad de hormona activa disponible, tanto a nivel plasmático como ya luego a nivel tisular. El transporte de la T4 libre circulante al interior celular se produce principalmente a través de varios receptores de la familia del transportador de monocarboxilatos, como MCTP8 o MCTP10 (32), receptores OATP (transportador de aniones orgánicos) o LAT (transportadores de aminoácidos de tipo L) (33). Una vez en el interior, la T4 se transforma en la forma activa de la hormona tiroidea, la T3, a través de las enzimas desyodasas

(en inglés *deiodinases*) (DIO) (34, 35). De estas enzimas hay varios tipos, siendo la DIO1 y, sobre todo, la DIO2 las encargadas de la activación de las hormonas tiroideas, mientras que la DIO3 parece que tiene más bien un papel de degradación y inactivación de dicha hormona (28).

Entre las múltiples acciones de la hormona tiroidea activa (T3) se encuentra su participación en la regulación de la transcripción de múltiples genes. La T3 se une a su receptor específico THR (que puede ser de tipo alfa o beta), el cual queda activado para ejercer su papel de factor de transcripción, uniéndose al promotor de sus genes diana (los que tengan la secuencia TRE, elemento respuesta a hormonas tiroideas) y regulando así su expresión (Figura 3). De entre esos genes diana y en los que se ha centrado este estudio, se encuentran las proteínas desacoplantes o UCP2 y UCP3 (del inglés *Uncoupling Protein*). Las proteínas desacoplantes o termogeninas están localizadas en la membrana mitocondrial interna y actúan como mecanismo de regulación mediante el cual la energía se utiliza para generar calor y/o evitar la saturación de la cadena respiratoria. En concreto, la mayoría de los autores proponen que UCP2 y UCP3 actúan regulando la cantidad de ATP disponible en las células, el flujo de electrones en la cadena respiratoria, la producción de ROS mitocondriales, así como también protegen contra el daño celular y disminuyen la secreción de insulina (36, 37). Todo el proceso descrito anteriormente desde la hormona inactiva T4 libre en plasma hasta la expresión de UCP se describe en la Figura 3.

Diversos estudios han demostrado que la nutrición puede influir en la fisiología del tiroides. Así, por ejemplo, una dieta rica en grasa (HFD, del inglés *High Fat Diet*) provoca cambios en el perfil lipídico, el funcionamiento del tiroides e incluso en su morfología. Es más, dietas con un elevado contenido en carbohidratos también parecen afectar al funcionamiento de las hormonas tiroideas y a sus niveles en sangre (38).

1.6. Programación fetal

La hipótesis acerca de la programación fetal la propusieron Barker y Hales en 1992 (39), donde se postula que la susceptibilidad a las enfermedades crónicas de un adulto se presenta en respuesta a un entorno adverso nutricional prenatal y/o perinatal. Esta hipótesis ha sido apoyada por múltiples estudios epidemiológicos (40).

La programación fetal es un proceso mediante el cual diversos factores ambientales, genéticos y el ambiente nutricional intrauterino recibido durante el desarrollo embrionario y fetal van a determinar el desarrollo posterior de enfermedades en la edad adulta. Estos factores pueden dar lugar a alteraciones estructurales, fisiológicas y metabólicas permanentes durante el desarrollo y en la edad adulta de la descendencia (41). Hay estudios que afirman y constatan que el consumo de fructosa durante el embarazo produce un fenotipo programado que conlleva efectos perjudiciales en la descendencia (42).

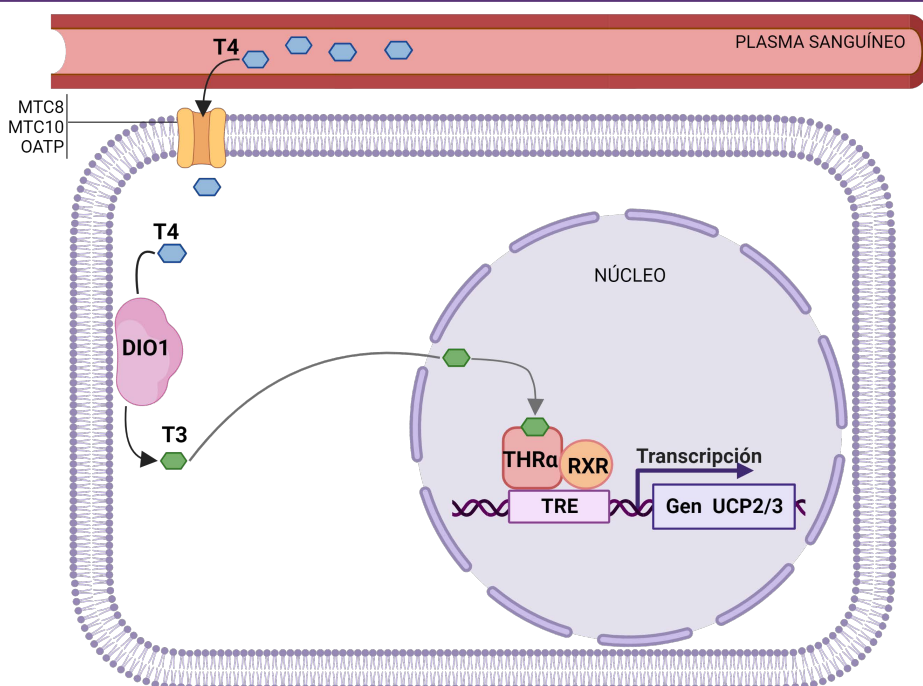


Figura 3. Proceso de activación de la transcripción de UCP2/3 a partir de la T4 libre en plasma. La T4 libre se introduce en la célula a través de transportadores (MTC8, MTC10 y OATP), se activa por DIO1 a T3. La T3 accede al núcleo celular, se une al receptor (THRα) que forma un dímero con el receptor RXR (receptor X retinoide), los cuales se unen a la región TRE del gen diana y activan su transcripción.



Esta exposición a factores ambientales y del entorno materno puede provocar, a través de la programación fetal, cambios epigenéticos que conducirán a alteraciones en la expresión de algunos genes. Es más, es importante resaltar que la programación fetal permanece activa generación tras generación cuando la exposición al factor de estrés ocurre durante períodos críticos de la vida, como el embarazo y la lactancia (43).

2. OBJETIVOS

Con los antecedentes previamente descritos, quisimos averiguar si había un componente nutrigenómico que afectara a la funcionalidad y metabolismo de las hormonas tiroideas, para lo cual evaluamos el efecto de diversas dietas: fructosa, tagatosa y *Western diet*. Además, con el fin de estudiar la posible implicación de la programación fetal, nos planteamos determinar si los efectos observados eran dependientes de la dieta materna.

Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar si la ingesta de fructosa durante 21 días en ratas tiene algún efecto sobre la concentración de T4 libre en el plasma y, en consecuencia, sobre la expresión génica de la desyodasa y los genes diana de la hormona tiroidea: UCP2 y UCP3 en hígado, tejido adiposo lumbar e íleon.
2. Evaluar si la ingesta de tagatosa genera los mismos efectos que la fructosa en la ruta descrita en el apartado anterior, para comprobar si los efectos observados son específicos de alguno de estos 2 azúcares.
3. Determinar si la ingesta de una dieta *Western* (u occidental) (rica en fructosa y colesterol) induce los mismos efectos que la ingesta de fructosa sola en la ruta mencionada en el primer objetivo, para comprobar si la presencia de colesterol potencia los efectos provocados por la fructosa.
4. Valorar si los efectos observados están influenciados por la dieta materna y, por lo tanto, implican la intervención de procesos de programación fetal. Para ello, a las madres de los animales utilizados en los tres anteriores apartados se les suministró en la gestación agua sin aditivos o agua suplementada con fructosa.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental

El diseño experimental que se llevó a cabo se detalla a continuación (Figura 4). Ratas Sprague-Dawley se aparearon y una vez se constató el inicio de la gestación, las hembras (generación

F0) recibieron una dieta estándar y se separaron en dos grupos según la bebida administrada durante este periodo. Uno de los grupos, el grupo de madres-Control, recibió agua sin ningún aditivo, mientras que el otro grupo de ratas gestantes, grupo de madres-Fructosa, recibió agua con una solución de fructosa al 10% p/v.

Tras el parto, tanto la madre como los descendientes recibieron en la bebida agua sin ningún aditivo en ambos grupos hasta el inicio de la segunda parte del estudio (a los 3 meses de edad). Solo se prosiguió el estudio con los descendientes macho (generación F1). A los 3 meses de edad todos los descendientes, procedentes tanto de madres-control como de madres-fructosa, se separaron en cuatro grupos en función de la dieta recibida:

- Grupo Control: recibieron una dieta sólida estándar y agua sin ningún aditivo.
- Grupo de Fructosa: recibieron una dieta sólida estándar y agua con una solución de fructosa al 10% p/v.
- Grupo de Tagatosa: recibieron una dieta sólida estándar y agua con una solución de tagatosa al 10% p/v.
- Grupo de fructosa y colesterol: recibieron una dieta sólida estándar suplementada con un 2% de colesterol y agua suplementada con fructosa al 10% p/v (Figura 4).

Así, se obtuvieron un total de 8 grupos experimentales (Figura 4). La primera letra de cada grupo indica el tratamiento recibido por las madres y la segunda letra el tratamiento recibido por los descendientes. Tras 21 días de tratamiento las ratas fueron sacrificadas. La sangre se recogió en tubos Vacutainer® con EDTA-K2. Para la obtención del plasma se centrifugaron las muestras de sangre (20 min, 3000rpm, 4°C), se repartieron en diferentes alícuotas y se almacenaron a -80°C hasta el momento de la medición de los parámetros. Los tejidos obtenidos fueron congelados en nitrógeno líquido tras su obtención y se almacenaron a -80°C hasta el momento de la medición de los parámetros correspondientes.

3.2. Ensayos de parámetros plasmáticos

3.2.a. Determinación de T4 libre en plasma

La determinación cuantitativa de la T4 libre en plasma se hizo con un kit de NovaTech (Immundiagnostica GmbH), que permite la detección mediante un método inmunoenzimático y colorimétrico de T4 libre, tanto en suero como en plasma. Este protocolo se basa en la realización de un ELISA, que en este caso era tipo sándwich.

Para ello se pipetearon en cada pocillo 50µL de cada muestra, 6 soluciones estándar a diferentes concentraciones (A: 0.0

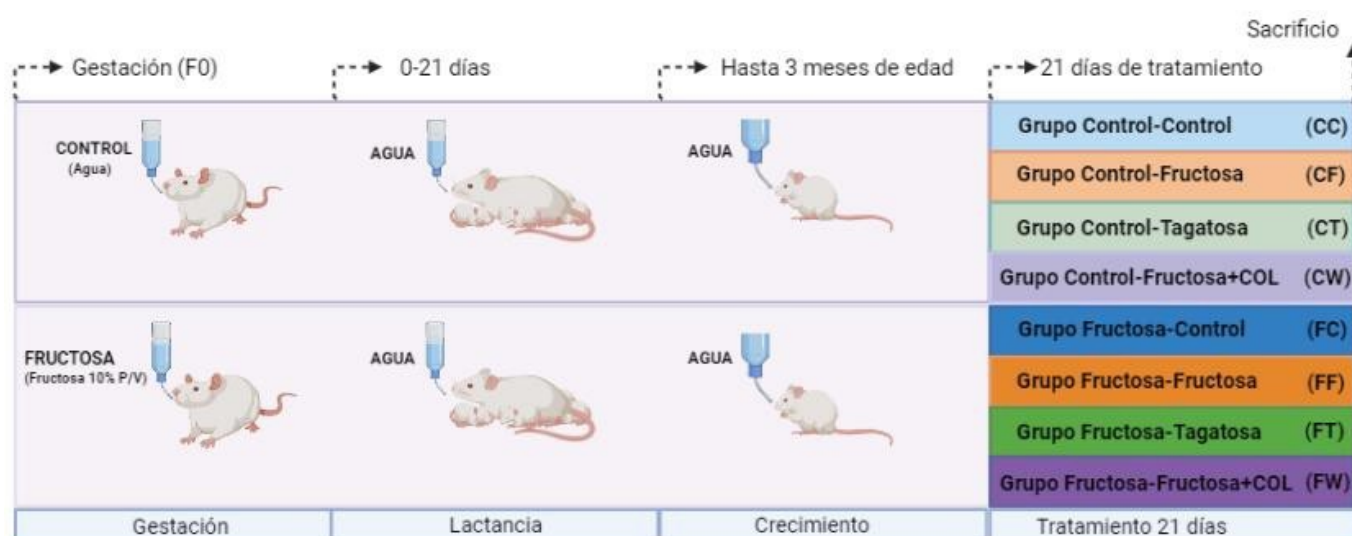


Figura 4. Diseño experimental. Creada con BioRender.com

ng/l; B: 3.0 ng/l; C: 9.5 ng/l; D: 21.0 ng/l; E: 36.0 ng/l; F: 70 ng/l) y de control, a los que se añadieron posteriormente 100 μ L de reactivo conjugado (T4-HRP). A continuación, se incubó la mezcla de reacción 1 h a 37°C en oscuridad. Tras el tiempo de incubación se lavó cada pocillo tres veces con 300 μ L de una solución de lavado. Seguidamente, se añadieron 100 μ L de solución sustrato (TMB) y se incubó en oscuridad a 20-25°C durante 15 minutos, tras los cuales se añadió una solución de parada. Por último, se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas SpectroStar Nano (BMG Labtech, Alemania).

Con la absorbancia obtenida de los estándares se realizó una recta de calibrado a partir de la cual se interpolaron las absorbancias de las muestras y el control.

3.3. Ensayos de parámetros moleculares

3.3.a. Homogeneización de los tejidos y extracción de ARN

Para la homogeneización de los tejidos se pesaron 100mg de muestra a los que se les añadió *Tri Reagent*® (Invitrogen, ThermoFisher, EEUU) y se llevó a cabo la homogeneización mediante la utilización de un *TissueLyser LT* (Qiagen, EEUU). Se centrifugó posteriormente el homogenado (10 min, 16000g, 4°C). A continuación, para aislar el ARN se utilizó bromocloropropano y se volvieron a centrifugar las muestras (10 min, 16000g, 4°C) pudiendo así extraer el ARN que quedó disuelto en la fase acuosa.

3.3.b. Purificación del ARN. Cuantificación, determinación del grado de pureza e integridad del ARN. Tratamiento con DNasa

Tras la extracción, el ARN se purificó mediante el kit *Ribopure*™ (Invitrogen, ThermoFisher, EEUU). Para llevar a cabo la cuantificación del ARN obtenido se utilizó un *NanoDrop*® One

(ThermoFisher, EEUU). Además, se determinó el grado de pureza del ARN extraído por duplicado teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

- Relación de absorbancias a 260 y 230nm para detectar una posible contaminación de la muestra con solventes orgánicos.
- Relación de absorbancias a 260 y 280nm para evaluar una posible contaminación con proteínas.

El grado de pureza de las muestras se consideró óptimo cuando la relación de absorbancias se encontraba en el intervalo 1.8-2.0. La integridad del ARN obtenido se determinó mediante una electroforesis (90V, 20 min) en gel de agarosa al 2% teñido con Midori Green Advance (Nippon Genetics) y para ello se cargaron 500 ng de ARN con tampón de carga y agua, en los que se observaron las bandas correspondientes al ARN ribosomal (18S y 28S), tal y como se observa en la (Figura 5).

Para retirar las posibles trazas de ADN contaminante y evitar así que interfiera en los posteriores análisis, se llevó a cabo un tratamiento con DNasa, mediante el kit *Turbo DNA-free*™ (Invitrogen, ThermoFisher, EE.UU.) y se determinó de nuevo la concentración de ARN tras el tratamiento, siguiendo el protocolo mencionado anteriormente. Se realizó posteriormente una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para comprobar la ausencia de ADN en las muestras utilizando los cebadores de un gen constitutivo: el RPS29.

3.3.c. Retrotranscripción

Para realizar los ensayos de expresión génica requeridos en este estudio fue necesario obtener el ADN complementario (ADNc) a partir del ARNm, para lo cual se llevó a cabo una retrotranscripción utilizando el kit *SuperScript*® II *Reverse Transcriptase* (Invitrogen, EEUU) y un Termociclador iCycler (BioRad,

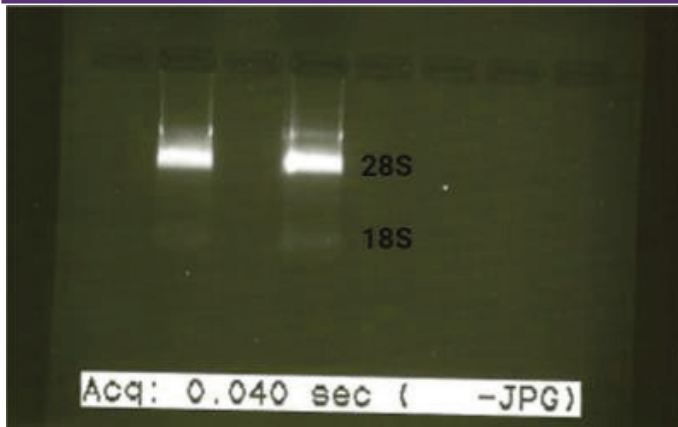


Figura 5. Comprobación de la integridad del ARN obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa. Bandas correspondientes al ARN ribosomal 18S y 28S.

EEUU). Para ello se utilizaron 2,5 ng de ARN tratado con DNasa en muestras de hígado e íleon y 1 ng de ARN en muestras de tejido adiposo. Se comprobó la funcionalidad del ADNc obtenido mediante una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando cebadores del gen RPS29 como referencia y una electroforesis posterior (Figura 6).

3.3.d. Estudio de la expresión génica

Se utilizó la técnica de PCR a tiempo real o Q-PCR para el estudio de la expresión génica. La PCR a tiempo real permite tanto el análisis cualitativo como cuantitativo simultáneo de las muestras. Para ello emplea la medida de la fluorescencia en cada uno de los ciclos de amplificación ya que el ADN amplificado en cada ciclo queda marcado con *SyBR- Green I*, un fluoróforo específico de ADN bicatenario, siendo la fluorescencia proporcional a la cantidad de producto amplificado (44).

3.3.1.a. Diseño de primers

Los cebadores (*primers*) se diseñaron utilizando el programa *Primer Blast* estableciendo los siguientes parámetros: un tamaño de 100 a 300 pb de producto de amplificación y una T_m de 60°C. La secuencia de los cebadores se comprobó mediante el programa *Beacon Designer*. Se verificó que los cebadores eran válidos buscando si amplificaban de forma específica, tanto el primer Forward como el primer Reverse, en la secuencia FASTA del gen correspondiente. La secuencia de los cebadores utilizados se muestra en la tabla 1.



Figura 6. Comprobación de la funcionalidad del cDNA mediante electroforesis en gel de agarosa. Bandas correspondientes al producto de amplificación de los cebadores correspondientes a RPS29.

3.3.2.a. Recta de calibrado

El estudio de la expresión génica y cuantificación del ADNc requiere de una recta de calibrado en la que interpolar los valores obtenidos posteriormente en los ensayos de las muestras. Para ello, a partir de concentraciones conocidas del ADNc diana, se realizaron diluciones seriadas 1/10 (50, 5, 0.5 y 0.05 ng/ μ L). La eficiencia de los primers (E) se calculó a partir de los C_p de la recta de calibrado obtenida y se realizó una electroforesis en gel de agarosa para comprobar que el tamaño del producto de amplificación era el esperado y no se observaban productos secundarios (Figura 7).

Además, se pudo verificar la amplificación de la secuencia diana mediante la determinación de su T_m (temperatura de fusión) ya que este parámetro depende de la longitud del producto de amplificación y el porcentaje de GC.

3.3.3.a. Protocolo PCR a tiempo real para la cuantificación de la expresión génica

La PCR a tiempo real se llevó a cabo en un *Termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* (BioRad, EEUU) con los cebadores descritos anteriormente. Para ello se utilizó una dilución 1/30 de ADNc en muestras de hígado e íleon y una dilución 1/5 en muestras de tejido adiposo lumbar (TAL) alcanzando así una concentración próxima a 5ng/ μ L con el fin de asegurar que los valores de C_p se encontrasen dentro de la recta de calibrado y no superasen valores superiores a 33 ciclos, a partir de los cuales hay probabilidad de que amplifiquen productos inespecíficos y se pierde eficiencia.

Tabla 1. Secuencia de los primers (cebadores) F y R de los genes DIO1, THRA1, UCP3 y UCP2 con su procedencia.

Gen	Primer Forward	Primer Reverse	Procedencia
DIO1	CTGGTTCGTCCTGAAGGTCC	TCCACGTTGTTCTTAAAGCCC	Primer BLAST
THRA1	CCTTGCTCAGCTCGGTCCA	CAGCCTTTCACACCATGCC	Primer BLAST
UCP3	GCCCCACAGCCTTCTACAAA	CCGCAGTACCTGGACTTTCA	Primer BLAST
UCP2	ATGACAGACGACCTCCCTTG	GAAGGCATGAACCCCTTGTA	Primer BLAST

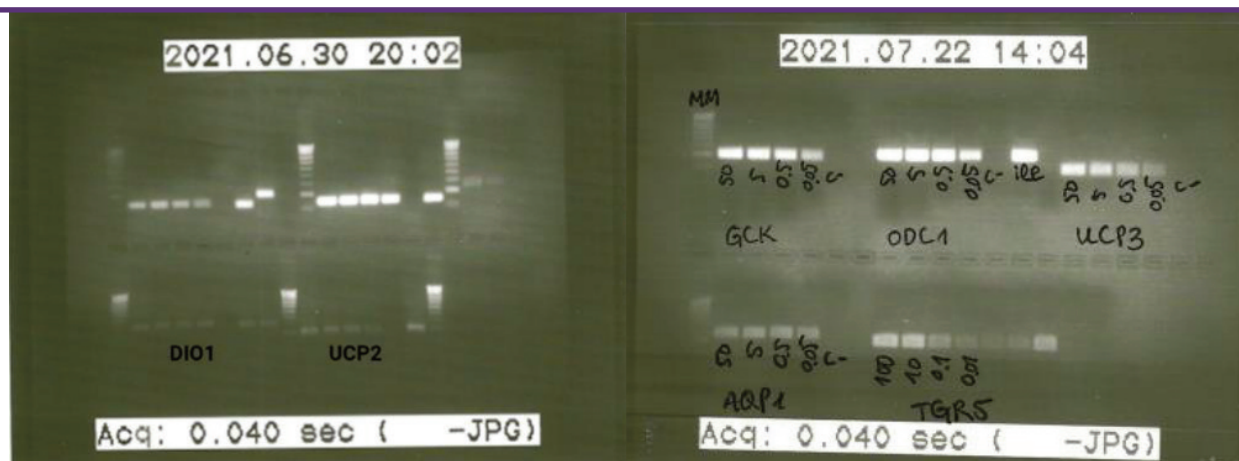


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de las rectas de calibrado de DIO1, UCP2 y UCP3.

Para cada muestra, los volúmenes de reactivos añadidos fueron: 6mL de agua mili-Q estéril, 1 μ L de cebador F (10 μ M), 1 μ L de cebador R (10 μ M), 2 μ L de muestra de ADNc y 10 μ L de SuBR Green Premix Ex Taq (Takara Bio Inc., Japón). La cuantificación de la expresión génica se basa en el método 2-DCt o método de Pfaffl (45). Para el cálculo se utilizó RPS29 como gen de referencia, cuya expresión no varía en función de las condiciones experimentales. En el caso del tejido adiposo el gen de referencia utilizado fue el HPRT1.

3.4. Análisis estadístico

En el análisis estadístico los resultados se expresaron como media \pm error estándar (S.E.) y corresponden a 7-8 animales por grupo. Los efectos del tratamiento fueron analizados mediante análisis de varianza de doble vía (ANOVA). Cuando las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se analizaron mediante la corrección de Bonferroni para identificar la significancia de cada una de las varianzas. Toda la determinación estadística se realizó utilizando el programa informático SPSS (versión 27).

Así, los resultados estadísticamente significativos se indican:

- Con almohadillas (#) si se presentan diferencias estadísticamente significativas (# $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$) entre los descendientes tratados con la misma dieta durante su edad adulta (21 días), pero procedentes de madres tratadas con diferente dieta durante la gestación (Factor madre: M; Madres control vs. Madres fructosa).
- Con asteriscos (*) si se presentan diferencias estadísticamente significativas (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$) entre los descendientes tratados con diferente dieta durante su edad adulta (21 días), pero procedentes de madres tratadas con la misma dieta durante la gestación (Factor dieta: D).
- El valor de η^2 determina la proporción de varianza atribuida a la influencia de la madre (M), de la dieta en la descendencia (D) o a la interacción entre ambos parámetros (M*D).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para facilitar la organización y el análisis de los resultados se han dividido en dos estudios según la dieta de la descendencia en la edad adulta (fructosa versus tagatosa; fructosa versus Western diet) y el tejido implicado (hígado, ileón y TAL).

4.1. Efectos de la fructosa vs tagatosa

4.1.a. T4 libre en plasma

La Tabla 2 muestra los resultados del análisis estadístico de varianza de doble vía (ANOVA) en cuanto a la concentración de T4 libre en plasma. Se puede observar que hay diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,009$) en función de la dieta recibida por la descendencia (machos F1).

Tras la corrección a posteriori de Bonferroni, se muestran los datos obtenidos de la T4 libre en plasma en la Figura 8. Se observa que hay diferencias estadísticamente significativas de los niveles de T4 libre en plasma entre los descendientes macho que tomaron fructosa en el agua de bebida (FF) frente a los que

Tabla 2. ANOVA de doble vía T4 libre en plasma fructosa vs tagatosa. P valor: indica la probabilidad de obtener un valor tan o más extremo al observado, partiendo de la suposición de la igualdad de efecto que marca la hipótesis nula. η^2 : determina la proporción de varianza atribuida a la influencia de la madre (M), a de la dieta en la descendencia (D) o a la interacción entre ambos parámetros (M*D).

2-way ANOVA	PLASMA T4 libre (ng/L)	
	Fructosa vs Tagatosa	
	p	η^2
MADRE	0,131	0,064
DIETA	0,009	0,236
MADRE*DIETA	0,498	0,039

Nutrigenómica y funcionamiento de las hormonas tiroideas, un efecto dependiente de la ingesta materna de fructosa

Carla Marcuccini, Elena Fauste, et al.

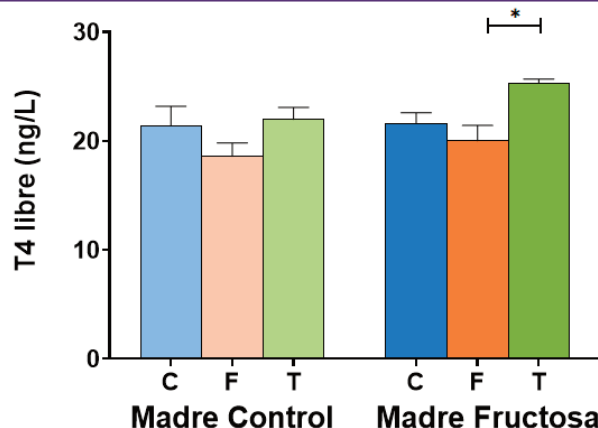


Figura 8. Concentración (ng/L) de T4 libre en plasma de machos F1 tras los 21 días de tratamiento (barra azul: agua-C; barra naranja: fructosa-F; barra verde: tagatosa-T). Las barras más claras pertenecen a los machos F1 descendientes de madres control (recibieron agua sin aditivos durante la gestación), mientras que las oscuras pertenecen a machos F1 descendientes de madres fructosa (recibieron fructosa como tratamiento en el agua de bebida durante la gestación). Los datos presentados son las medias \pm error estándar (S.E.). El símbolo * indica diferencias estadísticamente significativas entre dietas, y el # entre la ingesta materna.

recibieron tagatosa (FT), siendo la dieta de la madre la misma (Madres-Fructosa). Así, el grupo de descendientes que ingirió tagatosa (FT) mostró un aumento significativo frente al suplementado con fructosa, pero sin alcanzar valores significativos frente a los que tomaron agua sin aditivos (FC). Curiosamente, en los descendientes de madres control no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos dietéticos. Estos resultados indican que la ingesta de tagatosa y no de fructosa aumenta la concentración de hormona T4 libre en plasma y que, además, es un efecto dependiente de la dieta materna.

Estudios anteriores han descrito que la ingesta de fructosa puede disminuir la captación de T4 por el hígado, con lo que habría un incremento en plasma, y ese efecto podría estar relacionado con el aumento de norepinefrina observado tras una dieta rica en carbohidratos (46). Además, sugieren que la captación tisular de T4 puede estar regulada por las reservas de energía intracelular, afectando al metabolismo y disponibilidad de la hormona, dado que parece ser que hay dependencia de ATP por parte del hígado en el transporte de yodotironinas (47). Sin embargo, en el presente estudio no se han observado cambios de T4 libre en plasma dependientes del consumo de fructosa y, por el contrario, el aumento que se ha observado se ha producido por la ingesta de la tagatosa, lo cual no

está descrito en la bibliografía y menos que sea dependiente de la dieta materna. Esta falta de efecto mediado por la ingesta de fructosa puede deberse a que los resultados descritos por Hallfrisch et al. en 1983 fueron obtenidos tras un tratamiento a corto plazo y quizás estos efectos no se produzcan a largo plazo, por lo que sería necesario realizar más trabajos en este ámbito.

4.1.b. Hígado

El análisis de varianza ANOVA de doble vía realizado sobre la expresión de DIO1 en el hígado (Tabla 3) muestra que se encuentran diferencias estadísticamente significativas ($p=0,012$) debidas a la influencia de la dieta recibida por la madre en la gestación (M). También hay diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la expresión de THRA ($p=0,008$) en función de la dieta recibida por la descendencia (D). Además, se muestran diferencias estadísticamente significativas en la expresión de UCP2 ($p=0,023$) por la influencia de la dieta recibida por la descendencia (D).

La expresión génica analizada en el hígado tras la corrección de Bonferroni (Figura 9) muestra un perfil muy similar en DIO1 al encontrado para los niveles plasmáticos de T4 (Figura 8), esto es, el mayor nivel de expresión se observa en los hijos de madres-fructosa que consumieron tagatosa (FT), sin alcanzar valores

Tabla 3. ANOVA de doble vía expresión génica de DIO1, THRA y UCP2 en hígado. P valor: indica la probabilidad de obtener un valor tan o más extremo al observado, partiendo de la suposición de la igualdad de efecto que marca la hipótesis nula. η^2 : determina la proporción de varianza atribuida a la influencia de la madre (M), a de la dieta en la descendencia (D) o a la interacción entre ambos parámetros (M*D).

2-way ANOVA	HIG DIO1 (ua)		HIG THRA (ua)		HIG UCP2 (ua)	
	p	η^2	p	η^2	p	η^2
MADRE	0,012	0,166	0,465	0,015	0,771	0,003
DIETA	0,198	0,088	0,008	0,241	0,023	0,205
MADRE*DIETA	0,740	0,017	0,924	0,004	0,131	0,116





Tabla 4. ANOVA de doble vía expresión génica DIO1 y UCP2 íleon. P valor: indica la probabilidad de obtener un valor tan o más extremo al observado, partiendo de la suposición de la igualdad de efecto que marca la hipótesis nula. η^2 : determina la proporción de varianza atribuida a la influencia de la madre (M), a de la dieta en la descendencia (D) o a la interacción entre ambos parámetros (M*D).

2-way ANOVA	ILE DIO1 (ua)		ILE UCP2 (ua)	
	p	η^2	p	η^2
MADRE	0,144	0,058	0,021	0,136
DIETA	0,193	0,087	0,742	0,016
MADRE*DIETA	0,121	0,111	0,043	0,156

diferencias estadísticamente significativas en la expresión de DIO1 tanto por la influencia del tratamiento de la madre (M, $p=0,003$), la influencia del tratamiento recibido por la descendencia (D, $p=0,020$), como por la interacción entre ambos tratamientos (MD, $p=0,016$). También se observan diferencias estadísticamente significativas en la expresión de UCP3 debidas a la interacción entre ambos tratamientos (M*D, $p=0,046$).

En cuanto a la expresión de los genes en el tejido adiposo lumbar tras el test de Bonferroni *a posteriori* (Figura 11) se encontró que, de nuevo, tanto DIO1 como UCP3 presentaban perfiles muy similares. Así, se hallaron diferencias estadísticamente significativas únicamente en los descendientes de madres-control, donde observamos que los animales que recibieron fructosa (CF) presentaron un aumento muy marcado en la expresión de DIO1 comparado con los que consumieron agua (CC) y los que consumieron tagatosa (CT); A su vez, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ese grupo CF y los que consumieron fructosa y eran hijos de madres-fructosa (FF). Se encontraron resultados similares en la expresión de UCP3 (Figura 11) mostrando un

Tabla 5. ANOVA de doble vía expresión génica DIO1 y UCP3 en TAL. P valor: indica la probabilidad de obtener un valor tan o más extremo al observado, partiendo de la suposición de la igualdad de efecto que marca la hipótesis nula. η^2 : determina la proporción de varianza atribuida a la influencia de la madre (M), a de la dieta en la descendencia (D) o a la interacción entre ambos parámetros (M*D).

2-way ANOVA	TAL DIO1 (ua)		TAL UCP3 (ua)	
	p	η^2	p	η^2
MADRE	0,003	0,228	0,289	0,031
DIETA	0,020	0,205	0,269	0,070
MADRE*DIETA	0,016	0,217	0,046	0,158

aumento en los descendientes de madres control suplementados con fructosa (CF) frente a los otros dos grupos (CC o CT) y, por otro lado, también se observaron diferencias significativas de ese grupo CF con respecto a los animales que también tomaron fructosa, pero eran hijos de madres-fructosa (FF).

El consumo de tagatosa en tejido adiposo lumbar no produce un efecto significativo en la expresión génica de las proteínas estudiadas. Por otro lado, la fructosa produce un aumento de la expresión de DIO1 con respecto a la tagatosa y al control en descendientes de madres control, sin embargo, el efecto no se observa en los descendientes de madre fructosa (FF). Se hace patente un efecto significativo en la expresión de UCP3 de la misma forma que en DIO1, la fructosa produce un aumento en la expresión de UCP3 sólo cuando la madre es control. Por tanto, en TAL, al igual que vimos en íleon (pero no en hígado), la fructosa produce en la descendencia cambios tanto en la expresión de DIO1 como de las UCPs, que son dependientes de la ingesta materna y que no están relacionados con los niveles de hormona en plasma.

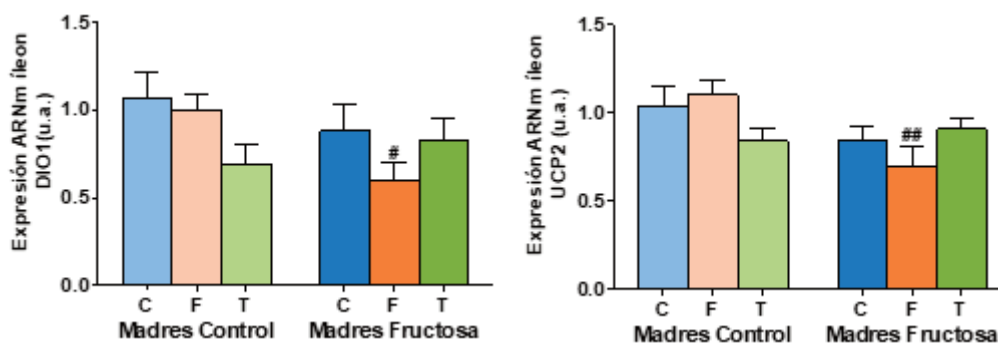


Figura 10. Expresión génica de DIO1 y UCP2 en íleon de machos F1 tras los 21 días de tratamiento (barra azul: agua-C; barra naranja: fructosa-F; barra verde: tagatosa-T). Las barras más claras pertenecen a los machos F1 descendientes de madres control (recibieron agua sin aditivos durante la gestación), mientras que las oscuras pertenecen a machos F1 descendientes de madres fructosa (recibieron fructosa como tratamiento en el agua de bebida durante la gestación). Los datos presentados son las medias \pm error estándar (S.E.). El símbolo * indica diferencias estadísticamente significativas entre dietas, y el # entre la ingesta materna.

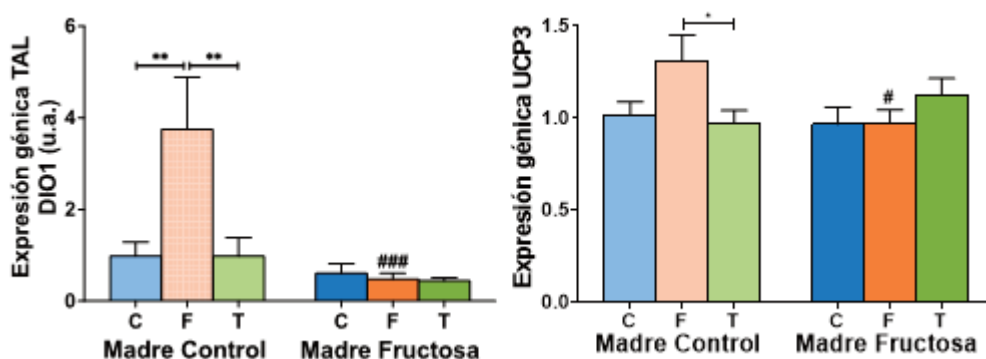


Figura 11. Expresión génica de DIO1, THRa y UCP3 en TAL de machos F1 tras los 21 días de tratamiento (barra azul: agua-C; barra naranja: fructosa-F; barra verde: tagatosa-T). Las barras más claras pertenecen a los machos F1 descendientes de madres control (recibieron agua sin aditivos durante la gestación), mientras que las oscuras pertenecen a machos F1 descendientes de madres fructosas (recibieron fructosa como tratamiento en el agua de bebida durante la gestación). Los datos presentados son las medias \pm error estándar (S.E.). El símbolo * indica diferencias estadísticamente significativas entre dietas, y el # entre la ingesta materna.

4.2. Efectos de la fructosa vs “Western diet” (fructosa + colesterol)

4.2.a. T4 libre en plasma

En cuanto a los efectos producidos por la fructosa vs. fructosa + colesterol en la descendencia, los resultados del análisis estadístico de varianza de doble vía (ANOVA) de la Tabla 6 muestran que no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en los niveles de T4 libre en plasma entre ninguno de los grupos del estudio.

Tras la posterior corrección de los resultados por el test de Bonferroni (Figura 12) tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la concentración (ng/L) de T4 libre en plasma en estos grupos.

4.2.b. Hígado

En cuanto al estudio de los efectos de la fructosa comparado con la administración conjunta de fructosa con colesterol en la expresión de los tres genes, (ANOVA de doble vía) (Tabla 7), se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de DIO1 por la influencia de la dieta recibida por los machos (D, $p=0,049$) y por la interacción de ambos tratamientos ($M*D$, $p=0,001$).

Estas diferencias también se encontraron en la expresión de THRa en el hígado, influenciada por el tratamiento recibido por la descendencia (D, $p=0,021$) y en la expresión de UCP2 en el hígado, en función de la dieta de la descendencia (D, $p=0,003$).

Los resultados de la expresión de los genes medidos en hígado tras aplicar a posteriori la corrección de Bonferroni

Tabla 6. ANOVA de doble vía T4 libre en plasma fructosa vs fructosa + colesterol. P valor: indica la probabilidad de obtener un valor tan o más extremo al observado, partiendo de la suposición de la igualdad de efecto que marca la hipótesis nula. η^2 : determina la proporción de varianza atribuida a la influencia de la madre (M), a de la dieta en la descendencia (D) o a la interacción entre ambos parámetros ($M*D$).

2-way ANOVA		PLASMA	
		T4 libre (ng/L)	
		Fruct vs Fruct+Col	
		p	η^2
MADRE		0,997	0,000
DIETA		0,225	0,086
MADRE*DIETA		0,523	0,039

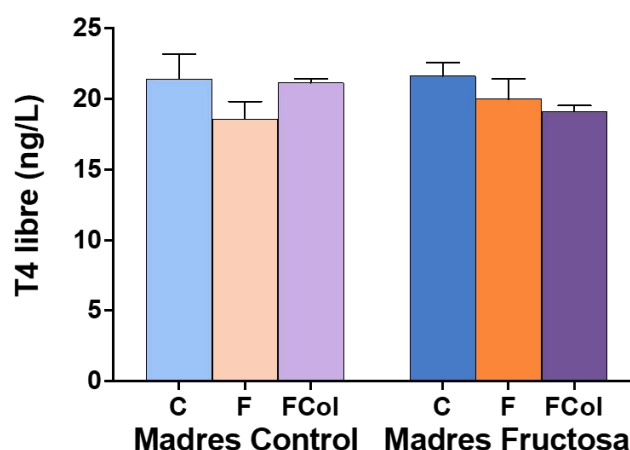


Figura 12. Concentración ng/L T4 libre en plasma de machos F1 tras los 21 días de tratamiento (barra azul: agua-C; barra naranja: fructosa-F; barra morada: fructosa + colesterol-W). Las barras más claras pertenecen a los machos F1 descendientes de madres control (recibieron agua sin aditivos durante la gestación), mientras que las oscuras pertenecen a machos F1 descendientes de madres fructosas (recibieron fructosa como tratamiento en el agua de bebida durante la gestación). Los datos presentados son las medias \pm error estándar (S.E.). El símbolo * indica diferencias estadísticamente significativas entre dietas, y el # entre la ingesta materna.

Tabla 7. ANOVA de doble vía expresión génica DIO1, THRA y UCP2 en hígado. P valor: indica la probabilidad de obtener un valor tan o más extremo al observado, partiendo de la suposición de la igualdad de efecto que marca la hipótesis nula. η^2 : determina la proporción de varianza atribuida a la influencia de la madre (M), a de la dieta en la descendencia (D) o a la interacción entre ambos parámetros (M*D).

2-way ANOVA	HIG DIO1 (ua)		HIG THRA (ua)		HIG UCP2 (ua)	
	p	η^2	p	η^2	p	η^2
MADRE	0,483	0,014	0,632	0,006	0,216	0,045
DIETA	0,049	0,158	0,021	0,189	0,003	0,291
MADRE*DIETA	0,001	0,318	0,987	0,001	0,422	0,049

mostraron, como se observa en la Figura 13, que existe un aumento significativo en la expresión de DIO1 en los animales descendientes de madres control que consumieron fructosa con colesterol (FCol) frente a los que consumieron solamente fructosa (CF) y los que tomaron agua sin aditivos (CC). Sin embargo, dicho efecto no se observó en los descendientes de madres-fructosa y por eso encontramos una diferencia significativa entre dicho grupo FCol y el correspondiente FFCol. Así pues, este efecto en la expresión de DIO1 era debido a la presencia del colesterol en la dieta y dependiente de la dieta materna. Y, al contrario de lo observado con la tagatosa (Figura 9), no está relacionado con los niveles de T4 en plasma.

En cuanto a la expresión de THRA, la disminución debida a la ingesta de fructosa que habíamos encontrado en descendientes de madres-fructosa y, sobre todo, en los de madres control (Figura 9), desaparece cuando dicha fructosa se combina con colesterol en la dieta (Figura 13). Y con respecto a la expresión de UCP2 (Figura 13) se encontró algo curioso, el perfil de los hijos de madres control se asemeja al encontrado para DIO1, mientras que en los machos provenientes de madres-fructosa es más similar al descrito para THRA. Así pues, la expresión del gen diana (UCP2) en los descendientes de madres control experimenta un aumento

provocado por la ingesta de la dieta occidental (FCol) con respecto a los restantes grupos (CC y CF), pero ese efecto no se observó en los descendientes de madres-fructosa. Sin embargo, la disminución observada en la expresión de UCP2 por la ingesta de fructosa en los hijos de madres-fructosa (FF) desaparece tras la adición de colesterol a la dieta (FFCol) alcanzando valores similares a los controles (FC).

4.2.c. Íleon

Los resultados del análisis de varianza ANOVA de doble vía en cuanto a la expresión de los genes en el íleon mostraron que existían diferencias estadísticamente significativas relativas a la expresión de DIO1 en función del tratamiento recibido por la madre (M, $p=0,006$) e influenciado también por la dieta de la descendencia (D, $p=0,025$). Por otro lado, también se observan diferencias estadísticamente significativas en UCP2 ($p=0,003$) influenciadas por el tratamiento recibido por la madre (M) (Tabla 8).

Tras la corrección a posteriori mediante el test de Bonferroni (Figura 14), en cuanto a la expresión génica de DIO1 se observa que la adición de colesterol a la dieta con fructosa acentúa la tendencia a la disminución observada cuando sólo estaba presente

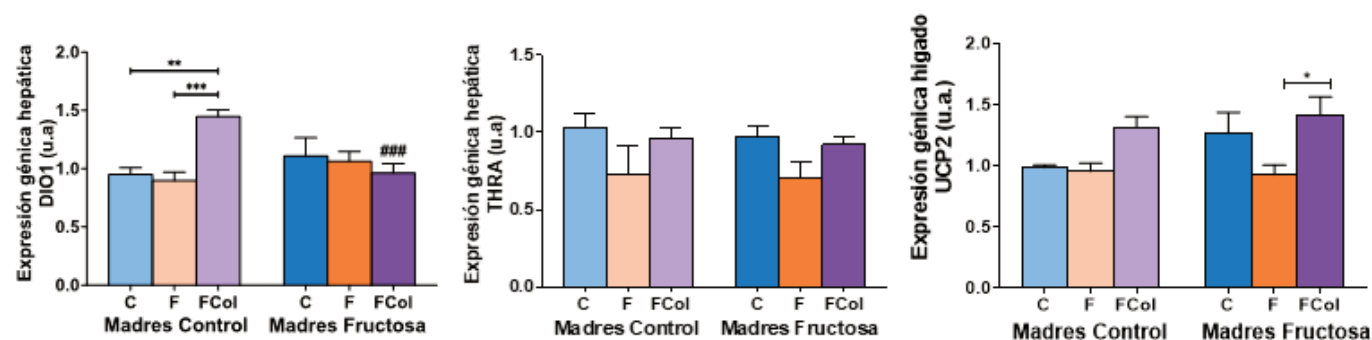


Figura 13. Expresión génica de DIO1, THRA y UCP2 en hígado de machos F1 tras los 21 días de tratamiento (barra azul: agua-C; barra naranja: fructosa-F; barra morada: fructosa + colesterol-FCol). Las barras más claras pertenecen a los machos F1 descendientes de madres control (recibieron agua sin aditivos durante la gestación), mientras que las oscuras pertenecen a machos F1 descendientes de madres fructosa (recibieron fructosa como tratamiento en el agua de bebida durante la gestación). Los datos presentados son las medias \pm error estándar (S.E.). El símbolo * indica diferencias estadísticamente significativas entre dietas, y el # entre la ingesta materna.

Tabla 8.

2-way ANOVA	ILE DIO1 (ua)		ILE UCP2 (ua)	
	p	η^2	p	η^2
MADRE	0,006	0,195	0,003	0,225
DIETA	0,025	0,190	0,783	0,013
MADRE*DIETA	0,659	0,024	0,255	0,073

la fructosa y, de nuevo, es un efecto más evidente en los hijos de madres-fructosa. Con todo, dicha disminución no llega a alcanzar diferencias significativas en comparación con el resto de los grupos.

Sin embargo, en este caso y al contrario de lo observado con la dieta de fructosa (CF vs FF), la tendencia que la Western diet (FFCol) ejerce en la expresión de DIO no se ve reflejada en la expresión de UCP2, ya que no se encuentra modificada.

4.2.1. Tejido Adiposo Lumbar (TAL)

Por último, se estudió la expresión en tejido adiposo lumbar. En este caso, tras la ANOVA de doble vía (Tabla 9) se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de DIO1 influenciada por la dieta recibida por la madre durante la gestación (M, $p=0,006$), por la dieta recibida por la descendencia (D, $p=0,003$) y por la interacción entre ambos tratamientos (M*D, $p=0,004$).

La corrección *a posteriori* por Bonferroni se muestra en la Figura 15. Curiosamente, el aumento significativo en la expresión de DIO1 en este tejido, en el grupo de hijos de madres control que consumieron fructosa en el agua de bebida (CF) comparado con el

Tabla 9. ANOVA de doble vía expresión génica DIO1, THRA y UCP3 en TAL. P valor: indica la probabilidad de obtener un valor tan o más extremo al observado, partiendo de la suposición de la igualdad de efecto que marca la hipótesis nula. η^2 : determina la proporción de varianza atribuida a la influencia de la madre (M), a de la dieta en la descendencia (D) o a la interacción entre ambos parámetros (M*D).

2-way ANOVA	TAL DIO1 (ua)		TAL UCP3 (ua)	
	p	η^2	p	η^2
MADRE	0,006	0,199	0,195	0,049
DIETA	0,003	0,282	0,217	0,086
MADRE*DIETA	0,004	0,267	0,061	0,152

grupo control (CC), no se observó cuando se añadió colesterol asociado a fructosa (FFCol). Esa adición de colesterol a la dieta con fructosa tampoco fue capaz de inducir cambios en la expresión de DIO1 en los hijos de madres fructosa (FFCol), al igual que había ocurrido con los que sólo tomaron fructosa (FF). Se encontraron resultados similares en la expresión génica de UCP3. La adición de colesterol a la dieta anuló el efecto inductor de la fructosa (la cual alcanzaba a ser cuasi-significativa, $p = 0,051$, CF frente a CC) en los descendientes de madres control (Figura 15).

Así pues, se observa que el efecto de la ingesta de fructosa en descendientes de madres control aumenta la expresión génica de DIO1 y de UCP3, efecto que no se observó cuando la madre se trató con fructosa durante la gestación. La ingesta conjunta de fructosa y colesterol no produjo el mismo efecto que el consumo de fructosa sola.

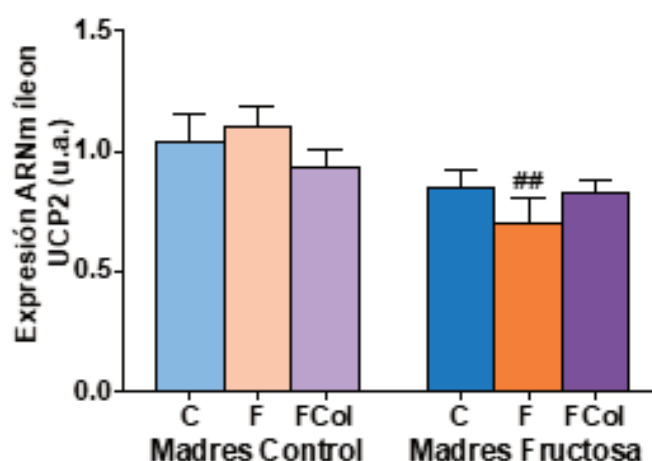
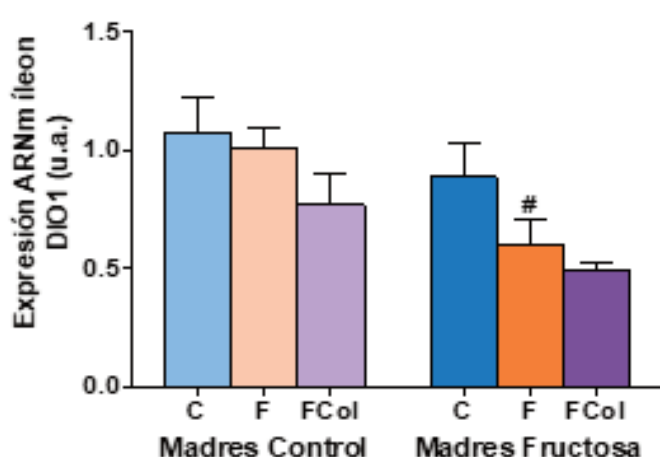


Figura 14. Expresión génica de DIO1 y UCP2 en íleon de machos F1 tras los 21 días de tratamiento (barra azul: agua-C; barra naranja: fructosa-F; barra morada:fructosa + colesterol-FCol). Las barras más claras pertenecen a los machos F1 descendientes de madres control (recibieron agua sin aditivos durante la gestación), mientras que las oscuras pertenecen a machos F1 descendientes de madres fructosa (recibieron fructosa como tratamiento en el agua de bebida durante la gestación). Los datos presentados son las medias \pm error estándar (S.E.). El símbolo * indica diferencias estadísticamente significativas entre dietas, y el # entre la ingesta materna.

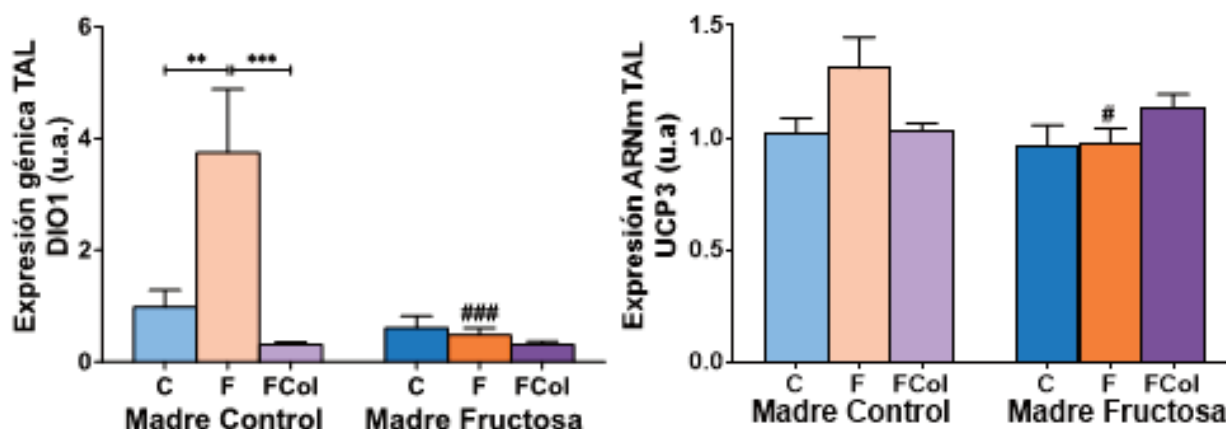


Figura 15. Expresión génica de DIO1 y UCP3 en TAL de machos F1 tras los 21 días de tratamiento (barra azul: agua-C; barra naranja: fructosa-F; barra morada: fructosa + colesterol-FCol). Las barras más claras pertenecen a los machos F1 descendientes de madres control (recibieron agua sin aditivos durante la gestación), mientras que las oscuras pertenecen a machos F1 descendientes de madres fructosa (recibieron fructosa como tratamiento en el agua de bebida durante la gestación). Los datos presentados son las medias \pm error estándar (S.E.). El símbolo * indica diferencias estadísticamente significativas entre dietas, y el # entre la ingesta materna.

Conflictos de Interés

Los autores declaran no tener ningún tipo de conflicto de interés, aceptando las bases de este premio.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente estudio en relación a los resultados obtenidos son:

- Los niveles de T4 libre en plasma se ven incrementados por el consumo de tagatosa en los descendientes de madres fructosa, no observándose dicho efecto ni con la ingesta de fructosa ni con la combinación de ésta con colesterol. Además, este es un efecto claramente dependiente de la dieta materna.
- Los cambios observados en la T4 libre sólo afectaron a la expresión de DIO1 en hígado y no en el resto de los tejidos.
- La expresión del gen diana para hormonas tiroideas estudiado en el presente trabajo (UCP2) presentó un perfil en hígado más similar al observado para THRa que al de T4 o al de DIO1, lo que confirma la posibilidad de que estos receptores puedan regular la expresión génica también en ausencia de ligando.
- Tanto en íleon como en tejido adiposo lumbar, los perfiles de expresión encontrados para DIO1 y UCP son similares y experimentan cambios inducidos por el consumo de fructosa, observándose un aumento de ambas proteínas en el tejido adiposo lumbar de los descendientes de madres control. Nuevamente estos efectos fueron dependientes de la ingesta materna.

- Los efectos observados por el consumo de fructosa en hígado (para THRa y UCP2) y en TAL (para DIO1 y UCP3), no se encontraron tras la adición de colesterol en la dieta. Sin embargo, los efectos de fructosa en íleon (para DIO1) sí que se vieron potenciados por la presencia de colesterol.
- Con todos estos resultados, podemos confirmar que el consumo de fructosa materno durante la gestación afecta al metabolismo de las hormonas tiroideas de la descendencia, tanto en respuesta a una dieta rica en fructosa como en forma de “Western diet” (fructosa y colesterol) poniendo de manifiesto un claro efecto de programación fetal.
- Este trabajo pretende alertar a la población, en especial a las mujeres embarazadas del papel relevante que ejerce la nutrición durante este periodo, dado que puede tener consecuencias negativas, no solo en la propia salud de la madre, sino también en la salud de sus hijos en la etapa adulta. El papel del farmacéutico es esencial y clave en este proceso al poder ejercer su consejo dietético en la oficina de farmacia insistiendo a las embarazadas en la necesidad de adquirir hábitos saludables asociados a un consumo limitado de azúcares y de alimentos procesados, para evitar las consecuencias indeseables de su ingesta en la salud de sus hijos.

Índice de abreviaturas

- DIO: desyodasa (deiodinase)
- UCP: proteína desacoplante (uncoupling protein)
- THR: receptor nuclear de hormonas tiroideas (thyroid hormone nuclear receptor)
- TAL: tejido adiposo lumbar (lumbar adipose tissue)

Agradecimientos

Los autores agradecen a J.M. Garrido y su equipo su ayuda en el manejo de los animales. Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICIN) (PID2020-118054RB-I00/MCIN/AEI/10.13039/501100011033). Elena Fauste disfrutó de una beca FPU del MICIN.

6. REFERENCIAS

1. Lee W., Wu K.L.H., Leu S. and Tain Y.L. (2018). "Translational insights on developmental origins of metabolic syndrome: Focus on fructose consumption". *Biomedical Journal* 41(2). 96-101. doi:10.1016/j.bj.2018.02.006
2. Girirajan, S., Campbell, C., and Eichler, E. (2011). "Added sugars intake across the distribution of US children and adult consumers: 1977–2012". *Physiology & Behavior*, 176(5), 139–148. doi:10.1016/j.jand.2016.06.003.
3. Hanover, L. M., and White, J. S. (1993). "Manufacturing, composition, and applications of fructose". *The American journal of clinical nutrition*, 58(5 Suppl), 724S–732S. doi:10.1093/ajcn/58.5.724S
4. Dornas, W. C., de Lima, W. G., Pedrosa, M. L., and Silva, M. E. (2015). "Health implications of high-fructose intake and current research". *Advances in Nutrition*, 6(6), 729–737. doi:10.3945/an.114.008144
5. Bray, G.A., Nielsen, S.J. and Popkin, B.M. (2004) "Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity," *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(4), pp. 537–543. doi:10.1093/ajcn/79.4.537.
6. Myles, I. A. (2014). "Fast food fever: reviewing the impacts of the Western diet on immunity". *Nutr J*, 13, 61. doi:10.1186/1475-2891-13-61
7. Cena, H., and Calder, P. C. (2020). "Defining a Healthy Diet: Evidence for The Role of Contemporary Dietary Patterns in Health and Disease". *Nutrients*, 12(2). doi:10.3390/nu12020334
8. Taskinen, M. R., Packard, C. J., and Borén, J. (2019a). "Dietary fructose and the metabolic syndrome". *Nutrients*, 11(9), 1–16. doi:10.3390/nu11091987
9. Younossi, Z. M. (2019). "Non-alcoholic fatty liver disease — A global public health perspective". *Journal of Hepatology*, 70(3), 531–544. doi:10.1016/j.jhep.2018.10.033
10. Mellor, K. M., Ritchie, R. H., Davidoff, A. J., and Delbridge, L. M. D. (2010). "Elevated dietary sugar and the heart: experimental models and myocardial remodeling". *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 88, 525–540. doi:10.1139/Y10-005
11. Durante, M., Sgambellone, S., Lucarini, L., Failli, P., Laurino, A., Collotta, D., Provensi, G., Masini, E., and Collino, M. (2021). "D-Tagatose Feeding Reduces the Risk of Sugar-Induced Exacerbation of Myocardial I/R Injury When Compared to Its Isomer Fructose". *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8(April), 1–12. doi:10.3389/fmolb.2021.650962
12. Chan, A. M. L., Ng, A. M. H., Mohd Yunus, M. H., Idrus, R. B. H., Law, J. X., Yazid, M. D., Chin, K. Y., Shamsuddin, S. A., and Lokanathan, Y. (2021). "Recent developments in rodent models of high-fructose diet-induced metabolic syndrome: A systematic review". *Nutrients*, 13(8), 1–21. doi:10.3390/nu13082497
13. Agodi, A. et al. (2018) "Association of dietary patterns with metabolic syndrome: Results from the kardioVize brno 2030 study," *Nutrients*, 10(7). doi:10.3390/nu10070898.
14. Williams, J. (2013). "The Effect of D-Tagatose on Fructose Absorption in a Rat Model". *Journal of Developing Drugs*, 02(03). doi:10.4172/2329-6631.1000111
15. Levin G. V. (2002). "Tagatose, the new GRAS sweetener and health product". *Journal of medicinal food*, 5(1), 23–36. doi:10.1089/109662002753723197
16. Levin, G. V., Zehner, L. R., Saunders, J. P. and Beadle, I. R. (1995). "Sugar substitutes, their energy values, bulk characteristics and potential health benefits". *Am. Clin. Nutr.* 62 (suppl. 1): 1161S1168S
17. Vastenavond, Christian & Bertelsen, Hans & Hansen, S.J. & Laursen, R.S. & Saunders, James & Eriknaue, K. (2016). "Tagatose (D-tagatose)".
18. Donner, T. W., Wilber, J. F., and Ostrowski, D. (1999). "D-tagatose, a novel hexose: acute effects on carbohydrate tolerance in subjects with and without type 2 diabetes". *Diabetes, obesity & metabolism*, 1(5), 285–291. doi:10.1046/j.1463-1326.1999.00039.x
19. Kim P. (2004). "Current studies on biological tagatose production using L- arabinose isomerase: a review and future perspective". *Applied microbiology and biotechnology*, 65(3), 243–249. doi:10.1007/s00253-004-1665-8
20. Collotta, D., Lucarini, L., Chiazza, F., Cento, A. S., Durante, M., Sgambellone, S., Chini, J., Baratta, F., Aragno, M., Mastrocola,



- R., Masini, E., and Collino, M. (2018). "Reduced susceptibility to sugar-induced metabolic derangements and impairments of myocardial redox signaling in mice chronically fed with D-tagatose when compared to fructose". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. doi:10.1155/2018/5042428.
21. Herrera, E.; Ramos M.P.; Roca P.; and Viana, M.: "Bioquímica Básica". Ed. Elsevier, 2014.
22. Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; and Cox M.M.: "Principios de Bioquímica". 5ª Edición. Ed. Omega, S.A. Barcelona. 2009.
23. Sun, S. z., and Empie, M. W. (2012). "Fructose metabolism in humans--what isotopic tracer studies tell us.: University at Albany Libraries eDiscover Service". *Nutrition and Metabolism*, 9(89), 1–15.
24. Douvard, V., and Ferraris, R. P. (2008). "Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease". *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 295(2). doi:10.1152/ajpendo.90245.2008
25. Mráček, T., Drahota, Z., and Houšťek, J. (2013). "The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues". *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1827(3), 401–410. doi:10.1016/j.bbabi.2012.11.014
26. Krause, N., and Wegner, A. (2020). "Fructose Metabolism in Cancer". *Cells*, 9(12). doi:10.3390/cells9122635
27. Lu, Y., Levin, G. V., and Donner, T. W. (2008). "Tagatose, a new antidiabetic and obesity control drug". *Diabetes, obesity and metabolism*, 10(2), 109-134. doi:10.1111/j.1463-1326.2007.00799.x
28. Mendoza A., and Hollenberg A.N. (2017). "New insights into thyroid hormone action". *Pharmacology & Therapeutics*, 173, 135-145. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.02.012.
29. Brent, G. A. (2012). "Mechanisms of thyroid hormone action". In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 122, Issue 9, pp. 3035–3043). doi:10.1172/JCI60047.
30. Mullur, R., Liu, Y. Y., and Brent, G. A. (2014). "Thyroid hormone regulation of metabolism". *Physiological reviews*, 94(2), 355–382. doi:10.1152/physrev.00030.2013
31. Williams, G. R., and Bassett, J. H. D. (2011). "Local control of thyroid hormone action: Role of type 2 deiodinase". In *Journal of Endocrinology* (Vol. 209, Issue 3, pp. 261–272). doi:10.1530/JOE-10-0448
32. Visser, W. E., Friesema, E. C., Jansen, J., and Visser, T. J. (2007). "Thyroid hormone transport by monocarboxylate transporters. Best practice & research". *Clinical endocrinology & metabolism*, 21(2), 223–236. doi:10.1016/j.beem.2007.03.008
33. van der Deure, W. M., Peeters, R. P., and Visser, T. J. (2010). "Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters". *Journal of molecular endocrinology*, 44(1), 1–11. doi:10.1677/JME-09-0042
34. Benjamin Chun-Kit Tong (2017) "乳鼠心肌提取 HHS Public Access," *Physiology & behavior*, 176(5), pp. 139–148. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.02.012.New.
35. Gereben, B., Zavacki, A. M., Ribich, S., Kim, B. W., Huang, S. A., Simonides, W. S., Zeöld, A., and Bianco, A. C. (2008). "Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling". *Endocrine reviews*, 29(7), 898–938. doi:10.1210/er.2008-0019
36. Brand, M.D. and Esteves, T.C. (2005) "Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3," *Cell Metabolism*, 2(2), pp. 85–93. doi:10.1016/j.cmet.2005.06.002.
37. Aguilar Salinas, C.A. (2002) "Las proteínas desacoplates en la patogenia de la obesidad," *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 10(3), pp. 165–170. Available at: <http://www.medigraphic.com/pdfs/endoc/er-2002/er023j.pdf>.
38. Bruinstroop, E., Zhou, J., Tripathi, M., Yau, W. W., Boelen, A., Singh, B. K., and Yen, P. M. (2021a). "Early induction of hepatic deiodinase type 1 inhibits hepatosteatosis during NAFLD progression". *Molecular Metabolism*, 53(June), 101266. doi:10.1016/j.molmet.2021.101266
39. Hales, C.N., and Barker, D.J.P. "Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis". *Diabetologia* 35, 595–601 (1992). doi:10.1007/BF00400248
40. Wahlqvist, M. L., Krawetz, S. A., Rizzo, N. S., Dominguez-Bello, M. G., Szymanski, L. M., Barkin, S., Yatkine, A., Waterland, R. A., Mennella, J. A., Desai, M., Ross, M. G., Krebs, N. F., Young, B. E., Wardle, J., Wrann, C. D., and Kral, J. G. (2015). "Early-life influences on obesity: From preconception to adolescence". *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1347(1), 1–28. doi:10.1111/nyas.12778
41. Kwon, E. J., and Kim, Y. J. (2017). "What is foetal programming?: A lifetime health is under the control of in utero health". *Obstetrics and Gynecology Science*, 60(6), 506–519. doi:10.5468/ogs.2017.60.6.506
42. Fauste, E., Panadero, M. I., Donis, C., Otero, P., and Bocos, C. (2021). "Pregnancy is enough to provoke deleterious effects in descendants of fructose-fed mothers and their fetuses". *Nutrients*, 13(10). doi:10.3390/nu13103667



43. Portha, B., Grandjean, V., and Movassat, J. (2019). "Mother or father: Who is in the front line? Mechanisms underlying the non-genomic transmission of obesity/diabetes via the maternal or the paternal line". *Nutrients*, 11(2). doi:10.3390/nu11020233
44. Herráez, Á. (2010). Análisis de biomarcadores empleando biochips y matrices de biomoléculas. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.
45. Pfaffl M.W., (2001) "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR". *Nucleic Acids Research*, 29 (9). e45-e45.
46. Judith Hallfrisch, Ph.D., Sheldon Reiser, Ph. D., and Elizabeth S. Prather, Ph.D., J.J. Canary, M. D. (1983). "Relationships of glucoregulatory hormones in normal and hyperinsulinemic men consuming fructose". 3(c), 119–128.
47. Jong, M. de, Docter, R., Bernard, B. F., M Van Der Heijden, J. T., van Toor, H., Krenning, E. P., Hennemann, G., Jong, D., Dotter, R., M van der Heijden, J. T., and van Toor, H. (n.d.). "T4 uptake into the perfused rat liver and liver T4 uptake in humans are inhibited by fructose". www.physiology.org/journal/ajpendo
48. Solmonson, A., & Mills, E. M. (2016). Uncoupling Proteins and the Molecular Mechanisms of Thyroid Thermogenesis. *Endocrinology*, 157(2), 455–462. <https://doi.org/10.1210/en.20151803>

Si desea citar nuestro artículo:

Nutrigenómica y funcionamiento de las hormonas tiroideas, un efecto dependiente de la ingesta materna de fructosa

Carla Marcuccini, Elena Fauste, Madelín Pérez, Antonio Canoyra, Cristina Donis, María Isabel, Paola Otero y Carlos Bocos de Prada.

An Real Acad Farm (Internet].

An. Real Acad. Farm.Vol. 89. nº (2023) · pp. 245-263

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2023.89.03.01>

DISEÑO Y EVALUACIÓN COMPUTACIONAL DE LYTACS PARA LA DEGRADACIÓN SELECTIVA DE MMP-2

COMPUTATIONAL DESIGN AND EVALUATION OF LYTACS FOR THE SELECTIVE DEGRADATION OF MMP-2

Laura Márquez Cantudo, Cristina Valverde López-Gallego, Claire Coderch Boué y Beatriz Pascual-Teresa Fernández

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

correspondingauthor: claire.coderchboue@ceu.es; bpaster@ceu.es

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Premio GSK del Concurso Científico RANF 2022

RESUMEN

Los LYTACs (*LYsosome TArgeting Chimeras*) son una novedosa estrategia farmacológica basada en la degradación dirigida de proteínas extracelulares y transmembrana. Su mecanismo de acción se basa en la utilización de un receptor de membrana para internalizar a una proteína diana y promover su degradación lisosomal. Hasta la fecha, su desarrollo se ha basado en el uso de anticuerpos para la unión a la proteína diana, lo cual presenta ciertas desventajas desde el punto de vista farmacocinético y sintético. El objetivo de este trabajo es diseñar un LYTAC capaz de inducir la degradación selectiva de MMP-2 (LYTAC-MMP2), una metaloproteasa de la matriz que se encuentra sobreexpresada en diversos tipos de cáncer. LYTAC-MMP2 está formado por un ligando del receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes (CI-MPR) y un inhibidor selectivo de MMP2 previamente descrito. Se han empleado métodos computacionales de modelado por homología, *docking* y dinámica molecular para estudiar el receptor CI-MPR y su mecanismo de internalización, así como para la comparación del comportamiento dinámico libre en agua de un ligando de CI-MPR descrito en la bibliografía y el LYTAC-MMP2.

ABSTRACT

LYTACs (*LYsosome TArgeting Chimeras*) are a novel pharmacological strategy based on the targeted protein degradation of extracellular and transmembrane proteins. Their mechanism of action is based on the use of a membrane receptor to internalize a target protein and mediate its lysosomal degradation. To date, its development has been focused on the use of antibodies for target binding, which has certain disadvantages from the pharmacokinetic and synthetic point of view. The aim of this work is to design a LYTAC capable of inducing the selective degradation of MMP-2 (LYTAC-MMP2), a matrix metalloprotease that is overexpressed in many types of cancer. LYTAC-MMP2 consists of a cation-independent mannose-6-phosphate receptor (CI-MPR) ligand and a selective MMP-2 inhibitor, previously described, developed by our research group. Computational methods of homology modelling, docking and molecular dynamics have been used to study the CI-MPR receptor and its internalization mechanism, as well as for the comparison of the dynamic behaviour in water of a CI-MPR ligand described in the literature and LYTAC-MMP2.

Palabras Clave:

LYTAC
MMPs
degradación de proteínas
dinámica molecular

Keywords:

LYTACs
MMPs
protein degradation
molecular dynamics

1. INTRODUCCIÓN

Los organismos inferiores y superiores constan de una maquinaria celular específica con la que mantienen un equilibrio entre la expresión y la degradación de proteínas para el correcto funcionamiento celular. En células eucariotas, los principales sistemas son el Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS) y el sistema endo-lisosomal (1).

El UPS está formado por un conjunto de enzimas que se encarga del marcaje de proteínas intracelulares con moléculas de ubiquitina, y por la proteasoma 26S cuya función es el reconocimiento de estas proteínas ubiquitinadas y su posterior degradación (2). Por otro lado, el papel del sistema endo-lisosomal es la degradación de proteínas extracelulares o de membrana que han sido previamente glicosiladas (3). La disfunción de ambos sistemas se ha visto relacionada con el origen de procesos patológicos tales como el cáncer y enfermedades neurodegenerativas (especialmente en la enfermedad de Alzheimer), por lo que tanto el estudio de su funcionamiento, como la búsqueda de ligandos que puedan modular su actividad, se ha convertido en uno de los campos que más interés está despertando en los últimos años en el ámbito del descubrimiento de fármacos (2).

1.1 Sistema endo-lisosomal para la degradación de proteínas

En las células eucariotas, las vías endocítica y secretora están organizadas en varios compartimentos celulares conectados a través de pequeñas vesículas. Entre sus funciones fisiológicas se encuentran el mantenimiento de la composición lipídica y proteica de la célula, el transporte de componentes a/desde la membrana plasmática, así como el control del tamaño y composición de distintos orgánulos. Ambas vías presentan un componente común, el lisosoma. Estos son orgánulos ácidos encargados del metabolismo degradativo de macromoléculas extra e intracelulares en procesos endocíticos, fagocíticos y autofágicos, respectivamente (4). Además, están formados por un conjunto de enzimas hidrolasas, proteasas, glicosidasas y lipasas en las que recae su capacidad degradativa (5).

La vía endo-lisosomal (Figura 1) comienza con la invaginación de la membrana plasmática, ya sea a través de un mecanismo mediado por clatrina o por receptores de membrana, y la consecuente formación de una pequeña vesícula en el interior de la célula. Esta vesícula se fusiona con una endosoma temprano, cuyo interior ligeramente ácido propicia la disociación de la macromolécula extracelular endocitada y su receptor. En este punto, el receptor puede ser devuelto a la membrana o incorporarse a la

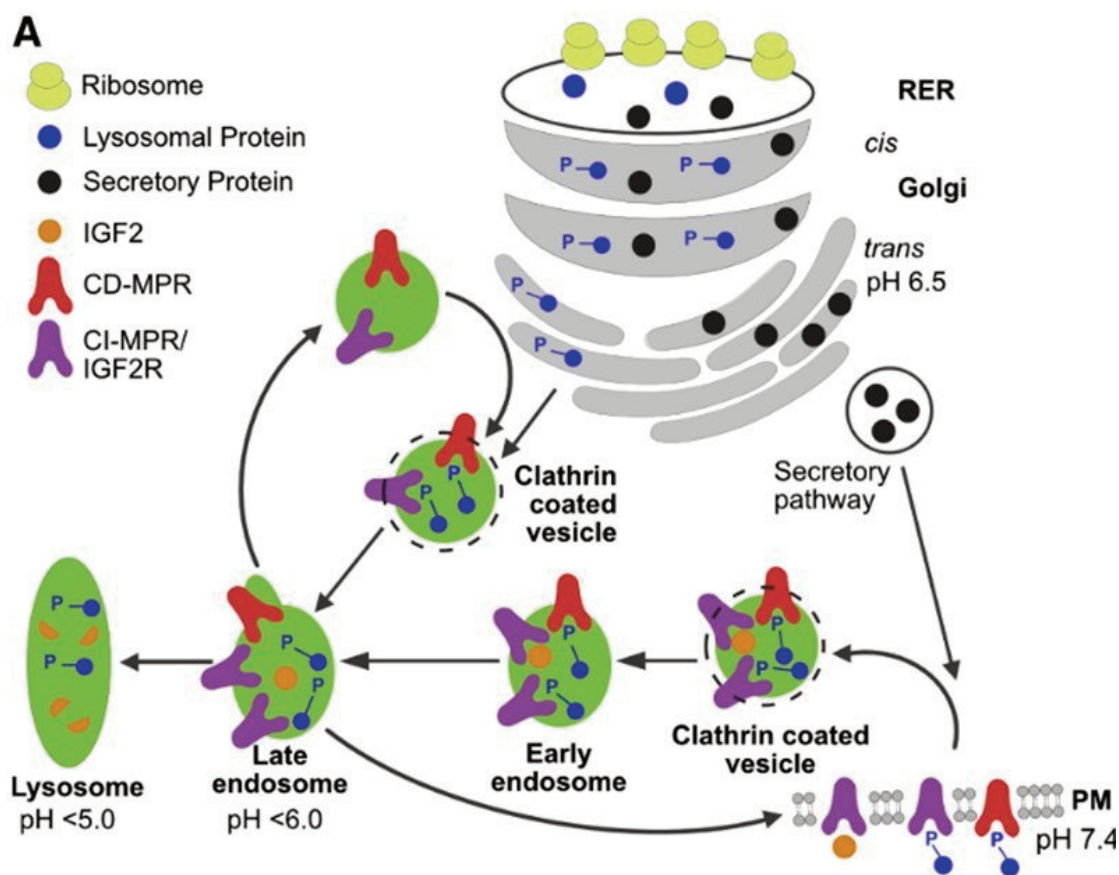


Figura 1. Representación gráfica de la vía endo-lisosomal mediada por los receptores CI-MPR y CD-MPR. Imagen extraída del artículo de L. J. Olson et al. (5)

red *trans*-Golgi (TGN; "*trans-Golgi Network*"). Mientras tanto, la endosoma temprano madura a endosoma tardío donde comienza la degradación de la carga endosomal, que terminará en los lisosomas (6).

Las enzimas lisosomales se sintetizan en el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi y, a continuación, entran a formar parte de la TGN. Para que estas enzimas sean transportadas hasta los lisosomas deben estar glicosiladas con residuos de manosa-6- fosfato (M6P), o bien, con fosfodiésteres de manosa-6- fosfato N-acetilglucosamina (Man-P-GlcNAc), (7) que harán que sean reconocidas y transportadas por el receptor de manosa-6- fosfato independiente de cationes (CI-MPR) o por el receptor de manosa-6- fosfato dependiente de cationes (CD-MPR) (8). Además, a pH fisiológico, CI-MPR también puede encontrarse en la membrana plasmática y mediar la endocitosis tanto de hidrolasas lisosomales extracelulares como de otras proteínas no glicosiladas (Figura 2) (6).

1.2 Receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes (CI-MPR)

CI-MPR es un receptor transmembrana de 300 kDa implicado en diversos procesos fisiológicos relacionados con la génesis lisosomal, el tráfico intracelular y extracelular de proteínas, así como la regulación del crecimiento y movilidad celular (5). Asimismo, ha sido estudiado como diana para el tratamiento del cáncer y enfermedades lisosomales (9).

Las principales localizaciones subcelulares de este receptor son el aparato de Golgi (90%) y la membrana plasmática (10%), en esta última cumple una función fundamentalmente endocítica (10). Además de internalizar hidrolasas extracelulares glicosiladas, presenta como sustratos al factor de crecimiento de insulina II (IGF2), plasminógeno y fibronectina, entre otros (11). IGF2 es un pequeño polipéptido similar estructuralmente a la insulina que lleva a cabo funciones relacionadas con la migración, diferenciación, crecimiento y supervivencia celular debido a su interacción con el receptor de factor de crecimiento de insulina I (IGF1R) (12). Dada la relevancia biológica de IGF2, CI-MPR también puede recibir el nombre de receptor del factor de crecimiento de insulina II (IGF2R), puesto que es capaz de disminuir la concentración extracelular de este a nivel local y circulante (10).

CI-MPR (Figura 2a) se compone principalmente de 15 dominios extracelulares de unos 150 aminoácidos cada uno que presentan una estructura conservada de barril β y a los que se les denomina dominios homólogos del receptor de manosa-6-fosfato (MRH), puesto que presentan entre un 15 y 38% de identidad de secuencia (13). A pesar de esto, tan solo los dominios MRH3, 5, 9 y 15 reconocen azúcares derivados de manosa (14). Su sitio de unión está altamente conservado y se compone principalmente por la secuencia "QREY" (Glutamina, Arginina, ácido Glutámico, Tirosina), clave para el reconocimiento de este azúcar. Los aminoácidos glutamina (Q), arginina (R) y tirosina (Y) están localizados en las láminas β 3, β 8 y β 9, respectivamente, mientras que el ácido glutámico (E) lo está en el Loop D (entre las láminas β 8 y β 9)

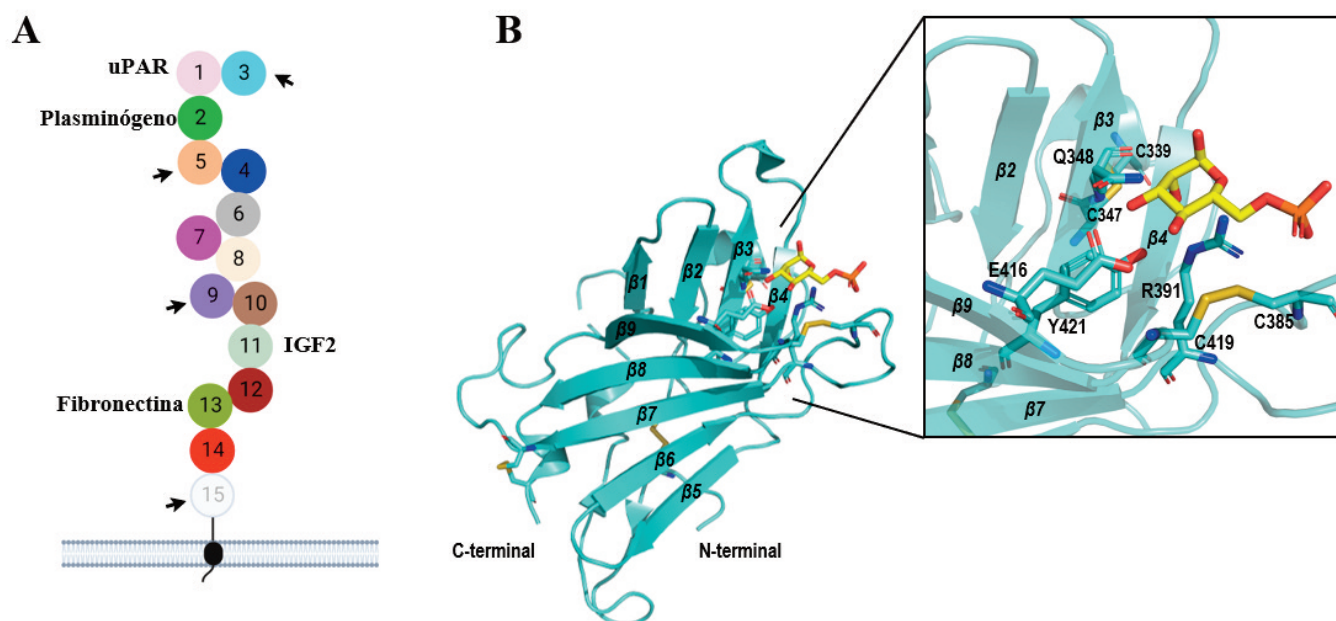


Figura 2. (A) Esquema del receptor CI-MPR adaptado del trabajo de L. J. Olson et al. (5) Las flechas indican la posición de los dominios de reconocimiento de azúcares. (B) Estructura general de un dominio de reconocimiento de azúcares (dominio MRH3, extraído del PDB código 1SZ0). Esta imagen ha sido generada con PyMOL (16)

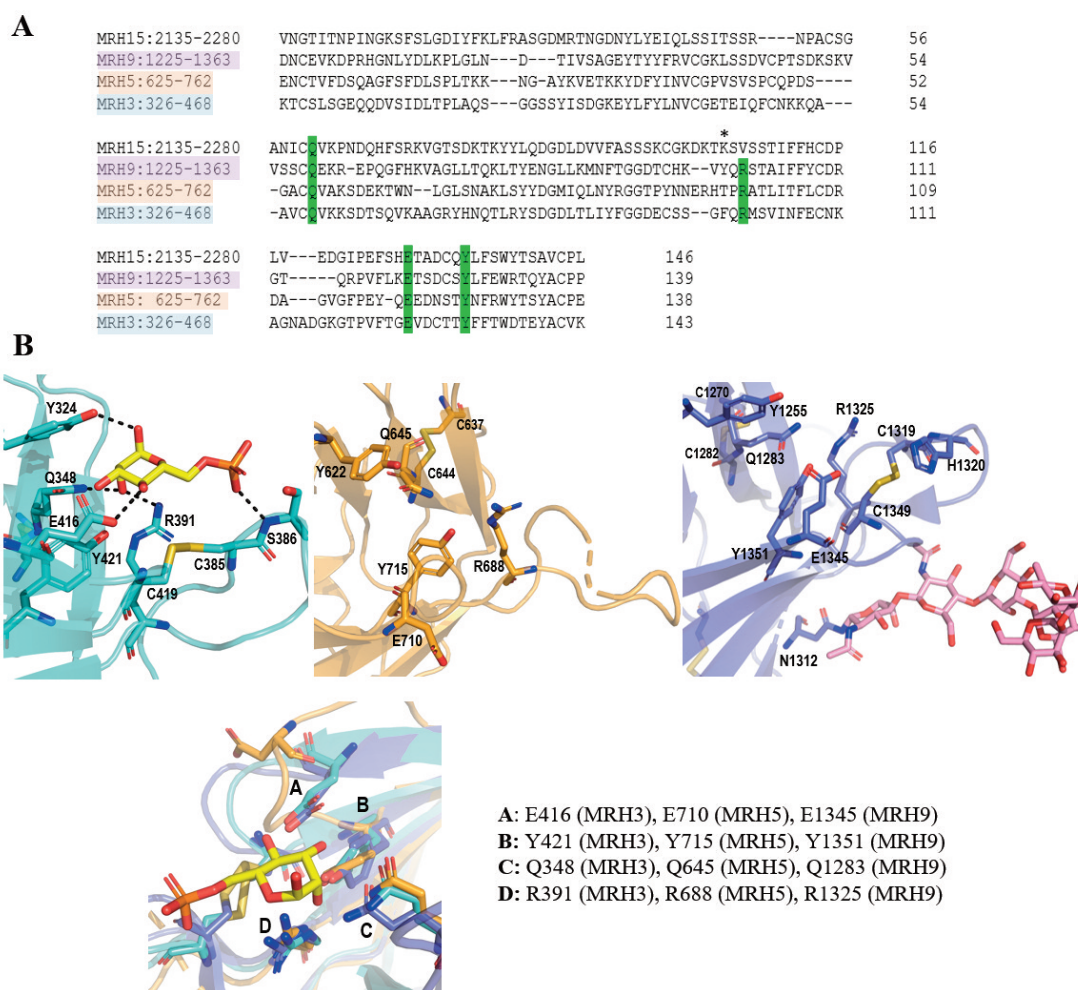


Figura 3. (A) Alineamiento de las secuencias de los dominios MRH3, MRH5, MRH9 y MRH15 llevada a cabo con Clustal Omega (19). (B) Estructuras tridimensionales de los dominios MRH3 (izquierda, azul), MRH5 (centro, naranja) y MRH9 (derecha, violeta) depositadas en el PDB bajo los códigos 1S20, 6V02 y 6Z32, respectivamente. El ligando M6P se muestra en color amarillo (código PDB 1S20), mientras que la glicosilación del dominio MRH9 (código PDB 6Z32) aparece en rosa. En la parte inferior, se muestra una superposición del sitio de unión a azúcares donde se destaca la secuencia consenso "QREY". El dominio MRH15 ha sido omitido porque no se dispone de estructura cristalográfica. Estas imágenes han sido generadas con PyMOL (16).

(Figura 2b). No obstante, como se puede observar en el alineamiento de secuencias mostrado en la Figura 3a, los dominios MRH3, 5 y 9 presentan la secuencia "QREY" completa, mientras que MRH15 posee un residuo de valina en vez de arginina (15).

A pesar de su elevada homología, ligeros cambios estructurales en el sitio de unión a manosa hacen que estos dominios difieran en cuanto a su especificidad por el sustrato. Los dominios MRH3 y MRH9 reconocen específicamente a monoésteres de M6P,(14) (17) mientras que el dominio MRH5 es exclusivo de fosfodiésteres de Man-P-GlcNAc,(7) y MRH15 reconoce tanto a monoésteres como a fosfodiésteres.(15) Los dominios MRH5 y MRH15 no presentan un enlace disulfuro adyacente al sitio de unión de manosa, mientras que MRH3 y MRH9 sí, por lo que el bolsillo es de mayor tamaño y puede abarcar ligandos más voluminosos como los fosfodiésteres de Man-P-GlcNAc (7, 15). Por otro lado, los dominios MRH3 y MRH9 contienen aminoácidos clave para la interacción con monoésteres de M6P. El dominio MRH3 presenta un

residuo de S386 (código PDB 1S20) que interacciona con el grupo fosfato de M6P, cuya posición ocupa la H1320 (código PDB 6Z32) en el dominio MRH9 (Figura 3b) (17). El residuo H1320 ha sido descrito como un aminoácido esencial para la especificidad de este dominio por monoésteres de M6P.(18) Asimismo, en el caso de MRH3, la cooperación entre los dominios MRH1-3 hace que incremente en 1000 veces la afinidad por este sustrato (7). En el caso de MRH15, aunque no se dispone de estructura cristalográfica, ha sido estudiada la naturaleza de la interacción de este dominio con M6P. En 2015, L. J. Olson et al. (15) construyeron un modelo del dominio MRH15 y mediante estudios de mutagénesis establecieron que el residuo R2170, que se encontraba cerca del sitio de unión a manosa, era clave para el reconocimiento de M6P.

El resto de los dominios extracelulares de CI-MPR no reconocen azúcares a pesar de su elevada homología. El dominio MRH1 tiene como ligando endógeno al receptor activador de plasminógeno (uPAR), MRH2 al plasminógeno, MRH11 a IGF2 y

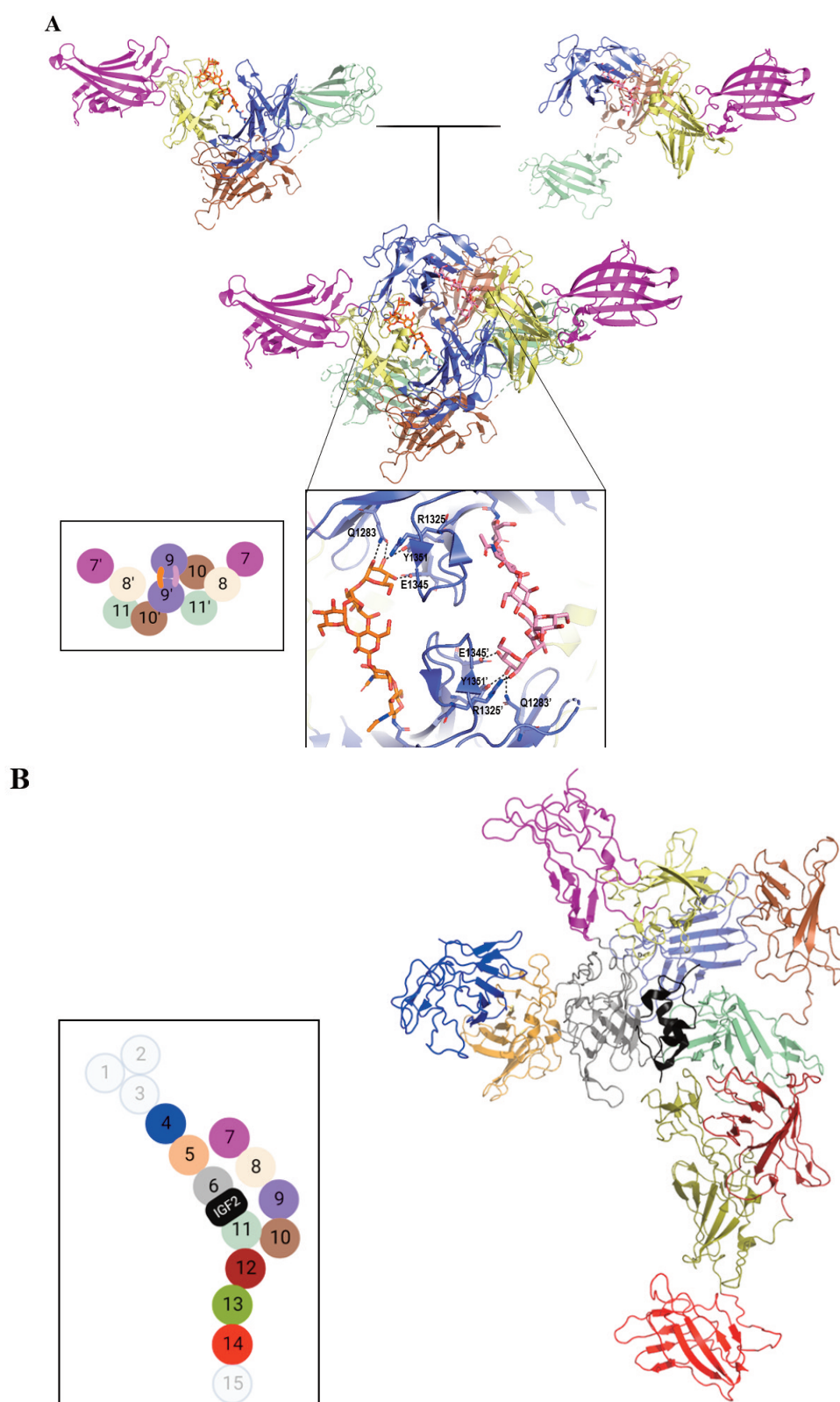


Figura 4. Principales hipótesis de conformación del receptor CI-MPR. (A) "Hipótesis de dimerización". (17) Cada monómero contiene los dominios MRH7-MRH11 (código PDB 6Z32). La dimerización se establece mediante el dominio MRH9 de un monómero y el dominio MRH9' del otro. Su formación es posible gracias a las glicosilaciones presentes en ambos monómeros, el oligosacárido de color rosa corresponde al monómero MRH9, mientras que el naranja a MRH9'. Los enlaces de hidrógeno están representados por líneas negras. (B) Hipótesis de "conformación pistola". Basada en la estructura tridimensional de los dominios MRH4-14 unidos a IGF2 de origen bovino resueltos por difracción de rayos X (código PDB 6UM2). El esquema es una adaptación del descrito en el trabajo de X. Li et al. (21) Los esquemas se han creado en Biorender.com. Las estructuras en 3D se han obtenido con PyMOL (16)

MRH13 a fibronectina. La función específica que desempeñan los dominios no mencionados es aún desconocida (5, 20).

Existen varias hipótesis en torno a la disposición tridimensional que debe adquirir el receptor para que este pueda ser internalizado en la célula. En 2020, el grupo de investigación de A. Bassim Hassan y M. P. Crump (17) resolvió por primera vez la estructura de los dominios MRH7 a MRH11 humanos utilizando difracción de rayos X (código PDB, 6Z32). En este cristal, el dominio MRH9 se encontraba glicosilado en el residuo D1312 con un oligosacárido de manosa y glucosa, lo que provocaba la formación de un dímero estabilizado a través de las interacciones establecidas entre la glicosilación del dominio MRH9 de un monómero y el sitio de unión a M6P del dominio MRH9 del otro (Figura 4a). Por otro lado, en ese mismo año, X. Li et al. resolvieron por crio- microscopía electrónica (Cryo-EM) la estructura de los dominios MRH4 a MRH14 del receptor CI-MPR bovino (código PDB, 6UM2) unido a IGF2 (21). En este caso, el dominio MRH9 no se encuentra dimerizado puesto que en la estructura no se aprecian glicosilaciones, sino que adquiere una "conformación de pistola". Adicionalmente, se observa que la interacción de IGF2 con el dominio MRH11 podría estar estabilizada por los dominios MRH6 y MRH8 (Figura 4b).

Debido a la alta complejidad estructural del receptor CI-MPR, su gran tamaño y la gran cantidad de ligandos endógenos con los que interacciona, no se ha llegado a un consenso sobre su mecanismo de internalización. Asimismo, se dispone de escasa información estructural. Un artículo publicado por R. G. MacDonald et al. (11) apoya la hipótesis de dimerización del receptor,

demostrando experimentalmente que una serie de ligandos multidentados con residuos de manosa eran capaces de promover la dimerización del receptor y, con ello, la internalización y degradación de IGF2. De este modo, catalogaron a IGF2 como "passenger ligand" o ligando polizón. En esta misma línea, L. M. Ali et al. (22) diseñaron un ligando de este receptor capaz de aumentar su internalización y además estudiaron su comportamiento dinámico en disolución e *in silico* mediante técnicas de espectroscopía NOESY ("Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy") y dinámica molecular, respectivamente. Este ligando consta de un grupo fluoróforo, seis unidades de γ -péptido y tres colas acabadas en manosa-6-fosfonato (M6Pn), que se unirán a los dominios de reconocimiento de azúcares del receptor (Figura 5). El cambio de M6P por M6Pn no compromete el modo de unión del ligando al receptor CI-MPR y dicha modificación se llevó a cabo principalmente para impedir la degradación del grupo fosfato por las fosfatasa plasmáticas.

1.3 Estrategias de degradación dirigida a proteínas: LYTACS

El enfoque tradicional para el tratamiento de enfermedades consiste en la modulación de la actividad de una proteína con una molécula pequeña, que puede actuar como agonista o como antagonista. Sin embargo, alrededor del 75% del proteoma humano no es susceptible de ser modulado con moléculas pequeñas, lo que se conoce como "undruggable proteome", y por ello surgió la estrategia de degradación dirigida de proteínas

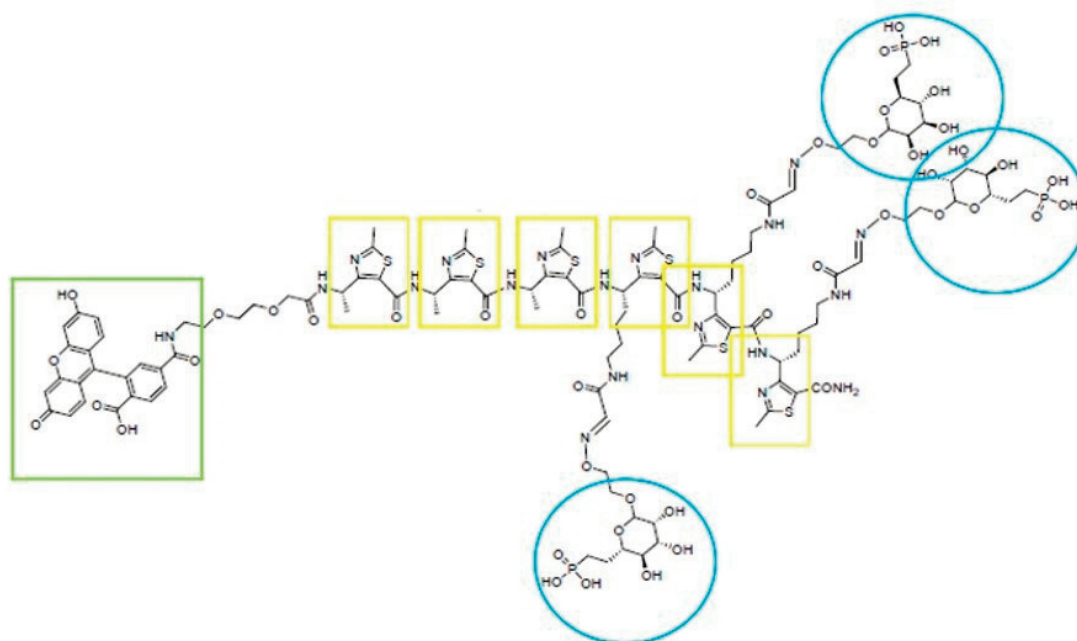


Figura 5. Estructura del ligando del receptor CI-MPR diseñado por L. M. Ali et al. (22). Los residuos de M6Pn se encuentran representados en azul, unidos a ellos a través de un espaciador, se encuentran los monómeros del γ -péptido (amarillo); y, por último, en verde, el grupo fluorescente.

("Targeted Protein Degradation", TPD).(23) Ésta consiste en aprovechar la maquinaria degradativa de las células con el fin de disminuir la concentración de una proteína de interés, ya sea intracelular, extracelular o de membrana.(24) Hoy en día, se hace un uso más amplio de la estrategia TPD, pues no se limita al "undruggable proteome", sino a cualquier proteína terapéuticamente relevante.

Uno de los métodos de degradación selectiva de proteínas más utilizado consiste en el reclutamiento del UPS mediante unas moléculas hereobifuncionales llamadas "PROteolysis TARgeting Chimeras" (PROTACs). Estos compuestos median la ubiquitinación de proteínas citosólicas y su posterior degradación por la proteasoma 26S (25). Por otro lado, recientemente se ha descrito una nueva tecnología con la que se recluta al sistema endo-lisosomal para la degradación de proteínas extracelulares mediante unas moléculas a las que se ha denominado "LYsosome TARgeting Chimeras" (LYTACs). Los LYTACs son capaces de unirse simultáneamente a un receptor transmembrana y a una proteína de interés y así mediar su internalización celular y su posterior degradación lisosomal (26).

Estos receptores pertenecen a la familia de receptores dirigidos al lisosoma ("Lysosome Targeting Receptors", LTRs) y facilitan el transporte de proteínas a este orgánulo celular. Hasta la fecha, solo el receptor CI-MPR y el "Asialoglycoprotein receptor" (ASGPR) han sido utilizados en la tecnología LYTAC. (9, 27) Ambos son receptores que poseen dominios de reconocimiento a azúcares, no obstante, mientras CI-MPR tiene como sustratos azúcares derivados de M6P (como ya se ha mencionado en el apartado

anterior), los sustratos de ASGPR son azúcares derivados de N-acetilgalactosamina (GalNAc). Otra diferencia entre ambos receptores es su distribución tisular, mientras que CI-MPR es un receptor ubicuo, ASGPR es exclusivamente hepático (9). En este trabajo nos centramos en el estudio del receptor CI-MPR.

En el año 2020, C. Bertozzi et al. (28) desarrollaron una prueba de concepto de la tecnología LYTAC. Carolyn Bertozzi ha obtenido el Premio Nobel de Química en el año 2022 por el desarrollo de la química click y la química bioortogonal y sus aplicaciones para el estudio de diferentes sistemas biológicos, entre otros, los LYTACs (29). Para ello, diseñaron una serie de moléculas capaces de unirse simultáneamente a la porción extracelular del receptor CI-MPR y a varias proteínas tanto extracelulares, como de membrana (Figura 6). En primer lugar, diseñaron un LYTAC basado en un polímero de M6P (20-90 unidades) y biotina como ligandos de unión a CI-MPR y NeutrAvidina-647 (proteína fluorescente), respectivamente (Figura 6a). De este modo demostraron la posibilidad de mediar la degradación lisosomal de una proteína usando una molécula pequeña como ligando. Adicionalmente, consiguieron degradar ApoE4, una proteína extracelular implicada en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, acoplado al polímero de M6P a un anticuerpo anti-apoE4. Además de proteínas extracelulares, lograron la degradación lisosomal del receptor del factor de crecimiento endotelial (EGFR) que se ubica en la membrana plasmática (Figura 6b).

1.4 MMP-2 como posible diana terapéutica de LYTACs

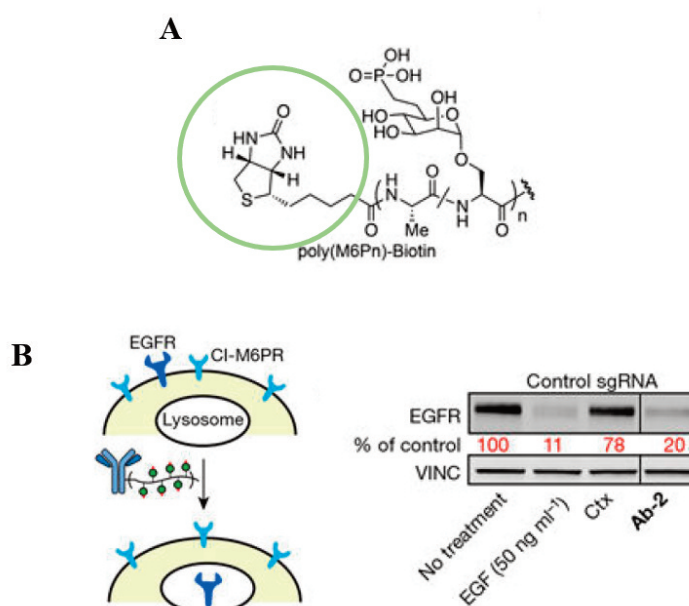


Figura 6. Ejemplos de los primeros LYTACs diseñados por C. Bertozzi et al. (28). (A) Estructura de un LYTAC con un polímero de M6P (poly(M6Pn)) como ligando de unión a CI-MPR y con biotina (verde) como ligando de unión a la proteína fluorescente NeutrAvidina-647. (B) Representación esquemática del mecanismo de acción de un LYTAC que media la degradación lisosomal del receptor de membrana EGFR (izquierda). A la derecha, los resultados de un ensayo Western Blot, en el que se observa degradación de EGFR en presencia del LYTAC (Ab-2). Las imágenes han sido extraídas del artículo de C. Bertozzi et al. (28).



Las Metaloproteasas de la Matriz (MMPs) son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc responsables de la remodelación de la matriz extracelular. (30) Estas enzimas juegan un papel fundamental a nivel fisiológico y fisiopatológico, ya que están involucradas en la proliferación, diferenciación, apoptosis celular y angiogénesis, por lo que una desregulación de sus niveles se ve relacionada con la aparición de procesos metastásicos, inflamatorios y de crecimiento tumoral (31).

Esta familia se puede dividir en seis subfamilias en función de la especificidad de sustrato: colagenasas (MMP-1, 8, 13 y 18), gelatinasas (MMP-2 y 9), estromelinas (MMP-3, 10, 11, 27), matrilisinas (MMP-7 y 26), asociadas a membrana (MMP-14, 15, 16 y 24), metaloelastasas (MMP-12) y otras (MMP-19, 20, 21, 23 y 28) (32, 33).

Las enzimas MMP-2 y MMP-9 degradan el colágeno tipo IV, que es el componente principal de la matriz extracelular (32). MMP-2 es una diana validada para el tratamiento de muchos tipos de cáncer, pues su sobreexpresión está relacionada con la invasión tumoral, metástasis y angiogénesis. (33) Por el contrario, a pesar de su similitud estructural y funcional, MMP-9 está involucrada tanto en procesos oncogénicos como antitumorales por lo que su eficacia como diana contra el cáncer está en entredicho. Por esta razón, diferentes grupos de investigación se centran en el diseño y síntesis de inhibidores selectivos de MMP-2 para el tratamiento del cáncer (34-36).

Este trabajo tiene como finalidad el diseño computacional de un LYTAC para la degradación selectiva de MMP-2. Esta molécula deberá poseer la capacidad de unirse simultáneamente a MMP-2 y al receptor transmembrana CI-MPR, que será el encargado de su internalización y de su transporte hasta los lisosomas, donde se degradará. En este trabajo se han llevado a cabo estudios computacionales y se han alcanzado los siguientes objetivos:

- Análisis detallado de las estructuras cristalográficas depositadas en el *Protein Data Bank* (PDB) (37) para estudiar las diferentes conformaciones que puede adoptar CI-MPR en presencia y ausencia de ligandos endógenos.
- Estudio del modo de unión de M6P a los dominios de reconocimiento de azúcares de CI-MPR (MRH3, 5, 9 y 15).
- Diseño de un LYTAC basado en la estructura del ligando propuesto por L. M. Ali et al. (22) y un inhibidor de MMP-2 desarrollado previamente descrito (36).
- Estudio del comportamiento dinámico y análisis conformacional del LYTAC- MMP2 y posterior comparación con el ligando de CI-MPR descrito por L. M. Ali et al. (22).

2. MATERIALES Y METODOLOGÍA

2.1 Análisis Cristalográfico

En primer lugar, se realizó una búsqueda de las estructuras cristalográficas del receptor CI-MPR en la base de datos PDB (Tabla 1), (37) con el objetivo de analizar los modos de unión de sus ligandos endógenos utilizando PyMOL (16).

En general, se seleccionaron aquellas estructuras que presentaban mejor resolución, una secuencia de aminoácidos más completa y que, además, incluyeran los ligandos de interés: M6P e IGF2. No obstante, también se analizaron estructuras con una peor resolución pero que aportaban información clave acerca de la disposición espacial de los dominios del receptor, como por ejemplo la estructura con el código 6UM2. Esta estructura fue obtenida por Cryo-EM a pH fisiológico con una resolución de 4.32 Å e incluye los dominios MRH4-14 adoptando una “conformación de pistola”, además, el ligando IGF2 se encuentra unido al dominio MRH11, por lo que se utilizó para analizar su modo de unión.

Con el fin de estudiar el reconocimiento de azúcares por parte del receptor, se analizaron las estructuras :1SZ0, 6V02 y 6Z32. El cristal 1SZ0, de origen bovino, fue obtenido por difracción de rayos X con una resolución de 2.10 Å. Este comprende los dominios N- terminales del receptor (MRH1-3) y se utilizó para estudiar el modo de unión de M6P al dominio MRH3. Por otro lado, el cristal 6V02 (resolución 2.46 Å) engloba a los dominios MRH1-5, pero no presenta al ligando M6P unido al dominio MRH5, por lo que para analizar su modo de unión se tuvo que recurrir a técnicas de *docking* molecular (Apartado 2.3). Los dominios MRH7-11 están cristalizados y depositados en PDB: 6Z32 (3.47 Å), en el que se observa una dimerización del receptor a través de glicosilaciones pertenecientes al dominio MRH9. Esta estructura apoya la hipótesis de la necesidad de dimerización de CI-MPR para que este pueda ser internalizado por la célula. Por último, no hay depositada ninguna estructura en el PDB del último dominio de reconocimiento de azúcares, dominio MRH15. Por esta razón y por su poca accesibilidad al encontrarse muy próximo a la membrana, se concluyó no estudiarlo como sitio de unión al LYTAC.

2.2 Modelado por homología

El único cristal de un dominio de reconocimiento de azúcares unido a M6P depositado en el PDB es 1SZ0 y este es de origen bovino. Puesto que los dominios MRH3 bovino y humano presentan una homología del 78.9%, se realizó un modelado por homología con el servidor SwissModel (38) utilizando el cristal 1SZ0 como molde. Posteriormente, se comparó el modo de unión de M6P en el cristal y en el molde mediante superposición en PyMOL.

Tabla 1. Estructuras del receptor CI-MPR, depositadas en el PDB, que han sido utilizadas para el desarrollo de este trabajo.

PDB	RESOLUCIÓN(Å)	LIGANDO	GLUCOSIDACIÓN	DIAGRAMA	DOMINIOS
1SZ0	2,1	M6P(manosa 6P)	2-Acetamido-2-deoxi-beta-D-glucopiranos-(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-beta-D-glucopiranos 2-acetamido-2-deoxi-beta-D-glucopiranos-(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-alpha-D-glucopiranos		Dominios 1-3
6P8I	2,54	NO	Alfa-D-manopiranos-(1-3)-beta-D-manopiranos-(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-beta-D-glucopiranos-(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-beta-D-glucopiranos		Dominios 1-5
6V02	2,46	NO	NAG (1 unidad en la cadena B)		Dominios 1-5
6UM1	3,46	NO	2-Acetamido-2-deoxi-beta-D-glucopiranos-(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-beta-D-glucopiranos beta-D-manopiranos-(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-beta-D-glucopiranos-(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-beta-D-glucopiranos		Dominios 1-14
6UM2	4,32	INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR II	NAG(5 unidades en la cadena C, D, E, F y G)		Dominios 4-14
6Z32	3,47	NO	Alfa-D-manopiranos-(1-2)-alfa-D-manopiranos-(1-2)-alfa-D-manopiranos-(1-3)-beta-D-manopiranos-(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-beta-D-glucopiranos-(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-beta-D-glucopiranos (2 unidades en la cadena C,D) y NAG (3 unidades en las cadenas F, G y H)		Dominios 7-11
6Z31	2,56	NO	NO		Dominio 8
6Z30	1,5	NO	Alfa-D-manopiranos-(1-3)-alfa-D-mannopiranos-(1-6)-[alfa-D-manopiranos-(1-3)]beta-D-manopiranos-(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-beta-D-glucopiranos-(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-beta-D-glucopiranos		Dominios 9-10
2V5O	2,91	NO	NAG (3 unidades en B, C y D)		Dominios 11-14
2V5N	3,2	NO	NAG (2 unidades en B y C)		Dominios 11-12
2V5P	4,1	INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR II	Beta-D-manopiranos-(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-beta-D-glucopiranos-(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-beta-D-glucopiranos y NAG (5 unidades en cadenas F, G, H, I y J)		Dominios 11-13

2.3 Docking molecular

Este es un estudio computacional que pretende predecir el modo de unión más favorable de un ligando a su proteína diana, mediante la exploración de las diferentes conformaciones que el ligando puede adoptar con el objetivo final de determinar la afinidad y actividad de estos. Para ello, se prepara una "grid" (39) de un tamaño preestablecido en la proteína diana, la cual consiste en energías de interacción pre- calculadas entre la proteína y una serie de sondas atómicas que exploran el sitio de unión del ligando. Para llevar a cabo este estudio se empleó la interfaz gráfica de la Suite de Schrödinger, MAESTRO (40).

Esta técnica se utilizó para predecir el modo de unión de M6P a los dominios MRH5 y MRH9, puesto que este ligando ya se encuentra unido a MRH3 en el cristal 1SZ0. No obstante, se decidió llevar a cabo el *docking* de M6P en el dominio MRH3 (1SZ0) para validar el uso de la técnica. Por un lado, el ligando se preparó usando la herramienta *LigPrep*, (41) en la que se tuvieron en cuenta los dos posibles estados de protonación del grupo fosfato del residuo de manosa (cargas -1 y -2). Por otro lado, se usó la herramienta *Protein Preparation Wizard* (42) para preparar los dominios MRH3 (1SZ0), MRH5 (6V02) y MRH9 (6Z32), es decir, se añadieron protones, se modelaron las cadenas laterales de aminoácidos que

faltaban y se corrigieron los estados de protonación de los residuos de las proteínas a pH 7. Posteriormente, se construyó una *grid* de tamaño suficiente para abarcar el sitio de unión a manosa de los tres dominios y se centró en la secuencia consenso "QREY". Como último paso, se realizó el *docking* con la herramienta *Glide* (43).

Los resultados obtenidos fueron analizados cualitativamente utilizando PyMOL y cuantitativamente mediante los valores de *Docking Score* obtenidos para cada una de las poses del ligando en la proteína.

2.4 Dinámica molecular (MD)

La dinámica molecular se basa en cálculos teóricos de mecánica molecular para obtener una trayectoria en la que la posición y velocidad de los diferentes átomos del sistema varían en función del tiempo de simulación. El campo de fuerzas utilizado es AMBER 20 (44). Esta metodología permitió determinar la estabilidad del modo de unión del ligando M6P en el dominio MRH3 (código PDB 1SZ0), así como estudiar el comportamiento dinámico libre en agua del ligando de CI-MPR diseñado por L. M. Ali et al. (22) y el LYTAC-MMP2.

Antes de llevar a cabo las simulaciones de dinámica molecular, los ligandos fueron parametrizados con mecánica cuántica utilizando el programa Gaussian 09 (45). Se optimizó su geometría y, en un segundo paso, se les calculó la distribución de cargas puntuales ajustando el potencial electrostático molecular (MEP) obtenido a un modelo con ayuda de un método intrínseco de este programa.

A continuación, los sistemas (ligando libre o complejo proteína-ligando) fueron preparados utilizando el software de AMBER 20 (44). Puesto que los ligandos contienen un azúcar fosfatado y que el dominio MRH3 de CI-MPR presenta

glicosilaciones, se emplearon simultáneamente campos de fuerza para glúcidos, GLYCAM_06j-1 (46) y para proteínas, Protein.ff19SB (47).

En un primer paso, los sistemas se minimizaron en vacío utilizando *Sander* (44) con el fin de eliminar posibles anomalías estructurales de las moléculas. A continuación, se solvataron las estructuras en octaedros truncados de agua TIP3P ("Three-site Transferable Intermolecular Potencial") con un número total de moléculas de agua que dependerá del tamaño del sistema con la consiguiente adición de contraiones para neutralizar su carga. Tras la obtención de los sistemas solvatados, estos se minimizaron de nuevo con *Sander* para evitar problemas derivados de posibles interacciones desfavorables entre los iones y las moléculas de agua. Posteriormente se llevó a cabo una fase de calentamiento en la cual los sistemas pasaron de una temperatura de 100K a 300K en 20 picosegundos (ps). En esta fase solo se permitió el movimiento de las moléculas de agua, pues se aplicó una fuerza de 50 Kcal/mol para mantener inmóvil a todos los átomos del soluto. El último paso, aunque previo a la producción de la dinámica, consiste en una fase de equilibrado en cinco pasos de 100 ps. Durante estos cinco pasos, la restricción inicial del soluto se fue reduciendo lo que permitió una mejor interacción entre éste y las moléculas de agua, las cuales se fueron disponiendo sobre la superficie accesible al disolvente del soluto. Para finalizar, se ejecutó la simulación de dinámica molecular de diferentes periodos de duración según el sistema molecular.

Las dinámicas moleculares fueron analizadas con el módulo *cptraj* de AMBER 20 (44) con el que se extrajeron los conformeros mayoritarios de cada sistema.

Dinámica molecular del complejo MRH3-M6P

Se llevó a cabo una simulación de 100 nanosegundos (ns) del cristal 1SZ0 para analizar la estabilidad del modo de unión de

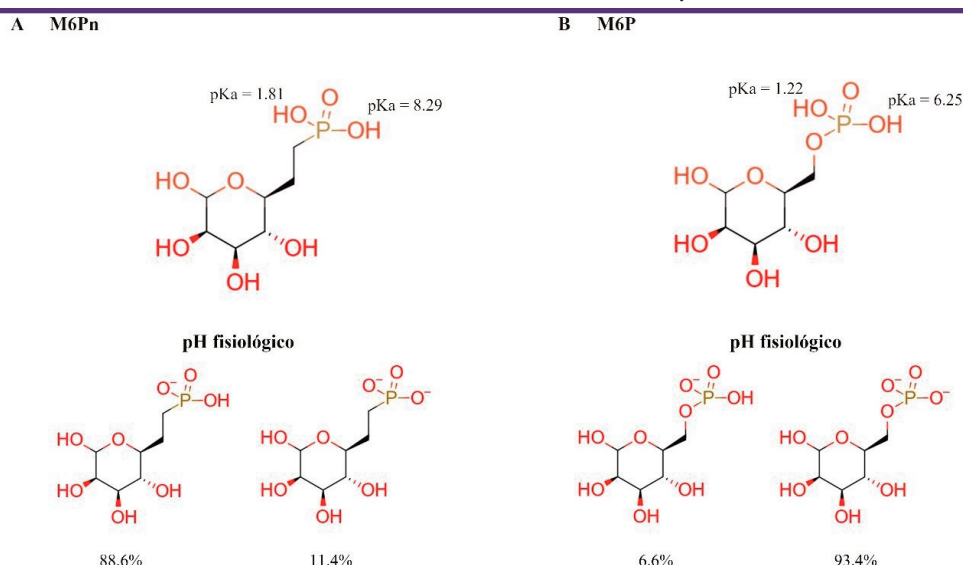


Figura 7. Valores de pKa y distribución de microespecies a pH fisiológico (7.4) de un residuo de M6Pn (A) y uno de M6P (B) calculados con Marvin Sketch (48)

M6P al dominio MRH3. Para el ligando M6P se seleccionó como estado de ionización -2 preferente, puesto que es el que mejor resultado dio en el *docking* y el mayoritario a pH fisiológico (Figura 7b). Se mantuvieron los dominios MRH1 y MRH2, ya que ha sido descrito su importante papel en la estabilización del modo de unión (7).

Dinámica molecular del ligando de CI-MPR y del LYTAC-MMP2

Las simulaciones de dinámica molecular de ambos ligandos libres en agua fueron de 200 ns. El ligando de CI-MPR fue simulado con carga neutra puesto que es la carga que se le asignó en las simulaciones de dinámica molecular mostradas en el artículo de referencia, con el objetivo de comparar los resultados (22). Sin embargo, tras un cálculo de pKa con Marvin Sketch (48), se determinó que los estados de protonación más probables en agua para M6Pn eran -1 y -2 (Figura 7a). Teniendo en cuenta esta predicción, el LYTAC-MMP2 se simuló tanto con carga -3 como con carga -6, ya que presenta tres residuos de M6Pn.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ANÁLISIS DE LOS DOMINIOS DE RECONOCIMIENTO DE AZÚCARES DE CI-MPR

Este análisis tiene como objetivo determinar cuál de los cuatro dominios de reconocimiento de azúcares presentes en el receptor CI-MPR es el más plausible para la interacción con un LYTAC.

En primer lugar, como la única estructura depositada en el PDB de un dominio de reconocimiento de azúcares unido a M6P era de origen bovino (código PDB 1SZ0), se decidió realizar un modelado por homología de la proteína humana usando este cristal como molde. El modelo obtenido con Swissmodel (38) presentaba una alta homología (78.9%) con los dominios MRH1, 2 y 3 de origen bovino, asimismo, los aminoácidos claves para la interacción con M6P (secuencia "QREY") se encontraban en la misma disposición espacial (Figura 8). Por esta razón, se decidió emplear la estructura del dominio MRH3 depositada en el cristal 1SZ0 para el resto del estudio computacional, pues no se esperaban diferencias significativas en el modo de unión a M6P o en su comportamiento en simulaciones de dinámica molecular.

3.1.a Estudio del modo de unión de M6P a los dominios MRH3, MRH5 y MRH9

El modo de unión de M6P a los dominios MRH5 y MRH9 se estudió mediante técnicas de *docking* molecular. Con el fin de validar este método para este tipo de macromoléculas, se empleó el cristal 1SZ0 como control.

Los cristales empleados para la realización del *docking* fueron: 1SZ0 (dominios MRH1, MRH2, MRH3), 6V02 (dominio MRH5) y 6Z32 (dominio MRH9). En el caso del ligando, se tuvieron en cuenta sus estados de protonación más probables, que son -1 y -2. En la siguiente tabla (Tabla 2) se muestran los mejores resultados obtenidos del *docking* en función del estado de protonación de M6P y el dominio de reconocimiento de azúcares.

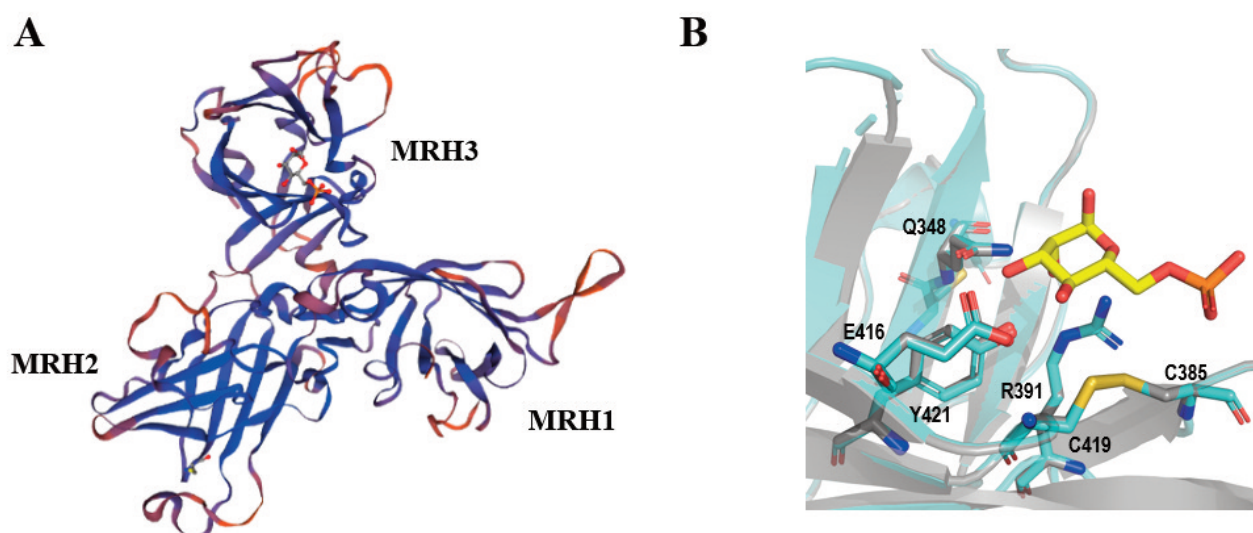


Figura 8. (A) Modelo de los dominios MRH1, 2 y 3 humanos obtenidos con Swissmodel,(38) usando el cristal 1SZ0 como molde. Las zonas más conservadas están representadas en azul, mientras las de menor homología en naranja. (B) Superposición con PyMOL (16) del dominio MRH3 del cristal 1SZ0 (cian) y el dominio MRH3 humano obtenido (gris). Se muestra el modo de unión del ligando M6P (amarillo) y la secuencia "QREY". Los enlaces de hidrógeno están representados con líneas negras.

Tabla 2. Resultados del *docking* molecular del ligando M6P con diferentes estados de protonación en los dominios MRH3, MRH5 y MRH9. Los datos de “*Docking Score*” hacen referencia a la energía de interacción ligando-proteína y está en Kcal/mol.

Dominio	Carga del ligando	“ <i>Docking Score</i> ” (Kcal/mol)
	-1	-6.55
MRH3	-2	-7.125
	-1	-7.3
MRH5	-2	-6.5
	-1	-5.054
MRH9	-2	-6.709

El resultado de *docking* del ligando M6P en el dominio MRH3 reproduce la pose encontrada en el cristal 1SZ0 (Figura 9b). La carga del ligando parece no influir en la conformación que adopta éste en el sitio de unión, no obstante, cuando presenta carga -2 la unión es ligeramente más favorable energéticamente (Tabla 2). En ambos casos, se establecen cuatro enlaces de hidrógeno intermoleculares entre el anillo de manosa y las cadenas laterales de E416, Y324 y Q348. Además, el grupo fosfato interactúa con la R391 a través de un enlace iónico reforzado con enlace de hidrógeno y con el grupo amino del esqueleto de S386 (Figura 9a).

En el caso del dominio MRH5, a pesar de que energéticamente el modo de unión del ligando es favorable (Tabla 2), éste no explora el sitio de unión a azúcares del dominio (Figura 10). Este resultado podría ser debido a que MRH5 es específico de fosfodiésteres de Man-P-GlcNAc y a que el bolsillo es ligeramente más grande por la ausencia de un puente disulfuro.

Por último, los resultados de *docking* en el dominio MRH9 muestran que la unión de M6P con carga -2 es más favorable, puesto que establece un mayor número de interacciones (Tabla 2). M6P con carga -1 establece dos enlaces de hidrógeno entre el anillo de

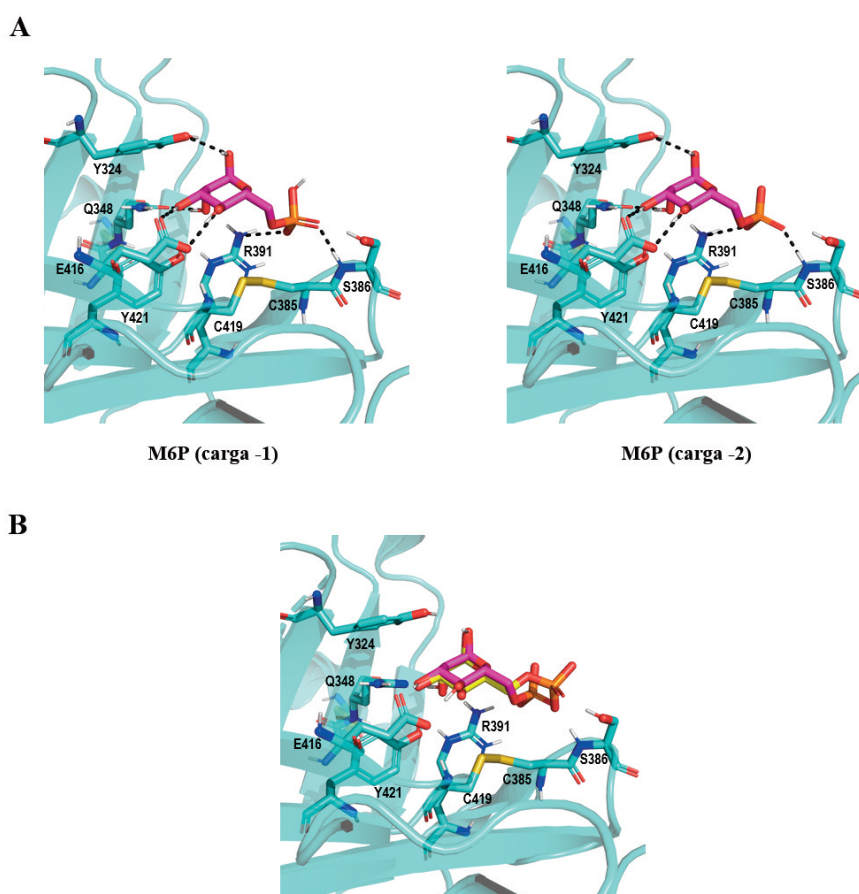


Figura 9. (A) Resultados de docking del ligando M6P (magenta) con cargas -1 y -2 en el dominio MRH3 (cian, código PDB 1SZ0). (B) Superposición del mejor resultado de docking de M6P (magenta) en el dominio MRH3 (cian) y el cristal 1SZ0 (M6P en amarillo). Los enlaces de hidrógeno están representados con líneas negras. Las imágenes han sido generadas con PyMOL (16)

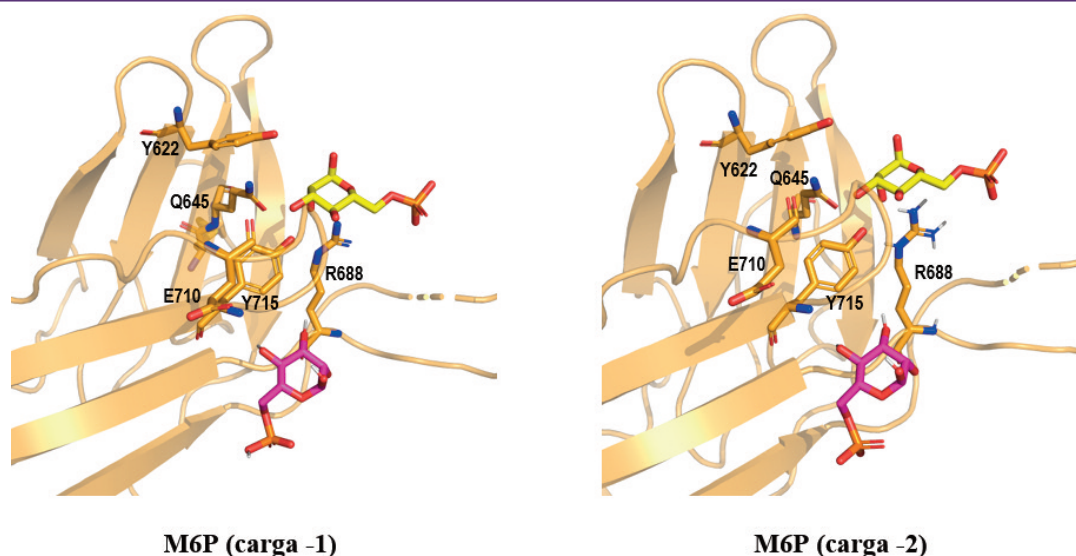


Figura 10. Resultados de docking del ligando M6P (magenta) con cargas -1 y -2 en el dominio MRH5 (naranja, código PDB 6V02). Además, se muestra el ligando M6P (amarillo) extraído del cristal 1SZ0 y superpuesto en este dominio. Los enlaces de hidrógeno están representados con líneas negras. Las imágenes han sido generadas con PyMOL (16)

manosa y las cadenas laterales de Y1255 y E1345, además de un enlace iónico reforzado con enlace de hidrógeno entre R1325 y el grupo fosfato. Por otro lado, la M6P con carga -2 establece tres enlaces de hidrógeno entre el anillo de manosa y las cadenas laterales de Q1283 y E1345, además de otro entre el grupo fosfato y el grupo amino del esqueleto de H1320 (Figura 11).

Adicionalmente a este estudio, se consideraron las dos hipótesis de internalización del receptor CI-MPR (17, 21) para concretar cuál sería la más plausible para la interacción con un LYAC. La hipótesis de dimerización del receptor se sustenta en el aislamiento de los dominios MRH7-MRH11 dimerizados a través de una glicosilación en el dominio MRH9 (código PDB 6Z32) de dos monómeros adyacentes (Figura 4a). Por otro lado, los dominios

MRH4-MRH14 de origen bovino se resolvieron por Cryo-EM (código PDB 6UM2) unidos a IGF2 y se encontraban en "conformación pistola" (Figura 4b). Aunque ambos cristales fueron resueltos a pH fisiológico, el dominio MRH9 en la estructura 6Z32 presentaba una glicosilación completa acabada en un residuo de manosa en N1312 (Figura 3b) que hacía posible la dimerización, mientras que en la estructura encontrada bajo el código 6UM2 estas glicosilaciones se reducían a un solo monosacárido de 2- acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranos (NAG). En este último caso, la ausencia de glicosilaciones completas podría imposibilitar la formación de un dímero, lo que podría dar lugar a una interpretación sesgada del proceso fisiológico.

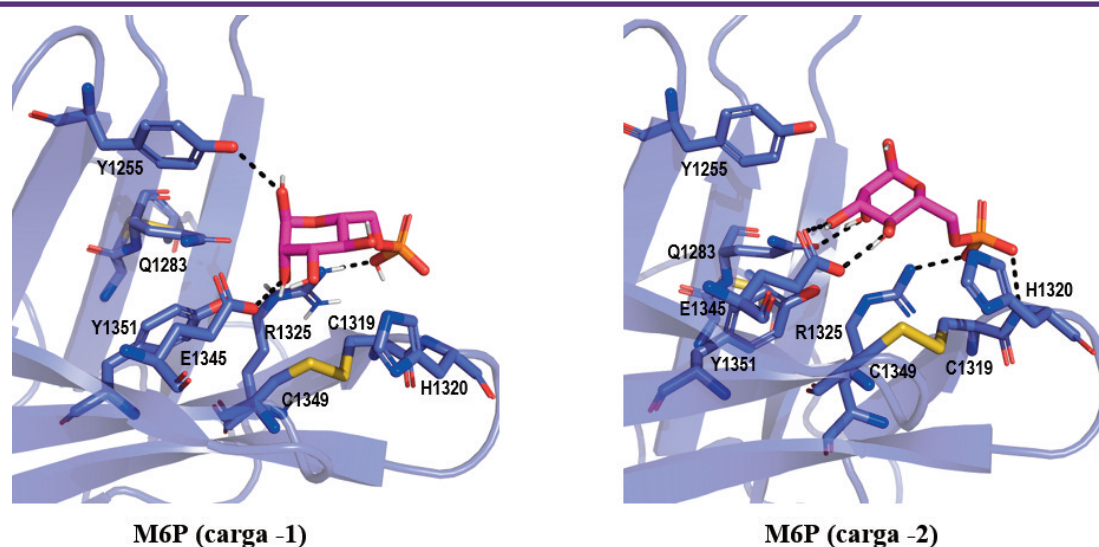


Figura 11. Resultados de docking del ligando M6P (magenta) con cargas -1 y -2 en el dominio MRH9 (violeta, código PDB 6Z32). Los enlaces de hidrógeno están representados con líneas negras. Las imágenes han sido generadas con PyMOL (16)

Además, se encontró en el dominio MRH3 (código PDB 1SZ0) una glicosilación de NAG en el residuo N365, muy próximo al sitio de unión de la M6P, lo que abriría la posibilidad de observar una dimerización análoga a la encontrada en la estructura 6Z32 si la glicosilación fuese completa.

Dados los resultados de *docking* y el estudio de dimerización de CI-MPR, se concluyó que la interacción LYTAC-receptor era más probable a través del dominio MRH3, tanto por su especificidad por monoésteres de manosa como por su accesibilidad. No obstante, no se debe descartar la posibilidad de que el ligando de CI-MPR descrito por L. M. Ali *et al.* (22) (Figura 5), al poseer tres residuos derivados de manosa, interactuase con más de un dominio del mismo monómero del receptor.

A continuación, se decidió estudiar la estabilidad del modo de unión de un único residuo de M6P en el dominio MRH3 mediante simulaciones de dinámica molecular libre en agua usando el software AMBER20.(44) Para ello, se seleccionó la estructura 1SZ0 que incluía además los dominios MRH1 y MRH2, que se mantuvieron durante la simulación ya que tienen un papel cooperativo en el modo de unión del ligando.(7) En cuanto a M6P, solo se tuvo en cuenta el estado de protonación -2, puesto que fue el que mejor energía de interacción obtuvo en los resultados de *docking*

(Tabla 2). Con el fin de evaluar la estabilidad del complejo se extrajeron ocho conformeros y se analizó la desviación cuadrática media ("Root-Mean-Square Deviation", RMSD) entre la proteína y el ligando. El porcentaje de distribución de los conformeros a lo largo de los 20 ns de simulación es de 33.9% para el conformero 1 (c1), 29.3% para c2, 17.8% para c3, 7.4% para c4, 5.6% para c5, 5.2% para c6, 0.7% para c7 y 0.2% para c8. Se seleccionaron cuatro de los ocho conformeros obtenidos, puesto que representaban diferentes modos de unión del ligando M6P al dominio MRH3 (Figura 12).

En el conformero mayoritario (c1) destaca la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre uno de los oxígenos del grupo fosfato y un grupo hidroxilo del anillo de manosa. Esta interacción impide que el grupo fosfato interactúe con el esqueleto de S386, tal y como está descrito en la bibliografía (17). sin embargo, se pierde en el resto de conformeros. Además, se establecen cinco enlaces de hidrógeno intermoleculares entre el anillo de manosa y las cadenas laterales de los residuos Q348, Y421, E416 y R391. En el conformero c4, el enlace de hidrógeno intramolecular desaparece y en su lugar se forma un enlace de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de Y421 y el anillo de manosa (Figura 12).

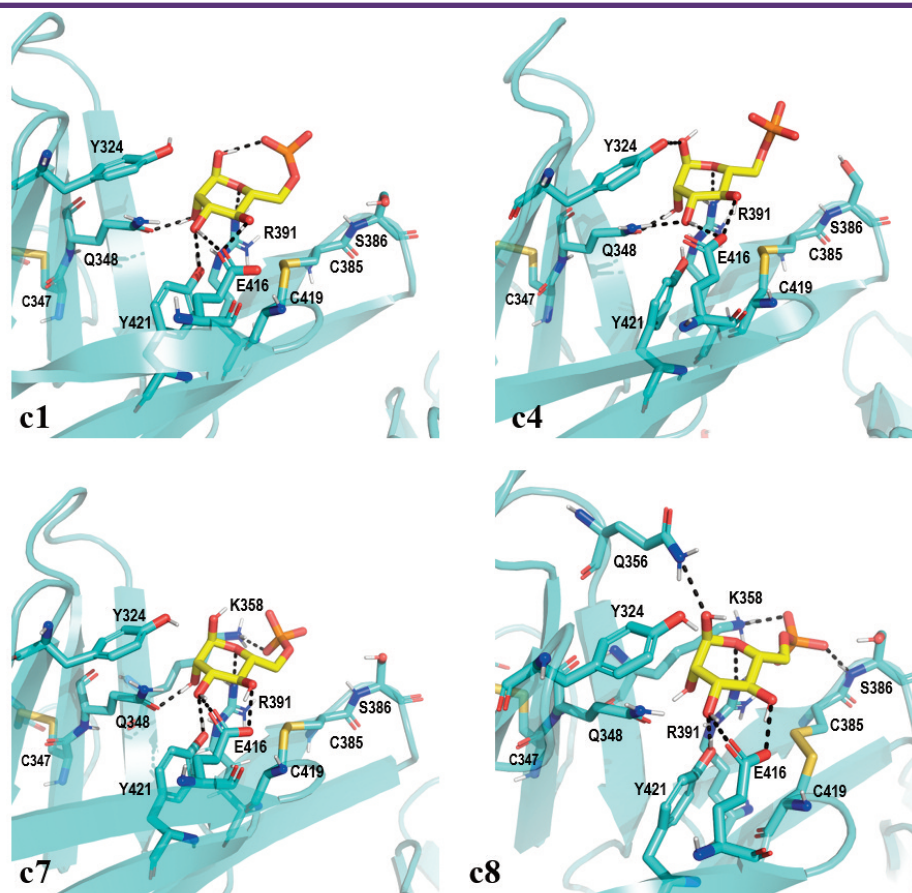
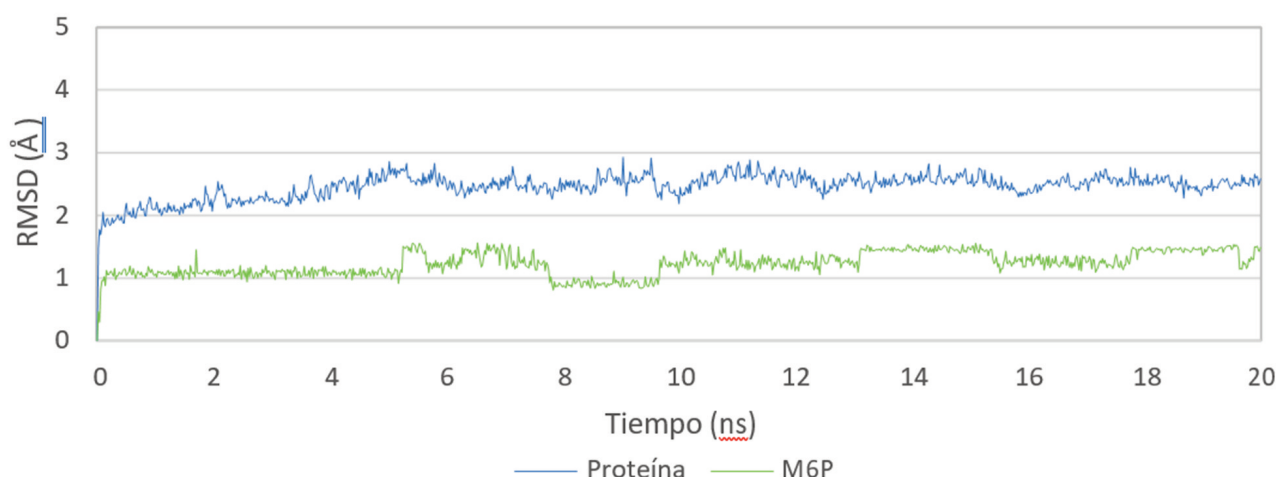


Figura 12. Conformeros representativos del modo de unión del ligando M6P (amarillo) en el dominio MRH3 (cian, código PDB 1SZ0) extraídos de una simulación de 20 ns de dinámica molecular. Los enlaces de hidrógeno están representados con líneas negras. Las imágenes han sido generadas con PyMOL (16).



Gráfica 1. Representación gráfica de la variación del RMSD (Å) en función del tiempo de simulación (20 ns) del complejo formado entre los dominios N-terminales de CI-MPR (MRH1, MRH2 y MRH3) y M6P.

Aunque los conformeros c7 y c8 no sean cuantitativamente representativos en la simulación, se observa una serie de interacciones interesantes para estabilizar el modo de unión del ligando (Figura 12). En ambos casos, el grupo fosfato establece un enlace iónico reforzado con enlace de hidrógeno con la cadena lateral del residuo K358. Además, en el conformero c8 se observan dos enlaces de hidrógeno adicionales entre el grupo fosfato y la cadena lateral del residuo Q356 y el grupo amino del esqueleto de S386.

El RMSD mide la variación en la posición de los átomos de una molécula empleando una conformación dada como referencia. En este caso, la estructura de referencia es la encontrada en el cristal 1SZ0. La representación del RMSD (Å) frente al tiempo de simulación (ns) (Gráfica 1) muestra que el modo de unión de la

M6P al dominio MRH3 es estable, puesto que tan solo se desvía 1.5 Å de media respecto a la estructura de referencia (línea verde). Debido al mayor tamaño y flexibilidad de los dominios MRH1, MRH2 y MRH3 en comparación con M6P, la gráfica (línea azul) sufre más fluctuaciones y desviación respecto a la estructura de referencia en este caso.

3.2 Diseño de un LYTAC para la degradación selectiva de MMP-2 (LYTAC- MMP2)

Con la información estructural disponible, se procedió al diseño de un LYTAC combinando la estructura del ligando de CI-MPR propuesto por L. M. Ali et al. (22) y la de un inhibidor selectivo de MMP-2 previamente descrito (Figura 13) (36). Para ello, se sustituyó el grupo fluoróforo (señalado en verde, Figura 5) del

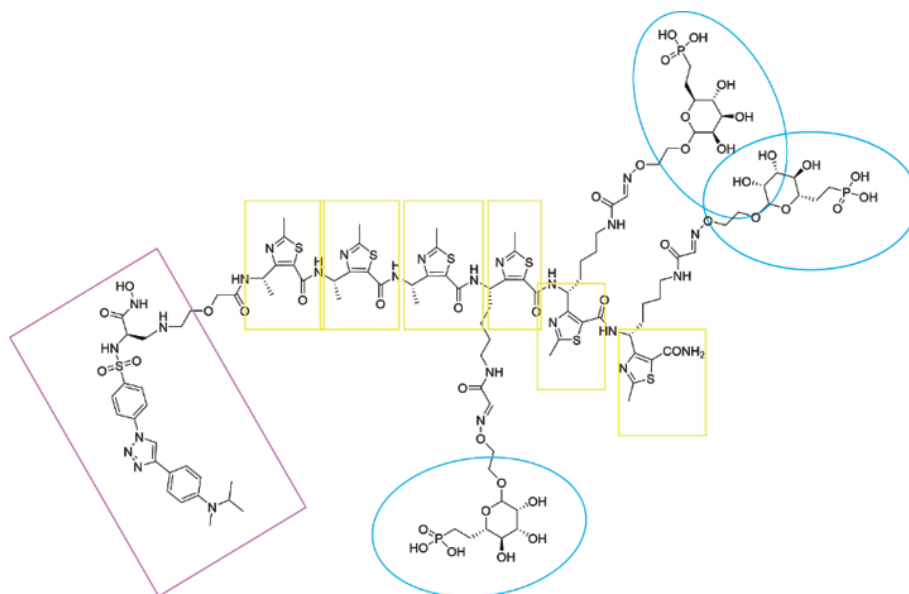


Figura 13. Estructura del LYTAC-MMP2. Los residuos de M6Pn se encuentran representados en azul, unidos a ellos a través de un espaciador, se encuentran los monómeros del γ -péptido (amarillo); y, por último, en morado, el inhibidor selectivo de MMP-2

ligando de CI-MPR por el inhibidor de MMP-2. El punto de anclaje del inhibidor se seleccionó cuidadosamente para que no influyese en su modo de unión a la enzima.

3.3 Comportamiento dinámico del ligando de CI-MPR y del LYTAC propuesto

L. M. Ali *et al.* (22) estudiaron el comportamiento del ligando de CI-MPR (Figura 5) en una disolución de tampón fosfato 50 mM mediante técnicas de espectroscopía NOESY. Posteriormente, utilizaron los resultados obtenidos como restricciones para las simulaciones de dinámica molecular del ligando, usando agua como solvente implícito y el software AMBER16 (49). Por el contrario, en este trabajo no se aplicaron restricciones en las simulaciones de dinámica molecular, se empleó agua como solvente explícito y se utilizó una versión más actualizada del software AMBER (AMBER 20) (44).

La finalidad del estudio fue la de estudiar el comportamiento dinámico libre en agua del ligando de CI-MPR y compararlo con el del LYTAC-MMP2.

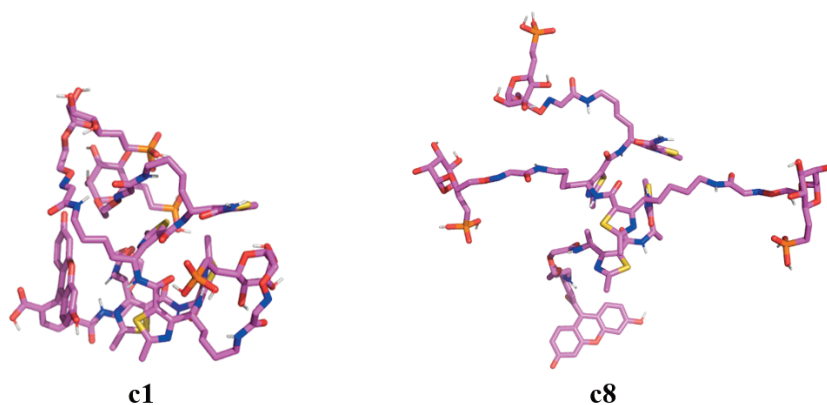
3.3.a Dinámica molecular del ligando de CI-MPR

En el artículo publicado por L. M. Ali *et al.* (22), se ejecutó la dinámica molecular del ligando de CI-MPR con carga neutra, por lo que se decidió mantener este estado de ionización a pesar de no ser el mayoritario a pH fisiológico (Figura 7) de acuerdo con los resultados obtenidos con el programa Marvin Sketch (48).

Se llevó a cabo una simulación de dinámica molecular lo suficientemente larga para observar grandes cambios conformacionales en la molécula, concretamente, su duración fue de 200 ns (10000 pasos). Para su análisis se extrajeron doce conformeros con diferentes porcentajes de distribución: 64.8% para c1, 13.2% para c2, 12.3% para c3, 6.3% para c4, 1.81% para c5, 0.74% para c6, 0.33% para c7, 0.21% para c8, 0.11% para c9, 0.05% para c10, 0.04% para c11 y 0.02% para c12. De acuerdo con estos resultados, el ligando puede adoptar conformaciones a lo largo de la simulación de dinámica molecular, en las que se establezcan un mayor número de interacciones intramoleculares o "conformación cerrada" o conformaciones en las que sus partes constituyentes se encuentren más distanciadas entre sí o "conformación abierta". La conformación abierta deja accesibles los residuos de manosa para su interacción con el receptor, por lo que se considera la conformación bioactiva.

La mayoría de los conformeros extraídos presentan una disposición cerrada, caracterizada por apilamientos π - π entre los monómeros del γ -péptido, así como por interacciones de enlace de hidrógeno entre los grupos polares de la molécula. En la Figura 14a se muestran el conformero mayoritario (c1) en una conformación cerrada y el "conformero bioactivo" (c8). Como se puede observar, la conformación bioactiva tan solo se explora en un 0.21% de la dinámica.

A



B

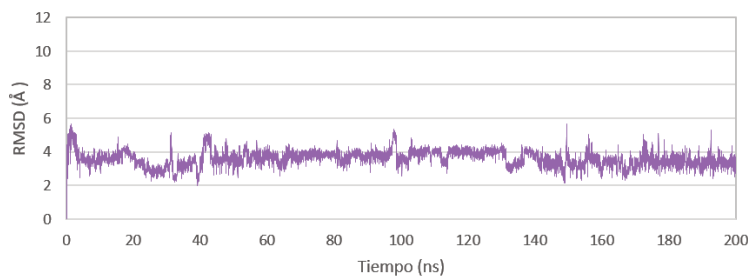


Figura 14. (A) Conformero mayoritario (c1) y conformero bioactivo (c8) extraídos de 200 ns de dinámica molecular del ligando de CI-MPR. Las imágenes han sido generadas con PyMOL (16). (B) Representación gráfica de la variación de RMSD (Å) frente al tiempo de simulación (200 ns) del ligando de CI-MPR (22) en agua.

Adicionalmente, se representó la variación del RMSD del ligando a lo largo del tiempo de simulación (Figura 14b). Se utilizó una conformación abierta del ligando como estructura de referencia, con el objetivo de que fuese similar a la conformación bioactiva. Se considera que dos conformaciones son lo suficientemente similares si la variación del RMSD es igual o inferior a 2 Å. En este caso, la posición media de los átomos del ligando se desvía entre 2.5 Å y 4.5 Å respecto a la conformación inicial, por lo que ésta no se vuelve a explorar a lo largo de la dinámica.

3.3.b Dinámica molecular del LYTAC-MMP2

La molécula propuesta está formada por tres extensiones en su estructura acabadas en residuos de M6Pn como ligando de unión al receptor CI-MPR, una cadena de γ -péptido como estructura base y un inhibidor para reclutar a la proteína de interés, MMP-2 (Figura 13).

La producción de la dinámica molecular, así como el análisis de los resultados se llevó a cabo de forma análoga al ligando de CI-MPR, no obstante, al contrario que en el caso anterior, para las simulaciones de dinámica molecular del LYTAC se tuvo en cuenta el estado de protonación del grupo fosfonato. Como ya se indicó en el apartado de Materiales y Métodos, a pH fisiológico el grupo fosfonato se encuentra en un 88.6% con carga -1 y en un 11.4% con carga -2 (Figura 7). A pesar de esto y con el objetivo de poder comparar el comportamiento dinámico del ligando de CI-MPR y el LYTAC, se decidió modelar también con carga neutra.

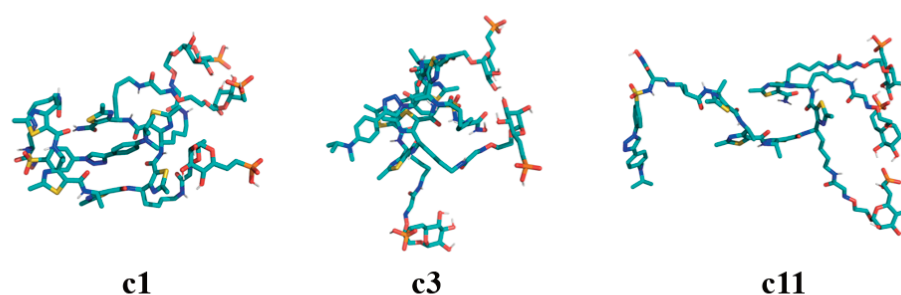
Desafortunadamente, la dinámica del compuesto con carga neutra falló por problemas en el término electrostático y, por lo tanto, los datos no se muestran en este trabajo.

Dinámica molecular del LYTAC-MMP2 ($\delta = -3$)

El estado de protonación -3 sería el mayoritario para el LYTAC a pH fisiológico, puesto que dispone de tres residuos terminales de M6Pn.

Al igual que en el caso anterior, se extrajeron doce conformeros con los siguientes porcentajes de distribución: 35.7% para c1, 16.51% para c2, 13.9% para c3, 12.83% para c4, 10.06% para c5, 3.3% para c6, 2.43% para c7, 1.71% para c8, 1.37% para c9, 1.07% para c10, 1.05% para c11 y 0.06% para c12. En este caso, la dispersión de los resultados es mayor, lo que indicaría un mayor número de cambios conformacionales representativos a lo largo de la dinámica. El conformero mayoritario (c1) (Figura 15a) se encuentra en una conformación cerrada estabilizada principalmente por apilamientos π - π entre el γ -péptido y ligando. En cambio, los conformeros c3 y c11 presentan una disposición espacial más cercana a la bioactiva. Por un lado, aunque la disposición de los residuos de M6Pn del conformero c3 pudiesen permitir la unión al receptor, el inhibidor de MMP-2 se encuentra inaccesible debido al establecimiento de interacciones intramoleculares con el γ -péptido. Por otro lado, el conformero c11, aunque es minoritario, adopta la conformación extendida necesaria

A



B

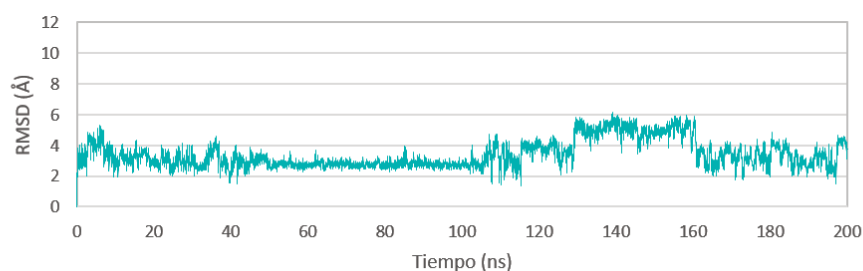


Figura 15. (A) Conformeros representativos extraídos de 200 ns de dinámica molecular del LYTAC-MMP2 con carga -3. Las imágenes han sido generadas con PyMOL. (16) (B) Representación gráfica de la variación de RMSD (Å) frente al tiempo de simulación (200 ns) del LYTAC-MMP2 con carga -3 en agua.

para que el compuesto pueda unirse a ambas dianas.

La desviación conformacional del LYTAC a lo largo de la dinámica respecto a la conformación bioactiva de referencia oscila entre 3 y 6 Å (Figura 15b). Sin embargo, en ocasiones llega a ser menor a 2 Å, por lo que se podría concluir que el LYTAC sí es capaz de explorar ocasionalmente la conformación bioactiva a lo largo de la simulación.

Dinámica molecular del LYTAC-MMP2 ($\delta = -6$)

El estado de ionización -2 para los residuos de M6Pn dan como resultado una microespecie minoritaria del LYTAC a pH fisiológico. No obstante, ya que en el organismo existen regiones con pH superior al fisiológico y que el porcentaje de distribución de la M6Pn a este estado de ionización pasa de 11.4% (pH 7.4) a 34% (pH 8), se decidió que el estudio de su comportamiento dinámico era biológicamente relevante.

En este caso, los doce conformeros extraídos tienen una distribución de: 71.17% para c1, 11.37% para c2, 4.88% para c3, 3.8% para c4, 2.13% para c5, 1.61% para c6, 1.45% para c7, 1.01% para c8, 0.87% para c9, 0.71% para c10, 0.54% para c11 y 0.45% para c12. Teniendo en cuenta estos datos y el análisis visual del conformero mayoritario (c1) (Figura 16a), el LYTAC se mantiene en una conformación cerrada durante prácticamente toda la dinámica.

Aunque no se vea representado en la Figura 16b, el LYTAC es capaz de explorar conformaciones más abiertas, como las representadas por los conformeros c6 y c11 (Figura 16a). Además, curiosamente, se aprecia una disminución paulatina del valor de RMSD a lo largo de la simulación lo que llevaría a pensar que, si se alargara el tiempo de simulación, el LYTAC podría llegar a explorar la conformación inicial o bioactiva.

4. CONCLUSIONES

Mediante el estudio estructural del receptor CI-MPR se han propuesto argumentos para apoyar la hipótesis de la dimerización del receptor a través de glicosilaciones terminadas en residuos de M6P. Asimismo, se ha propuesto al dominio MRH3 como dominio de reconocimiento de azúcares más plausible para la interacción del receptor con un LYTAC. Se ha demostrado mediante técnicas de *docking* que la interacción entre éste y la M6P está favorecida energéticamente en comparación con los resultados obtenidos para los dominios MRH5 y MRH9. Del mismo modo, mediante simulaciones de dinámica molecular se ha propuesto un modo de unión de M6P al dominio MRH3 que permanece estable a lo largo del tiempo de simulación.

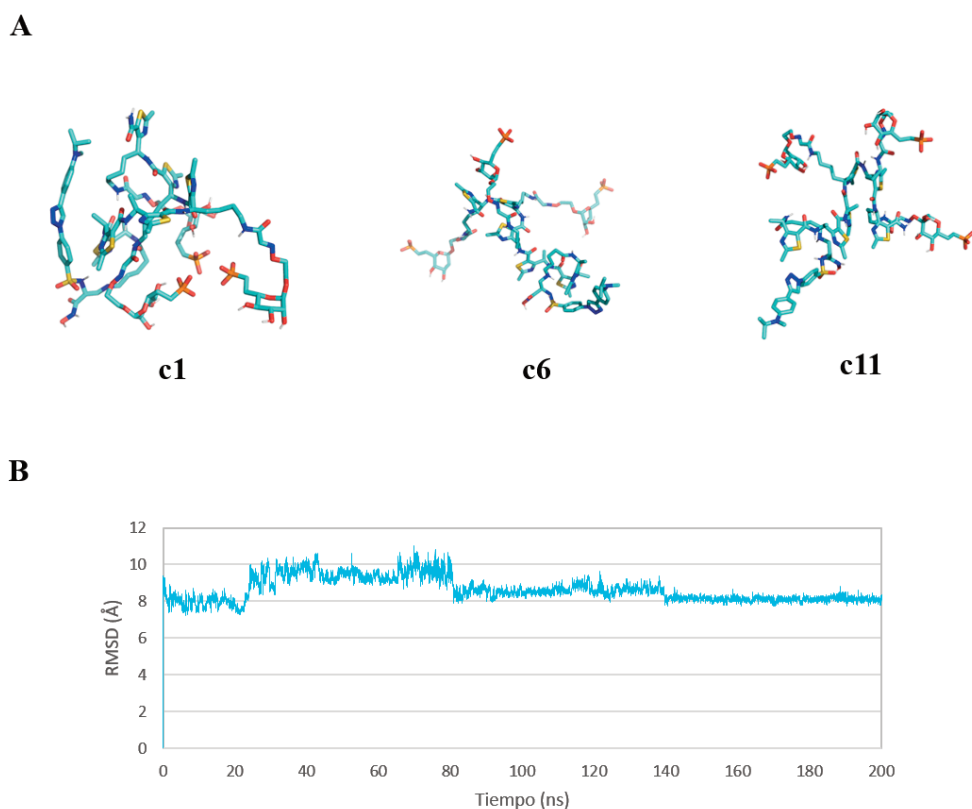


Figura 16. (A) Conformeros representativos extraídos de 200 ns de dinámica molecular del LYTAC-MMP2 con carga -6. Las imágenes han sido generadas con PyMOL (16). (B) Representación gráfica de la variación de RMSD (Å) frente al tiempo de simulación (200 ns) del LYTAC-MMP2 con carga -6 en agua.



Por otro lado, se ha diseñado un LYTAC basado en un ligando de CI-MPR previamente descrito en la bibliografía, que razonadamente podría tener utilidad para la degradación de MMP-2 (LYTAC-MMP2). El análisis conformacional del LYTAC-MMP2 muestra un comportamiento similar al del ligando de CI-MPR de referencia, sin embargo, no se han reproducido los resultados descritos en la bibliografía. La razón podría ser la falta de datos de los NOE que L. M. Ali *et al.* (22) aplicaron como restricciones para llevar a cabo las simulaciones de dinámica molecular del ligando de CI-MPR. Las principales diferencias en el comportamiento dinámico entre el LYTAC-MMP2 y el ligando de referencia han surgido debido a la presencia del inhibidor de MMP-2 y su capacidad de interactuar con el resto de la molécula mediante interacciones de tipo π - π entre sus grupos aromáticos. Para continuar este trabajo, se llevará a cabo la simulación de dinámica molecular del LYTAC-MMP2 con carga cero, para poder así compararla con las simulaciones realizadas en este trabajo y tras la optimización de la estructura, se planteará su síntesis y posterior evaluación biológica.

5. REFERENCIAS

- Chen B, Retzlaff M, Roos T, Frydman J. Cellular strategies of protein quality control. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(8):a004374.
- Marshall RS, Vierstra RD. Dynamic Regulation of the 26S Proteasome: From Synthesis to Degradation. *Front Mol Biosci.* 2019;6:40.
- Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(7):448-462.
- Kim JJ, Olson LJ, Dahms NM. Carbohydrate recognition by the mannose-6-phosphate receptors. *Curr Opin Struct Biol.* 2009;19(5):534-542.
- Olson LJ, Misra SK, Ishihara M, Battaile KP, Grant OC, Sood A, et al. Allosteric regulation of lysosomal enzyme recognition by the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Commun Biol.* 2020;3(1):498.
- van Meel E, Klumperman J. Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system. *Histochem Cell Biol.* 2008;129(3):253-266.
- Olson LJ, Peterson FC, Castonguay A, Bohnsack RN, Kudo M, Gotschall RR, et al. Structural basis for recognition of phosphodiester-containing lysosomal enzymes by the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(28):12493-12498.
- Le Borgne R, Hoflack B. Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1404(1-2):195-209.
- Li J, Sahagian GG. Demonstration of tumor suppression by mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor. *Oncogene.* 2004;23(58):9359-9368.
- Brown J, Jones EY, Forbes BE. Interactions of IGF-II with the IGF2R/cation-independent mannose-6-phosphate receptor mechanism and biological outcomes. *Vitam Horm.* 2009;80:699-719.
- Zavorka ME, Connelly CM, Grosely R, MacDonald RG. Inhibition of insulin-like growth factor II (IGF-II)-dependent cell growth by multidentate pentamannosyl 6-phosphate-based ligands targeting the mannose 6-phosphate/IGF-II receptor. *Oncotarget.* 2016;7(38):62386-62410.
- Chao W, D'Amore PA. IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19(2):111-120.
- Castonguay AC, Olson LJ, Dahms NM. Mannose 6-phosphate receptor homology (MRH) domain-containing lectins in the secretory pathway. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1810(9):815-826.
- Bohnsack RN, Song X, Olson LJ, Kudo M, Gotschall RR, Canfield WM, et al. Cation-independent mannose 6-phosphate receptor: a composite of distinct phosphomannosyl binding sites. *J Biol Chem.* 2009;284(50):35215-35226.
- Olson LJ, Castonguay AC, Lasanajak Y, Peterson FC, Cummings RD, Smith DF, et al. Identification of a fourth mannose 6-phosphate binding site in the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Glycobiology.* 2015;25(6):591-606.
- DeLano WL. Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter On Protein Crystallography.* 40, 82-92.2002.
- Bochel AJ, Williams C, McCoy AJ, Hoppe HJ, Winter AJ, Nicholls RD, et al. Structure of the Human Cation-Independent Mannose 6-Phosphate/IGF2 Receptor Domains 7-11 Uncovers the Mannose 6-Phosphate Binding Site of Domain 9. *Structure.* 2020;28(12):1300-1312.e5.
- Marron-Terada PG, Hancock MK, Haskins DJ, Dahms NM. Recognition of Dictyostelium discoideum lysosomal enzymes is conferred by the amino-terminal carbohydrate binding site of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *Biochemistry.* 2000;39(9):2243-2253.
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* [Internet]. 2011 2011/10/; 7:[539 p.]. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/21988835> Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC21988835/?tool=EBI> Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC21988835/pdf/?tool=EBI> Available from:



- <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75> Available from:
<https://europepmc.org/articles/PMC3261699> Available from:
<https://europepmc.org/articles/PMC3261699?pdf=render>.
20. Brown J, Jones EY, Forbes BE. Keeping IGF-II under control: lessons from the IGF-II-IGF2R crystal structure. *Trends Biochem Sci.* 2009;34(12):612-619.
 21. Wang R, Qi X, Schmiede P, Coutavas E, Li X. Marked structural rearrangement of mannose 6-phosphate/IGF2 receptor at different pH environments. *Sci Adv.* 2020;6(7):eaaz1466.
 22. Ali LMA, Simon M, El Cheikh K, Aguesseau-Kondrotas J, Godefroy A, Nguyen C, et al. Topological Requirements for Cl-M6PR-Mediated Cell Uptake. *Bioconjug Chem.* 2019;30(10):2533-2538.
 23. Ottis P, Crews CM. Proteolysis-Targeting Chimeras: Induced Protein Degradation as a Therapeutic Strategy. *ACS Chem Biol.* 2017;12(4):892-898.
 24. Zorca CE, Fallahi A, Luo S, Eldeeb MA. Multifaceted targeted protein degradation systems for different cellular compartments. *Bioessays.* 2022;44(6):e2200008.
 25. Zhang X, Liu H, He J, Ou C, Donahue TC, Muthana MM, et al. Site-Specific Chemoenzymatic Conjugation of High-Affinity M6P Glycan Ligands to Antibodies for Targeted Protein Degradation. *ACS Chemical Biology.* 2022;17(11):3013-3023.
 26. Alabi SB, Crews CM. Major advances in targeted protein degradation: PROTACS, LYTACS, and MADTACS. *J Biol Chem.* 2021;296:100647.
 27. Ahn G, Banik SM, Miller CL, Riley NM, Cochran JR, Bertozzi CR. LYTACS that engage the asialoglycoprotein receptor for targeted protein degradation. *Nat Chem Biol.* 2021;17(9):937-946.
 28. Banik SM, Pedram K, Wisnovsky S, Ahn G, Riley NM, Bertozzi CR. Lysosome-targeting chimaeras for degradation of extracellular proteins. *Nature.* 2020;584(7820):291-297.
 29. Nobel Prize [Available from:
<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/>.
 30. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem.* 2007;15(6):2223-2268.
 31. Bassiouni W, Ali MAM, Schulz R. Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease. *The FEBS Journal.* 2021;288(24):7162-7182.
 32. Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Isupov M, Lindqvist Y, Schneider G, et al. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science.* 1999;284(5420):1667-1670.
 33. Gimeno A, Beltrán-Debón R, Mulero M, Pujadas G, García-Vallvé S. Understanding the variability of the S1' pocket to improve matrix metalloproteinase inhibitor selectivity profiles. *Drug Discov Today.* 2020;25(1):38-57.
 34. Zapico JM, Puckowska A, Filipiak K, Coderch C, de Pascual-Teresa B, Ramos A. Design and synthesis of potent hydroxamate inhibitors with increased selectivity within the gelatinase family. *Org Biomol Chem.* 2015;13(1):142-156.
 35. Zapico JM, Acosta L, Pastor M, Rangasamy L, Marquez-Cantudo L, Coderch C, et al. Design and Synthesis of Water-Soluble and Potent MMP-13 Inhibitors with Activity in Human Osteosarcoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2021;22(18):9976.
 36. Fabre B, Ramos A, de Pascual-Teresa B. Targeting matrix metalloproteinases: exploring the dynamics of the S1' pocket in the design of selective, small molecule inhibitors. *J Med Chem.* 2014;57(24):10205-10219.
 37. The Protein Data Bank [Internet]. 2000. Available from: <https://www.rcsb.org/>.
 38. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W296-w303.
 39. Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, Halgren TA, et al. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein—Ligand Complexes. *J Med Chem.* 2006;49(21):6177-6196.
 40. Schrödinger Release 2022-3 : Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
 41. Schrödinger Release 2020-1 : LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020.
 42. Sastry GM, Adzhigirey M, Day T, Annabhimoju R, Sherman W. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J Comput Aided Mol Des.* 2013;27(3):221-234.
 43. Schrödinger Release 2018-1: Glide, Schrödinger, LLC, New York, N. (2018). www.schrodinger.com/Glide.
 44. J. Swails, R.C. Walker, R.C. Walker, X. Wu, L. Xiao, P.A. Kollman. Amber 20. San Francisco: University of California; 2020.
 45. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, R. Cheeseman, et al. Gaussian 09. Wallingford CT: Gaussian Inc.; 2016.
 46. Kirschner KN, Yongye AB, Tschampel SM, González-Outeiriño J, Daniels CR, Foley BL, et al. GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field. *Carbohydrates. J Comput Chem.* 2008;29(4):622-655.
 47. Tian C, Kasavajhala K, Belfon KAA, Raguet L, Huang H, Migués AN, et al. ff19SB: Amino-Acid-Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution. *J Chem Theory Comput.* 2020;16(1):528-552.
 48. Cherinka B, Andrews BH, Sánchez-Gallego J, Brownstein J, Argudo-Fernández M, Blanton M, et al. Marvin: A Tool Kit for



- Streamlined Access and Visualization of the SDSS-IV MaNGA Data Set. *Astron J.* 2019;158:74.
49. D.A. Case, R.M. Betz, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. Gohlke, A.W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, D. Mermelstein, K.M. Merz, G. Monard, H. Nguyen, H.T. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, C.L. Simmerling, W.M. Botello-Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X. Wu, L. Xiao and P.A. Kollman (2016), AMBER 2016, University of California, San Francisco.

Si desea citar nuestro artículo:

Diseño y evaluación computacional de LYTACS para la degradación selectiva de MMP-2

Laura Márquez Cantudo, Cristina Valverde López-Gallego,
Claire Coderch Boué y Beatriz Pascual-Teresa Fernández

An Real Acad Farm (Internet).

An. Real Acad. Farm.Vol. 89. nº (2023) · pp. 265-285

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2023.89.03.02>

VALOR TERAPÉUTICO DE LA RESTAURACIÓN DE MICROARNS SUPRESORES TUMORALES EN EL DESARROLLO DE CÁNCER DE PULMÓN

THERAPEUTIC VALUE OF RESTORATION OF TUMOR SUPPRESSOR MICRORNAS IN THE DEVELOPMENT OF LUNG CANCER

Pedro Medina Vico

GENYO. Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer / University of Granada / Andalusian Regional Government, PTS Granada - Avenida de la Ilustración, 114 - 18016

correspondingauthor: pedro.medina@genyo.es

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Premio OTIMES del Concurso Científico RANF 2022

RESUMEN

Los MicroARNs (miARNs) son moléculas reguladoras de la expresión de genes y como tales colaboran para determinar cuántas proteínas se producen en las células de un determinado gen. Como su nombre indican son moléculas funcionales pese a su pequeño tamaño (micro) y están constituidas por ácido ribonucleico (ARN), en contraste con los reguladores de la expresión génica más extensamente estudiados, que son de naturaleza proteica. Debido a su pequeño tamaño y su naturaleza peculiar, la presencia de los genes que codifican a los microARNs fue descubierta en el genoma humano en etapas posteriores a la de su secuenciación, ya en el siglo XXI. Los microARNs juegan un papel fundamental en el establecimiento de la identidad y el funcionamiento celular. Por lo que componentes de la maquinaria de síntesis de microARNs o microARNs per se, han sido asociados con diversas patologías humanas, incluyendo el cáncer. Se ha descubierto que los microARNs juegan un papel importante en muchos procesos celulares que están alterados en cáncer como: diferenciación, proliferación y apoptosis. Los genes que codifican para los microARNs se han encontrado en regiones cromosómicas frecuentemente ganadas o perdidas en cáncer. Algunos microARNs presentan niveles de expresión alterados en cáncer y han demostrado su capacidad para afectar la transformación celular, carcinogénesis y metástasis actuando como oncogenes o genes supresores de tumores. Así, la presencia de determinados microARNs se ha visto con utilidad clínica diagnóstica y pronóstica y se están intentando validar terapias basadas en la actividad de microARNs relevantes en cáncer. La familia de microARNs let-7 fue la primera descubierta en humanos. Muchos de sus miembros están en regiones cromosómicas frecuentemente delecionadas en tumores de cáncer de pulmón. Además, se ha correlacionado una expresión reducida de estos genes con un peor pronóstico cáncer de pulmón. Se piensa que el papel de supresor tumoral que ejerce let-7 es debido a que es capaz de inhibir la síntesis de importantes oncogenes tales como RAS, MYC y HMGA2 y la de proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular como CDC25A, CDK6 y la Ciclina D2. En el presente trabajo se recogen resultados experimentales que indican que la pérdida de función de let-7 favorece el desarrollo tumoral en un modelo tumoral de ratón, sugiriendo la hipótesis de que la actividad de let-7 colabora para evitar la formación de tumores. Por otra parte, se exponen resultados que indican que la reintroducción de la actividad de let-7 en tumores pulmonares ya establecidos dificultan significativamente su crecimiento, entrando incluso en regresión. Estos resultados pre-clínicos demuestran el potencial terapéutico antitumoral de la actividad de let-7 y que su reintroducción en tumores pulmonares podría tener utilidad clínica si se pudiera realizar de forma eficiente y segura.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are molecules that regulate gene expression and as such they collaborate to determine how many proteins are produced in the cells of a given gene. As their name indicates, they are functional molecules despite their small size (micro) and are made up of ribonucleic acid (RNA), in contrast to the most extensively studied regulators of gene expression, which are protein in nature. Due to its small size and peculiar nature, the presence of the genes that encode microRNAs was discovered in the human genome in stages after its sequencing, already in the 21st century.

MicroRNAs play a fundamental role in establishing cellular identity and function. Therefore, components of the microRNA synthesis machinery, or microRNAs per se, have been associated with various human pathologies, including cancer.

It has been discovered that microRNAs play an important role in many cellular processes that are altered in cancer such as: differentiation, proliferation, and apoptosis. The genes that code for microRNAs have been found in chromosomal regions frequently gained or lost in cancer. Some microRNAs have altered expression levels in cancer and have demonstrated their ability to affect cellular transformation, carcinogenesis, and metastasis by acting as oncogenes or tumor suppressor genes. Thus, the presence of certain microRNAs has been seen to have clinical diagnostic and prognostic utility and attempts are being made to validate therapies based on the activity of relevant microRNAs in cancer.

The let-7 family of microRNAs was the first discovered in humans. Many of its members are in chromosomal regions frequently deleted in lung cancer tumors. Furthermore, reduced expression of these genes has been correlated with a worse lung cancer prognosis. It is thought that the role of let-7 as a tumor suppressor is due to the fact that it is capable of inhibiting the synthesis of important oncogenes such as RAS, MYC and HMGA2 and that of proteins involved in cell cycle progression such as CDC25A, CDK6 and Cyclin D2. In the present work, experimental results are collected that indicate that the loss of function of let-7 favors tumor development in a mouse tumor model, suggesting the hypothesis that the activity of let-7 collaborates to prevent tumor formation. On the other hand, results are presented that indicate that the reintroduction of let-7 activity in already established lung tumors significantly hinders their growth, even entering regression. These preclinical results demonstrate the antitumor therapeutic potential of let-7 activity and that its reintroduction into lung tumors could have clinical utility if it could be performed efficiently and safely.

Palabras Clave:

microARN
cancer
genes supresores tumorales
terapias anti-tumorales
terapias experimentales

Keywords:

microRNA
tumor suppressor genes
cancer
anti-tumor therapies
experimental therapies



1. LA FAMILIA DE MICROARNS *let-7* Y SU PAPEL EN EL CÁNCER

Los micro-ARN (miARNs) son transcritos de genes que no se traducen a proteínas, y que ejercen papeles de regulación sobre la traducción de otros transcritos. El descubrimiento de la presencia de estos genes en el genoma humano, ya entrado en el siglo XXI, ha supuesto un cambio en el paradigma y función que se le otorgaba a los genes no codificantes de proteínas y sus transcritos (los ARN no codificantes).

El primer miembro de estos genes se descubrió al comienzo de la década de los ochenta en el gusano *C. elegans* (Ambros, 1989; Chalfie et al., 1981). En principio se pensó que era una peculiaridad de este nematodo, sin embargo, años después se empezaron a encontrar secuencias homólogas en otros organismos, incluidos los humanos, hasta el punto de que se ha estimado que corresponden al 1-4% de todos los genes transcritos humanos (Bentwich et al., 2005; Lim et al., 2003), siendo una de las familias de genes reguladores más abundante del genoma. Actualmente, en octubre de 2023 se han censado en la base de datos miRbase (<https://mirbase.org/>) 1917 secuencias encontradas en el genoma humano que podrían codificar a microARNs, de entre ellas existe evidencia alta de que lo hagan en más de quinientas. El papel de los microARNs sobre la síntesis de proteínas ha abierto un nuevo campo en la patología molecular, ya que disfunciones en la actividad de estos reguladores puede generar diversas patologías cuya causa no se había podido hallar hasta ahora.

El primer microARN descubierto en humanos se trató de *let-7a*. Su descubrimiento se hizo evidente cuando se compararon los genomas de humanos y del nematodo *C. elegans* y se halló que la secuencia funcional del gen *lethal-7* de *C. elegans* tenía una secuencia ortóloga en humanos (*hsa-let-7a*). De hecho, el genoma humano presenta, una, familia de microARNs *let-7*, compuesta por

12 genes que codifican para 9 microARN maduros, esto es así porque tres de ellos codifican para el mismo microARN maduro. Estos microARNs se agrupan en una familia porque presentan unas secuencias muy similares de 21-22 nucleótidos, que presentan en el extremo 5' una región conservada llamada semilla de familia (family seed), implicada en su funcionalidad y en el reconocimiento de dianas (Figura 1).

En este trabajo se expondrán resultados que intentan profundizar en el conocimiento de la implicación de los microARNs en el desarrollo del cáncer de pulmón con el fin de diseñar terapias experimentales que sirvan como prueba de concepto para su futuro aplicación en la clínica.

El cáncer de pulmón es el tumor más importante en cuanto a mortalidad en el mundo occidental. En España en el 2022 se diagnosticaron alrededor de 31000 casos nuevos de cáncer de pulmón y ha sido responsable de alrededor de 22000 muertes. Esto le hace ser el segundo tipo de cáncer en cuanto a incidencia (tras el cáncer colorrectal) y el primero en cuanto mortalidad. Como enfermedad, el cáncer de pulmón sigue siendo altamente letal, ya que menos del 15% de los pacientes españoles logran sobrevivir cinco años tras el diagnóstico. La letalidad de los cánceres de estómago, hígado, páncreas, esófago y estómago son comparables a la que tiene el cáncer de pulmón, aunque la suma de muertes que estos producen es la mitad de las que este produce el cáncer de pulmón.

Actualmente existen un número de evidencias creciente que vinculan la carcinogénesis pulmonar con aberraciones en los microARNs y en concreto con la familia *let-7*, algunas de las más significativas son:

- 1) Se ha observado que la ARNasa encargada de la maduración citoplasmática de los transcritos de miARNs (DICER) presenta una pérdida de expresión en cáncer de pulmón relacionada con un peor pronóstico (Karube et al., 2005).

Gene	Genome position	
mmu-let-7a-1	13:48550116-48550209	mmu-let-7a TGAGGTAGTAGGTTGTATAGT
mmu-let-7a-2	09:41287785-41287880	mmu-let-7b TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT
mmu-let-7b	15:85535085-85535169	mmu-let-7c TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT
mmu-let-7c-1	16:77482249-77482342	mmu-let-7d AGAGGTAGTAGGTTGCATAGT
mmu-let-7c-2	15:85534369-85534463	mmu-let-7e TGAGGTAGGAGGTTGTATAGT
mmu-let-7d	13:48547949-48548051	mmu-let-7f TGAGGTAGTAGATTGTATAGT
mmu-let-7e	17:17534970-17535062	mmu-let-7g TGAGGTAGTAGTTGTACAGT
mmu-let-7f-1	13:48549766-48549854	mmu-let-7i TGAGGTAGTAGTTGTGCTGT
mmu-let-7f-2	0X:147253062-147253144	mmu-mir-98 TGAGGTAGTAAGTTGTATTGTT
mmu-let-7g	09:106036941-106037028	Consensus tGAGGTAGtAggTTGtataGT.
mmu-let-7i	10:122388700-122388784	***** Family seed
mmu-mir-98	0X:147253930-147254037	

Figura 1: Familia de microARNs *let-7*: en ratón, al igual que en humanos, existen 12 genes (situados en diferentes posiciones cromosómicas) que codifican para 9 microARNs maduros (representados en la derecha). Las familias de microARNs comparten una secuencia (family seed) que está implicada en el reconocimiento de sus dianas y su funcionalidad, para la familia de *let-7* esta secuencia es (GAGGTAG).

- 2) La expresión de los genes de la familia de microARNs let-7 está reducida significativamente en tumores pulmonares pareados (Takamizawa et al., 2004).
- 3) Varios genes de la familia de microARNs let-7 mapean en regiones genómicas que están delecionadas tumores primarios pulmonares (Calin et al., 2004)
- 4) La de la familia de microARNs let-7 puede inhibir el crecimiento tumoral en algunos modelos celulares experimentales (Johnson et al., 2007)
- 5) La expresión de genes importantes para el desarrollo tumoral como el oncogén KRAS (un oncogén significativamente alterado en cáncer de pulmón) está regulado por los genes de la familia de microARNs let-7 (Johnson et al., 2005).

A continuación, se expondrán evidencias experimentales desarrolladas en preclínicos *in vivo* (Trang P, Medina P.P. et al., 2010) que pueden utilizarse para determinar el papel biológico de let-7 en el desarrollo tumoral y para desarrollar terapias experimentales antitumorales.

2. LA RE-INTRODUCCIÓN DE LET-7 EN TUMORES HUMANOS TRANSPLANTADOS EN RATONES INMUNODEFICIENTES REDUCE EL DESARROLLO TUMORAL

Estos estudios tenían como objetivo, estudiar qué pasa cuando se recupera la actividad de let-7, que se pierde en pacientes de cáncer de pulmón.

Para realizar estos estudios se utilizaron ratones severamente inmunodeprimidos del tipo NOD/SCID. Dichos ratones carecen de linfocitos funcionales, por lo que tienen muy dificultado el rechazo de células tumorales humanas, pudiéndose establecer en ellos trasplantes de tumores humanos (xenografts).

Se utilizó la línea celular H460, derivada de un tumor humano de células no pequeñas de cáncer de pulmón. Esta línea celular está entre las líneas celulares más agresivas y refractarias a terapias antitumorales convencionales (Hohla et al., 2007; Isobe et al., 2005).

Tres millones de células H460 fueron inyectadas subcutáneamente a cada ratón NOD/SCID ($n=6$). Once días después de la inoculación, los ratones desarrollaron tumores palpables de entre 100 y 150 mm³ y fueron inyectados intratumoralmente con suspensiones que contenían el microARN let-7b sintético (oligonucleótidos obtenidos de Ambion, Austin, TX, USA) o un microARN sintético de secuencia aleatoria (miR-NC utilizado como control). Dichos microARN se acomplejaron previamente con un agente de transfección lipídico desarrollado específicamente para ARNs pequeños (siPORT, obtenido de Ambion, Austin, TX, USA)

El tratamiento fue repetido cada tres días (a los días 11, 14, 17, 20), y la dinámica de crecimiento tumoral fue analizada durante las siguientes semanas, hasta que los ratones presentaron un tumor que excedía los 600 mm³ momento en el cual los ratones fueron sacrificados. Los tumores tratados solamente con el agente de transfección (siPORT), con suero salino (PBS) o con el microARN control (miR-NC) desarrollaron una dinámica de crecimiento similar. Sin embargo, los tumores que fueron tratados con let-7b, sufrieron una significativa reducción en su tasa de crecimiento (Figura 2).

Trascurridos 21 días los ratones fueron sacrificados y sus tumores fueron estudiados histológicamente. Un análisis de microsecciones teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) mostraron que los ratones controles (bien los tratados con el microARN control, o bien los tratados únicamente con el agente de transfección, siPORT) mostraron células densamente empaquetadas y sanas (marcadas como v), con pocas regiones necróticas (marcadas como d), en

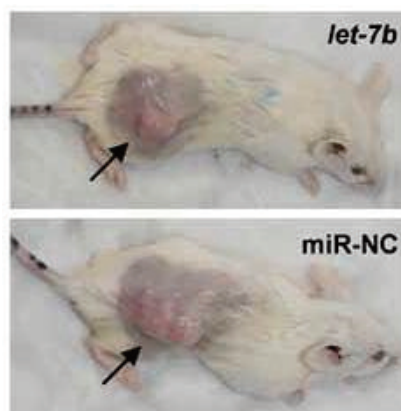
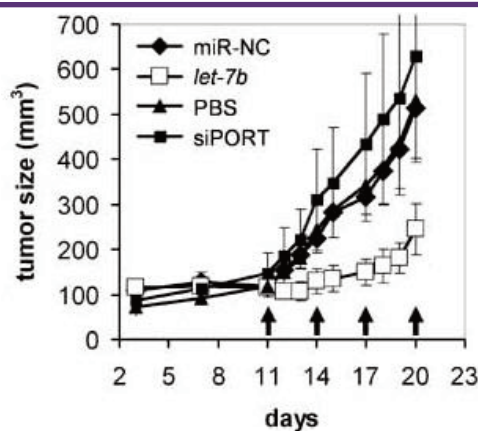


Figura 2: Izquierda Dinámica de crecimiento tumoral de xenografts en grupos de ratones ($n=6$) tratados con let-7b (cuadrados blancos), microARN control (rombos), el agente de transfección siPORT solamente (cuadrados negros) y suero salino (PBS) (triángulos). En ordenadas se representa el tamaño tumoral en milímetros cúbicos, en abscisas el tiempo en días. Las flechas indican los días en los cuales los ratones fueron tratados (11, 14, 17, 20). Derecha: una pareja de ratones representativos cuyo tumor (flechas) fue tratado con let-7b o con el microARN control.

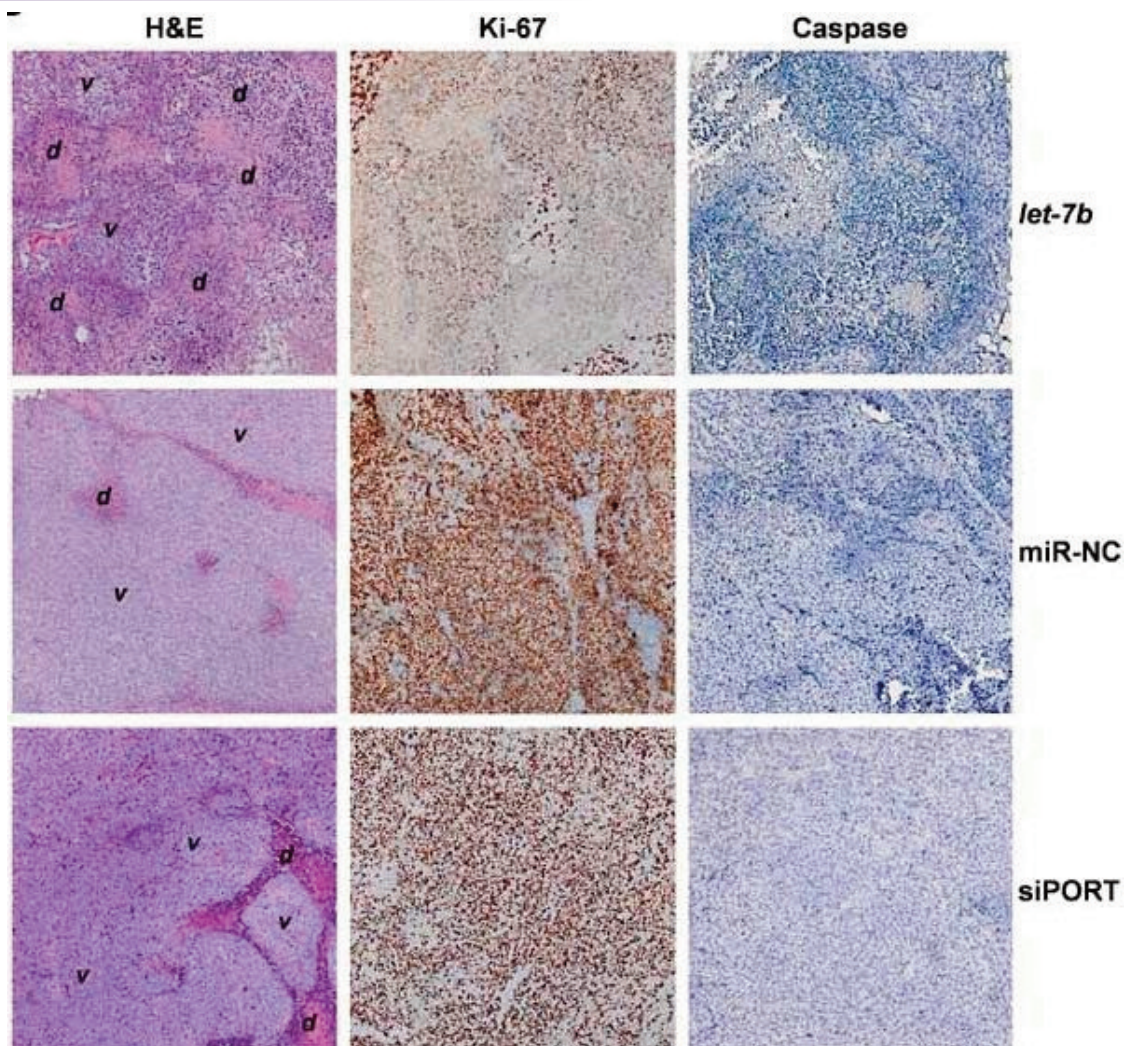


Figura 3: Histología de los tumores xenografts : Microsecciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina (H&E), el marcador de proliferación tumoral (Ki-67) y el marcador de apoptosis (caspase-3). Las células controles (tratadas con el agente de transfección siPORT) o con el microARN control (miR-NC) presentan una morfología viable (marcado como v en H&E) y unos niveles de proliferación (Ki67) sensiblemente superior a las tratadas con let-7b, que presentan abundante necrosis (marcada como d). Sin embargo, los niveles de apoptosis (que se deberían de marcar como marrón en el cuadro caspase) son similares y bajos en todos los tumores.

contraposición con los tumores que recibieron let-7b que presentaron amplias regiones con células muertas (Figura 3).

Las microsecciones tumorales fueron analizadas utilizando el marcador de proliferación celular Ki-67 y el marcador apoptótico (caspase-3), con el fin de evaluar la dinámica de crecimiento tumoral y de apoptosis. Los tumores controles (miR-NC y siPORT) presentaron una marcada presencia del antígeno ki-67 (teñido en marrón oscuro), mientras los tumores tratados con let-7b, presentaron una considerable reducción de este marcador. Sin embargo, los niveles de caspase-3 eran similares y bajos en todos los tumores. Así se puede concluir, que los efectos de la reintroducción de let-7b se deben en mayor medida a un efecto en una disminución en la proliferación tumoral y no en un aumento en la apoptosis de esta.

Con el fin de comprobar que dichos tumores incrementaban los niveles de let-7b tras la inyección del preparado

de oligos sintéticos se realizó una PCR cuantitativa capaz de detectar al microARN let-7b maduro (Taqman miRNA, AB). Se observó que los tumores inyectados con los oligos let-7b tenían unos 14 veces más niveles de let-7b en comparación con los tumores provenientes de los controles (miR-NC, siPORT, PBS), confirmándose la adquisición de let7b por parte de las células tumorales inyectadas (Figura 4).

La familia de microARNs let-7 actúa como tumor supresor, inhibiendo la expresión de importantes oncogenes (Johnson et al., 2007), por lo que, con el fin de ver la actividad del microARN transfectado se midió la cantidad de mensajero de dos de sus dianas: CDK6 y N-RAS. Se observó una sensible disminución de esta en los tumores tratados (Figura 4). Concluyéndose que el let-7 inyectado intratumoralmente, no es solo capaz de penetrar en las células tumorales, sino que es capaz de ejercer su función inhibiendo rutas oncogénicas conocidas para impedir el crecimiento tumoral.



Figura 4: Izquierda: Niveles de let-7b en tumores tratados medido por PCR cuantitativa utilizando cebadores específicos para detectar let-7b. Derecha: niveles de conocidas dianas de let-7 (CDK6, N-RAS) medidos por PCR cuantitativa utilizando cebadores específicos. Los datos muestran medias y errores de tres ratones analizados.

3. LA EXPRESIÓN DE LET-7 EN TUMORES DESARROLLADOS EN RATONES QUE TIENEN ACTIVADO EL ONCOGÉN RAS PROVOCA REGRESIÓN TUMORAL

Para observar si *let-7* podía reducir la carga tumoral actuando como un supresor tumoral in vivo, se utilizó un modelo de ratón transgénico (Jackson et al., 2001) que desarrolla tumores pulmonares en pocas semanas cuando se activa la forma mutada del oncogén K-RAS (G12D). Dicha activación se produce a través de la administración de la recombinasa cre mediante adenovirus inoculados al pulmón por el pasaje nasofaríngeo (Figura 5). Se utilizó este modelo debido a que previamente se había demostrado que *let-7* era capaz de inhibir los niveles de expresión de K-RAS (Johnson et al., 2005), por lo que este modelo puede poner más fácilmente el papel de *let-7* en el desarrollo tumoral.

Se utilizaron 18 ratones LSL-Kras-G12D de 6 semanas, a los que se administraron 5x10⁸ PFUs unidades de adenovirus

intranasalmente. Después de 10 semanas de incubación, se dividieron en tres grupos de seis ratones (0, L, C). Un grupo de ratones (0) se sacrificaron para obtener una idea de la carga tumoral en el momento del tratamiento, los dos restantes grupos (L y C) se inocularon con 1x10⁶ PFUs unidades de lentivirus que codificaban para *let-7* y un plásmido vacío (utilizado como control) respectivamente. Los dos grupos de ratones en tratamiento se mantuvieron durante cuatro semanas más y posteriormente fueron sacrificados para analizar su carga tumoral.

La carga tumoral fue medida en los diferentes grupos. El grupo de ratones tratado con *let-7* (L) presentó una carga tumoral significativamente menor a los grupos 0 ($p=0.04$) y C ($p=0.01$) (Figura 6). De esta forma, el grupo L tenía una carga tumoral un 75% menor que el grupo C y un 64% menor que el grupo 0. Por lo que se puede concluir que el tratamiento de los tumores con *let-7* induce una sensible regresión tumoral y que la administración de *let-7* puede tener un valor terapéutico en el cáncer de pulmón.

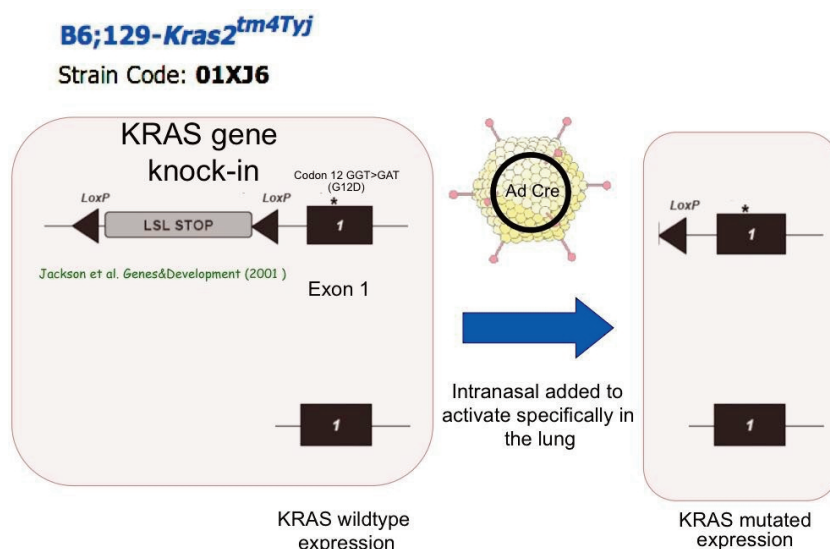


Figura 5: Ratón transgénico LSL-Kras-G12D (Strain 01X6). La forma mutada de KRAS (G12D) se activa mediante la inoculación de adenovirus intranasalmente que codifican para la recombinasa Cre (Jackson et al., 2001). La actividad recombinasa elimina la secuencia parada (LSL STOP), por lo que la forma mutada de K-RAS (G12D) se transcribe.

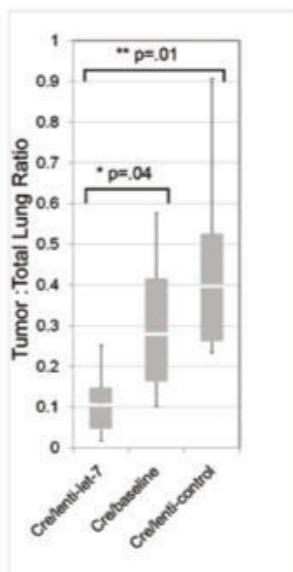


Figura 6: Carga tumoral de los grupos de ratones justo antes del tratamiento (0, Cre/basiline), el grupo de los ratones tratados con let-7 (L, Cre-lenti-let-7) y el grupo de los ratones tratados con el control (C, Cre-lenti-control). Los tumores tratados con let-7 presentan una carga tumoral significativamente menor que los grupos 0, observándose por lo tanto una regresión tumoral tras el tratamiento con let-7. El método de medición de carga tumoral usado se describe en (Esquela-Kerscher et al., 2008).

Los tumores fueron analizados histológicamente con el fin de evaluar los efectos de let-7 en la proliferación (observando la expresión de ki-67). Al igual de lo observado en los xenografts, los tumores tratados con let-7 presentan una reducción en los niveles de proliferación (Figura 7).

4. EL BLOQUEO DE LA ACTIVIDAD DE LET-7 PROMUEVE EL DESARROLLO TUMORAL PULMONAR

Aunque hay bastantes evidencias de que let-7 funciona como supresor tumoral en cáncer de pulmón (Johnson et al., 2005; Takamizawa et al., 2004) existían pocas evidencias *in vivo* de que la pérdida de función de let-7 promovía el desarrollo pulmonar.

Para realizar este experimento se utilizó unos inhibidores que se habían utilizado con éxito para bloquear funcionalmente a microARNs (Krutzfeldt et al., 2005). Estos inhibidores (anti-miRs), consisten en secuencias inversas complementarias a los microARNs maduros, que presentan modificaciones químicas (enlaces fosfotioato y bases metiladas en la ribosa) que aumentan su estabilidad *in vivo* (Figura 8).

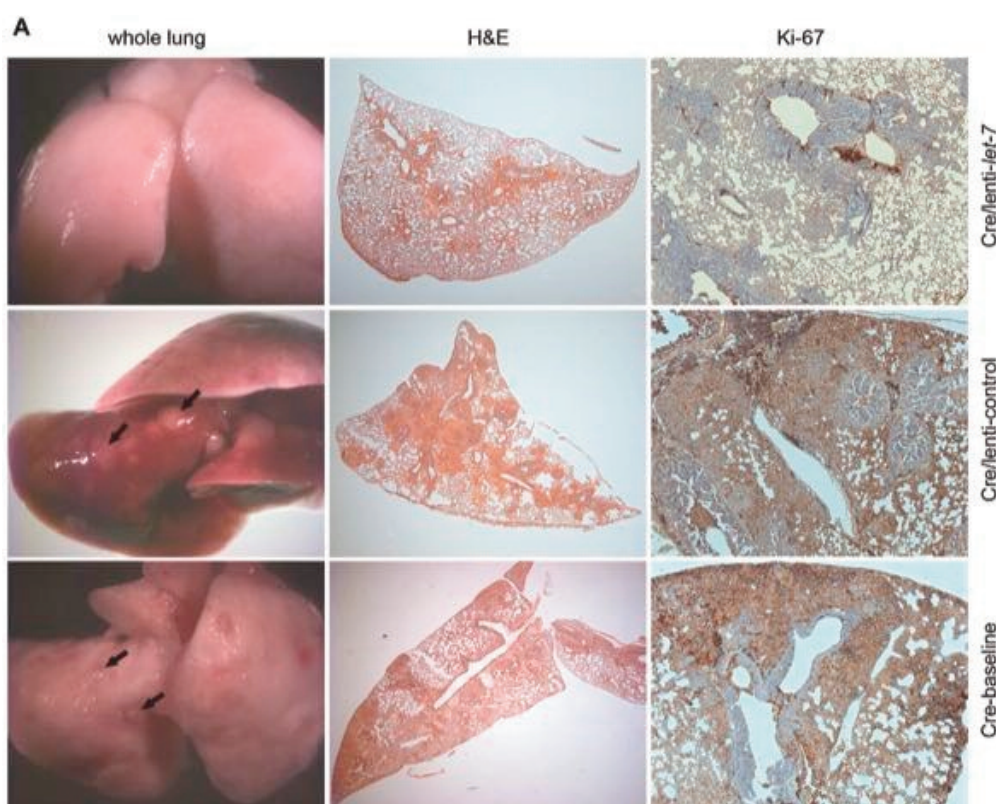


Figura 7: Izquierda: superficie pulmonar de los ratones justo antes del tratamiento (Grupo 0, Cre-baseline), tratados con el control (cre/lenti-control) y tratados con let-7 (cre/lenti-let-7). Las flechas negras indican abscesos tumorales. Centro: sección histológica pulmonar teñida con hematoxilina-eosina (H&E), nótese la hiperplasia tumoral más pronunciada en el grupo 0 y C. Izquierda: sección histológica pulmonar que revela la presencia del marcador de proliferación Ki-67, obsérvese una sensible disminución de proliferación en los tumores tratados con let-7.

mmu-let7-g

Mature miRNA (21pb)
5' **UGAGGUAGUAGUUUGUACAGU** 3'
ACUCCAUCAUCAAACAUGUCA 5'

Antimir 7g
5' **A*C*UGUACAAACUACUACCU*C*A** 3'

Scramble (control)

5' **ugcugaauuacguuguugag** 3'
3'ACGACUUUAUGCAACAACUC 5'

Similar GC% composition.
Largest area of homology to any gene in
Mouse 14pb (no human and mouse homology)

Antimir sc

5' **C*U*CAACAACGUAUAUUCAG*C*A** 3'

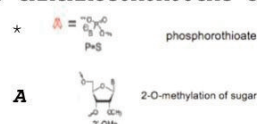


Figura 8: Anti-miRs: moléculas inhibitorias dirigidas contra let-7g se tratan de secuencias reversas complementarias al microARN (mmu-let-7, en azul este caso) modificadas químicamente para aumentar su estabilidad utilizando enlaces fosfotioato (*) y ribosas metiladas (marcadas en cursiva) de igual forma que se describe en (Kruzfeldt et al., 2005). Se utilizó una secuencia aleatoria control (scramble) de similar composición GC al microARN experimental pero sin homología con el genoma.

De entre los 9 miembros de la familia de microARNs let-7, se utilizó el let-7g por el hecho de que se había observado que let-7g se encuentra en la región cromosómica 3p21, implicada en la iniciación del cáncer (Calin et al., 2004) y porque existen evidencias que let-7g tiene efectos especialmente supresores en tumores que albergan mutaciones K-RAS (Kumar et al., 2008). Sin embargo, dada la alta homología presente en la familia de genes let-7, no podemos descartar que este anti-miR pueda tener una reacción cruzada para inhibir a otros miembros de la familia let-7.

El protocolo de administración de los anti-miRs se basó en un trabajo anterior en el cual se inoculaba intranasalmente de forma eficaz siRNA (Bitko and Barik, 2008; Bitko et al., 2005). Para cerciorarse que los anti-miRs eran capaces de acceder a las células pulmonares, se diseñó unos anti-miRs reporteros, que tenían en su extremo fluoresceína amidato (FAM) de forma que pudiera revelarse su presencia iluminando con luz azul (que la fluoresceína refleja como luz verde). De esta forma se pudo detectar que los inhibidores eran capaces de penetrar en las células pulmonares (figura 9).

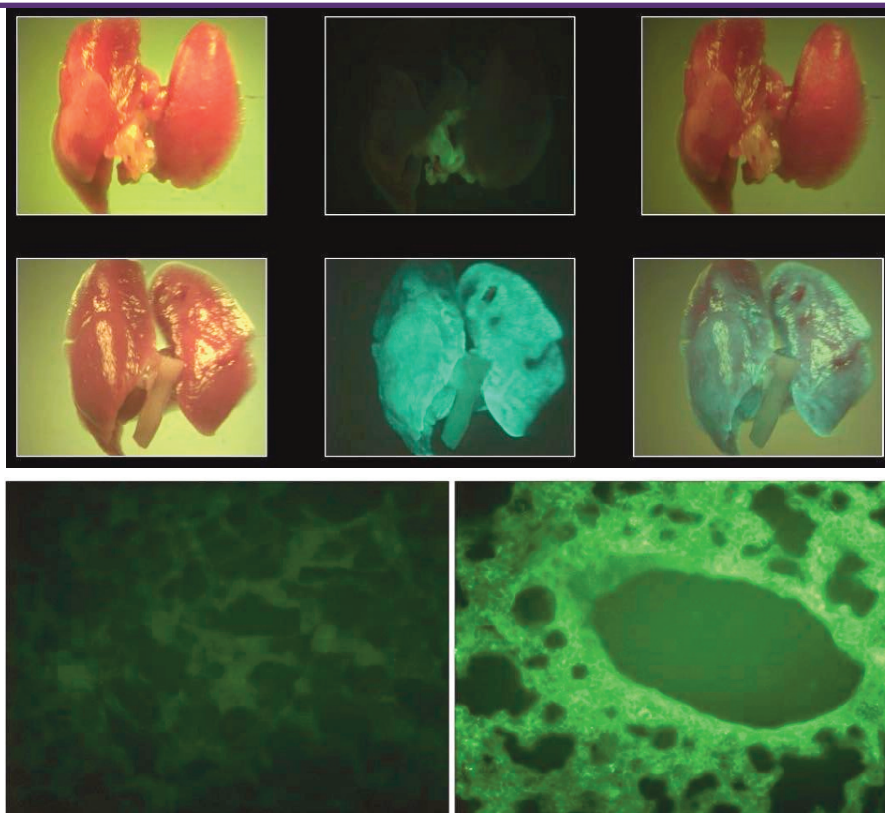


Figura 9: Superior: Pulmones de ratones a los que se había inoculado anti-miR-FAM reporteros (abajo) y pulmones normales (arriba) 16 horas después de la inoculación. Obsérvese que los pulmones inoculados con anti-miR reporteros presentan fluorescencia verde cuando se les ilumina con luz azul (centro). A la derecha puede observarse la superposición de imágenes. Inferior: fluorescencia en el tejido pulmonar (x400) donde puede observarse las células del parénquima bronquial de los pulmones sin tratar (izquierda) y tratados con los anti-miRs reporteros (derecha).

Para ver si estos inhibidores de let-7 eran capaces de modificar el desarrollo tumoral se administraron a ratones LSL-Kras-G12D (ver figura 5), de esta forma se podría validar la hipótesis de si el bloqueo funcional de let-7 promovía el desarrollo tumoral.

Se administró 60 μ g de anti-let7-g o anti-control (n=5) a los ratones LSL-Kras-G12D de forma simultánea que se les

activaba la forma mutante de K-RAS. A las siete semanas los ratones fueron sacrificados para analizar la carga tumoral de sus pulmones.

Los pulmones tratados con los inhibidores de let-7 presentaban una significativa mayor carga tumoral en comparación con los tumores tratados con el control (Figura 10) y una histología tumoral más avanzada (Figura 11).

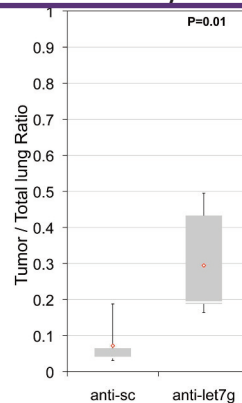


Figura 10: Carga tumoral de los ratones LSL-Kras-G12D tratados con el inhibidor de let-7g (anti-let-7g) y el control anti-sc. Obsérvese una significativa mayor carga tumoral en los tumores en los que se inhibe anti-let-7g.

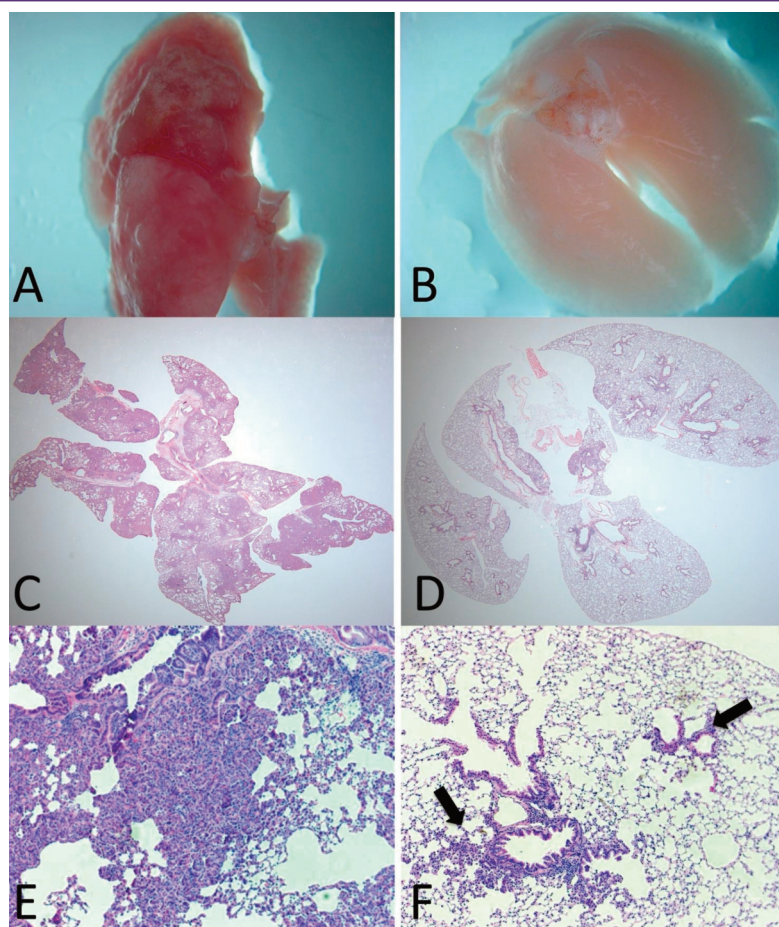


Figura 11: A-B: Pulmones de ratones tratados con inhibidores de let-7 (izquierda) y con el control (derecha). Obsérvese la superficie pulmonar llena de abscesos tumorales en los pulmones tratados con let-7. C-D: Secciones histológicas de los pulmones mostrados arriba (x100) teñidas con hematoxilina-eosina. E-F: Secciones histológicas de los pulmones mostrados arriba (x400): Nótese una hiperplasia-displasia avanzada en los pulmones tratados con inhibidores de let-7. Las flechas negras indican una hiperplasia incipiente en el tejido tratado con el control, una etapa temprana en el desarrollo tumoral.

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las evidencias presentadas indican que la inhibición de genes de la familia let-7 promueve el cáncer en un modelo preclínico *in vivo* dirigido por el oncogén K-ras, mientras que el aumento de su expresión suprime el crecimiento tumoral en tumores xenotrasplantados e incluso provoca su regresión. Esta serie de observaciones cimentan que se pueda considerar a la familia de microRNAs let-7 como genes supresores tumorales relevantes en el desarrollo de cáncer de pulmón.

La relevancia de let-7 en la patología del cáncer se debe a su función como modelador de oncogenes importantes como *ras*, *myc* o *cdk6* como se había visto anteriormente (Johnson et al., 2007; Johnson et al., 2005). Así se ha observado que la supresión tumoral ejercida por let-7 se debe principalmente a una bajada de la señal proliferativa, más que por un aumento de las rutas apoptóticas.

De forma más trascendente para la clínica, estos estudios sugieren que la re-introducción de let-7 puede tener utilidad terapéutica para tratar el cáncer de pulmón. Estos resultados se unen a otros en las que el valor terapéutico de los microARNs se había puesto de manifiesto en modelos de cáncer de hígado (Kota et al., 2009) y de próstata (Takeshita et al.). Si bien estos estudios son prometedores y sientan las bases para fundamentar estudios traslacionales clínicos, es necesario continuar investigando para utilizar a los microARNs como terapias efectivas en la clínica.

Los nuevos conocimientos alcanzados durante la optimización de las vacunas de ARN, podrían impulsar y mejorar las posibilidades para llevar a la clínica el uso de fármacos basados en la actividad de los microARNs.

6. REFERENCIAS

1. Ambros, V. (1989). A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. *Cell* 57, 49-57.
2. Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
3. Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., et al. (2005). Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 37, 766-770.
4. Bitko, V., and Barik, S. (2008). Nasal delivery of siRNA. *Methods Mol Biol* 442, 75-82.
5. Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O., and Barik, S. (2005). Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* 11, 50-55.
6. Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., et al. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15524-15529.
7. Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Iorio, M.V., Visone, R., Sever, N.I., Fabbri, M., et al. (2005). A MicroARN signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353, 1793-1801.
8. Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., et al. (2004). Human microARN genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2999-3004.
9. Chalfie, M., Horvitz, H.R., and Sulston, J.E. (1981). Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*. *Cell* 24, 59-69.
10. Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., et al. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13944-13949.
11. Esquela-Kerscher, A., and Slack, F.J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 259-269.
12. Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235-240.
13. He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J., et al. (2005). A microARN polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435, 828-833.
14. Hohla, F., Schally, A.V., Kanashiro, C.A., Buchholz, S., Baker, B., Kannadka, C., Moder, A., Aigner, E., Datz, C., and Halmos, G. (2007). Growth inhibition of non-small-cell lung carcinoma by BN/GRP antagonist is linked with suppression of K-Ras, COX-2, and pAkt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18671-18676.
15. Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293, 834-838.
16. Isobe, T., Herbst, R.S., and Onn, A. (2005). Current management of advanced non-small cell lung cancer: targeted therapy. *Semin Oncol* 32, 315-328.
17. Jackson, E.L., Willis, N., Mercer, K., Bronson, R.T., Crowley, D., Montoya, R., Jacks, T., and Tuveson, D.A. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* 15, 3243-3248.
18. Johnson, C.D., Esquela-Kerscher, A., Stefani, G., Byrom, M., Kelnar, K., Ovcharenko, D., Wilson, M., Wang, X., Shelton, J.,



- Shingara, J., et al. (2007). The let-7 microARN represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res* 67, 7713-7722.
19. Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., and Slack, F.J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microARN family. *Cell* 120, 635-647.
20. Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Takamizawa, J., Miyoshi, S., Mitsudomi, T., et al. (2005). Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci* 96, 111-115.
21. Kota, J., Chivukula, R.R., O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Montgomery, C.L., Hwang, H.W., Chang, T.C., Vivekanandan, P., Torbenson, M., Clark, K.R., et al. (2009). Therapeutic microARN delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* 137, 1005-1017.
22. Krutzfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M., and Stoffel, M. (2005). Silencing of microARNs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438, 685-689.
23. Kumar, M.S., Erkeland, S.J., Pester, R.E., Chen, C.Y., Ebert, M.S., Sharp, P.A., and Jacks, T. (2008). Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microARN family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3903-3908.
24. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microARNs from mouse. *Curr Biol* 12, 735-739.
25. Lim, L.P., Glasner, M.E., Yekta, S., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2003). Vertebrate microARN genes. *Science* 299, 1540.
26. Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. (2005). MicroARN-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 7, 719-723.
27. Medina, P.P., and Slack, F.J. (2008). microARNs and cancer: an overview. *Cell Cycle* 7, 2485-2492.
28. O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V., and Mendell, J.T. (2005). c-Myc-regulated microARNs modulate E2F1 expression. *Nature* 435, 839-843.
29. Richardson, G.E., and Johnson, B.E. (1993). The biology of lung cancer. *Semin Oncol* 20, 105-127.
30. Shiraishi, M., Noguchi, M., Shimosato, Y., and Sekiya, T. (1989). Amplification of protooncogenes in surgical specimens of human lung carcinomas. *Cancer Res* 49, 6474-6479.
31. Slack, F.J., and Weidhaas, J.B. (2006). MicroARNs as a potential magic bullet in cancer. *Future Oncol* 2, 73-82.
32. Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., et al. (2004). Reduced expression of the let-7 microARNs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 64, 3753-3756.
33. Takeshita, F., Patrawala, L., Osaki, M., Takahashi, R.U., Yamamoto, Y., Kosaka, N., Kawamata, M., Kelnar, K., Bader, A.G., Brown, D., et al. Systemic delivery of synthetic microARN-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther* 18, 181-187.
34. Trang P, Medina P P, J F Wiggins, L Ruffino, K Kelnar, M Omotola, R Homer, D Brown, A G Bader, J B Weidhaas, F J Slack. (2010). *Oncogene* 2010 Mar 18;29(11):1580-7.
35. Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microARNs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011-3016.

Si desea citar nuestro artículo:

Valor terapéutico de la restauración de microARNs supresores tumorales en el desarrollo de cáncer de pulmón

Pedro Medina Vico

An Real Acad Farm (Internet].

An. Real Acad. Farm.Vol. 89. nº (2023) · pp. 287-296

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2023.89.03.03>

FORMULAE OF OATH AND LICENSING OF PHARMACISTS DURING THE NAPOLEONIC ITALIAN REPUBLIC AND THE NAPOLEONIC KINGDOM OF ITALY

FÓRMULAS DE JURAMENTO Y HABILITACIÓN DE LOS FARMACÉUTICOS DURANTE LA REPÚBLICA ITALIANA NAPOLEÓNICA Y EL REINO DE ITALIA NAPOLEÓNICO

Enrico Cevolani

PhD student in Pharmacy at the Complutense University of Madrid

Pl. de Ramón y Cajal, s/n, 28040 Madrid, Spain

correspondingauthor: ecevolan@ucm.es

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

ABSTRACT

This study presents selected unpublished documents that concern the completion of the pharmacy degree programme and its corresponding qualifying exam, in accordance with the reforms of the Napoleonic Italian Republic (1802-1805) and the Napoleonic Kingdom of Italy (1805-1814). The Law on Public Education of 4 September 1802 and the Study and Discipline Plans for National Universities of 1803 stated that pharmacists had to study for three years at one of the national universities in order to obtain an academic degree. These reforms also declared that, after graduating, a further exam was required before pharmacists could freely exercise their profession.

The first remarkable document is the one containing the oath taken by pharmacy students upon obtaining their academic degree. The oath is very detailed and accurately describes the expectations that the new Italian Government placed on pharmacists, as well as all the duties that they had to fulfil.

Among the documents of the Ufficio Centrale Medico, Chirurgico, Farmaceutico (Central Medical, Surgical and Pharmaceutical Office) - the body that at the time was responsible for qualifying health professionals - there are the Office regulations, with all the rules concerning the pharmacists' qualifying exam and their proclamation. There is also the oath formula that pharmacists read aloud at the end of their final exam. This oath was more concise than the oath taken at the end of university studies and, in this case, it was the same as the one taken by physicians and surgeons. What is also remarkable in these documents is the special qualification that was granted to those most deserving pharmacists who passed the exam with excellent marks: the possibility of producing and selling large quantities of chemical-pharmaceutical compounds to other pharmacists.

RESUMEN

Este estudio presenta una selección de documentos inéditos relativos a la obtención del grado académico de farmacia y su correspondiente examen de habilitación, de acuerdo con las reformas de la República Italiana Napoleónica (1802-1805) y del Reino Napoleónico de Italia (1805-1814). La Ley de Instrucción Pública de 4 de septiembre de 1802 y los Planes de Estudio y Disciplina de las Universidades Nacionales de 1803 establecían que los farmacéuticos debían estudiar tres años en una de las universidades nacionales para obtener un título académico. Estas reformas también declaraban que, después de graduarse, se requería otro examen antes de que los farmacéuticos pudieran ejercer libremente su profesión.

El primer documento destacable es el que contiene el juramento prestado por los estudiantes de farmacia al obtener su título académico. El juramento es muy detallado y describe con precisión las expectativas que el nuevo Gobierno italiano depositaba en los farmacéuticos, así como todas las obligaciones que debían cumplir.

Entre los documentos del *Ufficio Centrale Medico, Chirurgico, Farmaceutico* (Oficina Central Médica, Quirúrgica y Farmacéutica), organismo que en aquella época se encargaba de habilitar a los profesionales sanitarios, se encuentra el reglamento del *Ufficio*, con todas las normas relativas al examen de habilitación de los farmacéuticos y su proclamación. También está la fórmula del juramento que los farmacéuticos leen al final de su examen final. Este juramento era más conciso que el que se prestaba al final de los estudios universitarios y, en este caso, era el mismo que el de los médicos y cirujanos. Lo que también llama la atención en estos documentos es la cualificación especial que se concedía a los farmacéuticos más meritorios que aprobaban el examen con excelentes notas: la posibilidad de producir y vender grandes cantidades de compuestos químico-farmacéuticos a otros farmacéuticos.

Keywords:

History of Pharmacy
Education
Pharmacy
Italy
Universities
19th Century

Palabras Clave:

Historia de la Farmacia
Educación
Farmacia
Italia
Universidades
Siglo XIX



1. INTRODUCCIÓN

Napoleon's conquest of Italy led to the birth of various republics that were satellite states of the French Republic. These states merged first into the Cisalpine Republic and then into the Italian Republic, which was established on 26 January 1802 with Milan as its capital and Napoleon Bonaparte himself as its President. A few years later, France was proclaimed an empire and consequently, in 1805, the Italian Republic became the Kingdom of Italy, although its territory was limited to north-eastern Italy and its borders remained unchanged to those of the previous Italian Republic. However, in the following years, new territories were acquired that extended the dominions of the Kingdom (1).

During the Italian Republic new reforms were enacted, several of which affected public education and universities. The Public Education Law of 4 September 1802 (2) was written with the aim of standardising public education in the territories of the Republic. Article 48 of this law stipulated that the exercise of the most "*interesting professions*" was to be entrusted to persons of known suitability and that therefore a degree and a subsequent approval were necessary for the exercise of six different classes of professions. Since these six classes included the pharmacist profession, the university pharmacy programmes at the two national universities of the republic at the time - Pavia and Bologna - were restructured and reorganized. The University of Padua was also included a few years later, during the Napoleonic Kingdom of Italy. With the 1803 Study and Discipline Plans for National Universities (3), faculties were created that grouped the various professorships according to the type of teaching. Three faculties were set up: the Physico-Mathematical Faculty, the Medical Faculty and the Legal Faculty.

The pharmacy degree programme was part of the Medical Faculty and had a duration of three years. The first year included subjects that were compulsory for the other degree courses as well and which were not strictly related to the scientific domain of pharmaceutical studies. As a matter of fact, first-year-subjects were Analysis of Ideas, or, in other words, a logic course, and Italian and Latin Rhetoric. The second and third years, on the other hand, included subjects that were specific to the Pharmacy degree course: Botany, Materia Medica, Pharmaceutical Chemistry and General Chemistry.

Obtaining the academic degree did not mean being able to exercise the profession immediately: it was also mandatory to carry out five years of apprenticeship, which the aspiring pharmacist often began before obtaining the degree certificate. Once the academic diploma was obtained and the five-year practice completed, the candidate had to take a new exam in order to obtain

the authorisation to practise as a pharmacist and thus be allowed both to work in a pharmacy and manage one.

In this research I present, for the first time, the proclamation, oath and licence formulas of the Italian pharmacists during the Napoleonic period. These documents were found in the old file catalogue of the University of Bologna in the Bologna State Archive. The oath, in particular, used to be signed and solemnly read before a commission after the candidates had sat both the academic and the qualification exams.

As far as pharmacy is concerned, this is the first time there is trace of a specific oath for "*farmacisti*" (pharmacists). As a matter of fact, before the reforms of 1802 and 1803, those who practised the profession of preparing and selling medicines were identified by the term "*speziale*" (apothecary), "*maestro speziale*" (master apothecary), "*speziale medicinalista*" (medicinal apothecary) or similar titles. In the past, apothecaries too, just like physicians, used to take an oath after they had been approved by their respective city guild. Admission was of course regulated and the criteria set out in the guild's statutes had to be met, meaning examinations were necessary. For example, very old proof of this comes from the statutes of the "*Arte dei Medici e Speziali*" (Guild of physicians and apothecaries) of Florence in which it is reported that, in the 14th century, Florentine apothecaries took an oath when they were admitted to the guild (4). It should be pointed out that the institution of the new Pharmacy course did not represent a clear watershed in the use, in texts and laws of the Napoleonic period, of the nouns apothecary and pharmacist, or where these professionals exercised their activity: apothecaries and pharmacies. When obtaining a Licentiate in Pharmacy at the University became compulsory, over the following decades, the term apothecary was gradually replaced by that of pharmacist. The word "*pharmacista*" identified a person who worked in their workshop with in-depth knowledge of General Chemistry, Pharmaceutical Chemistry, Botany and Materia Medica.

2. THE PHARMACISTS' OATH UPON OBTAINING THEIR ACADEMIC DEGREE

When students enrolled in a pharmacy university programme, they were required to attend classes and take exams. At that time there were two main exams: for the pharmacy course, the first one was held at the end of the second year and it conferred a Bachelor's degree; the second one, the final exam, was to be sat at the end of the third year and it conferred a Licentiate in Pharmacy. When students passed this latter exam, they attended a solemn ceremony (5) in the Aula Magna of the university and received their diploma in pharmacy.



On the Thursday following the final examination, the Commission summoned to the Aula Magna of the university the students who had passed the examination and were to be awarded the academic degree. After the students and the Commission had assembled in the aula, the Rector of the University and the Chancellor entered the room. At this point, the University Chancellor read aloud each student's examination papers and their corresponding approval.

After this, the Chancellor declared the candidates qualified to be awarded the Licentiate in Pharmacy, and an assistant gave each of them their diploma. Then, one of the new graduates had to publicly thank the faculty on behalf of all the graduating students and declare their common desire to fulfil their duties as pharmacists. All the students read and signed an oath in which they solemnly declared to carry out the pharmacist profession with dignity, care and in the service of the Republic.

Below is the first oath that was proclaimed by the pharmacy graduate students at the University of Bologna (6):

Form of oath to be taken by pharmacists

*I, [Name Surname] of [Town name] of the Department
 [Department name], promise to this Academic
 Body and to the Government of the
 Italian Republic to exercise, when granted governmental
 permission, the profession of Pharmacist,
 with all the zeal, diligence and honour that is appropriate for a
 person who is a depositary of the
 public faith and authorised by the public magistrates to preserve
 the lives of their fellows.*

*I will use the greatest diligence in the selection and manufacture
 of all the medicines, both simple
 and compound, in my workshop, and in both their preparation
 and preservation. I will carry out
 with all exactness all the precepts of my art.*

*I will never substitute the preparations prescribed by physicians at
 my own discretion, I will verify
 with the greatest punctuality that their prescriptions are carried
 out without exception not only by
 me, but also by the subordinates of my workshop.*

*All remedies, whether they are simple or compound, the use of
 which can easily be suspected in
 internal use, and particularly those so called poisonous substances
 or preparations, will be kept by*

*me, and preserved under lock and key in special places. I will not
 allow anyone else without my
 presence, or without the most diligent precautions on my part, to
 dispose of them under any pretext:
 nor will I allow even the smallest portion of them to leave my
 hands without a prior order signed by
 physicians or surgeons approved and known to me: if, by any
 chance, in any of these orders, I
 should happen to see an unusual dose of such active medicines
 marked, I shall not send it without
 first having consulted orally the physician or surgeon who could
 have prescribed it, or if this is not
 permitted to me by the circumstances of the time, I shall reduce
 the dose to such moderation that,
 according to the dictates of my knowledge, it does not seem to me
 capable of offending the life of my customers.*

*Whatever class of people, of whatever fortune and rank they may
 be, I will serve them with the same
 solicitude, and my preparations will not be of different condition
 in terms of their goodness in
 proportion to the fortune of those who come to seek them.*

*I will take great care of all the utensils of my workshop so that
 they will always be kept with that
 cleanliness and properties that are essential for the safety of so
 many preparations, and likewise I
 will have the greatest attention to the quality of the water, which I
 will regularly use in the
 composition of my medicines.*

*I promise to faithfully abide by these declarations, so that the
 Government of the Italian Republic may always honour me with
 its benevolence, and this Academic Body may in all circumstances
 recognise me as worthy of its illustrious approval.*

It should be highlighted that the oath that was found (Figure 1) was specific to the pharmacist profession. This solemn promise emphasised all the qualities that good pharmacists had to have, namely that they had to be at the service of the State and the public health. As the oath states, pharmacists had to exercise their profession with zeal, diligence and honour, as the Government placed its trust in them to "preserve the lives of their fellows".

From a certain point of view, we can say that this oath already offers a preview of the rules of good preparation which modern pharmacists must adhere to when preparing formulas in the pharmacy laboratory. This preview can firstly be found in the

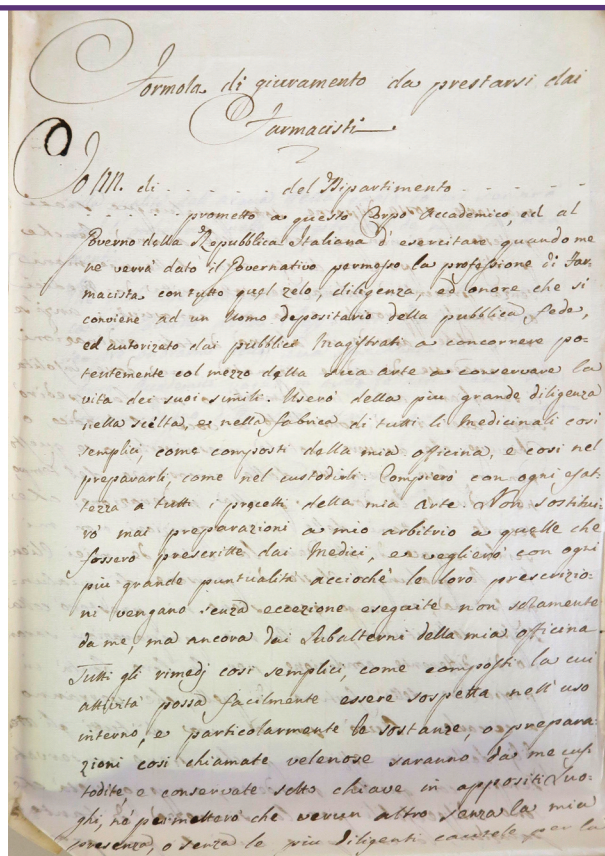


Figure 1: The first oath that pharmacists took when they obtained their Academic Degree in Pharmacy (1804). Bologna State Archive (ASB), Studio, n. 530.

fact that the preparations always had to be carried out perfectly in accordance with the recipe and had to be stored with due care. Secondly, they could not be arbitrarily altered, the laboratory tools had to be kept perfectly clean and the water quality had to be checked (at that time it was not a granted fact that the water quality was good). In the oath, the word safety, which is used in reference to preparations, stands out. As a matter of fact, when pharmacists prepare a medicine, they are responsible for the livelihood of the sick: if the medicine is not prepared in compliance with the physician's instructions, not only could it be ineffective but it could also harm the assisted person.

The use of the word "customer" is also worth mentioning. This word, together with the word "sick", was also used in the oath that physicians of the University of Bologna took during their graduation ceremony. The word "patient", on the other hand, which was already in use at the time, does not appear in the latter. This article shall not delve into a philological analysis of the topic, yet an in-depth study of these words in their historical context and especially in the oaths of the healthcare professionals of the time would certainly be very interesting.

Pharmacists had to know very well how to carefully prepare and store both simple and compound medicines in their pharmacies, and their preparations always had to be perfect, even when these were prepared by their assistants.

A large part of the oath is also dedicated to the poisons that pharmacists used to keep in their pharmacies for medicinal preparations. The concept of poison is embedded in the very etymology of the word medicine, in Italian "farmaco", from the Greek word "φάρμακον": "farmaco" is that substance which, on the one hand, is a medicine and can cure but, on the other hand, is a poison and can kill. In their oath, pharmacists used to promise that they would keep poisonous substances under lock and key and that these substances could only be handled by them or in their presence. It appears clear that lawmakers paid great attention to the use of these active substances, which could be used both in an accidental and in a deliberate criminal way to harm people.

In this regard, it was reported that pharmacists had to comply with prescriptions intelligently. In the event that unusual doses of substances dangerous to the health were prescribed, pharmacists were to contact the physician or surgeon and ask for clarification. If contacting the prescriber was not possible, pharmacists could dispense the medicine in its minimum effective dose: with that "moderation that, according to the dictates of my knowledge, it does not seem to me capable of offending the life of my customers". This point emphasises that pharmacists were not to be mere executors or manipulators of drugs. In the preparation of medicines, pharmacists used their scientific knowledge - obtained

from their university studies and experience - to ensure that what they prepared, if used correctly, was not dangerous to the patient. It is equally important to emphasise the relationship with the other health professionals, in particular physicians and surgeons, with whom pharmacists had to deal with if doubts arose regarding their preparations. This aspect of health professionals consulting with one another also emerged. Evidently, it was an important lesson that was intended to be passed on to the new health professionals of the Republic.

The equality concept, dear to the French Revolution, is also present in the pharmacist's oath. No difference was to be made between the wealthy and the poor in the preparation of a medicine and therefore the preparations were not to be "*of different condition in terms of their goodness in proportion to the fortune of those who come to seek them*". Wealth and social status could not be a discriminating factor in the preparation of a medicine: whether a person was rich or poor, they were entitled to the same quality of medicine, without distinction of any kind.

This principle of equality can be found in a more developed version even in the oath that Italian pharmacists have to make today (7). As a matter of fact, today pharmacists swear to assist all those who call upon their professional services "*with attention and dedication, without any distinction of race, religion, nationality, social condition or political ideology and with the greatest respect for their dignity*".

3. THE PHARMACISTS' OATH UPON OBTAINING THEIR QUALIFICATION

As we have seen, in consequence of the reforms of 1802 and 1803, pharmacists had to obtain a further qualification after graduating. The law required that a special commission assess the pharmacists' practical skills and therefore candidates were asked to pass an examination before obtaining the license that would enable them to freely practice their profession.

In 1805-1806, the body responsible for issuing such licences was the Ufficio Centrale Medico, Chirurgico, Farmaceutico (Central Medical, Surgical and Pharmaceutical Office), often referred to simply as the Ufficio Medico Centrale (Central Medical Office).

Before the Office was established in 1805, the Bologna Health Departmental Commission and the University of Bologna used to compete for the right to qualify health professionals. Paragraph 13 of article 9 of the aforementioned Study and Discipline Plans for National Universities of 1803 stipulated that, for professions requiring a licence besides a university degree - including the pharmacist profession - a further examination was necessary. The conflict between the two institutions arose from the fact that

paragraph 13 did not state which body had to hold the examination. Instead, it simply referred back to the examination's rules. This gave rise to a dispute between the Health Departmental Commission and the University of Bologna. The disagreement was eventually solved (8) in a meeting between the two parties, as evidenced by a letter from the Rector of the University of Bologna to the Prefect of Bologna dated 10 January 1804 (9).

The creation of the Central Medical Office made it possible to have a special body in charge of judging the suitability of aspiring professionals in the various branches of the healthcare field. The evaluation was regulated by specific rules for every branch. Initially, the Office was only based in Pavia, but, later, when the University of Bologna was recognized as equal to that of Pavia, a Medical, Surgical and Pharmaceutical Office was also founded in Bologna. This happened in 1805 (10). The Office remained open for a short time, as the Royal Decree of 5 September 1806 of the Napoleonic Kingdom of Italy ordered the closure of the Central Medical Offices and decreed the creation of the Medical Police Offices (11) (*Direzioni di Polizia Medica*).

The regulations (Figure 2) of the Bologna Central Medical Office contain a detailed description of how the pharmacists' examination was held as well as a description of the different oath formulas. The Office was composed of all the full professors of the Faculty of Medicine, the lead surgeon of the Civic Hospital as well as a physician and a pharmacist from Bologna.

Article 2 of the Office regulations lists the necessary requirements for aspiring pharmacists to be qualified as such. First and foremost, the first paragraph clearly specifies that "*no one in the Kingdom may work in a medical branch without previously being granted the public qualification by the Central Office*". Pharmacists were required to provide a certificate of good conduct and a diploma of higher education from one of the two national universities (either Pavia or Bologna). They were also asked to complete a five-year apprenticeship at a recognized pharmacy. In the health sector, would-be pharmacists were the health professionals who had to tread the longest training path of all: physicians and surgeons were indeed required only a 2-year-apprenticeship.

Article 5 well describes the examination that aspiring pharmacists had to sit. Its title, "*Exam Structure for Apothecaries*", attests to the interchangeability of the words apothecary and pharmacist at the time. Aspiring pharmacists were actually required to take two examinations: a practical and a theoretical one. The practical exam took place in a laboratory where the professor of General Chemistry, the professor of Pharmaceutical Chemistry and a licenced pharmacist asked the candidate to perform at least five chemical-pharmaceutical procedures. The theoretical exam was held in the headquarters of the Central Medical Office at the presence of

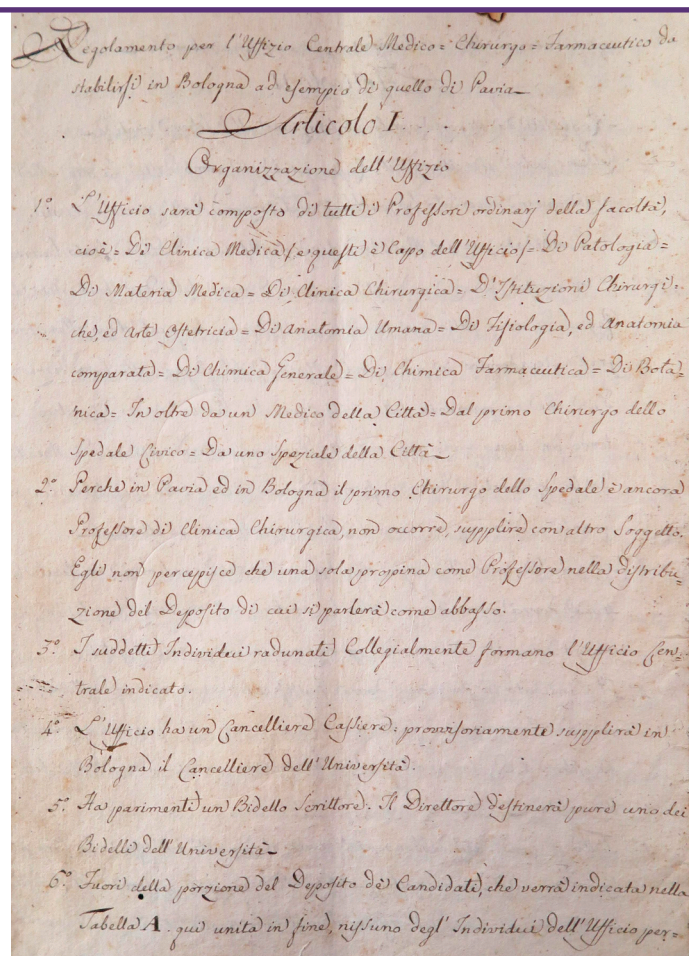


Figure 2: Regulations of the Central Medical, Surgical and Pharmaceutical Office of Bologna (1805). ASB, Prefettura del Dipartimento del Reno, Atti generali, n.504.

all its members. The Professor of Botany, who was the first to test the candidates, assessed their knowledge on medicinal plants. Then, the Professor of Medical Sciences asked questions using the collection of drugs owned by the university. He showed aspiring pharmacists resins, gums, roots, seeds, and barks of exotic plants and tested them on these. The exam finished with questions asked by the professor of General Chemistry, the professor of Pharmaceutical Chemistry and the licenced pharmacist. Their questions revolved around laboratory activities, the general principles of chemistry and the candidate's progress.

At the end of the examination the board secretly voted whether or not the candidate was approved. If the candidate passed the examination, they were invited to the Office Hall for the final ceremony, during which they were awarded the qualification diploma.

An accurate description of the ceremony, the proclamation speech and the oath can be found in article 7, "*Methods to grant formal qualification*", and its appendices. When the candidate entered the hall, the Director of the Central Medical Office first read the following proclamation speech (12):

Having fulfilled the requirements imposed by the Medical Regulations, and having given sufficient proof of your ability to practise Pharmacy, I declare, before this Medical Office, that you [Name Surname] have been approved and have been granted, in accordance with the aforementioned Regulations, the faculty to practise Pharmacy anywhere in these States for the benefit of the sick, and you will therefore take the usual oath before this Medical Office to swear exact observance of the Laws in force for Persons with this faculty.

At this point, the newly approved pharmacist solemnly swore the following oath (13) before the Medical Office (Figure 3):

I, [Name Surname], promise and swear before the Medical Office to obey the Laws of the new Plan, as well as the orders of the Office and the Delegation to which I will be subordinate, and I swear by calling God as my witness to the truth.

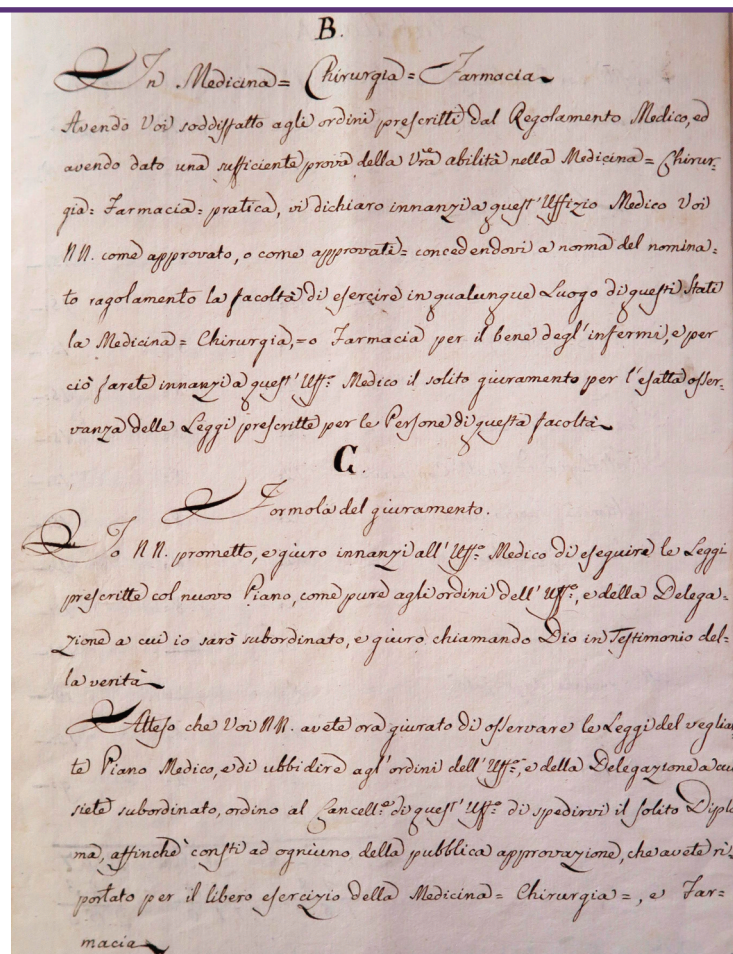


Figure 3: Proclamation and oath formulas for qualifying examinations for physicians, surgeons and pharmacists, contained in the Regulations of the Bologna Central Medical, Surgical and Pharmaceutical Office (1805). ASB, Prefettura del Dipartimento del Reno, Atti generali, n.504.

As opposed to the oath made upon receiving the academic degree, the oath taken upon being granted the pharmacist qualification was very concise and was the same as the one that physicians and surgeons had to swear. Basically, pharmacists promised to obey the Central Medical Office and its delegates. As we have seen, the oath that used to be taken upon obtaining the Academic Degree was already thorough and complete enough. It is probably for this reason that legislators did not deem it necessary to draft another extensive version of the oath to be read on the occasion of the qualification.

At this point the Director responded with the following formula (14):

Since you, [Name Surname], have now sworn to observe the Laws of the vigilant Medical Plan, and to obey the orders of the Office and the Delegation to which you are subordinate, I order the Chancellor of this Office to send you the usual diploma, so that everyone may be aware of the public approval you have received for the free exercise of the Pharmacy profession.

4. THE SPECIAL LICENCE TO CREATE CHEMICAL-PHARMACEUTICAL COMPOUNDS ON A LARGE SCALE

In the regulations pertaining to the examination, there is one interesting rule which is worth mentioning: those candidates who showed "*extraordinary doctrine and experience*" and passed the examination brilliantly, were awarded - if they so requested - a special qualification that gave them the privilege of being allowed to produce large quantities of chemical and pharmaceutical compounds and to sell them wholesale to other pharmacists (15). The introduction of this special qualification can be perceived as an early version of what would be, in the decades to come, the birth of the modern pharmaceutical industry.

In his writings (16), the Italian pharmacy historian Giulio Conci recalls that, in the 17th century, a few specialised pharmaceutical workshops in Milan and Venice used to produce chemical compounds. He also recounts that, as early as the 16th and 17th centuries, when Paracelsus's chemical compounds were introduced into therapies, apothecary shops equipped with the necessary tools and expertise to prepare the new compounds began



to open and probably started supplying those smaller apothecary shops that were unable to produce them. However, the fact that it was these regulations that created a specific licence for pharmacists to be officially allowed to produce medicines in large quantities is extremely interesting. Although it is likely that in the past this practice was already happening to a certain extent, we do not find evidence of a previously existing similar licence, at least in the regulations of the "*Arte degli Speziali*" (the Society of Apothecaries) and of the Bologna Medical College. On the other hand, as we have seen, the new regulations of the Bologna Central Medical Office - which was born on the example of the Pavia Central Medical Office - totally included the possibility for those most brilliant candidates to produce chemical pharmaceutical compounds on a large scale. This provided the new pharmacist with a fantastic professional and economic opportunity.

Even though a whole paragraph of the Regulations of the Central Medical Office was devoted to this special licence, this opportunity was not well regulated and the criteria by which this type of privilege could be granted were not specified.

The criteria were defined on 7 July 1806 during a meeting of the Office (17). On that occasion it was decided that only those pharmacists who were unanimously approved by all professors - or approved by all of them but one - could benefit from this opportunity.

This decision was made as a result of the pressing demands of the pharmacist Francesco Bonini, who had successfully passed his qualification exam on 24 June of that same year (18). His performance had been brilliant and he wished to be granted the permission to produce large quantities of both simple and compound medicines to be sold to other pharmacists. For this reason, he wrote two letters (19) to the Central Office asking for its official permission. Initially, the Office Chancellor sent him the official report of the meeting of 24 June during which Bonini had been granted the qualification. However, this report did not expressly state the permission to manufacture medicines in large quantities and therefore the pharmacist wrote a new letter in which he clearly stated that without the official permission he refused to "*undertake such a considerable effort as the large-scale manufacturing of medicines is*". Another argument against their manufacturing without permission was linked to the "*considerable expenditure that the setting up of a suitable chemical laboratory would entail*". The letters prove that granting an official licence like the one in question was something new that had never happened before. As a result of these pressing requests, the Office issued a new certificate that officially allowed to produce and sell large quantities of chemical-pharmaceutical compounds to other pharmacists.

5. CONCLUSIONS

The oath that pharmacists had to make upon obtaining their academic degree during the Napoleonic period is proof of the responsibility that the State entrusted to "*a person who is a depositary of the public faith and authorized by the public magistrates to preserve the lives of their fellow*". With the oath, pharmacists promised to carefully prepare medicines, by following physician's prescriptions to the letter and by being careful not to dispense unusual doses that could harm patients. In case it was necessary, they could also reduce a medicine to the minimum effective dose if they thought it could be dangerous for the patients' life. They also evoked the new concepts of equality and brotherhood both in the treatment and in the preparation of medicines for the sick. At present, this represents the first academic oath ever taken by Italian pharmacists.

The documents of the Central Medical, Surgical and Pharmaceutical Office are themselves exceptional. Thanks to the Office regulations, we can learn about how the pharmacist qualification exam took place. The pharmacist second oath, the one that was made upon obtaining the qualification, was very concise and did not show any peculiarity, as it was identical to the one of physicians and surgeons. On the other hand, the documents found regarding the new licence to produce medicines on a large scale are very interesting: they are early evidence of the shift towards the mass production of medicines that the pharmacy industry underwent in the following decades.

6. REFERENCIAS

1. Rosa M, Verga M. La storia moderna: 1450-1870. Milan: Ed. Bruno Mondadori 2003; pp. 136-141.
2. Bollettino delle Leggi della Repubblica Italiana, from N. 1 to N. 20. Milan: Reale Stamperia 1802-1805; pp. 295-308.
3. Foglio Ufficiale della Repubblica Italiana, from N. 1 to N. 15. Milan: Reale Stamperia 1802-1805; pp. 155-216.
4. Ciuti F. Il Collegio dei fisici e l'Arte dei medici e speziali di Firenze: dalla Repubblica allo Stato mediceo (XIV-XVI secolo). Archivio Storico Italiano 2012; 631: 5-6.
5. Piani di Studi e di Disciplina per le Università Nazionali del 1803. Milan: Luigi Veladini Stampatore Nazionale 1803.
6. Bologna State Archive (ASB), Studio, n. 530, Disavanzamento Lauree Mediche e Chirurgiche, Gradi Farmaceutici (1803-1804).
7. Federazione degli Ordini dei Farmacisti Italiani (F.O.F.I.), Giuramento del Farmacista, Testo approvato dal Consiglio Nazionale il 15.12.2005. Available at: https://www.fofi.it/pg_f.php?id=21



8. According to the agreement, the Health Commission was responsible for examining Barbers, Midwives and "Gargioni" (apothecaries in the first degree), while the University was responsible for examining Physicians, Surgeons, Pharmacists and Master Apothecaries.
9. ASB, Prefettura del Dipartimento del Reno, Atti generali (1803-1813), Tit. XXV (Sanità), Rub. 2, 1804, inside "Sanità Commissione, Rapporto di concerti presi col Rettore dell'Università intorno agli esami relativi a Polizia Medica", n. 538.
10. ASB, Prefettura del Dipartimento del Reno, Atti generali (1803-1813), Tit. XXV (Sanità), Rub. 2, 1805, inside "Istruzione Pubblica – Direttore Generale: Regolamento per l'Ufficio Centrale Medico Chirurgico Farmaceutico da stabilirsi in Bologna ad esempio di quello di Pavia", n. 18860.
11. Bollettino delle Leggi della Regno d'Italia, Part III from N. 29 to N. 39. Milan: Reale Stamperia 1806; pp. 923-941.
12. ASB, Prefettura del Dipartimento del Reno, Atti generali (1803-1813), Tit. XXV (Sanità), Rub. 2, 1805, inside "Istruzione Pubblica – Direttore Generale: Regolamento per l'Ufficio Centrale Medico Chirurgico Farmaceutico da stabilirsi in Bologna ad esempio di quello di Pavia", n. 18860.
13. Ibidem.
14. Ibidem.
15. This licence was also granted during the proclamation and was accorded in compliance with paragraph 4 of article 5 of the Regulations of the Central Medical Office.
16. Conci G. Pagine di Storia della Farmacia. Milan: Vittoria Edizioni 1934; pp. 270-272.
17. ASB, Prefettura del Dipartimento del Reno, Atti generali (1803-1813), Tit. XXV (Sanità), Rub. 2, 1805, unnumbered act (Office meeting on 7 July 1806).
18. Ivi, n. 23.
19. Ivi, unnumbered act (Office meeting on 7 July 1806).

Si desea citar nuestro artículo:

**Formulae of oath and licensing of pharmacists during the
Napoleonic Italian Republic and the Napoleonic Kingdom of Italy**

Enrico Cevolani

An Real Acad Farm (Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 89. nº (2023) · pp. 297-305

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2023.89.03.04>

COMERCIO ILEGAL DE MEDICAMENTOS, PROBLEMÁTICA ENFOCADA EN PUNTOS DE DISTRIBUCIÓN Y DESTRUCCIÓN: UNIDADES DE ELIMINACIÓN DE MEDICAMENTOS E INSUMOS

ILLEGAL TRADE IN MEDICINES, PROBLEMS FOCUSED ON POINTS OF DISTRIBUTION AND DESTRUCTION: UNITS FOR THE DISPOSAL OF MEDICINES AND SUPPLIES

Jorge Humberto Restrepo Zapata¹, Adriana Barrera Reyes, Kiary Dayana Heredia Diosa², Paola Andrea Ospina Atehortua³ y Brenda Alejandra Salazar Delgado⁴

¹<https://Orcid.Org/0000-0001-9819-0057>, ²<https://Orcid.Org/0009-0004-3891-5609>, ³<https://Orcid.Org/My-Orcid?Orcid=0009-0000-2120-2689>,

⁴<https://orcid.org/0009-0006-2822-9298>

^{1,2,3,4}Universidad Santiago de Cali. Facultad de salud. Programa Tecnología en Regencia de Farmacia

corresponding author: jorge.restrepo05@usc.edu.co, adriana.barrera01@usc.edu.co, brenda.salazar00@usc.edu.co, paola.ospina07@usc.edu.co, kiary.heredia00@usc.edu.co

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

RESUMEN

Introducción: La falsificación y/o adulteración de medicamentos es un problema de salud pública el cual cada día se ve más reflejado en el país; una forma de evitarlo ya sea en mínima escala, es la correcta utilización de las unidades de eliminación de medicamentos e insumos, ayudando así a una eficaz desnaturalización y destrucción de estos.

Objetivo General: Reconocer la importancia de la prevención del comercio ilegal de medicamentos mediante la utilización de las unidades de eliminación de medicamentos e insumos, en las etapas de comercialización y destrucción del producto, en los municipios de Santiago de Cali, La Unión y Jamundí en el Departamento del Valle del Cauca.

Objetivos Específicos:

- Medir el grado de conocimiento de las unidades de eliminación de medicamentos e insumos en cuanto a su funcionalidad e impacto en la población de Santiago Cali y en el municipio de La Unión Valle.

- Analizar la incidencia de hallazgos de medicamentos en el material de reciclaje y su nivel de comercialización en Santiago de Cali y Jamundí.

Método: Se realizó un estudio descriptivo- comparativo, de corte transversal, con enfoque cuantitativo que incluyó una muestra de 171 personas del municipio de Santiago de Cali y 89 personas en el municipio de La Unión Valle; una muestra de 21 recicladores del municipio de Santiago de Cali y 20 recicladores del municipio de Jamundí. El estudio fue realizado entre octubre y noviembre del 2022. Se utilizaron dos cuestionarios validados, diligenciados uno de forma virtual (grupo A) y otro de forma presencial (grupo B), el cual fue desarrollado de forma voluntaria.

Resultados: Respecto al grupo de personas encuestadas en el grupo A, 45 que equivalen al 26.3% del universo de la población encuestada en Cali tienen conocimiento de las unidades de eliminación de medicamentos e insumos, 126 personas que equivalen al 73.7% no tienen conocimiento acerca del mismo. En la Unión Valle, 14 personas que equivalen al 15.7 % conocen las unidades de eliminación de medicamentos e insumos mientras que 75 personas que equivalen al 84.3% no tienen conocimiento de él.

En el grupo B se mide los hallazgos de medicamentos en el reciclaje: en Santiago de Cali 21 personas que equivalen al 100 % del universo de la población, han encontrado medicamentos y del Municipio de Jamundí 20 personas que equivalen al 100% del universo de la población, también han encontrado medicamentos.

Conclusión: La principal causa de falsificación de medicamentos respecto a la no utilización de las unidades de eliminación de medicamentos e insumos, es por desconocimiento de su existencia.

Palabras Clave:

falsificación
medicamentos
población
unidades de eliminación de
medicamentos e insumos
reciclaje
venta

Keywords:

counterfeiting
medicines
population
blue dot
recycling
sale

ABSTRACT

Introduction: Counterfeiting and/or adulteration of medicines is a public health problem which is increasingly reflected in the country; One way to avoid it, whether on a small scale, is the correct use of the blue dot, thus helping to effectively denature and destroy them.

General Objective: Recognize the importance of preventing the illegal trade of medicines using the blue point, in the stages of commercialization and destruction of the product, in the municipalities of Santiago de Cali, La Unión and Jamundí in the Department of Valle del Cauca.

Specific Objectives: Measure the degree of knowledge of the blue dot in terms of its functionality and impact on the population of Santiago Cali and the municipality of La Unión Valle.

Analyze the incidence of drug display in recycling material and its level of commercialization in Santiago de Cali and Jamundí.

Method: A descriptive-comparative, cross-sectional study was conducted, with a quantitative approach that included a sample of 171 people from the municipality of Santiago de Cali and eighty-nine people from the municipality of La Union Valle, a sample of twenty-one recyclers from the municipality of Santiago de Cali and twenty recyclers from the municipality of Jamundí. The study was conducted between October and November 2022. Two validated questionnaires were used, one completed online (group A) and the other in person (group B), which was developed voluntarily.

Results: Regarding the group of people surveyed in group A, 45, equivalent to 26.3% of the universe of the population surveyed in Cali, are aware of the blue dot, while 126 people, equivalent to 73.7%, are unaware of it. In Unión Valle, 14 people, equivalent to 15.7%, know about the blue dot, while 75 people, equivalent to 84.3%, are unaware of it.

In group B, the findings of medicines in recycling are measured: in Santiago de Cali 21 people, equivalent to 100% of the universe of the population, have found medicines and from the Municipality of Jamundí 20 people, equivalent to 100% of the universe of the population, they have also found medicines.

Conclusion: The main cause of falsification of medicines about the non-use of the blue dot is due to ignorance of its existence.



1. INTRODUCCIÓN

La falsificación de medicamentos es un problema de orden mundial que cada vez afecta con mayor frecuencia a la población en general, y más que todo en el aspecto de la salud, “generan múltiples efectos negativos en la salud pública ‘según Jonathan García Ruiz en su artículo: *Medicamentos falsificados en Colombia: Análisis desde una perspectiva de anticorrupción*; sumándole a esto factores como el decrecimiento en la economía nacional y el aumento en los índices de corrupción del país.

En el siguiente artículo se enfatiza en Colombia, haciendo la salvedad que éste no es un delito exclusivo del país, sino que cada vez más abarca países desarrollados como Estados Unidos y continentes como Europa entre otros. Puede observarse que la problemática radica desde la misma cultura del ser humano, ya que a lo largo de los años se ha tomado como parte cultural el hecho de interrumpir los tratamientos farmacológicos al primer momento de mejorar la sintomatología y dichos fármacos pasan a ser parte del grupo de guardados en cada hogar en el país, por otra parte, cuando se toma la decisión de revisar botiquín se encuentran productos cuya fecha de vencimiento ya expiró; éstos junto a los primeros pasan a ser eliminados a la basura o a los desagües del alcantarillado.

Estas actividades facilitan tanto la falsificación de productos farmacéuticos como la contaminación al medio ambiente que de por sí ha venido incrementando gradualmente a lo largo de la historia. Se trata de tomar medidas significativas para mitigar estos efectos negativos en la población; uno de éstas actividades que a pesar de ser eficaz es poco conocida, es la utilización de los llamados unidades de eliminación de medicamentos e insumos (contenedores donde eliminar los medicamentos vencidos o en desuso), los cuales se encuentran estratégicamente ubicados en centros comerciales, ancianatos y droguerías (1902 actualmente en el país); según Resolución 371 del 2009, toda empresa a nivel farmacéutico debe tener un Plan de Gestión de Devolución de Productos Posconsumo, dentro de este plan se ubica esta medida del unidades de eliminación de medicamentos e insumos (2).

Se conoce parcialmente tres métodos en los cuales facilita la falsificación de medicamentos:

- Modificación del principio activo y de la composición química de producto, para comprimirlo usan sustancias nocivas para la salud las cuales generan efectos colaterales fuertes (3).
- Adulteración: retiran la mitad del medicamento (como por ejemplo un jarabe) y lo completan con otro producto de desconocida procedencia, por lo tanto, se consiguen dos productos de uno solo. Reutilizan frascos vacíos de medicamentos (3).

- Contrabando: cambian o adulteran empaques de medicamentos provenientes de otros países como por ejemplo Ecuador y Venezuela, ya que se consiguen a menores costos (3).
- Alteración: es la modificación de la fecha, número de lote, o borrar la expresión “uso institucional” (3).

Como ejemplo del incremento de la problemática de la falsificación de medicamentos se puede mostrar un informe de caracol radio publicado por Andrés Gonzales del 17 de febrero de 2022 donde afirma: Los nueve operativos de allanamientos se hicieron en las localidades de Los Mártires, Tunjuelito, San Cristóbal en Bogotá, y en Soacha, Cundinamarca. De acuerdo con los primeros reportes indican que cerca de 215 toneladas de medicamentos adulterados fueron incautados (8).

2. MÉTODO

Estudio descriptivo-comparativo de corte transversal, con un enfoque cuantitativo, en el que se incluyó una muestra de 171 personas del municipio de Santiago de Cali, 89 personas en el municipio de La Unión Valle (alumnos de grados 10 y 11; en edad promedio entre 15 a 17 años), los cuales pertenecen al grupo A; una muestra de 21 recicladores del municipio de Santiago de Cali y 20 recicladores del municipio de Jamundí, los cuales se incluyeron en el grupo B. La selección se realizó a través del muestreo empleando la metodología bola de nieve para la población del grupo A y para el grupo B se utilizó el muestreo de forma aleatoria simple.

El estudio tuvo en cuenta variables socioeconómicas, académicas y se realizaron preguntas sobre: conocimiento del unidades de eliminación de medicamentos e insumos, revisión de fechas de vencimiento, destino final de medicamentos vencidos, conocimiento sobre contaminación del medio ambiente por los medicamentos desechados, comercio ilícito por medicamentos encontrados en la basura, destino final de medicamentos que no vuelven a ser consumidos, revisión del estado del medicamento (olor, color y sustancias extrañas del mismo), capacitación en EPS sobre unidades de eliminación de medicamentos e insumos. En cuanto a las personas que realizan actividades de reciclaje se les realizó preguntas sobre: tiempo de desempeño en el reciclaje, medicamentos vencidos encontrados, venta y tipo de medicamentos encontrados, compra de cajas de medicamentos, medicamentos utilizados para uso personal. Para las variables cuantitativas de las personas de Cali y La Unión Valle se tuvo en cuenta los gráficos estadísticos del formulario Google y para la encuesta presencial se realizó gráficos de torta, información que se ilustra en tablas.

Illegal trade in medicines, problems focused on points of distribution and destruction: units for the disposal of medicines and supplies

Jorge H. Restrepo, Adriana Barrera, et al.

An. Real Acad. Farm. Vol. 89, nº 3 (2023) - pp. 307-314

Los encuestados virtuales respondieron un cuestionario de 15 preguntas y los presenciales respondieron un cuestionario de 11 preguntas. Los cuestionarios contenían respuestas de tipo dicotómica y politómica. La decisión de participar en el estudio fue voluntaria y la identificación de los participantes fue anónima. Se aplica también el estudio o revisión de fuentes primarias de información, como artículos de internet.

3. RESULTADOS

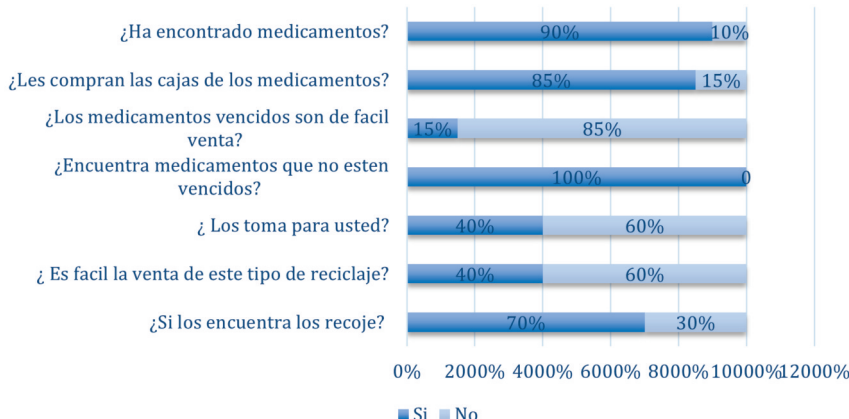
Grupo A

FUNDACIÓN VARIABLES	MUNICIPIO DE CALI		MUNICIPIO DE UNION VALLE	
	MUESTRA (n)= 171	%	MUESTRA (n)= 89	%
1. Nivel educativo				
Educación básica	20	11.70%	3	3.40%
Educación media	48	28.10%	76	85.40%
Educación superior	103	60.20%	10	11.20%
2. Estrato socioeconómico				
Estrato 1	23	13.50%	38	42.70%
Estrato 2	32	18.70%	44	49.40%
Estrato 3	51	29.80%	6	6.70%
Estrato 4	41	24%	1	1.10%
Estrato 5	21	12.30%	0	0
Estrato 6	3	1.80%	0	0
3. Edad				
Entre 10-20 años	10	5.80%	88	98.90%
Entre 20-30 años	53	31%	0	0
Entre 30-40 años	40	23.40%	0	0
Entre 40-50 años	36	21.10%	36	1.10%
Mas de 50	30	17.50%	0	0
Entre 50-60 años	2	1.20%	2	0
4. ¿Consume de medicamentos?				
Si	91	53.20%	27	30.30%
No	80	46.80%	62	69.70%



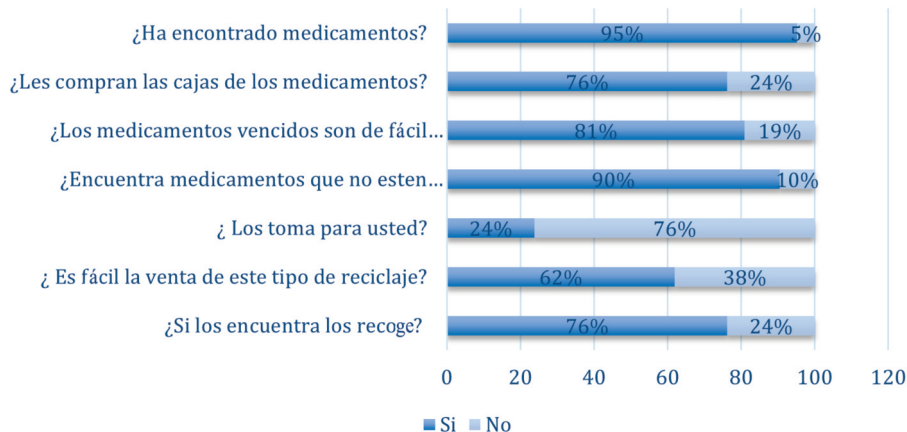
5. ¿Toma el tratamiento completo?					
Si	84	49.10%	25	28.10%	
No	87	50.90%	64	71.90%	
6. ¿Revisa la fecha de vencimiento antes de comprar o recibir medicamentos?					
Si	137	80.10%	59	66.30%	
No	34	19.90%	30	33.70%	
7. ¿Revisa el registro INVIMA del medicamento?					
Si	62	36.30%	21	23.60%	
No	109	63.70%	68	76.40%	
8. ¿Revisa que el empaque del medicamento este en buen estado?					
Si	153	89.50%	80	89.90%	
No	18	10.50%	9	10.10%	
9. ¿Revisa que el contenido del medicamento este completo, el apropiado olor, color y sin sustancias fuera de lo normal?					
Si	119	69.60%	68	76.40%	
No	52	30.40%	21	23.60%	
10. ¿Qué hace con los medicamentos vencidos?					
La bota a la basura	108	63.20%	72	80.90%	
La bota al inodoro	20	11.70%	8	9%	
La bota al sifón	12	7%	2	2.20%	
Los incinera	3	1.80%	1	1.10%	
Los llevan a unas unidades de eliminación de medicamentos e insumos	28	16.40%	6	6.70%	
11. ¿Qué hace con los medicamentos que no vuelve a tomar?					
La bota a la basura	104	60.80%	71	79.80%	
La bota al inodoro	17	9.90%	5	5.60%	
La bota al sifón	14	8.20%	2	2.20%	
Los incinera	3	1.80%	1	1.10%	
Los llevan a unas unidades de eliminación de medicamentos e insumos	33	19.30%	10	11.20%	
12. ¿Sabía usted que al desechar los medicamentos de forma inadecuada contaminan el medio ambiente?					
Si	73	42.70%	33	37.10%	
No	98	57.30%	56	62.90%	
13. ¿Sabía usted que al desechar los medicamentos de forma inadecuada permite que otra persona los use para el comercio ilegal?					
Si	87	50.90%	29	32.60%	
No	84	49.10%	60	67.40%	
14. ¿Sabe que es las unidades de eliminación de medicamentos e insumos?					
Si	45	26.30%	14	15.70%	
No	126	73.7	75	84.30%	
15. ¿Le gustaría que en su EPS den capacitación de las unidades de eliminación de medicamentos e insumos?					
Si	166	97.10%	86	96.60%	
No	5	2.90%	3	3.40%	

FUNDACIÓN



Recicladores Cali			Recicladores Jamundí	
16. ¿Tiempo desempeñando la labor?	Muestra(n) = 21	%	Muestra(n) = 20	%
Entre 1 y 5 años	6	28%	10	50%
Entre 5 y 10 años	6	29%	3	15%
Mas de 10 años	9	43%	7	35%
17. ¿Tipo de medicamentos encontrados?				
Tabletas	19	90%	17	85%
Capsulas	0	0%	1	5%
Jarabes	2	10%	2	10%
18- ¿Estado en que deben estar las cajas de los medicamentos?				
Buen estado	14	67%	13	65%
Avariados	0	0%	6	30%
Completas	4	19%	1	5%
No sabe / No responde	3	14%	0	0%

RECICLADORES CALI





4. DISCUSIÓN

Conforme a los resultados obtenidos de las encuestas virtuales (grupo A) y las encuestas presenciales (grupo B), observamos que en cuanto a las contaminación ambiental en el municipio de Cali 126 personas, es decir el 73,7% y del municipio de la Unión Valle 75 personas, es decir, el 84,3% no tienen conocimiento en cuanto a que el hecho de que desechar de forma inadecuada los medicamentos causa gran impacto ambiental, afectando a la fauna y la flora, debido a que los químicos de los medicamentos van por el agua y la tierra, por consiguiente al momento en que los animales se alimentan, éstos se ven afectados por los residuos que estos generan.

Los medicamentos causan impacto ambiental al momento de verterlos por los inodoros, los sifones y acueductos, también botarlos en zonas rurales, debido a que la tierra los absorbe. De ahí la importancia de tener un mejor impacto en la población acerca de las unidades de eliminación de medicamentos e insumos, para darle el correcto manejo a la disposición final de los medicamentos.

Las Unidades de eliminación de medicamentos e insumos es una "corporación sin ánimo de lucro, busca la protección del medio ambiente y la salud pública de los colombianos, específicamente en el marco de la disposición final de los productos posconsumo de fármacos y medicamentos vencidos, deteriorados o parcialmente consumidos" (2). Se demuestra que las personas dedicadas al reciclaje son un factor o filtro importante en la falsificación de medicamentos, esto se debe a que según las encuestas realizadas se encuentra que aproximadamente el 50% de los recicladores recogen los medicamentos de cualquier tipo de presentación de forma farmacéutica, para después proceder a la venta, los recicladores nos comprueban y afirman que para la venta y compra de estos medicamentos su empaque secundario es el más importante, y como bien sabemos son las cajas, éstas deben estar en un buen estado, es decir sin enmendaduras ni averías, al realizar la encuesta estas personas nos comentan que en la basura se encuentran desde medicamentos vencidos, y hasta con larga fecha de vencimiento.

Por medio de la práctica en la formulación de las encuestas se ve reflejado el grado de prácticas ilícitas con respecto a los medicamentos que se encuentran en los desechos en casas y empresas; existen personas dedicadas a comprar los empaques para revenderlos luego en droguerías ubicadas en puntos estratégicos para su comercialización y posterior consumo de las personas que por necesidades en salud acuden a estos sitios, sin saber que su salud está en juego. Hay casos extremos en los que entidades que de una u otra forma prestan servicios de salud, también se ven incluidas en estas prácticas que van en deterioro de la salud del ser humano, e incrementa el índice de delincuencia en el país (3).

La táctica utilizada por la Corporación y sus Unidades de eliminación de medicamentos e insumos es la de instalar en sitios estratégicos y concurridos como es el caso de droguerías, centros comerciales y ancianatos, unos contenedores adecuados para depositar allí los medicamentos que no estén en uso, ya sea porque están vencidos o por abandono de tratamiento farmacológico, para su posterior recogida por medio de una empresa certificada para tal fin, la cual le dará una correcta disposición final; contribuyendo así a la conservación del medio ambiente y la prevención de que estos sean utilizados con fines fraudulentos (3).

La instalación de los contenedores se realiza de manera voluntaria acorde a la solicitud de la droguería o centro comercial que lo requiera, demostrando su compromiso con el medio ambiente y a la salud pública; la Corporación Unidades de eliminación de medicamentos e insumos no puede exigir la obligatoriedad de la ubicación de un contenedor ya que la norma no lo ordena. El manejo de estos contenedores son exclusividad de la, el gestor de residuos peligrosos encargado de la incineración en Cali 4. Por medio de un trabajo de campo en el cual se han visitado barrios de estratos socioeconómicos 1, 2, 3 y 4, en los Municipios de Cali y Jamundí en Valle del Cauca, se percibe el hecho de que en estos sitios no se evidencia la presencia contenedores unidades de eliminación de medicamentos e insumos; la respuesta a esto es clara: hay desconocimiento de la población con respecto al tema, a pesar de que la se orienta hacia la farmacovigilancia y participa frecuentemente en conferencias y espacios dando a conocer sus objetivos los cuales son: la prevención de la falsificación de medicamentos y prevención del impacto ambiental negativo⁴. Se da por sentado que evidentemente hace falta mayor divulgación hacia la comunidad para el aprovechamiento de este recurso.

"El contenido de los Unidades de eliminación de medicamentos e insumos es recogido por personal autorizado, que lo pesa en el lugar de recolección, deja registro de ello y lo cierra con un dispositivo plástico que lleva un número de seguridad. Al llegar al centro de clasificación y transferencia, cada bolsa vuelve a ser pesada, para asegurar que no se perdió nada en el camino" (5).

"Lo que el consumidor final debe depositar son medicamentos de uso humano y veterinario vencidos, deteriorados o parcialmente consumidos, envases vacíos, frascos plásticos, frascos de vidrio, blíster, cartón o plegadizas y empaques de medicamentos en general" (2). El consumidor final no debe clasificar los medicamentos antes de depositarlos a las unidades de eliminación de medicamentos e insumos puesto que ese proceso lo realiza la empresa operadora encargada de la disposición final, la corporación unidades de eliminación de medicamentos e insumos trabaja de la mano con la policía fiscal aduanera y del Fondo Nacional de Estupefacientes para garantizar la seguridad de los residuos evitando la falsificación de los medicamentos (2).

Para la destrucción o desnaturalización de medicamentos hay tres procesos avalados:

- **Incineración controlada:** Es el principal y consiste en la termo destrucción, se procede a quemar los medicamentos de una manera controlada en los incineradores, los cuales son propiedad de la empresas que trabajan con residuos peligrosos, la incineración controlada se ejecuta a través de unos mecanismos de control precisamente para evitar las contaminaciones de emisión de gases por fuera de los límites máximos permisibles, se entiende por emisión de gases contaminantes como los son: dióxido de carbono, metano, ozono, óxidos de nitrógeno, etc. Siendo este el proceso mayormente utilizado en Colombia (4).
- **Procesamiento:** este proceso de destrucción también consiste en la termo destrucción o incineración controlada, pero con la diferencia que en el procesamiento se aprovecha la energía térmica generada de los procesos para suplir otro proceso productivo, es decir en el mismo horno en que destruyen los medicamentos procesan otra materia prima y aprovechan el calor que está siendo generado por la quema de los medicamentos y procesan una materia prima que necesiten para otro proceso productivo (4).
- **Celda de seguridad:** está en proceso de no realizarse más debido a que no es recomendable este tipo de destrucción de medicamentos se trata de un proceso similar al del relleno sanitario, pero con unos controles adicionales, se efectúa llevando los residuos peligrosos a unas celdas, diseñadas para evitar que los residuos resultantes de ese proceso generan una contaminación y allí son cubiertos con otro tipo de material para evitar que queden expuestos al medio ambiente (4).

5. CONCLUSIONES

Una de las causas que puede influir en cierta medida en la falsificación de medicamentos, se puede ver reflejado en la mala disposición que se le da a los medicamentos vencidos o parcialmente consumidos.

Es muy importante dar a conocer o más bien informar a la comunidad sobre la Corporación Unidades de eliminación de medicamentos e insumos, su utilidad y los beneficios que estos prestan, en cuanto a la prevención con respecto a la falsificación y la contaminación del medio ambiente.

En nuestra labor como Regentes de Farmacia se puede

aportar un grano de arena en la disminución de esta problemática que tanto afecta a nivel mundial la salud de la población en general, una de las maneras es brindando información que tanta falta hace con respecto a la disposición final y segura de los medicamentos, dando a conocer la importancia del unidades de eliminación de medicamentos e insumos y su correcta utilización tanto a nivel comunitario como corporativos. Se podría dar charlas en sitios de mayor concurrencia como casetas comunales, salas de espera en IPS/EPS, E.S.E, droguerías, colegios, universidades, empresas, entre otros. No menos importante brindarles información a los recicladores puesto que son ellos quienes mayormente son fuente de primera mano en la recolección de medicamentos y destacar la importancia que tienen frente al comercio ilegal de medicamentos y su aporte social y ético dentro de los valores Morales, cívicos y profesionales que hay que desarrollar en la persona para bien de la humanidad.

Recomendaciones

Desde la perspectiva de esta trabajo consideramos que se debe desarrollar en compañía de los entes gubernamentales específicamente sus ministerios de salud y protección social; sus secretarías de salud campañas de socialización que permitan aplicar los respectivos Objetivos de desarrollo sostenible al 2030 de las naciones unidas que proyectan el futuro hacia una mayor transparencia ética corporativa y una mejor educación social frente a nuestro medio ambiente y la salud de todo ser viviente.

6. REFERENCIAS

1. García Ruiz, J.; (2022) Medicamentos falsificados en Colombia: Análisis desde una perspectiva de anticorrupción. Bergen: U4 Anti-Corruption Resource Centre, Chr. Michelsen Institute (U4 Issue 2022:7)
2. Unidades de eliminación de medicamentos e insumos. 2019. > <https://www.puntoazul.com.co/preguntas-frecuentes-medicamentos-humanos/<> (12/11/2022)
3. El País. ("Así opera el mercado de los medicamentos falsos en Cali") 2011. > <https://www.elpais.com.co/cali/asi-opera-el-mercado-de-los-medicamentos-falsos-en.html<> (13/11/2022)
4. Andrés Felipe Quintero Rodríguez, Ingeniero Ambiental, Coordinador del Plan Posconsumo de Medicamentos de Unidades de eliminación de medicamentos e insumos
5. Reyes Luisa. ¿Qué hacer con los medicamentos vencidos? Revista Bienestar Colsanitas. [internet]. Edición 163. 2019.[13/11/2022]. Disponible en: <https://www.bienestarcolsanitas.com/articulo/medicamentos-vencidos.html>



6. COPYRIGHT. Falsificación de medicamentos, mal que azota a Colombia.2022.> <https://www.portafolio.co/economia/falsificacion-de-medicamentos-mal-que-azota-a-colombia-536879>< (14/11/2022)
7. García Ruíz, J.; (2022) Medicamentos falsificados en Colombia: Análisis desde una perspectiva de anticorrupción. Bergen: Centro de Recursos Anticorrupción U4, Chr. Instituto Michelsen (Número U4 2022: 7). Disponible en: <https://www.u4.no/publications/medicamentos-falsificados-en-colombia-analisis-desde-una-perspectiva-de-anticorrupcin.pdf>.(14/11/2022)
8. Caracol radio. Peligrosa organización falsificaba medicamentos en centro de reciclaje en Bogotá.2022.> https://caracol.com.co/radio/2022/02/17/judicial/1645088297_011793.html< (15/11/2022)

Si desea citar nuestro artículo:

Comercio ilegal de medicamentos, problemática enfocada en puntos de distribución y destrucción: unidades de eliminación de medicamentos e insumos

Jorge H.Restrepo Zapata, Adriana Barrera Reyes, Kiary D. Heredia Diosa, Paola

A.Ospina Atehortua y Brenda A. Salazar Delgado

An Real Acad Farm (Internet].

An. Real Acad. Farm.Vol. 89. nº 3 (2023) · pp. 307-314

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2023.89.03.05>

JEAN IRVINE AND LESLEY YELLOWLEES, FIRST FEMALE PRESIDENTS OF THE ROYAL PHARMACEUTICAL SOCIETY AND OF THE ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, RESPECTIVELY

JEAN IRVINE Y LESLEY YELLOWLEES, PRIMERAS MUJERES PRESIDENTAS DE LA ROYAL PHARMACEUTICAL SOCIETY Y DE LA ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, RESPECTIVAMENTE

Agustín García Asuero¹ y Juan Núñez Valdés²

¹Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia y de la Academia Iberoamericana de Farmacia. Profesor Emérito por la Universidad de Sevilla. Departamento de Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012-Sevilla. ORCID: 0000-0002-9301-7287

²Investigador Honorario de la Universidad de Sevilla. Doctor en Matemáticas y Farmacia por la Universidad de Sevilla. Departamento de Geometría y Topología. Facultad de Matemáticas. Universidad de Sevilla, 41012-Sevilla. ORCID: 0000-0002-8413-6735

corresponding author: jnvaldes@us.es

ARTÍCULO DE REVISIÓN

ABSTRACT

Despite the indisputable progress made in the fight against gender inequalities since the last years of the last century, there are still many differences between the roles played by women and men when it comes to holding the top positions on boards of directors of relevant companies or in the presidencies of scientific societies, in which the presence of women does not reach at all the percentage of 40% that is estimated as necessary to achieve that equality. In this article, we show the biographies of Jean Irvine and Lesley Yellowlees, the first female presidents of the Royal Pharmaceutical Society and the Royal Society of Chemistry, respectively, although their appointments occurred many years after the aforementioned societies had been founded. The objective is to make their figures known to society and place them as references and models to be followed by the rest of women who wish to practice a profession. Some brief biographical data of other women who played a prominent role in scientific and academic societies in the early years of the 20th century are also shown.

RESUMEN

A pesar de los indiscutibles avances habidos en la lucha contra las desigualdades de género desde los últimos años del siglo pasado, aún existen muchas diferencias entre los roles que desempeñan las mujeres y los hombres a la hora de ocupar los primeros puestos en los consejos de administración de empresas relevantes o en las presidencias de sociedades científicas, en las que la presencia de mujeres no alcanza en absoluto el porcentaje del 40% que se estima necesario para alcanzar esa igualdad. En este artículo mostramos las biografías de Jean Irvine y Lesley Yellowlees, las primeras mujeres presidentas de la Royal Pharmaceutical Society y de la Royal Society of Chemistry, respectivamente, aunque sus nombramientos se produjeron muchos años después de la fundación de dichas sociedades. El objetivo es dar a conocer sus figuras ante la sociedad y situarlas como referentes y modelos a seguir por el resto de las mujeres que deseen ejercer una profesión. También se muestran algunos breves datos biográficos de otras mujeres que desempeñaron un papel destacado en sociedades científicas y académicas en los primeros años del siglo XX.

Keywords:

Jean Irvine
Lesley Yellowlees
female presidents of scientific societies
Royal Pharmaceutical Society
Royal Society of Chemistry

Palabras Clave:

Jean Irvine
Lesley Yellowlees
mujeres presidentas de sociedades científicas
Real Sociedad Farmacéutica
Real Sociedad de Química



1. INTRODUCCIÓN

It is clear that since the last twenty years of the last century, especially in the European and American continents, the great difference between the rights of women and those of men in many areas of life has been significantly reduced. However, this equalization has not yet been fully achieved and it is still very evident in what refers to the occupation of managerial or important positions by women in companies, educational centers and other social institutions, in which women appear in a much smaller proportion than men, which implies that this difference continues being still very remarkable.

This is the case, for example, of what happened in very relevant world scientific societies, such as The Royal Society of Chemistry, the Royal Pharmaceutical Society, or the Royal Society of London. In the first one, the first woman to become president, Lesley Yellowlees, did so in 2012, that is, almost 45 years after the society was founded, and this is without counting the previous years that passed without women in the presidencies of the different entities that constituted the germ of it.

Many years before, Jean Irvine took longer to achieve the position of president of the Royal Pharmaceutical Society, as she became president of that society in 1947, more than a century after its founding and after more than one hundred and seventy men had passed through that post.

And if we refer to the Royal Society of London, formally The Royal Society of London for Improving Natural Knowledge, the oldest and most prestigious of the scientific and academic societies in the world, which was created in 1660, it is very significant that still, nearly four and a half centuries later, no woman has held the position of president.

Moreover, not only no woman has been president of this Royal Society to date, but it also took a long time for a woman to be admitted in that institution, specifically until 1945, when Kathleen Lonsdale (1903-1971) and Marjory Stephenson (1885, 1948), x-ray crystallographer the first cited and biochemist the second, respectively, were elected to the Royal Society in that year.

According to these situations, the main objective of this article is to make Jean Irvine and Lesley Yellowlees known to society. To do so, the methodology followed has been the usual in this type of research, the search for information on both women in all kinds of sources, mainly primaries.

The structure of the article is as follows. After this introduction, Section 2 is devoted to recall the enormous difficulties that women had to be admitted at the different British scientific societies at the beginning of the 20th century and who were some of those women who dared to take that step. Next, and by way of

contextualization, Sections 3 and 4 are devoted to briefly recall the historical origins of the Royal Pharmaceutical Society and the Royal Society of Chemistry. Sections 5 and 6 show biographies of Jean Irvine and Lesley Yellowlees, respectively. Finally, a section of conclusions closes the article.

2. BACKGROUND

It has already been commented that it took a long time from their respective beginnings for the Royal Pharmaceutical Society and the Royal Society of Chemistry to allow a woman to occupy the position of president, and also that almost three and a half centuries after its foundation, no woman has still acceded to that position in the Royal Society of London.

Focusing on this last society, since the following two sections are dedicated to the first two ones mentioned, respectively, it can be indicated that although the early statutes of the society did not explicitly prohibit a woman from being appointed Fellow of the society, the fact is that this admission was for a long time of its history closed to women, due in large part to the fact that in England the access of women to studies and, therefore, to academic societies, was practically non-existent during the 17th and 18th centuries, and it was not until well into the 19th century that this situation changed, very slowly at first and then gradually consolidating. with the founding of the Zoological Society of London in 1829 (it is a global science-led conservation organization helping people and wildlife live better together to restore the wonder and diversity of life everywhere) and the Royal Entomological Society in 1833, which already allowed the admission of women to their ranks from its inception (1), (2). The foundation of this last society began with a meeting of "gentlemen and friends of entomological science", held on 3 May 1833 in the British Museum under the presidency of John George Children. There, assistants decided that a society should be convened for the promotion of the science of entomology in its various branches and it should be called the Entomological Society of London. Women were allowed membership and had the same rights as the men.

The first known incidence of the admission of women to the Royal Society took place in 1900, when Marian Sarah Ogilvie Farquharson (née Ridley, 1846-1912), a British naturalist and women's rights activist, the first woman to have been admitted as a Fellow of the Royal Microscopical Society, although she was not permitted to attend meetings, he sent a letter to the Council of the Royal Society requesting that "duly qualified women should have the advantage of full fellowship in scientific and other learned societies" (the Royal Microscopical Society was founded as "The Microscopical Society of London" in 1839 and awarded its Royal Charter in 1866).

However, the Royal Society Council did not uphold Farquharson's request, arguing that the admission of women "must depend on the interpretation to be placed upon the Royal Charters under which the Society has been governed for more than three hundred years" (1). Marian Farquharson had also sent that request to the Linnean Society of London with the same result (The Linnean Society of London had been founded in 1788 by botanist Sir James Edward Smith, taking its name from the Swedish naturalist Carl Linnaeus, the 'father of taxonomy' and later, in 1802 gained its Royal Charter and took the name of "The Linnean Society of London"). At present, more than for these requests, Marian Farquharson is best remembered by the society for her campaign of women rights to full fellowship of learned societies.

Later, when another woman, the British engineer, mathematician, physicist, and inventor Phoebe Sarah Hertha Ayrton, usually known as Hertha Ayrton (1854-1923), was nominated for fellowship of that society in 1902, her candidature was rejected for the sole reason of a married woman had no standing in law (3). Hertha Ayrton always suffered many difficulties, both in her primary and secondary studies as well as in her university career, just because she was a woman. In 1880, she passed the Tripos in Mathematics

but did not receive the degree because, at that time, Cambridge University only gave certificates, not degrees, to women. She had to pass an external examination to obtain her Bachelor of Science degree from the University of London in 1881.

In 1901, Hertha Ayrton had published *The Electric Arc*, a compendium of her previous twelve articles published between 1895 and 1896 on her analysis, research and technical advances in the field of electric arc lighting, in "The Electrician", the premier electrical engineering periodical of the age. It made that she was nominated for Fellowship of the Royal Society by the renowned electrical engineer John Perry. However, as we have just indicated, the Royal Society Council rejected her application, because "married women were ineligible for membership partners" (4).

However, the Royal Society later corrected her position somewhat and in 1904 allowed her to become the first woman to read a publication in its dependencies. The paper was entitled "The Origin and Growth of Ripple Marks", but it could not be read by her for being a woman, having to do it on her behalf who had nominated her for Fellowship, John Perry (5). That paper was later published in the *Proceedings of the Royal Society*.

Media in category "Female Fellows of the Royal Society"

The following 54 files are in this category, out of 54 total.

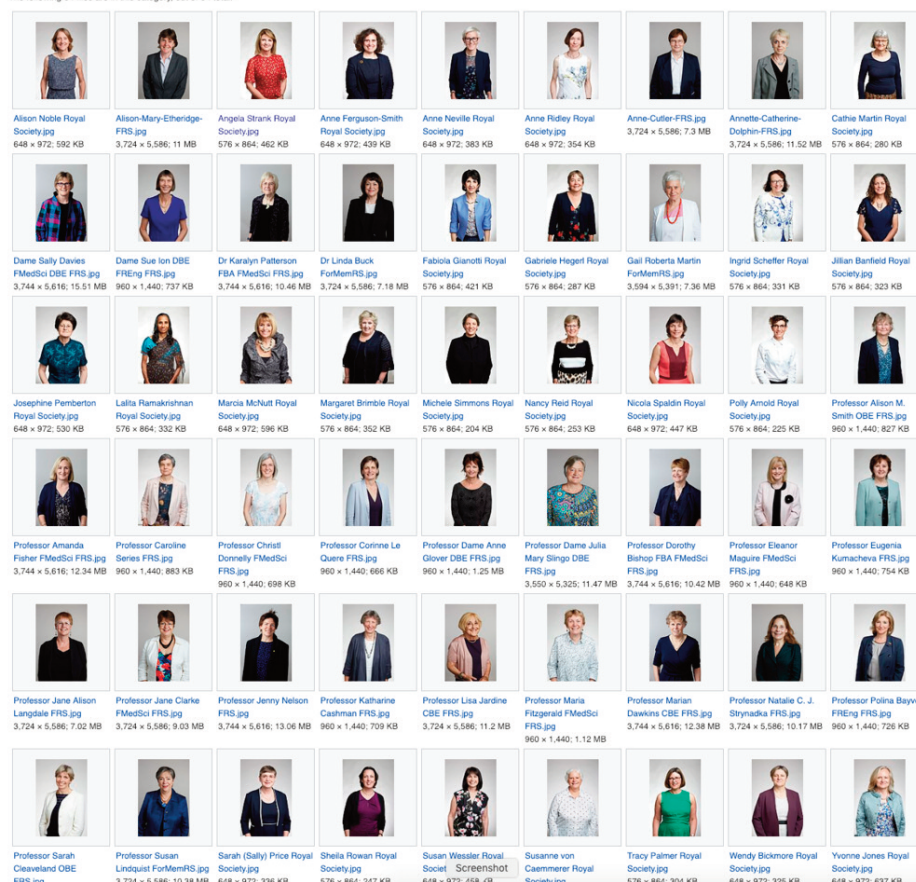


Figura 1. The list of Female Fellows of the Royal Society elected from 2014 to 2018.

Source: picture uploaded as part of the Wikiproject Royal Society (22).



Moreover, in 1906, she was awarded the Royal Society's most prestigious award, the Hughes Medal, for "her experimental investigations on the electric arc, and also on ripples in the sand". She was the fifth person to receive that prize, awarded annually since 1902, in recognition of an original discovery in the physical sciences, particularly electricity and magnetism or their applications; and until 2013, one of only two award-winning women (5).

Hertha Ayrton was also the first woman to read her own paper in the prestigious engineering society Institution of Electrical Engineers and in 1899, was elected as a member of that institution, which was a prestigious and widely recognized professional qualification. Thus, Ayrton became the first female member of that institution and the first professionally recognized female electrical engineer.

Several years later from the rejection of Hertha Ayrton as a member by the Royal Society, the Sex Disqualification (Removal) Act 1919 considered illegal for incorporated societies to refuse admission on the grounds of an individual's sex or marital status (6). Although the Royal Society admitted the provision of section 1 of the Act in 1925, in reply to a question originally put to them by the Women's Engineering Society three years prior, it was not until 1943 that another woman was nominated for fellowship. Finally, Kathleen Lonsdale and Marjory Stephenson were duly elected in 1945, after a postal vote amending the Society's statutes to explicitly allow women fellows (7).

At present, there is a lot of information in the literature about the causes that produced the very low presence of women both in the Royal Society and in other societies and in science in general. Among them, the following publications can be consulted: (8) to (21). The list of Female Fellows of the Royal Society elected from 2014 to 2018 (22) can be seen in Figure 1.

To finish this background, we include next some brief notes related to the presence of women in the early years of Spanish scientific societies, in order to complete with data of female scientists from our country this contribution, that deals with the presence and role of women in the early years of life of these societies.

Although with some delay with respect to them, the scientific societies were founded in Spain in the image and likeness of those already existing abroad, coming from the phenomenon of scientific associationism of the European 19th century.

Among them, the one that had the greatest presence of women among its members was the Spanish Society of Physics and Chemistry, founded on January 23, 1903. In its first year it reached 263 members. In 1928, King Alfonso XIII granted it the title of "Royal" and in 1980 it was decided to split it into two branches, the Royal Spanish Society of Chemistry and the Royal Spanish Society of Physics.

The first woman who joined as a member was Martina Casiano Mayor (Madrid, 1881 - Cádiz, 1958), in 1912. She was a teacher of Higher Education since 1898 (23). And the first woman President of the Society, already in the Physics branch, was María del Rosario Heras Celemín, who held that position in the period 2010-2013, when it had already passed more than a century since its foundation. At present, María del Rosario Heras Celemín (Zamora, 1950) is a scientist, researcher and physicist, who is a pioneer in research on renewable energy and energy efficiency in buildings. She was emeritus researcher at the Center for Energy, Environmental and Technological Research and earned the 2021 National Energy and Environment Awards, delivered by the Ministry for Ecological Transition and Demographic Challenge.

Other of the Spanish scientific associations of that time were, chronologically by year of foundation, the Spanish Society of Natural History, the Spanish Association for the Progress of Sciences and the Spanish Society of Mathematics.

The (currently Royal) Spanish Society of Natural History was established in 1871 thanks to the impulse given by a group of 26 people, of whom only 3 were women (23). Until 2022, that Society has had 114 presidents, among whom there is only one woman: Isabel Rábano Gutiérrez del Arroyo, a member of the Mining and Geological Institute of Spain, who held that position between 2010 and 2013. She is a PhD in Biological Sciences from the Complutense University of Madrid and a Senior Scientist of the CSIC (on leave of absence). Since 1993, she was director of the Geomining Museum of the Geological and Mining Institute of Spain. As a scientist, she is a paleontologist specializing in Ordovician trilobites, author of numerous publications on the subject, and responsible for research projects on movable and immovable geological heritage.

The Spanish Association for the Progress of Sciences was founded at the prior request of the President of the Spanish Society of Natural History, Luis Simarro (1851-1921), and other prestigious scientists, such as José Rodríguez Carracido, Ignacio Bolívar, José Echegaray, Blas Cabrera, Julián Calleja and Leonardo Torres Quevedo, among others, to the President of the Council of Ministers Segismundo Moret (1833-1913), on January 2, 1908. From its foundation and until the beginning of the Civil War (1936) there were 38 women members. The Association's activity declined from the decade of 1950 and led to its completion in 1979, the year of the last Congress. There is no data that any woman held the presidency.

The Spanish Mathematical Society (now the Royal Spanish Mathematical Society) was founded in 1911 by a group of mathematicians, including Luis Octavio de Toledo y Zulueta (1857-1934), and Julio Rey Pastor (1888 -1962), both Professors of



Mathematical Analysis at the Central University of Madrid. One of its founders was Josefa Barrera, Castilla` widow, who was a teacher at the Normal School for Teachers in Madrid. Between 1911 and 1936 there were 12 associated women (23). The first woman who presided the society reached that position a century and 5 years after its foundation, in 2006. She was Olga Gil Medrano, who remained in office for 3 years. The second woman president of the Society is who currently holds that position, Eva A. Gallardo Gutiérrez, who took office in 2022.

Olga Gil Medrano (Burgos, 1956) was also a member of the Executive Committee of the European Mathematical Society (2005-2008) and of the Scientific Committee of the Institute of Mathematics of the Polish Academy of Sciences, "Banach Center" (2006-2009). Since 2009 she is a member of the Scientific Committee of the Tbilisi International Center for Mathematics and Informatics, of the Georgian Academy of Natural Sciences. In addition to being President of the Royal Spanish Mathematical Society from 2006 to 2009, she was President of the Spanish Committee for the International Mathematical Union, from 2008 to 2009. At present, she works at the University of Valencia, where she was Vice Chancellor from April 2010 to March 2014.

For her part, Eva Antonia Gallardo Gutiérrez (Seville, 1973) is a PhD in Mathematics from the University of Seville. She became a professor at the Complutense University of Madrid and in November 2019 she was elected First Vice President of the Royal Spanish Mathematical Society, becoming president in 2022.

3. THE ROYAL PHARMACEUTICAL SOCIETY: ITS ORIGINS

In Great Britain, the history of the Royal Pharmaceutical Society (hereinafter RPS) goes back to the Middle Ages, when the pharmacy was a trade controlled by the Company of Grocers, a guild that regulated the sale of spices, meats, food and beverages. At one point, the apothecaries, who manufactured and sold drugs, decided to abandon their guild, to take responsibility for the drugs they produced and to ensure that they were not adulterated, so they separated from the Company of Grocers in 1617 and were incorporated in London as the Worshipful Society of Apothecaries. This society, in addition to being responsible for the sale and manufacture of medicines, acquired powers to inspect medicines, requiring then a seven-year apprenticeship for those who wanted to be apothecaries.

In 1704, thanks to the Worshipful Society of Apothecaries winning the Rose Case against the Royal College of Physicians, apothecaries were able to prescribe and dispense drugs, just like physicians, and later, a new pharmacy trade emerged in the 18th century, when the industrial revolution began.

However, the emergence of new chemists and pharmacists in urban areas made them different from apothecaries, even though they were completely unregulated and without a national entity to represent them.

In 1815, the newly introduced Apothecaries Act required all practicing apothecaries to be licensed, with the objective that the Worshipful Society of Apothecaries could control chemists and pharmacists. These were required by law to become apothecaries or stop dealing in medicines. However, they fought against that law and managed to continue as they were, although that fight showed that the new chemists and pharmacists needed to join together to maintain their interests.

A Medical Reform Bill was proposed in 1841 to prevent chemists and pharmacists from dispensing medicines unless they were qualified to do so, thereby eliminating the need for a separate pharmaceutical profession. On February 10 of that year, chemist Jacob Bell met with other London-based chemists and pharmacists to discuss that bill. Consequence of that meeting was the foundation of the Pharmaceutical Society of Great Britain, on April 15, 1841, at the meeting held at the Crown and Anchor Tavern, on the Strand, in London. William Allen, who had proposed the motion, which was seconded by John Bell, father of proponent Jacob Bell, was voted to be the first President of the Society.

The first Council of the same had 40 members, who were responsible for creating the statutes and structure of the Society. In September of that year, a house at 17 Bloomsbury Square for their meetings was leased.

Since then, this society has had more than one hundred and seventy presidents, but it was not until June 1947 when a woman, Jean Irvine, held that position, thus becoming the first woman president of what would later be called Royal Pharmaceutical Society.

Further information on the origins of this society can be checked on (24) or on the website of the society (25).

4. THE ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY: ITS ORIGINS

The origins of the Royal Society of Chemist (hereinafter RSC), the oldest chemical society in the world, go back to the foundation of the Chemical Society of London in 1841. A total of 77 scientists, academics, manufacturers, and entrepreneurs decided to create it to achieve general advancement of Chemical Science and hold meetings for the communication and discussion of discoveries and observations on that discipline. The dialysis inventor Thomas Graham was their first President, and seven years later Queen Victoria granted a Royal Charter to the Society.



Later, in 1877, the Institute of Chemistry of Great Britain was created to give responses to the need for properly qualified chemists. Later, the Institute became the Royal Institute of Chemistry. Its main objectives were to advance the profession of chemistry and ensure that chemistry professionals were thoroughly and properly qualified and trained.

The founding of the Society of Public Analysts was due to the rapid growth of the chemical industry during the nineteenth century in Great Britain, a growth for which chemists were not analytically well prepared at that time. With this motive of improving the knowledge of analytical chemistry, this society was formed in 1874, which subsequently became the Society for Analytical Chemistry.

The Faraday Society, so-called in honor of 19th century chemist Michael Faraday, was founded in 1903 to publish research in physical chemistry. It was publishing papers of interest in that topic until 1971 when the Royal Society of Chemistry took over the publication.

These four mentioned institutions, the Chemical Society, the Society for Analytical Chemistry, the Royal Institute of Chemistry, and the Faraday Society merged in 1980 to the Royal Society of Chemistry, which was granted a new Royal Charter in 1980.

Further information on the origins of the Royal Society of Chemistry can be checked in the website of the society (26) or in (27).

5. JEAN IRVINE: HER BIOGRAPHY

Jean Kennedy Irvine (née Jean Kennedy) was born on July 22, 1876, in Hawick, Scotland (Great Britain). Her parents were Walter Phillips Kennedy, a bookseller by profession, and Jane Kennedy (née Law) (28).

Her link with the Pharmacy started when she began working as an apprentice in the pharmacy of the pharmacist Thomas Maben, located in her hometown. Later, at the age of 24, she graduated in Pharmaceutical Chemistry from the Pharmaceutical Society in 1900 (29).

After graduating, she began working as a pharmaceutical assistant and later became chief pharmacist for the Glasgow Apothecaries Company. After working for the well-known Glasgow pharmacist, John McMillan, she became a member of the staff of the Glasgow Royal Infirmary (30).

On June 2, 1904, she married the pharmaceutical chemist Peter Irvine (1876-1949) and began helping him run the two pharmacies he owned in Glasgow. However, at the outbreak of World War I, he was conscripted into the army, and she moved to London to be closer to him. There, she worked in the National Health Insurance, in 1914, dealing with checking the prices of prescriptions

and two years later, in 1916, when the centralized price offices were established, she became the superintendent of the Joint Committee for the Fixation of Prescription Prices (Southeast Division). This committee was responsible for overseeing prescription prices in the region, and she remained in that position for 35 years, until her retirement in 1947 (29).

During her career, she held many honorary positions and was the recipient of numerous honors. In 1928, she was made a Member of the Order of the British Empire for "meritorious service in connection with the National Insurance Scheme" (30).

She became the first woman president of the staff side of the Whitley Council for National Health Insurance administrative, technical, and clerical services (31). She was also first president and then honorary secretary of the National Association of Women Pharmacists. That Association sponsored her to stand for election to the Council of the Royal Pharmaceutical Society in 1937, which made her become the third woman member of the Council in its history and later, in June 1947, the first woman President, aged 70 (32). As a curiosity, she, well known for her strength of character, once described the Council as "crazy" in a public session. However, she was well respected for her support and encouragement of younger colleagues (25).

Precisely, in the speech of acceptance of that presidency, Jean Irvine mentioned the book "Physica", written by Hildegarda de Bingen in 1533, which was in the Library of the Society, and referring to it, she affirmed that anyone who doubted the place of the woman in the pharmacy story should read it (33).

Jean Irvine remained on the council until 1952. During her time as President of the Royal Pharmaceutical Society oversaw the terms of the Royal Pharmaceutical Society's final agreement with the University of London on the transfer of the new building in Brunswick Square, which would house its school of Pharmacy, now University of London School of Pharmacy (29).

In 1957, Robert Norman Hepple (1908 – 1994), English portrait painter, engraver and sculptor, best known for his portraits of the British royal family, painted the portrait of Jane Irvine in oils, which was exhibited at the Royal Academy's summer exhibition and later hung in the council chamber at the Pharmaceutical Society's headquarters in Bloomsbury Square (Figure 2). At present, that portrait is part of the collections of the Royal Pharmaceutical Society (34).

Jean Irvine died on March 3, 1962, aged 85, at 166 Westbourne Grove, Paddington, London. A requiem mass was celebrated for her on 8 March 1962 in the Church of the Most Holy Redeemer, Cheyne Row, London, followed by a private burial (35). The newspaper "*El Pharmaceutical Journal*" honored her with several posthumous tributes. In one of those articles in her honor, you can read the following (31):



Figure 2. Portrait of Jean Kennedy Irvine, by Norman Hepple. Source: (34).

Mrs. Irvine was forthright in her opinions, which she combined with granitic honesty of a Scot educated in the Victorian era; a virtue perhaps not always appreciated by those who live in the gender South, but she was recognized as a major force in the organization which set out to secure for women equal opportunities with men.

In 2019, the name Jean Irvine was added to the Oxford Dictionary of National Biography (36).

6. LESLEY YELLOWLEES

Lesley Jane Yellowlees was born in London in 1953. Her father was an employee of the Rank Hovis McDougall company, and she had two sisters (37).

At the age of 9, she moved to Edinburgh, Scotland, where she studied at St Hilary's Girls' School. She completed her university studies at the University of Edinburgh, where she graduated in Chemical Physics in 1975 and subsequently obtained a PhD in Inorganic Electrochemistry in 1982, with a doctoral thesis entitled "Spectro-electrochemical studies on luminescent complexes". She was the only woman to graduate from her class. Regarding it, in 2013, Nicola Davis affirmed on her (38): "I saw something no one else had seen".

After graduating, she first worked as an administrator in the National Health Service, moving shortly thereafter to Australia, to Brisbane, where she began her research studies in electrochemistry and later worked at the University of Queensland. After finishing research positions in Brisbane, Lesley Yellowlees returned to an academic position in Edinburgh in 1986 to do a new PhD in Solar Cell Chemistry,

In 1986 she worked as a demonstrator, in 1989 as a lecturer and a few years later, in 2005, she gained a personal chair in Inorganic Electrochemistry.

She became the first woman to be appointed Head of the School of Chemistry in University of Edinburgh and then Vice Principal and Head of the College of Science and Engineering at that University.

In 2005 she was appointed Fellow of the Royal Society of Chemistry and in 2012 she became Fellow of the Royal Society of Edinburgh and also Fellow from the Institute of Physics (39).

In 2012, on July 4, she assumed the presidency of the Royal Society of Chemistry for a period of two years, becoming the first woman President in 175 years (26). She was succeeded by Dominic Tildesley, British professor, and chemist, born 1952, who had obtained a doctorate at Oxford University in 1976. At present,



Figure 3. Professor Lesley Yellowlees and Ian Blackley, unveil the plaque on April 27. Source: (41)

he is director of the European Center for Atomic and Molecular Computation at the Ecole Polytechnique Federale de Lausanne in Switzerland (40).

On the occasion of this election as president of the Royal Society of Chemistry, 2012 was a year of great activity for Lesley Yellowlees.

That year and for the second time in a row, the Zoological Society of London and the L'Oréal-UNESCO For Women in Science program convened some of the UK's leading scientists to give talks to promote science. Among those women were Lesley Yellowlees, Professor Dame Athene Donald, an advocate for equality at Cambridge University, and Professor Sunetra Gupta, a successful novelist, awarded the Royal Society Rosalind Franklin Prize for her scientific discoveries.

Likewise, on May 5 of that year, while already president of the Royal Society of Chemistry, Lesley Yellowlees condemned the

theft of the historic chemical plate, blue coiled, hexagonal, dedicated to the legacy of James "Paraffin" Young that was located in the outer wall of the Bennie Museum, in Bathgate, West Lothian.

That plaque was unveiled by "Paraffin" Young's great-great-grandson, Ian Blackley at a ceremony attended by politicians, schoolchildren, scientists and others. Mr Blackley said at the ceremony: "This reminds us that important scientific breakthroughs can have a lasting legacy for many generations".

The inscription on that plaque read the following: "In recognition of the outstanding contribution, made on a site close to here in Birniehill, Bathgate, where in c.1850 he processed torbanite ("cannel coal") to create the first commercial production of paraffin oil in the world, leading to the major shale oil industry in West Lothian" (Figure 3).

With respect to that theft, Lesley Yellowlees (Figure 4) said as follows (26):



Figure 4. Lesley Yellowlees standing in front of past portraits of RSC Presidents at Burlington House, Piccadilly. Source: (26)

Jean Irvine y Lesley Yellowlees, primeras mujeres presidentas de la Royal Pharmaceutical Society y de la Royal Society of Chemistry, respectivamente



This is awful news and very sad. All of those that were so involved with the museum gaining the plaque must be devastated too. I hope the police either find out who was responsible for the theft or that the thief or thieves have the decency to return the plaque.

In 2015, Lesley Yellowlees became an Honorary Member of the Royal Society of Chemistry (42).

In an interview made in 2015 at the University of Edinburgh, she answered the following (43):

Your time at the University

I always enjoyed chemistry, physics, and maths at school and, being a lot more indecisive than I am today, decided to study chemical physics at university. The Edinburgh University curriculum was flexible enough for me to keep my options open in all three areas until the end of second year and so I came to Edinburgh unsure of what subject I would settle on but sure that I wanted to go to university and study science. In the end, I stuck with my original choice and graduated in chemical physics in 1975 – the only girl in my year.

In my first year, the miners went on strike, which resulted in intermittent electricity. Lectures could no longer take place in the Appleton Tower lecture theatres and all lifts were out of action. Lectures were held instead in the top floor labs in AT and I would arrive at my 9 o'clock lectures exhausted and out of breath. We had to pay a chemistry lab deposit at the beginning of each session. I can well remember the cheer that went up when a fellow student on checking their glassware dropped their drawer of pipettes, flasks and measuring cylinders and broke the lot.

My final year involved punch cards in which I always managed to get a hole in the wrong place, struggling with quantum mechanics, parties, hard work and the decision to leave science behind, I realized my mistake within a few months. On immigrating to Australia to take up a research position at the University of Brisbane, I started my lifelong passion in the field of solar energy. I realized that to have any chance of a successful research career I would need to have a PhD qualification and so returned to The University of Edinburgh in 1983 to study for my postgraduate qualification in inorganic electrochemistry. I found the transition from employee back to a student challenging but persevered and ultimately thoroughly enjoyed working for my thesis if not writing it!

The University has given me fantastic opportunities - I

think if you were to cut me through the middle like a stick of rock, I would read "University of Edinburgh".

Tell us about your Experiences since leaving the University.

I studied my post-doctorate at the University of Glasgow and then returned to Edinburgh as a senior demonstrator in 1986 and have never left. I have held a variety of roles within the University, balancing my job with raising a family and have enjoyed a wonderfully fulfilling career hugely supported by family, friends and colleagues. My research concentrated on developing Spectro electrochemical techniques for the study of potential solar energy dyes and has resulted in many worldwide collaborations. I gained a personal chair in inorganic electrochemistry in 2005 when I also became Head of the School of Chemistry - a very exciting and demanding role that I loved. On completing my five-year term, I then became Vice Principal and Head of the College of Science and Engineering which has enabled me to hone my leadership skills.

Whilst pursuing my academic career I also worked extensively with the Royal Society of Chemistry, my professional body with 60,000 members worldwide. In 2012, I became their President - the first woman to hold that position in their 170-year history - what an honor and a privilege that was. My main objective during my two-year presidency was to raise the profile of women in science and engineering - a message that resonated in the UK and internationally. In 2005, I was awarded an MBE for services to science, and a CBE in 2014 for services to chemistry and elected as a Fellow of the Royal Society of Edinburgh.

And Rebecca McQuillan (37) affirmed on her: "You've got to have support because work is not always going to go well".

To date, Lesley Yellowlees has been the recipient of numerous awards and honors. She was appointed a Member of the Order of the British Empire in 2005 for services to science, as well as a Commander of the British Order in the 2014 New Year Honors for services to chemistry (44). She is Fellow of the Royal Society of Edinburgh and an honorary doctorate from Heriot-Watt (2012) and Edinburgh Napier (2016) universities.

Lesley Yellowlees is a huge supporter of women and science. With the aim of commemorating the International Year of Chemistry, in 2011, the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) included her in its selection of women for the Award for Distinguished Women in Chemistry/Chemical Engineering for her scientific contributions to this discipline worldwide. Her research interests included inorganic electrochemistry,



electrochemistry, Spectro electrochemistry, electron paramagnetic resonance spectroscopy, solar energy, and CO₂ conversion. Other interests included the public outreach of science, and the promotion of women scientists.

She was also named the 2013 Alumnus of the Year at University of Edinburgh in honor of her research, leadership and her work as an advocate for women in STEM subjects and in 2014, she was included in the BBC's list of 100 distinguished women (45). Her image has already been immortalized on several occasions. The National Portrait Gallery has two portraits of her. There is also another portrait of her, painted by Peter Edwards, in the main staircase in Burlington House, the headquarters of the Royal Society of Chemistry.

Lesley Yellowlees is currently married to Peter W. Yellowlees, a Chartered Accountant and has two children, Sarah and Mark. She is University Assistant Director and Full Professor of the Faculty of Science and Engineering at the University of Edinburgh. Her re-appointment runs from 3 October 2021 to 2 October 2025.

Lesley Yellowlees is also a woman who is very committed to social issues, gender, environment, and diversity. At present, she continues to be a strong advocate of equality between men and women in general and of the role of women in the relatively novel STEM education. In this regard, related to parity, she affirmed that (42):

Diversity these days also means taking into account what areas of chemistry women are representing and that has also changed significantly in recent years. We are seeing not just parity among the male/female A-level chemistry ratio and not just a significant rise in the number of women academics, but also the role of female chemists in all sorts of walks of life is becoming more influential all the time.

And some of her opinions on the last matter are the following (42)

There is still some way to go in terms of academic positions, with most recent figures showing the number of women in senior positions in university chemistry departments remaining relatively low at only 6.0% at professor level and 13.6% at senior lecturer level in 2006-07. But it is worth noting that these figures had hugely increased from 0.8% and 4.9% respectively from 1997-98.

Although 73% of female STEM grads are not in STEM employment, compared with 52% of men, this really reflects the range of careers that women enter. It's incredibly positive to move away from an obvious chemistry-related career into other areas and applying that scientific knowledge to other fields.

A striking gender divide persists in other STEM subjects. Despite total number increases in the number of both girls and boys sitting physics, the divide remains at approximately 1 girl for every 4 boys achieving A level physics. In Maths, 60 % of A-level candidates were male while more than 77% of males studied "other sciences".

8. CONCLUSIONS

In this article, authors show the enormous difficulties that in the period between the end of the 19th century and the first decades of the 20th century, the current laws of the time placed women in relation to the access to their university studies and later to the exercise of their profession. And not only these difficulties did exist, but even in the case of those women who could overcome them and graduate in some university career, then the scientific societies themselves placed another large number of obstacles to allow them access as members. And not to mention to allow them to occupy some managerial position once these women had entered them.

However, there were several women in many countries, especially European ones, who tried to overcome these difficulties with effort and tenacity, constituting a true model for others, who decided to follow those footsteps and fight to get the same rights as men, as far as academic training and professional work is concerned. Two of these women were the British Isabella Clarke-Keer and Margaret Buchanan. The first, Isabella Skinner Clarke-Keer (née Clarke) (1842-1926), was a pharmacist and pioneer of women in pharmacy. In 1875, she became the first woman to qualify as a Pharmaceutical Chemist and in 1879 was one of the first two women admitted as members (with Rose Minshull) of the Pharmaceutical Society (46). The second, Margaret Buchanan (1865-1940), was registered as a Chemist and Druggist in 1886, being the only female student at the Pharmaceutical Society's School of Pharmacy to take double honors in its exams. She was also the first woman to be awarded its Silver Medal. She started working as a hospital dispenser at the Westminster General Infirmary. Later, she became a businesswoman. She founded in 1913 the Margaret Buchanan School of Pharmacy for Women at Gordon Hall, Gordon Square in London. She also worked as Lecturer in Pharmacy at the London School of Medicine for Women and was a member of the Teachers' Guild (46).

As at that time, in the early 20th century, women were not allowed to join the Pharmaceutical Society, these two women, Isabella Clarke-Keer and Margaret Buchanan, together with a group of women pharmacists, came together to establish, on June 15, 1905, the Association of Women Pharmacists (at present, National Association of Women Pharmacists), to which 50 women joined



immediately, appointing Isabella Clarke-Keer as the association's first President and Margaret Buchanan Members as Vice President (46), (47).

Two other women who exemplify this situation are those studied in this work, Jean Irvine and Lesley Yellowlees, who became the first women to hold the presidency of the Royal Pharmaceutical Society and the Royal Society of Chemistry, respectively.

All these mentioned women can be considered, without any doubt, as references and models to be followed by the rest of the women who wish to study a career and then practice their profession, getting in this the distinctions and awards that their work has deserved, in the same way as men.

Fortunately, the situation of inferiority of women compared to men has already changed a lot, especially in the European and American continents, and today there are no obstacles for women to study a university degree, or to later practice their profession, and not even to become part of scientific societies, although it is true that there are still very few of them who have got to hold management positions in those societies. Do not forget that the reality indicates that the percentage of women who occupy these positions, especially the presidencies, compared to that of men is still very small and that effects such as the so-called glass ceiling or the Matilda effect are still valid in our society (see (48) to (55), for instance, for further information on gender and science).

Since scientific work must ultimately be judged on its merit, and not on the nationality or sex of its author, authors think that opposition to the election of women in scientific societies will soon be seen to be unfair and detrimental to the progress of natural knowledge. By no pedantic reasoning can the rejection of a candidate for membership in a scientific society be justified if the work done places the candidate in the leading position among other competitors. Science knows no nationality, and must not recognize any distinction of sex, color, or creed among those who are contributing to its advance. Firmly believing that this is the conclusion to which consideration of the issue must inevitably lead, we are confident that the doors of all scientific societies will eventually be open to women on equal terms with men.

9. REFERENCIAS

- Mason J. The women fellow's jubilee. Notes Rec R Soc London 1995; 49(1): 125-40.
- Ferry G. The exception and the rule: women and the Royal Society 1945-2010. Notes Rec R Soc London 2010; 64: 163-72.
- Mason J. Ayrton (Phoebe) Sarah (1854-1923). Oxford Dictionary of National Biography (online ed.). Oxford University Press. 2010
- Henderson F. (2016). Almost a Fellow: Hertha Ayrton and an embarrassing episode in the history of the Royal Society. <https://royalsociety.org/blog/2012/03/almost-a-fellow/>
- Riddle L. Hertha Marks Ayrton. Biographies of Women Mathematicians. Agnes Scott College.
- Sex Disqualification (Removal) Act 1919. [https://en.wikipedia.org/wiki/Sex_Disqualification_\(Removal\)_Act_1919](https://en.wikipedia.org/wiki/Sex_Disqualification_(Removal)_Act_1919)
- Calvo Iglesias E. Científicas y sufragismo. Sevilla: SIEMUS (Seminario Interdisciplinar de Estudios de las Mujeres de la Universidad de Sevilla) 2016.
- Fyfe A, Rostvik CM. How female fellows fared at the Royal Society. Nature 2018; 555: 159-61.
- Holmes R. The Royal Society's lost women scientists. "The Guardian" 2010 21 Nov. <https://www.theguardian.com/science/2010/nov/21/royal-society-lost-women-scientists>
- Martin J, Asuero AG, Sáez P. Química (Analítica) y Farmacia en los orígenes de las academias y sociedades científicas: Francia Inglaterra y Hungría como ejemplos. Mem. Real Acad. Sevillana Cien. 2018; 21: 163-217.
- Mason J. The admission of the first women to the Royal Society of London. Notes Rec R Soc London 1992; 46(2): 279-300.
- Ceci SJ, Williams WM. Understanding current causes of women's underrepresentation in science. PNAS 2011; 108(8): 3157-62.
- Holman L, Stuart-Fox D, Hauser CE. The gender gap in science: how long until women are equally represented. PLOS Biology 2018; 16(4): e2004956.
- Noordenbos G. Women in academies of sciences: from exclusion to exception. Women's Studies International Forum 2002; 25(1): 127-37.
- Rayner-Canham M, Rayner-Canham GW. British women and chemistry from the 16th to the mid-19th Century. Bul. His. Chem 2009; 34(2): 117-23.
- Rayner-Canham MF, Rayner-Canham GW. Forgotten women in chemistry. World Scientific 2020
- Rayner-Canham MF, Rayner-Canham GW. Fight for rights. Chem. World 2009; 6(3): 57-9.
- Rulev AY, Voronkov MG. Women in chemistry: a life devoted to science. New J Chem 2013; 37(12): 3826-32.
- Serrano E, Mercelis J, Lykknes A. I am not a Lady I am scientists. Chemistry women and gender in the Enlightenment and the era of professional science. Ambix 2022; 69:203-220.
- List of female fellows of the Royal Society. https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_female_fellows_of_the_Royal_Society
- 1904 Petition to the Chemical Society. https://en.wikipedia.org/wiki/1904_petition_to_the_Chemical_Society



- society
22. WikiProject Royal Society: https://en.wikipedia.org/wiki/Wikipedia:WikiProject_Royal_Society
23. Magallón Portolés C. Pioneras españolas en las ciencias. Las mujeres del Instituto Nacional de Física y Química. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas 2004.
24. Holloway SWF. Royal Pharmaceutical Society of Great Britain 1841-1991. A political & social history. London: The Pharmaceutical Press 1991.
25. The Royal Pharmaceutical Society. <https://www.rpharms.com/>
26. The Royal Society of Chemistry News (August 2012). Lesley Yellowlees. <https://www.rsc.org/news-events/articles/2012/05-may/lesley-yellowlees-condemns-paraffin-young-plaque-theft/>
27. Asuero AG. La Real Sociedad de Química y la Real Sociedad Farmacéutica. Mem Real Acad Sevillana Cien 2019; 22: 105-78.
28. Oxford Dictionary of National Biography. British Academy. Oxford University Press. (Online ed.). Oxford.
29. Haines CM, Stevens HM. International women in science: a biographical dictionary to 1950. Santa Barbara, California 2001.
30. "The Chemist and Druggist" (March 26, 1949). 35 years as a pricing officer. 151(410): 26.
31. "The Pharmaceutical Journal" (March 10, 1962). Obituary.
32. "The Glasgow Herald" (June 5, 1947). Woman's Distinction.
33. "The Pharmaceutical Journal" (June 1947). Report of Council Meeting 158:(407).
34. Matthews L. Portrait of Jean Kennedy Irvine. "The Pharmaceutical Journal" 1976; 216(365).
35. "The Pharmaceutical Journal" (March 17, 1962). Jean Kennedy Irvine. 237.
36. "The Pharmaceutical Journal" (Apr 11, 2019). Seven women pharmacists entered into the Oxford Dictionary of National Biography.
37. McQuillan R. On Lesley Yellowlees. "The Herald" July 2, 2012.
38. Davis N. Lesley Yellowlees. "The Guardian" November 3, 2013.
39. University of Edinburgh (2014). Professor Lesley Yellowlees. www.ed.ac.uk
40. Royal Society of Chemistry News. New CSR President. Chemistry Views 9 July 2014.
41. Web Image 3: <https://www.rsc.org/news-events/articles/2012/05-may/lesley-yellowlees-condemns-paraffin-young-plaque-theft/>
42. Royal Society of Chemistry News. Honorary Fellows of the Royal Society. 8 June 2016.
43. University of Edinburgh. Interview with Professor Lesley Yellowlees. Dec 22, 2015. <https://www.ed.ac.uk/alumni/services/profiles/graduation/1970s/lesley-yellowlees>
44. "The Telegraph Newspaper". New Year Honors 2014.
45. BBC. Who are the 100 Women 2014? October 26, 2014.
46. Núñez Valdés J. Women in the early days of Pharmacy in Great Britain. IJMRAS 2021; 04(12): 1-12.
47. The Royal Pharmaceutical Society. Foundation of the Association of women pharmacists; <https://www.rpharms.com/about-us/museum/online-exhibitions/celebrating-women-in-pharmacy/foundation-of-the-association-of-women-pharmacists>
48. Jarvis CL. Chemical textbooks still lack gender and racial representation. Chem. Eng. News 2021; 99:(14).
49. Keller EF. Reflections on Gender and Science. Yale University Press 1985.
50. Le Floch F, Griffete N. Moins de femmes dans les sciences comment inverser la tendance? L'Act. Chim. 2022; 472: 4-6.
51. Murray C, Anderson Y, Simms CH, Seery MK. Representations of women and men in popular chemistry textbooks in the United Kingdom and Republic of Ireland. Chem. Educ. Res. Pract. 2022; 23: 373.
52. Royal Society of Chemistry. Breaking the barriers. Women's retention and progression in the chemical sciences. Cambridge 2018.
53. Salton GJ, Nelson S. Gender and Thought Diversity in Chemistry. In Diversity in the Scientific community 2017. In Vol. 1: Quantifying Diversity and Formulating Success ACS Symposium Series Chap. 8: 205-17.
54. Tom JW, Green RA, Cherney EC, Huang M, Loft J. Empowering women in chemical sciences and engineering through outreach: a platform to explore careers in the pharmaceutical industry. J. Chem. Educ. 2022; 99: 154-61.
55. Watts R. Women in Science: A Social and Cultural History. Routledge 2007.

Si desea citar nuestro artículo:

Jean Irvine and Lesley Yellowlees, first female presidents of the Royal Pharmaceutical Society and of the Royal Society of Chemistry, respectively

Agustín García Asuero y Juan Núñez Valdés

An Real Acad Farm (Internet).

An. Real Acad. Farm. Vol. 89. nº (2023) · pp. 315-326

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2023.89.03.06>

Jean Irvine y Lesley Yellowlees, primeras mujeres presidentas de la Royal Pharmaceutical Society y de la Royal Society of Chemistry, respectivamente

Agustín García Asuero y Juan Núñez Valdés

An. Real Acad. Farm. Vol. 89. nº 3 (2023) · pp. 315-326

LA NEURODEGENERACIÓN DESDE UN PUNTO DE VISTA HOLÍSTICO

A HOLISTIC INSIGHT INTO NEURODEGENERATION

José Clerigué Louzado y Olmo Martín-Cámara

Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

corresponding author: olmomart@gmail.com

ARTÍCULO DE REVISIÓN

RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por un deterioro neuronal progresivo e irreversible. Aunque constituyen un grupo de patologías muy heterogéneo, la mayoría comparten un origen multifactorial y una estrecha relación con el envejecimiento. El aumento de la esperanza de vida a nivel mundial ha convertido a estas patologías en una amenaza para los sistemas sanitarios y de cuidados, pues su prevalencia crece de forma paralela al envejecimiento de la población. Destacan entre ellas, por su elevada prevalencia o por el impacto sanitario que tienen, las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington; y la esclerosis lateral amiotrófica. El conocimiento sobre el origen de estas enfermedades es generalmente muy limitado, lo que condiciona la extrema dificultad de su manejo clínico. No existen métodos fiables para su diagnóstico temprano, por lo que su detección se suele producir cuando el deterioro clínico es ya irreversible. Por otra parte, los tratamientos disponibles hoy en día son meramente paliativos, ya que el desconocimiento sobre las causas primarias de la enfermedad y su diagnóstico tardío impiden el desarrollo de tratamientos capaces de detener o revertir el deterioro estructural y funcional.

En los últimos años se han identificado varios fenómenos patológicos que podrían constituir las verdaderas causas primigenias de estas enfermedades, destacando el estrés oxidativo, las alteraciones de la proteostasis y la neuroinflamación: en las conexiones entre ellos y en su capacidad para retroalimentarse podrían estar algunas de las respuestas necesarias para avanzar hacia un abordaje clínico efectivo de los procesos neurodegenerativos.

ABSTRACT

Neurodegenerative diseases are defined by a progressive and irreversible impairment of neurons. Despite being a very heterogeneous group of pathologies, they share some common features, such as their multifactorial origin and their close correlation with ageing. As worldwide life expectancy increases, these diseases have become a tough challenge for healthcare systems as their prevalence is raising in the same way. The most important neurodegenerative disorders, because of their prevalence or their health impact, are Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases; and amyotrophic lateral sclerosis. The knowledge about their origin is still very poor, so their clinical management is far from being adequate. There are not reliable methods for early diagnosis, so these diseases are usually detected when tissue damage is irreparable. Furthermore, current available therapies are intended only for symptomatic relief, since the misunderstanding about the real causes of these diseases and their delayed diagnosis hinder the development of new treatments being able to stop or even reverse the structural and functional decline.

In the last few years, some pathological events have been identified as potential key factors to understand the origin of neurodegeneration. Among them, we shall mention oxidative stress, impaired proteostasis and neuroinflammation: a deeper knowledge about their interconnections and their ability to feedback each other could provide valuable information to progress towards an effective clinical management of neurodegenerative disorders.

Palabras Clave:

neurodegeneración
envejecimiento
estrés oxidativo
proteostasis
neuroinflamación
terapias modificadoras de la enfermedad

Keywords:

neurodegeneration
ageing
oxidative stress
proteostasis
neuroinflammation
disease modifying therapies



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Las enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un grupo heterogéneo de patologías caracterizadas por el deterioro funcional y estructural del sistema nervioso central y/o periférico. Dentro de este grupo destacan, por su impacto sanitario y socioeconómico, las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, así como la esclerosis lateral amiotrófica.

Aunque bajo esta denominación se incluyen patologías de índole muy diversa, todas comparten una serie de características: tienen un origen multifactorial, un desarrollo progresivo y una relación íntima con el envejecimiento. Todas las áreas del sistema nervioso pueden verse afectadas por un proceso neurodegenerativo, siendo específicos de cada enfermedad el foco originario del daño celular y su patrón de extensión anatómica, que se correlacionan directamente con las manifestaciones clínicas (1).

El principal problema que envuelve a las enfermedades neurodegenerativas es el desconocimiento que aún reina sobre su origen y los mecanismos patológicos subyacentes que condicionan su progresión, aunque los enormes esfuerzos consagrados a su estudio en los últimos años hayan permitido realizar ciertos avances. Esta falta de conocimiento tiene unas consecuencias nefastas, pues implica que se carezca de métodos fiables para realizar un diagnóstico temprano de estas patologías, y que los pocos tratamientos farmacológicos disponibles sirvan únicamente para paliar los síntomas, sin una capacidad real para detener o revertir su progreso clínico.

El hecho de que estas enfermedades estén estrechamente relacionadas con el envejecimiento agrava considerablemente el alcance del problema, pues los avances médicos del último siglo han impulsado un notable aumento de la esperanza de vida a nivel mundial que conlleva un aumento paralelo de la incidencia de las patologías neurodegenerativas, con los consecuentes costes sanitarios y socioeconómicos. Están más que justificados, pues, los enormes esfuerzos que está invirtiendo la comunidad científica en la comprensión de estas enfermedades.

1.1.a. Epidemiología y etiología generales

En este apartado reside, como se ha señalado anteriormente, el reto que suponen las enfermedades neurodegenerativas. La esperanza de vida se ha doblado desde los inicios del siglo XX, situándose en unos 72 años a nivel mundial y en torno a los 80 años en las regiones con mayor nivel socioeconómico (2). La consecuencia inevitable de esta buena noticia es el aumento de la incidencia de todas aquellas patologías relacionadas con el envejecimiento. Así, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares se han erigido como las primeras causas de muerte,

mientras que la incidencia de las enfermedades neurodegenerativas se está disparando, un incremento que se agudizará a medida que la esperanza de vida en los países en vías de desarrollo se aproxime a la de los países más avanzados.

Como en ocasiones una cifra vale más que mil palabras, un vistazo a la evolución epidemiológica de las principales enfermedades neurodegenerativas bastará para poner en valor el reto a enfrentar. La asociación *Alzheimer's Disease International* señaló, en un informe del año 2019, que los 20 millones de enfermos de demencia que se estimaban en el año 1990 a nivel mundial se han convertido en unos 50 millones en la actualidad, y serán aproximadamente 150 millones en el año 2050. Los costes asociados suponen cifras mareantes: se estima que los gastos sanitarios derivados de las demencias solo en Estados Unidos rondan el billón de dólares, e incluso dicho informe asevera que el coste global de la demencia sería la decimoctava economía mundial si fuese un país (3). El mismo panorama se extiende a otras enfermedades neurodegenerativas: el número de enfermos de Parkinson en 2050 se quintuplicará respecto al existente en el año 1990, y se prevé que la incidencia de la esclerosis lateral amiotrófica aumente un 70 % al cabo de las dos próximas décadas (4,5).

Es importante insistir en que buena parte de este incremento se producirá en los países en vías de desarrollo, que no cuentan con sistemas sanitarios y de cuidados capaces de absorber la consiguiente demanda de servicios, de modo que la búsqueda de nuevos métodos diagnósticos tempranos y nuevas terapias capaces de modificar el curso de estas enfermedades se ha convertido en una necesidad acuciante.

El principal obstáculo al que hay que hacer frente para alcanzar este objetivo tiene que ver con las enormes lagunas de conocimiento que existen sobre el funcionamiento del sistema nervioso, en general, y del origen de las enfermedades neurodegenerativas, en particular. Se sabe que estas enfermedades tienen una etiología multifactorial, en la que multitud de mecanismos celulares y fenómenos fisiopatológicos se interconectan en el origen y el desarrollo del proceso neurodegenerativo, pero persisten numerosas incógnitas sobre los actores de este proceso y la manera en que se relacionan entre sí. Hay que imaginar el estado actual del conocimiento sobre la neurodegeneración como un mapa vial en el que faltasen numerosas carreteras y poblaciones: hasta que no se arroje luz sobre las partes del mapa que faltan es imposible conocer las causas íntimas de la enfermedad y dilucidar a qué niveles se puede actuar para prevenirla o curarla.

Se puede considerar que la degeneración del sistema nervioso, como la del resto del organismo, es una consecuencia ineludible del envejecimiento. (Figura 1) Serían otros factores como los genéticos y los ambientales los que determinen cuándo, cómo y

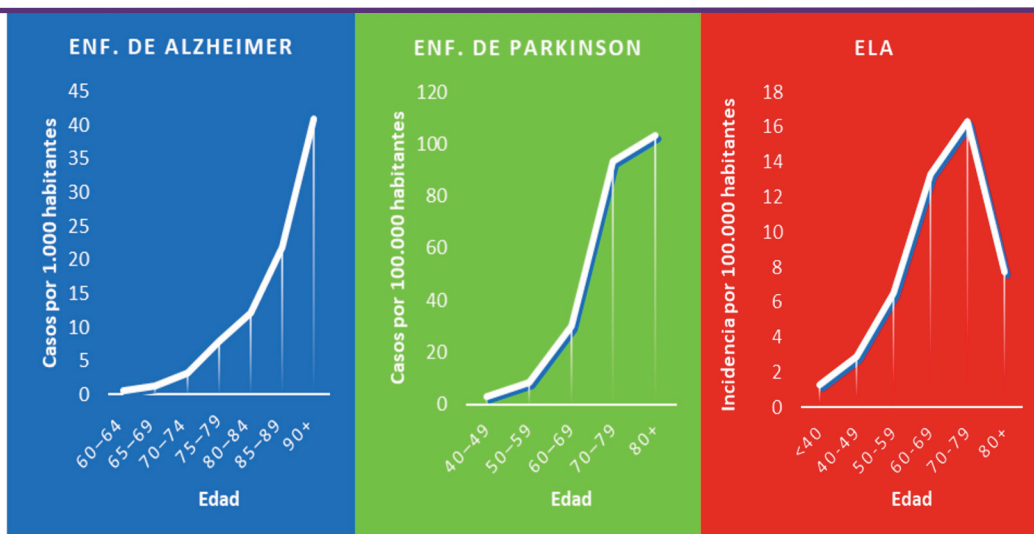


Figura 1: Relación de las principales patologías neurodegenerativas con el envejecimiento. Prevalencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa (azul), de la enfermedad de Parkinson en el mundo (verde) e incidencia de ELA en Europa (rojo) desagregada por grupos de edad. (7–10)

con qué intensidad se manifiesta este deterioro estructural y funcional (6).

En las fases últimas de la vida se constata una acumulación progresiva de alteraciones genéticas y proteicas que determinan múltiples perturbaciones de la fisiología celular a nivel del metabolismo, la homeostasis y las señales de supervivencia/muerte celular. Este fenómeno tiene un impacto aún más marcado a nivel del sistema nervioso, ya que el hecho de que las neuronas sean células postmitóticas implica que la capacidad de regeneración estructural y funcional del tejido nervioso frente a una situación de deterioro sea muy limitada. De ahí que explorar las causas primigenias de la enfermedad, y no sus manifestaciones

posteriores, sea de imperiosa necesidad si se desea encontrar estrategias terapéuticas eficaces.

Decíamos antes que ciertos factores genéticos pueden influir decisivamente en el desarrollo de las patologías neurodegenerativas. (Tabla 1) El ejemplo más evidente es el de la enfermedad de Huntington, ligada a una mutación del gen que codifica para la proteína huntingtina y que se considera una enfermedad autosómica dominante en el 90 % de los casos, mientras que el porcentaje restante se debe a mutaciones espontáneas de dicho gen (11). En el caso de otras enfermedades como las de Alzheimer, Parkinson o la ELA, el porcentaje de casos que se pueden asociar a un defecto genético hereditario es

Tabla 1: Origen de las enfermedades neurodegenerativas más comunes. Afectaciones más comunes a nivel proteico y genético.

Patología	Esporádicos (%)	Genéticos (%)	Mutaciones más comunes
EA	98	2	APP, PSEN1, PSEN2
EP	95	5	LRRK-2, SNCA, PRKN, PINK-1
ELA	90	10	SOD1, TARDBP, FUS, C9ORF72, DJ-1, ALS-2
EH	10	90	HTT
Enf. priónicas	85-90	10-15	PRNP
DFT	60-75	25-40	MAPT

Tabla realizada con datos de (7–9,13,14)



considerablemente menor, si bien ciertas alteraciones genéticas hereditarias o adquiridas pueden participar de forma más o menos significativa en el origen del proceso patológico. A veces, determinados polimorfismos genéticos pueden modificar el riesgo de sufrir la enfermedad: uno de los casos más estudiados es el de la apolipoproteína E, cuyo alelo $\epsilon 4$ triplica el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer, mientras que el alelo $\epsilon 2$ podría comportarse para sus portadores como un factor de protección (12).

Se ha estudiado ampliamente el papel de muchos factores ambientales en relación con las principales enfermedades neurodegenerativas, si bien la variedad en las conclusiones invita a leer los resultados con cautela. No en vano, es difícil llevar a cabo estudios consistentes en este tipo de pacientes por los largos periodos de latencia de estas enfermedades, la ausencia de criterios diagnósticos sólidos y la complejidad de los casos clínicos, en los que es frecuente que se solapen varias patologías.

Así, se ha relacionado la exposición a metales, pesticidas, disolventes y contaminantes ambientales con un mayor riesgo de desarrollar alguna enfermedad neurodegenerativa, aunque la claridad de la posible relación causa-efecto en estudios *in vitro* o *in vivo* no se ha reproducido en los estudios de exposición en humanos (15–17). En cuanto al sexo, está bien establecido que los hombres tienen más riesgo de padecer la enfermedad de Parkinson que las mujeres, y se sugiere que podría ocurrir lo contrario en la enfermedad de Alzheimer, aunque en este caso la evidencia es menos sólida (18). Se han relacionado ciertas patologías como la *diabetes mellitus* tipo II, las enfermedades cardiovasculares y la obesidad con un mayor riesgo de desarrollar demencia; también un historial de traumatismos craneoencefálicos, insomnio crónico, o determinadas infecciones víricas o bacterianas podrían aumentar el riesgo de padecer posteriormente alguna de las enfermedades neurodegenerativas más comunes. Finalmente, el estilo de vida también parece influir en la aparición del proceso neurodegenerativo: el hábito tabáquico podría ser un factor de protección frente a la enfermedad de Parkinson pero de riesgo frente a la enfermedad de Alzheimer y la ELA, un consumo moderado de alcohol podría ser protector frente a un aumento del riesgo si este es excesivo, y el ejercicio físico moderado y la dieta mediterránea podrían otorgar un cierto grado de protección. Hay que destacar también que una mayor formación académica e intelectual parecen constituir un factor de protección frente a las demencias (19,20).

Las enfermedades neurodegenerativas son, por tanto, el fruto de un deterioro inherente al envejecimiento que se ve agravado por la concurrencia de ciertos factores genéticos y ambientales, de modo que este declive funcional y estructural traspasa el umbral considerado como patológico. A nivel

fisiopatológico, distintos factores como el estrés oxidativo, la alteración de las proteostasis y la neuroinflamación se solapan y retroalimentan abocando a las neuronas a una situación de fracaso fisiológico y funcional caracterizada por una homeostasis general y del calcio alteradas, disfunción mitocondrial, fallos en el transporte axonal y, finalmente, la muerte celular.

1.1.b. Evolución y diagnóstico de las enfermedades neurodegenerativas

Mucho de lo que sabemos sobre las enfermedades neurodegenerativas se ha descubierto a través del desarrollo de modelos *in vitro* e *in vivo* que tratan de imitar sus aspectos fisiopatológicos o clínicos más relevantes. No obstante, el grado de aproximación de estos modelos a la realidad queda en entredicho si se comparan los resultados de numerosos fármacos experimentales en estos modelos con los que arrojan en los ensayos clínicos. Queda claro, por tanto, que aún hay mucho trecho por recorrer a la hora de entender la naturaleza real de los distintos procesos neurodegenerativos, y uno de los campos donde se han depositado más esperanzas es la búsqueda de biomarcadores. El hallazgo de biomarcadores fiables de la neurodegeneración permitiría extraer información muy útil sobre el origen de la misma, así como seguir su evolución y elegir las dianas terapéuticas más adecuadas para circunstancia. Todo ello conllevaría la posibilidad de ajustar el inicio del tratamiento al del proceso patológico subyacente sin esperar a la aparición de las manifestaciones clínicas, momento en el que el daño tisular y el deterioro funcional suelen ser ya irreversibles (21).

El enfoque tradicional para predecir la aparición de una enfermedad neurodegenerativa se basaba en la búsqueda de determinadas mutaciones que se asociaban a la misma. No obstante, como ya se comentó anteriormente, los casos clínicos suelen ser de origen esporádico, e incluso muchas de las mutaciones que se relacionan con estas patologías no constituyen una causa única o necesaria, de modo que esta aproximación resulta poco adecuada. Hoy en día se consagran muchos estudios a la búsqueda de biomarcadores bioquímicos, de mayor utilidad en el diagnóstico y monitorización de estas enfermedades.

Para explicar los avances en la búsqueda de biomarcadores y cómo éstos han permitido extender considerablemente la comprensión del desarrollo del proceso degenerativo, tomaremos como ejemplo el caso de la enfermedad de Alzheimer, por ser de largo la patología más estudiada. Los niveles de proteína tau, tau fosforilada y péptido $A\beta_{42}$ en líquido cefalorraquídeo (LCR) podrían ser suficientemente específicos y selectivos para el diagnóstico adecuado de la enfermedad, mientras que la ratio $A\beta_{42}$ /p-tau parece ofrecer un buen valor predictivo para seguir la enfermedad desde el estadio prepatológico hasta la fase

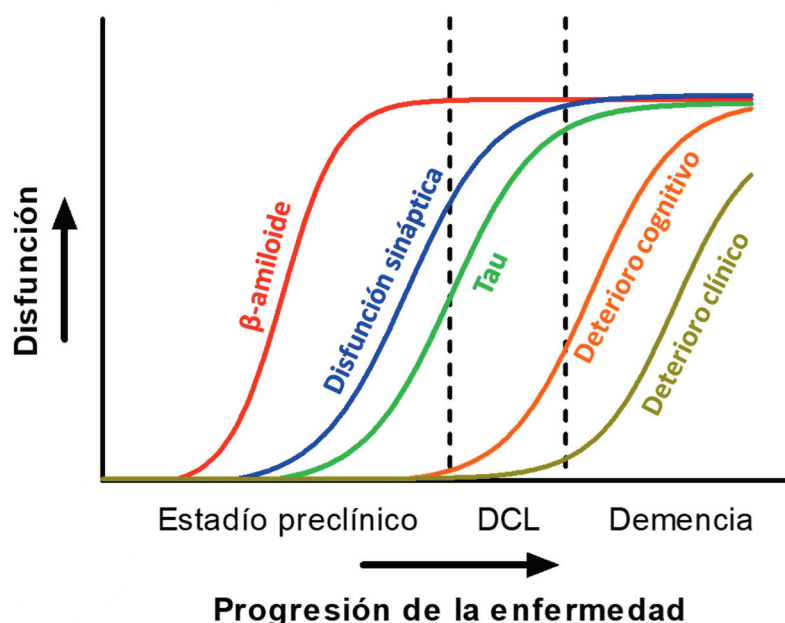


Figura 2.: Progresión temporal de los marcadores fisiopatológicos y bioquímicos de la EA en relación con la situación clínica. Adaptado de (23).

de deterioro cognitivo severo. Otras técnicas que se están estudiando son la tomografía de emisión de positrones (PET) para la detección de depósitos de péptido β -amiloide, que parece tener un buen valor predictivo y diagnóstico, y la detección de la captación cerebral de ^{18}F -fluorodeoxiglucosa mediante PET, pues su captación reducida es un signo de hipometabolismo que muestra una correlación predictiva y diagnóstica aceptable con la enfermedad (22).

El estudio de estos biomarcadores ha permitido seguir la evolución de la enfermedad de Alzheimer con una fiabilidad hasta ahora desconocida, constatándose que el verdadero inicio del proceso fisiopatológico puede tener lugar entre cinco y diez años antes que la aparición de las manifestaciones clínicas. Las primeras alteraciones observables serían el aumento de los niveles del péptido $\text{A}\beta_{42}$ y la ratio $\text{A}\beta_{42}/\text{p-tau}$ en líquido cefalorraquídeo, así como la presencia de depósitos cerebrales de $\text{A}\beta_{42}$. Años más tarde, se podría comenzar a observar el deterioro funcional a través de la detección de ^{18}F -fluorodeoxiglucosa por PET o la resonancia magnética nuclear (RMN) de imagen funcional en las áreas cerebrales afectadas. Poco después aumentan los niveles de proteína tau en LCR, un hallazgo que se suele considerar un signo inespecífico de daño neuronal. Tras otro periodo de duración variable, que puede durar años, la disfunción cerebral se puede constatar mediante RMN de imagen volumétrica de los territorios cerebrales afectados y mediante pruebas funcionales que permiten evaluar el estatus cognitivo del paciente. Esta fase, que se conoce como periodo de deterioro cognitivo leve, anunciaría la próxima instauración de la demencia típica de la enfermedad de Alzheimer. (24,25) Como se refleja en la Figura 2, la evolución de todos estos parámetros no sería de carácter lineal, sino más bien se suele representar como

funciones sigmoideas cuya pendiente reviste una importante variedad interindividual, que en ocasiones puede incluso afectar al orden de aparición de las alteraciones descritas.

A pesar de estos avances, el diagnóstico de las enfermedades neurodegenerativas en la práctica clínica habitual se sigue basando en la sintomatología del paciente, pues los métodos en desarrollo aún carecen de la practicidad, la fiabilidad y el bajo coste necesarios para su aplicación a gran escala. Procede continuar, por tanto, con la búsqueda de métodos diagnósticos sensibles, específicos, económicos y no invasivos que permitan una detección temprana en la práctica clínica, ampliando la ventana temporal en la que se pueden poner en marcha las estrategias terapéuticas.

1.1.c Tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas

El gran problema a nivel práctico de las enfermedades neurodegenerativas, que supone un futuro oscuro para los pacientes que son diagnosticados de alguna y para sus allegados, es la carencia de tratamientos realmente efectivos. Se dispone para la mayoría de estas patologías de diversos fármacos que tienen una cierta capacidad para aliviar los síntomas o retrasar ligeramente el progreso de la enfermedad, pero ninguno puede realmente ejercer un impacto decisivo, deteniendo o revirtiendo su desarrollo. En la Tabla 2 se resumen los tratamientos disponibles hoy en día para las principales enfermedades neurodegenerativas, aunque posteriormente se describirán con más detalle patología por patología:

¿Por qué los enormes esfuerzos consagrados al tratamiento de estas enfermedades han dado tan poco fruto? La respuesta está, además de en la falta de métodos para el diagnóstico



Tabla 2: Fármacos actualmente disponibles para el tratamiento de las principales enfermedades neurodegenerativas. (26) * Se administran conjuntamente. ** No aprobado aún por la Agencia Europea del Medicamento (sí por FDA y/o Japón)

Patología	Mecanismo de acción	Fármacos
EA	Inhibidores de la acetilcolinesterasa	Rivastigmina, galantamina, donepezilo
	Antagonista del receptor NMDA	Memantina
	Eliminador de depósitos amiloides	Aducanumab **
	Precursor de dopamina*	Levodopa
EP	Agonistas dopaminérgicos	Bromocriptina, lisurida, cabergolina, pramipexol, ropirinol, rotigotina
	Inhibidores de la L-aminoácido aromático descarboxilasa periférica*	Carbidopa, benserazida
	Inhibidores de la monoaminoxidasa B	Rasagilina, selegilina
	Inhibidores de la catecol <i>O</i> -metil transferasa	Entacapona, tolcapona
	Antagonistas muscarínicos	Benzatropina, biperideno, prociclidina, trihexifenidilo, benztropina
	Estimulador de la liberación de dopamina	Amantadina
	Antagonista del receptor A _{2A} de adenosina	Istradefilina **
ELA	Modulador glutamatérgico	Riluzol
	Captador de radicales libres	Edaravona **
EH	Deplecionadores de monoaminas	Tetrabenazina, reserpine
	Antagonistas dopaminérgicos postsinápticos	Haloperidol, pimozida, tiaprida, perfenazina
	Agonistas dopaminérgicos presinápticos	Bromocriptina, apomorfina

temprano, en el desconocimiento que envuelve el origen de estas patologías. Hasta hace poco, los tratamientos se han basado eminentemente en la corrección de determinadas anomalías que se observaban en el transcurso de la enfermedad. Así, la hipótesis colinérgica por la que la enfermedad de Alzheimer se relaciona con un agotamiento de la neurotransmisión colinérgica llevó al empleo de inhibidores de la acetilcolinesterasa como terapia de primera línea. En el caso de la enfermedad de Parkinson, donde se constata un deterioro de la neurotransmisión dopaminérgica a nivel de los ganglios basales, las terapias de reemplazo o restitución

dopaminérgicas siguen constituyendo la estrategia más extendida. El problema de estas terapias es que se enfocan hacia la compensación de un daño que ya se ha producido, y no hacia las verdaderas causas que han motivado la alteración de esos procesos de neurotransmisión. Aunque hoy en día se están explorando una gran cantidad de dianas terapéuticas novedosas, en muchos casos se siguen dando palos de ciego: baste mencionar que entre la aprobación de la memantina para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en 2003 y la aprobación del aducanumab en 2021, unas 300 moléculas alcanzaron la fase clínica de desarrollo sin

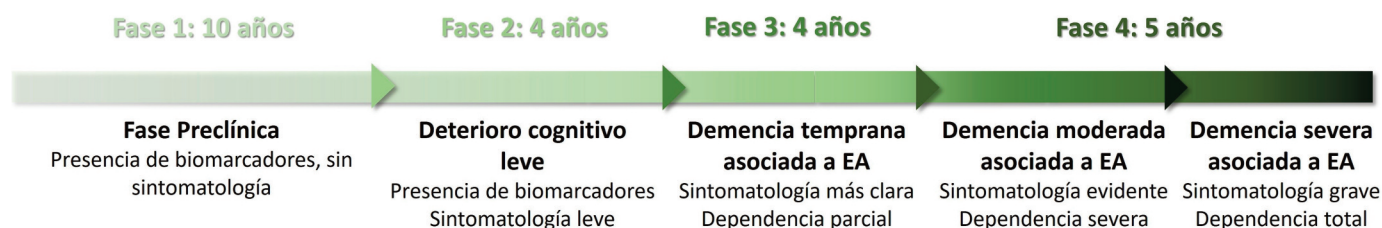


Figura 3: Fases clínicas por las que atraviesa un paciente con EA.

reproducir los resultados prometedores que habían exhibido en los ensayos previos (27).

Este fracaso a la hora de trasladar las moléculas potencialmente activas de la fase preclínica de desarrollo a los ensayos clínicos es de tal magnitud que se le conoce como un “valle de la muerte” terapéutico. Ante la evidencia de que el enfoque no es el correcto, quizá por actuar cuando el daño neuronal es ya irreversible o porque las dianas a las que se dirigen los tratamientos actuales no se cuentan entre las causas primarias de la enfermedad, hoy en día la comunidad científica se afana en el desarrollo de terapias que modifiquen el curso de las patologías en cuestión, deteniendo y revirtiendo el curso de la enfermedad. (28) Para ello se están aplicando herramientas terapéuticas muy novedosas, como anticuerpos monoclonales, terapias génicas o moléculas pequeñas dirigidas a nuevas dianas más relacionadas con el origen de la enfermedad. Dentro del campo de las moléculas pequeñas merece la pena destacar el diseño de compuestos multidiana que reúnen varias actividades farmacológicas en una única entidad química, ya que podrían suponer una aproximación especialmente adecuada al tratamiento de enfermedades de etiología multifactorial, como es el caso que nos ocupa.

1.2. Enfermedad de Alzheimer y otras demencias

La demencia se puede definir como un síndrome caracterizado por un deterioro cognitivo que supera a aquel inherente al envejecimiento, en el que se observa una grave afectación de funciones cerebrales como la memoria, el pensamiento, el lenguaje, el razonamiento, la personalidad, etcétera. El 60-70 % de los casos de demencia se asocian a la enfermedad de Alzheimer, que será la que describamos con detalle en lo sucesivo. (29)

1.2.a. Epidemiología y transcurso de la enfermedad

La enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrita en 1906 por el neurólogo alemán Alois Alzheimer cuando, examinando el cerebro de una paciente fallecida aquejada de demencia, observó que ciertas zonas del cerebro presentaban un volumen reducido, así como unas lesiones que posteriormente se denominarían placas seniles y ovillos neurofibrilares. Es una patología neurodegenerativa

crónica en la que, tras una fase preclínica asintomática que puede durar hasta diez años, se va constatando un deterioro cognitivo paulatino que transita desde un estado funcional asimilable al típico del envejecimiento a un cuadro de demencia severa en el que los pacientes pierden la capacidad de llevar a cabo las tareas cotidianas y de comunicarse, además de presentar otros síntomas como agitación, paranoia e importantes alteraciones del estado de ánimo. (Figura 3) El proceso completo, desde que se alteran los primeros biomarcadores de la enfermedad hasta la muerte del paciente, puede llegar a durar más de 20 años (30).

La EA afecta a más de 20 millones de personas hoy en día a nivel mundial, y se espera que esta cifra siga incrementándose drásticamente en las próximas décadas al calor del aumento de la esperanza de vida, ya que el principal factor de riesgo para su aparición es el envejecimiento. Esto se ilustra fácilmente con las siguientes cifras: si entre el 4 y el 6 % de la población mundial mayor de 60 años podría padecer la enfermedad, este porcentaje supera el 15 % en la franja etaria de los 75 a los 85 años, y se eleva hasta un 40 % en los mayores de 90 años. El coste de la enfermedad es inmenso a nivel económico, como ya se explicó en el inicio de esta revisión, pero también supone un terrible problema a nivel emocional y social, dado el elevado grado de dependencia que alcanzan los pacientes y la duración de la enfermedad. Por ello, supone un reto sanitario formidable que será ineludible afrontar en las próximas décadas. (29,31,32)

1.2.b. Etiopatogenia

La verdadera etiología de la EA, al igual que en el caso de las otras enfermedades neurodegenerativas, permanece oculta al saber científico actual. No obstante, se han ido formulando algunas hipótesis según avanzaban los conocimientos sobre la enfermedad. La primera hipótesis sólida sobre el origen de la EA fue la “teoría colinérgica”, formulada tras la observación de que en el cerebro de los enfermos se produce una notable pérdida de la inervación colinérgica en determinadas áreas cerebrales, especialmente en el hipocampo y el neocórtex. La disfunción de la neurotransmisión colinérgica se produce a todos los niveles: hay una pérdida de masa neuronal en esas áreas, además de una disminución en los niveles de acetilcolina y de la enzima responsable de su síntesis, la colinaacetiltransferasa. Si bien estos fenómenos están

Tabla 3: Resumen de la fisiopatología asociada a las enfermedades neurodegenerativas.

Patología	Zona afectada	Neurotransmisión afectada	Sintomatología predominante	Proteínas alteradas
EA	Corteza cerebral, hipocampo	Hipoactividad colinérgica	Cognitiva, psiquiátrica	β -amiloide, tau
EP	Sustancia negra	Hipoactividad dopaminérgica	Motora	α -sinucleína
ELA	Motoneuronas superiores e inferiores	Hipoactividad colinérgica	Motora	TDP-43, FUS, SOD-1
EH	Ganglios basales, hipotálamo, tálamo, corteza cerebral	Hiperactividad dopaminérgica	Motora, cognitiva	Huntingtina

bien documentados y los fármacos que emanan de esta teoría tienen un impacto (muy moderado) sobre la evolución de la enfermedad, parece evidente que esta reducción de la neurotransmisión colinérgica sería más bien la consecuencia de determinados sucesos patológicos previos, y no la causa directa y primigenia de la EA. (33) Más adelante se formuló la "teoría amiloide", que basaría la enfermedad en la toxicidad provocada por las placas seniles de péptido β -amiloide ($A\beta$) que ya observara Alois Alzheimer cuando describió esta patología. (34) Más tarde, los ovillos neurofibrilares compuestos por la proteína tau hiperfosforilada se incorporarían a esta hipótesis (Tabla 3).

Los depósitos de $A\beta$ se originan cuando la proteína precursora amiloide (PPA), por efecto de determinadas mutaciones

u otras circunstancias, es procesada erróneamente por las enzimas β -secretasa y γ -secretasa de modo que se generan algunos péptidos, entre los que destaca el $A\beta_{42}$, que propenden a agregarse formando primero oligómeros muy reactivos, y finalmente grandes agregados que constituyen las placas seniles. La proteína tau, por su parte, es una proteína estabilizadora de los microtúbulos axonales que sufre procesos de hiperfosforilación mediante mecanismos aún no bien elucidados en el contexto de la neurodegeneración. Esta hiperfosforilación induce un cambio conformacional que promueve su agregación en fibras insolubles que constituyen formaciones conocidas como ovillos neurofibrilares. (35) (Figura 4) La correlación entre la gravedad de la enfermedad y la presencia de depósitos proteicos insolubles está mejor

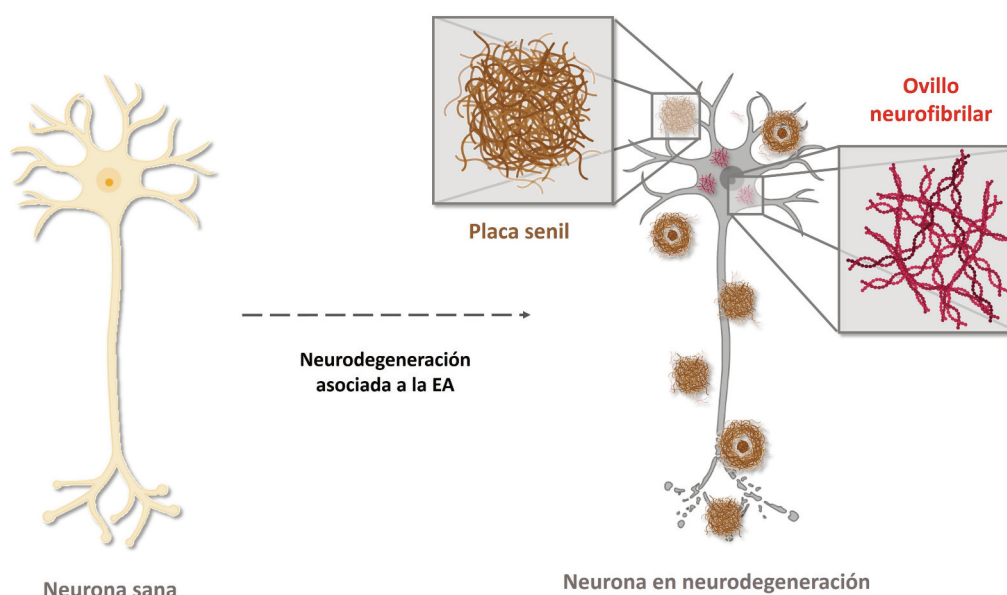


Figura 4: Formación de los macroagregados que actúan como biomarcadores en el proceso neurodegenerativo de la EA, los ovillos fibrilares como agregados de tau, y las placas seniles o neuríticas como agregados de $A\beta$.

establecida para la proteína tau que para el péptido A β : de hecho, se está cuestionando severamente las bases de la teoría amiloide, bajo acusaciones de fraude en los trabajos originales, y esgrimiendo como argumento adicional la ineficacia de todos los tratamientos dirigidos a la eliminación de las placas seniles. Recordemos que sobre el aducanumab, único tratamiento aprobado que tiene como diana estos depósitos, pesan dudas más que razonables sobre su eficacia real y se teme que hayan sido intereses no estrictamente científicos o médicos los que hayan impulsado su aprobación.

Realmente, lo más probable es que ambas teorías tengan una parte de razón y a la vez ninguna, ni tan siquiera ambas juntas, sean capaces de explicar por sí mismas la enfermedad. Otros actores como la excitotoxicidad, el estrés oxidativo y la neuroinflamación podrían estar también implicados formando una red de fenómenos patológicos que constituya el verdadero origen de la EA.

1.2.c. Tratamiento

El tratamiento actual de la enfermedad de Alzheimer se limita a la atenuación de los síntomas y, si acaso, a una moderada ralentización del deterioro cognitivo. La principal herramienta disponible son los inhibidores de la acetilcolinesterasa, que tratan de reestablecer los niveles de acetilcolina en las zonas cerebrales donde se observa una disminución de este neurotransmisor. Tras la retirada de la tacrina, por problemas de hepatotoxicidad, quedan tres fármacos disponibles con este mecanismo de acción: rivastigmina, galantamina y donepezilo (Figura 5). El otro fármaco aprobado que tiene una experiencia clínica ya contrastada es la memantina, un antagonista del receptor de *N*-metil-D-aspartato (NMDA) que trata de limitar la excitotoxicidad suscitada por el neurotransmisor glutamato, un fenómeno que muchos estudios han

identificado como parte del proceso neurodegenerativo (13). Por último, hay que mencionar al aducanumab, un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a los depósitos de péptido β -amiloide y dirigirlos hacia su eliminación. Este fármaco ha sido aprobado recientemente (2021) solo por la agencia reguladora estadounidense FDA (*Food and Drug Administration*), ya que según muchos expertos y otros organismos reguladores como la Agencia Europea del Medicamento los resultados de los ensayos clínicos en términos de eficacia y seguridad no serían suficientes para permitir su aprobación (36).

1.3. Enfermedad de Parkinson

1.3.a. Epidemiología y transcurso de la enfermedad

La enfermedad de Parkinson (EP), al igual que la EA, tiende a ser considerada cada vez más como un síndrome que agrupa una serie de manifestaciones clínicas, y no como una entidad clínica fija y bien diferenciada. Su primera descripción corresponde al médico y político inglés James Parkinson, quien describió en 1817 un síndrome al que denominó "parálisis agitante". Unas décadas más tarde, el estudioso de la enfermedad Jean Martin Charcot nombraría la enfermedad tal cual la conocemos en homenaje a su primer descubridor.

La EP tiene un carácter crónico y progresivo, pudiéndose distinguir varias fases. En primer lugar, se puede reconocer una larga fase preclínica caracterizada por la alteración silenciosa de ciertos biomarcadores y por el comienzo de la neurodegeneración sin que ello suponga manifestación clínica alguna. A esta etapa le sucede la fase prodrómica, en la que comienzan a manifestarse algunas alteraciones motoras leves como la rigidez o los temblores

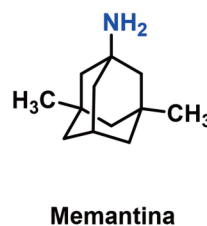
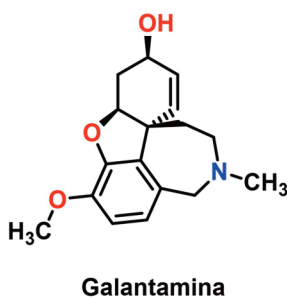
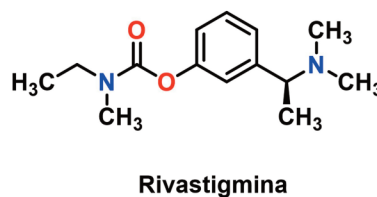
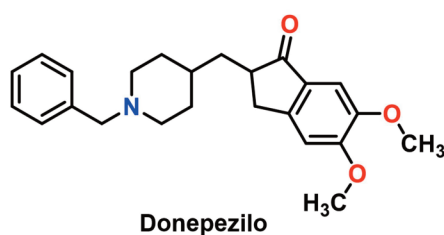


Figura 5: Estructuras de los fármacos empleados en el tratamiento de la EA.

que se pueden controlar satisfactoriamente con terapias de reemplazo dopaminérgico. Por último, cuando la neurodegeneración avanza se instaura la fase clínica de la enfermedad, en la que los síntomas motores ya presentes se agravan y aparecen otros nuevos como la bradiquinesia o la inestabilidad postural, de manera que el paciente va perdiendo la capacidad de realizar sus actividades cotidianas. Además, aparece la sintomatología no motora en forma de alteraciones psiquiátricas, cognitivas y del comportamiento. Es preceptivo aumentar la potencia de la terapia dopaminérgica cuando se alcanza este estadio, pero hay que tener en cuenta las consecuencias: disquinesias, alteraciones del habla, caídas, etc. La degeneración suele llegar a una fase terminal entre 5 y 10 años después del inicio de la fase prodrómica. (37) (Figura 6).

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente, tras la EA. Se estima que más de 7 millones de personas mayores de 60 años la padecen en todo el mundo, lo que supondría una prevalencia de entre el 0,3 y el 1 % en ese grupo etario. Al estar estrechamente relacionada con el envejecimiento, su prevalencia aumenta en los grupos de edad más avanzada, afectando al 4 % de los hombres y al 2 % de las mujeres mayores de 85 años (el sexo es un factor de riesgo en esta patología). Es bastante común, especialmente en los pacientes de mayor edad, que la EP termine generando una demencia secundaria (38).

1.3.b. Etiopatogenia

La principal característica fisiopatológica de la EP es la muerte masiva de neuronas dopaminérgicas en los ganglios basales, concretamente a nivel de la sustancia negra, de modo que queda severamente afectada la vía nigroestriatal que comunica esta región con el cuerpo estriado y que es responsable del control de la actividad motora. A nivel histológico se observa la aparición en la zona afectada de unos cuerpos de inclusión conocidos como cuerpos de Lewy, compuestos por una proteína llamada α -sinucleína que en estado normal desempeña numerosas funciones a nivel sináptico, pero que cuando sufre un procesamiento anormal tiende a formar estos agregados patológicos (Tabla 3). Durante la fase clínica se cree

que pueden desaparecer hasta el 80 % de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, lo que provoca que los pacientes pierdan el control de sus funciones motoras (38).

La causa de la muerte de las neuronas dopaminérgicas es una incógnita. Se han relacionado con la enfermedad algunas mutaciones que afectan a la estructura de determinadas proteínas como la propia α -sinucleína o proteínas relacionadas con la autofagia (parkina, PINK-1), la defensa antioxidante (DJ-1), la actividad lisosomal (glucocerebrosidasa) o el tráfico intracelular de vesículas (LRRK-2), entre otras. No parece que estas mutaciones sean capaces de explicar por sí solas la enfermedad en la mayoría de los casos, por lo que se les supone un papel adicional al de otros actores comúnmente presentes en el proceso de neurodegeneración: estrés oxidativo, excitotoxicidad, neuroinflamación, etcétera.

1.3.c. Tratamiento

El tratamiento de la EP es eminentemente paliativo, y debe aplicarse bajo un control constante y muy fino debido a las distintas fases por las que pasa la enfermedad y la enorme variabilidad constatable en los cuadros clínicos (39).

La principal estrategia terapéutica pasa por la aplicación de una terapia de reemplazo dopaminérgico, tratando de compensar la pérdida de la neurotransmisión dopaminérgica causada por la muerte de las neuronas nigroestriatales. El fármaco protagonista de esta aproximación es la levodopa, el precursor metabólico de la dopamina, que se puede acompañar de otros fármacos para mejorar su eficacia. Por ejemplo, en el tratamiento de elección para la fase prodrómica de la EP se combina la levodopa con la carbidopa, un inhibidor de la dopa descarboxilasa periférica que disminuye el metabolismo periférico de la levodopa, lo que permite disminuir la dosis de esta última y, por tanto, sus efectos adversos. Este tratamiento de combinación palia significativamente la sintomatología motora asociada a esta fase de la enfermedad. Se han aprobado análogos sintéticos de la dopamina, entre los que destacan el pramiprexol, el ropinirol o la apomorfina, que se pueden utilizar en monoterapia o en combinación para el tratamiento de la EP. Soslayan los inconvenientes farmacocinéticos de la levodopa

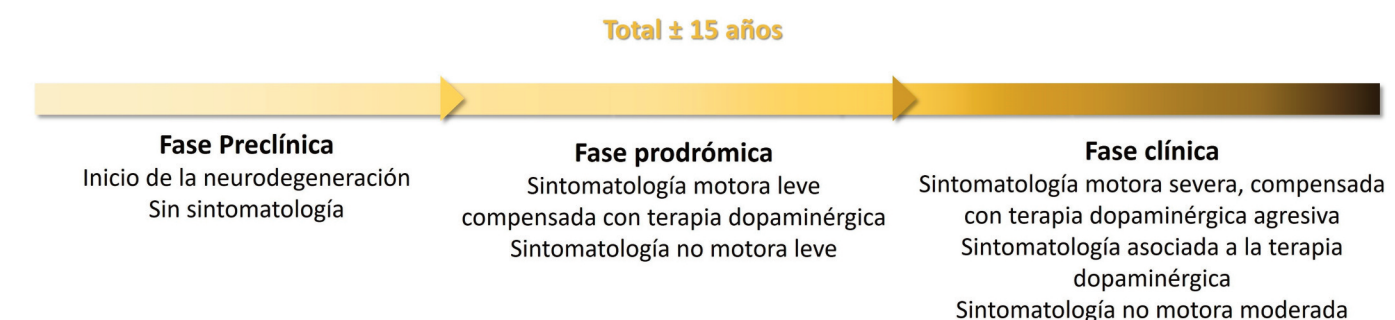


Figura 6: Distintas fases clínicas por las que atraviesa un paciente con EP.

pero tienen un mayor potencial de efectos adversos psiquiátricos, eminentemente en forma de alucinaciones o alteraciones del comportamiento. Los inhibidores de la enzima catecol-*O*-metiltransferasa (COMT), como la entacapona o la tolcapona, se combinan frecuentemente con la levodopa ya que aumentan su semivida, cumpliendo la misma función en el tratamiento que la expuesta anteriormente para la carbidopa. Otra familia de interés son los inhibidores de la enzima monoamino oxidasa B (MAO-B), que inhiben la degradación de la dopamina y la levodopa, además de reducir la recaptación de dopamina en el espacio intersináptico. Gracias a estos efectos la rasagilina está aprobada como monoterapia para la EP, mientras que otros fármacos como la selegilina y la safinamida están incluidas en tratamientos combinados. Por último, hay que mencionar la amantadina, un fármaco comúnmente asociado a la levodopa por su capacidad para limitar la bradiquinesia provocada por el precursor de la dopamina, pero que opera por un mecanismo de acción distinto: es un antagonista de los receptores de NMDA (Figura 7).

Algunos fármacos anticolinérgicos de acción central, especialmente la benztropina y el trihexifenidilo, se utilizan ocasionalmente para el tratamiento de los temblores. Su uso se limita a los pacientes más jóvenes, pues se asocian a efectos adversos como estreñimiento, anuria o confusión, que son leves en estos pacientes pero que cobran importancia en los pacientes de edad avanzada.

En EE. UU. y Japón también se ha aprobado un nuevo fármaco, la istradefilina, que se utiliza en combinación con levodopa

y carbidopa cuando se producen periodos de ineficacia del tratamiento. Es un antagonista de los receptores de adenosina A_{2A} , si bien no se conoce con exactitud cómo este efecto farmacológico tiene un impacto en la EP (40).

Además de los tratamientos específicos para la sintomatología motora de la EP, los pacientes suelen requerir la administración de otras terapias para el control de los síntomas cognitivos o psiquiátricos, además de intervenciones no farmacológicas para limitar el impacto de la enfermedad en su vida cotidiana. La revisión de Zesiewicz ofrece un buen resumen sobre este tema (37).

1.4. Esclerosis lateral amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) tiene una incidencia, afortunadamente, muy inferior a la de las dos enfermedades analizadas anteriormente, pero tiene una repercusión social muy significativa debido a la relativa juventud de los pacientes a los que puede afectar y al terrible porvenir que les espera, pues se trata de una enfermedad que supone un velocísimo deterioro funcional y físico que culminan con la muerte del paciente, sin que exista tratamiento alguno capaz de frenar significativamente su progresión.

1.4.a. Epidemiología y transcurso de la enfermedad

El cuadro clínico de la ELA viene determinado por la degeneración rápida de las motoneuronas superiores e inferiores, que motiva una parálisis muscular que progresa rápidamente. En la primera fase de la enfermedad el paciente sufre una debilidad

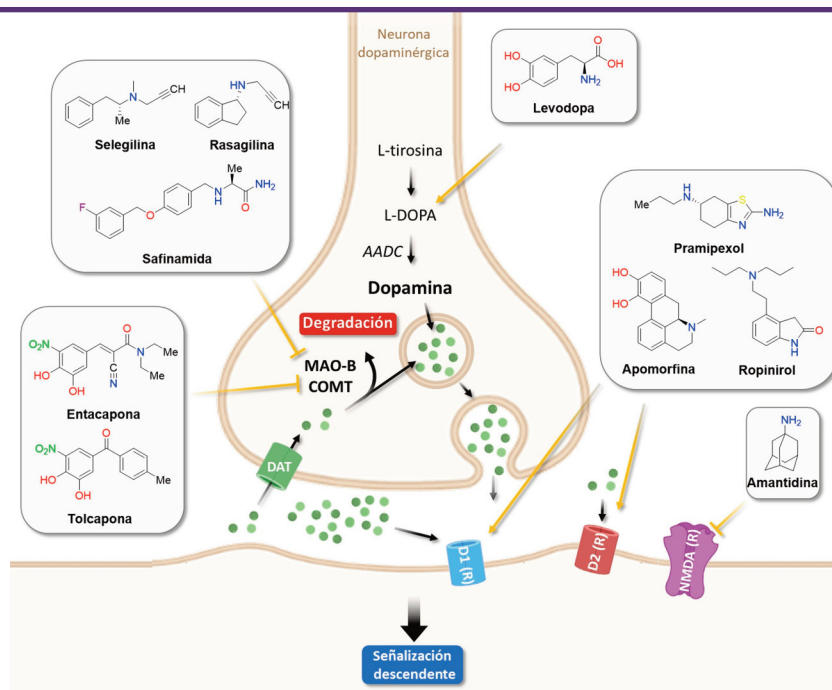


Figura 7: Vía de señalización ascendente de la transmisión dopaminérgica. Las flechas negras señalan la ruta en estado fisiológico. Los efectos de inducción o inhibición de los fármacos se encuentran en color amarillo.

muscular general, que puede venir acompañada de otras manifestaciones motoras como espasticidad y fasciculaciones. Según avanza la afectación de las motoneuronas, la debilidad se acentúa y aparecen las dificultades en el habla y la deglución, además de cuadros de insuficiencia respiratoria que son la causa de muerte más común de los pacientes de ELA. Inicialmente considerada una enfermedad neuromuscular, hoy en día se la incluye en el grupo de las patologías neurodegenerativas por la presencia en más de la mitad de los casos de otros síntomas de carácter cognitivo o psiquiátrico. Hasta un 13 % de los pacientes de ELA desarrollan demencia frontotemporal (DFT), una patología con la que parece guardar una relación muy estrecha: de hecho, se propone que ambas enfermedades podrían constituir los extremos fenotípicos de una misma patología, existiendo cuadros clínicos intermedios en los que conviven aspectos característicos de ambas enfermedades (41). La prevalencia mundial de la ELA oscila entre los 6,1 y los 8,4 casos por cada 100.000 habitantes: en torno a medio millón de enfermos en términos absolutos, con una prevalencia algo mayor en hombres que en mujeres (1,4:1). Se considera que hay dos variantes fundamentales de la ELA: ELA familiar (ELAf), asociada a la herencia genética, y ELA esporádica (ELAE). La ELAf supone un 5-15 % de los casos totales de la enfermedad y tiene una edad de inicio en torno a los 65 años, claramente mayor que los 55 años de edad media de inicio de la ELAE. Ambas variantes destacan en la misma medida por su agresividad, pues el deterioro clínico es muy veloz y la esperanza de vida media tras el diagnóstico oscila entre los dos y los cuatro años, aunque hay algunas variantes muy poco prevalentes en las que la progresión de la enfermedad se alarga incluso décadas (42).

1.4.b. Etiopatogenia

Poco se sabe sobre el origen de la ELA: parece estar relacionado con diversos fenómenos como la alteración de la proteostasis y del transporte axonal, el estrés oxidativo, la excitotoxicidad y la neuroinflamación; pero la evidencia de la que se dispone no es muy firme y está lejos de explicar satisfactoriamente por qué se inicia el proceso de degeneración de las motoneuronas. Se han descubierto mutaciones en más de 30 genes que tienen una

relación directa con la ELAf, siendo las más comunes, por este orden, las de los genes c9orf72, SOD1, FUS y TARBP. La expresión de las proteínas mutadas asociadas a estos genes (SOD-1, TDP-43, FUS) (Tabla 3) produce la agregación patológica de las mismas, además de la consecuente toxicidad provocada por la incapacidad de estas proteínas para ejercer su función. El componente genético no es exclusivo de la ELAf, pues hasta el 60 % de los casos de ELAE también estarían asociados en mayor o menor medida con diversas alteraciones genéticas, muchas de las cuales se repiten a lo largo del eje ELA-DFT. Este hallazgo sugiere que la ELA podría ser una enfermedad oligogénica, en la que varias alteraciones de baja penetración génica pueden coexistir para dar también lugar a los casos esporádicos (43,44).

1.4.c. Tratamiento

El panorama terapéutico de la ELA casi merece el apelativo de desolador, pues apenas hay tratamientos disponibles, y la eficacia de los que existen se limita a aumentar en unos meses la esperanza de vida de los pacientes. Detrás de este hecho está el desconocimiento absoluto del origen y desarrollo de la enfermedad, sobre los que pesan aún muchas más incógnitas que en el caso de las enfermedades de Alzheimer y Parkinson.

El primer fármaco aprobado para la ELA, y único en Europa, fue el riluzol, un anticonvulsivante que fue reposicionado en los años 90 tras haber demostrado una relativa utilidad frente a la ELA en un ensayo clínico (Figura 8). No se conoce con exactitud su mecanismo de acción, aunque se le suele atribuir una actividad antiglutamatérgica que podría reducir la excitotoxicidad a nivel de las motoneuronas. Se estima que aumenta la esperanza de vida de los pacientes en torno a seis meses, aunque con poco impacto sobre su sintomatología motora. En 2017 la FDA autorizó en EE. UU. la edaravona, un derivado de pirazolona cuyo mecanismo de acción se suele relacionar con su elevada capacidad antioxidante y captadora de radicales libres, si bien existen muchas dudas al respecto. La edaravona se ha asociado con una cierta ralentización en el progreso de la enfermedad, si bien el impacto sobre la esperanza de vida no parece ser muy significativo (45).

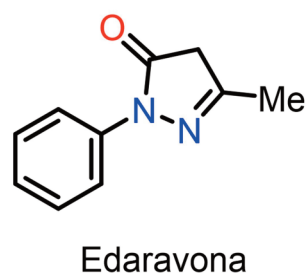
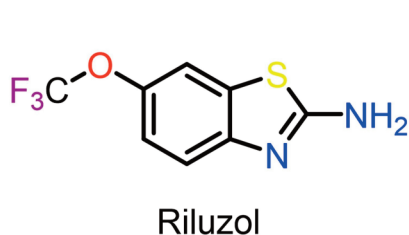


Figura 8: Estructura química de los dos fármacos más representativos del tratamiento farmacológico de la ELA. .

Recientemente se ha aprobado en EE. UU. el uso compasivo del fasudil para el tratamiento de la ELA, aunque una vez más se ha cuestionado ampliamente su eficacia. Actualmente hay varios ensayos clínicos en marcha que tratan de dilucidar si tiene un impacto real en la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes. El fasudil es un inhibidor de la Rho-quinasa cuya acción terapéutica se ha asociado a la modulación de la respuesta inflamatoria de la microglía y a la protección de la integridad axonal, si bien no está firmemente establecido su mecanismo de acción. (46)

La posibilidad de que la ELA forme en realidad un continuo patológico con la DFT y tenga un carácter oligogénico abriría las puertas a la medicina personalizada, dirigiendo tratamientos específicos para las particularidades genéticas que presente cada caso. Ya se están ensayando algunas terapias génicas para esta patología, que serán revisadas posteriormente al hablar de la proteostasis como diana terapéutica.

1.5. Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington tiene un origen genético claramente establecido, lo que la diferencia de otras enfermedades neurodegenerativas. Desgraciadamente, este mejor conocimiento sobre su origen no se ha traducido en el desarrollo de tratamientos eficaces, de modo que las perspectivas vitales de los afectados continúan siendo muy desfavorables.

1.5.a. Epidemiología y transcurso de la enfermedad

La enfermedad de Huntington (EH) lleva el nombre del médico estadounidense George Huntington, quien la describió por vez primera en el año 1872. Se la conoce también como corea de Huntington, debido a que los pacientes presentan unos movimientos bruscos e involuntarios de las extremidades muy característicos, conocidos como movimientos coreicos. Esta enfermedad, que se suele describir como una tríada de alteraciones motoras, cognitivas y emocionales, suele presentar tres estadios bien diferenciados. En una fase temprana comienzan a observarse alteraciones en la coordinación de los pacientes y algunos pequeños movimientos involuntarios, que se acompañan de un ánimo deprimido o irritable y ciertas dificultades para el pensamiento y la resolución de problemas. La enfermedad progresa hacia una fase donde los movimientos coreicos pasan a ser la manifestación predominante, acompañadas de disartria y disfagia. Las dificultades para controlar los movimientos voluntarios, sumadas al deterioro cognitivo, incapacitan progresivamente a los pacientes para la realización de las tareas cotidianas y laborales. Las manifestaciones motoras en el último estadio de la enfermedad varían desde cuadros de corea muy severos hasta otros en los que predominan la bradiquinesia y la rigidez. Los pacientes suelen desarrollar una demencia severa

que los incapacita para comunicarse, aunque a menudo retienen una cierta capacidad de comprensión. Muchos pacientes mueren por las complicaciones derivadas de la disfagia, ya sea por inanición o por asfixia, aunque las caídas e incluso los suicidios representan también un porcentaje significativo de las muertes derivadas de la EH (47).

La EH destaca por su precocidad dentro de las enfermedades neurodegenerativas, pues el inicio de los síntomas suele tener lugar entre los 35 y los 50 años, aunque realmente puede ocurrir en cualquier punto entre la niñez y la vejez. La esperanza de vida media tras el comienzo de la enfermedad ronda los 15 a 20 años, con pacientes que pueden llegar a convivir con ella más de 40 años.

La prevalencia de la EH a nivel mundial presenta una notable variabilidad interregional: ronda los 5 a 10 casos por cada 100.000 habitantes en América del Norte, Europa y Oceanía, mientras que en Asia y África es mucho menor. Esto se puede atribuir al carácter hereditario de la enfermedad, pero también a la menor capacidad diagnóstica que puedan poseer los países en vías de desarrollo, especialmente en el caso de África. Aunque hay una cierta correlación con la edad, la forma juvenil de la EH (inicio de los síntomas antes de los 20 años) supone en torno al 5 % de los casos (48).

1.5.b. Etiopatogenia

La EH es una patología autosómica dominante ligada a una mutación del gen HTT en el cromosoma 4 que codifica para la proteína huntingtina. (Tabla 3) Concretamente, se produce una expansión de las repeticiones de tripletes CAG que se traduce en un fragmento de poliglutamina anormalmente largo. Esta anomalía estructural provoca el plegamiento incorrecto de la proteína, ya que estos fragmentos favorecen el establecimiento de interacciones hidrofóbicas indebidas dentro de la misma proteína o con otras unidades de huntingtina. Las consecuencias a nivel fisiopatológico parecen derivar eminentemente de la generación de agregados patológicos de la proteína anormalmente plegada, que desatan un proceso neurodegenerativo que se inicia en los ganglios basales, concretamente en el núcleo caudado y el putamen, y que se extiende progresivamente hacia otros ganglios basales y zonas adyacentes como el tálamo, el hipotálamo y la corteza cerebral. Este patrón de extensión anatómica explica la evolución del cuadro clínico hacia una tríada de síntomas motores, cognitivos y psiquiátricos. No hay que descartar que la pérdida de las funciones fisiológicas de la huntingtina desempeñe un papel importante en el origen de la enfermedad, aunque al no estar bien caracterizadas estas funciones no se sabe mucho al respecto (49).

1.5.c. Tratamiento



El origen genético de la enfermedad fomenta la búsqueda de terapias génicas que permitan evitar la producción errónea de la proteína huntingtina. Esta aproximación, que parece una de las más prometedoras para el abordaje terapéutico de la EH, se analizará con más detalle posteriormente.

El término estrés oxidativo hace referencia a una concentración de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente) que resulta nociva para las células, llegando a promover la aparición de agregados proteicos tóxicos y de alteraciones genéticas, la disfunción de ciertos orgánulos como la mitocondria y el retículo endoplasmático, e incluso la muerte celular. Estas especies tóxicas se generan de forma fisiológica por ligeros defectos en las reacciones de reducción-oxidación del organismo, que no logran completar la reducción del oxígeno molecular a agua. Normalmente la presencia de estas especies oxidantes en bajas concentraciones no supone un grave problema, ya que el organismo posee múltiples herramientas para neutralizarlas. Sin embargo, bajo ciertas situaciones patológicas como la neurodegeneración, los sistemas que velan por mantener la homeostasis de estas especies se pueden ver saturados, momento en que pueden desatar todo su potencial tóxico (50).

A pesar de que es común hablar del estrés oxidativo como ROS, es importante recalcar que el término también incluye a las especies reactivas de nitrógeno (RNS) y a cualquier especie hiperreactiva generada a partir del metabolismo del oxígeno. Estos



agentes oxidantes suelen ser de naturaleza radicalaria, pero también incluyen otras especies que, aunque no lo son, generan radicales fácilmente (50).

La formación de ROS comienza con la transferencia de un único electrón al oxígeno, generándose el radical superóxido (O_2^-), el cual es a su vez precursor de gran parte de las otras especies oxidantes. (Figura 9) Este radical puede evolucionar de dos formas distintas: con la captación de un protón del medio, que dará lugar al radical $HO_2\cdot$; o por mediación de la superóxido dismutasa (SOD), que catalizará su transformación en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). De nuevo, esta molécula puede seguir dos rutas, una enzimática mediada por la catalasa gracias a la cual se convertirá de nuevo en agua y oxígeno; o puede sufrir la reacción de Fenton, catalizada por ciertos cationes metálicos como el catión ferroso, dando lugar a otras especies como el anión hidroxilo (HO^-) y el radical hidroxilo ($HO\cdot$). Esta última especie es una de las más reactivas y, por tanto, de las más nocivas para todos los componentes celulares (51,53). Por otra parte, las especies reactivas de nitrógeno (RNS) se originan por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), que produce óxido nítrico ($NO\cdot$) durante la transformación de la arginina en citrulina. Este óxido nítrico reacciona de forma espontánea con el radical superóxido, generando el anión peroxinitrito ($ONOO^-$). Además de estas RNS, también es necesario destacar el papel de otras como el dióxido de nitrógeno (NO_2), el anión nitrito (NO_2^-) o el anión nitrosoperoxycarbonato ($ONOOCO_2^-$) (52,54).

A pesar de que se ha puesto el foco sobre los efectos tóxicos de estas especies oxidantes, resulta preciso ahondar en el papel fisiológico que también ejercen en el organismo. En primer lugar, cumplen una función imprescindible dentro del sistema inmunitario, ya que muchas de las células de este sistema producen especies oxidantes para atacar a patógenos invasores. Además, se ha comprobado que median en otras muchas funciones esenciales para la supervivencia celular como la regulación de la mitosis y de la señalización del crecimiento celular, e incluso en la producción de ATP. Sin embargo, su función más importante quizás sea la debida al óxido nítrico, el cual además de mediar en la función inflamatoria y el tono vascular, desempeña un papel vital en la plasticidad sináptica actuando prácticamente como un neurotransmisor (55).

Como se ha señalado anteriormente, la formación de estas especies oxidantes tiene su origen en ciertas funciones celulares como el procesamiento postraducciona asociado al retículo endoplasmático, el metabolismo asociado a los peroxisomas, la acción de ciertas enzimas oxidantes como la NADPH oxidasa (NOX) o las monoamino oxidasas A y B (MAO-A, MAO-B), y la actividad de la mitocondria (53). Este orgánulo resulta ser el que más ROS genera, principalmente anión radical superóxido, por la acción de la cadena transportadora de electrones. De hecho, son los complejos

I y III de dicha cadena los principales contribuyentes al aumento del estrés oxidativo, especialmente en un órgano que obtiene tanta energía a través de esta ruta como es el cerebro. Cabe destacar que la labor que cumple la mitocondria también se vuelve progresivamente más tóxica, ya que al soportar un ambiente tan oxidante se ven afectados progresivamente a nivel estructural ciertos componentes mitocondriales como las membranas y el ADN mitocondrial, lo cual produce un estado degenerativo que no hace sino maximizar la producción de estas ROS (51,56).

2.2. Respuesta antioxidante endógena

2.2.a. Enzimas y moléculas pequeñas

Dado que estas especies oxidantes se generan de forma fisiológica, el organismo ha logrado desarrollar una serie de mecanismos para defenderse frente a este estímulo nocivo, principalmente mediante moléculas pequeñas y enzimas. En el primer grupo encontramos múltiples ejemplos de sustancias antioxidantes como las vitaminas C y E o el glutatión. Este último ejemplo merece una mención especial, ya que se trata de un sustrato central en la reparación del daño por estrés oxidativo. Se trata de un tripéptido (γ -glutamato-cisteína-glicina) con propiedades antioxidantes intrínsecas que además actúa como donador de electrones durante la acción de la glutatión peroxidasa. Por su parte, esta enzima cataliza la reducción de lípidos peroxidados o de peróxido de hidrógeno a agua. Una acción similar presentan las peroxirredoxinas, responsables de la reducción de más del 90 % del peróxido de hidrógeno, además de la de otros peróxidos como el peroxinitrito. Otras enzimas que participan en la neutralización de estas especies oxidantes son la superóxido dismutasa (SOD), la tiorredoxina o las catalasas (50).

2.2.b. Nrf2

Todos estos ejemplos de enzimas con capacidad antioxidante y citoprotectora, además de otras muchas que se han quedado en el tintero, provienen de las secuencias de Elementos de Respuesta Antioxidante (ARE) del ADN, cuya expresión depende de una serie de factores de transcripción, siendo el más relevante el factor de transcripción Nrf2. Nrf2 es una proteína de vida corta sujeta a un control estricto por varios mecanismos, siendo el más estudiado el ejercido por la proteína Keap-1. (57) Usualmente, Nrf2 se encuentra unido a dos monómeros de Keap-1 por sendas regiones presentes en el factor de transcripción (DLG y ETGE) con distinta afinidad por Keap-1. Así, el heterotrímero Nrf2-(Keap-1)₂ es reconocido por el complejo ligasa E3 CRL3 de la maquinaria del proteasoma, que dirige la poliubiquitinación y posterior degradación de Nrf2 (58).

Sin embargo, en una situación de elevado estrés oxidativo, las especies oxidantes o electrófilas interactúan con la región sensible



de Keap-1, que consiste en una serie de residuos de cisteína presentes en la región intermedia (Cys272 y Cys278) y el dominio BTB (Cys151) de Keap-1. Normalmente los grupos tiol pertenecientes a estos residuos se encuentran estabilizados por iones de zinc, pero en presencia de especies oxidantes o electrófilos producen un cambio conformacional en Keap-1. De este modo se impide que se forme el complejo Nrf2/Keap1/CRL3 y Nrf2 puede translocarse al interior del núcleo, formar un heterodímero con la proteína Maf e iniciar la transcripción de la secuencia ARE. (59,60) Existe una teoría alternativa según la cual Nrf2 no queda completamente libre, sino que solo se rompe la unión a Keap-1 de baja afinidad (mediada por la región DLG de Nrf2), de modo que solo un monómero de Keap-1 queda unido al factor de transcripción. Esto no es suficiente para promover la degradación de Nrf2, pero tampoco para permitirle translocarse al interior del núcleo. Así, Keap-1 quedaría paulatinamente secuestrado, incapaz de unirse al Nrf2 sintetizado *de novo*, permitiendo por tanto que este se transloque al interior del núcleo (59).

Una vez Nrf2 se encuentra en el interior del núcleo se une a proteínas pequeñas del tipo Maf formando heterodímeros habilitados para la transcripción de los elementos de respuesta antioxidante (ARE), entre los que podemos encontrar enzimas y proteínas con distintas funciones como la neutralización directa de especies oxidantes, el metabolismo de xenobióticos o la regulación de los procesos de supervivencia celular y procesamiento proteico (61).

La función antioxidante es posiblemente la función mejor caracterizada de Nrf2, ya que promueve la expresión de varias enzimas con una potente actividad antioxidante, como son la hemooxigenasa 1 (HO-1), la NAD(P)H deshidrogenasa quinona 1 (NQO1), y otras ya mencionadas como distintas enzimas relacionadas con la homeostasis del glutatión (glutatión peroxidasa, glutatión reductasa o subunidades de la glutamato cisteína ligasa), tiorreductasas o peroxirreductasas. (61) La HO-1 es la encargada del catabolismo del grupo hemo, liberando Fe^{2+} , monóxido de carbono, para el cual se han descrito varias actividades neuroprotectoras; (62) y biliverdina, la cual se reduce a bilirrubina, que es otro compuesto antioxidante y neuroprotector. En cuanto a la NQO1, su principal acción es la de reducir moléculas endógenas y exógenas que se encuentran en estado oxidado. Esta enzima también participa en el metabolismo de xenobióticos, al igual que otras proteínas y enzimas cuya expresión está controlada por Nrf2: la aldo-cetorreductasa o la aldehído deshidrogenasa (metabolismo de fase I); la UDP glucuronosiltransferasa o la glutatión-S-transferasa (tipo II); y otras proteínas asociadas con la resistencia y expulsión de fármacos (tipo III) (63).

En cuanto a otras funciones reguladoras, Nrf2 también promueve la expresión de proteínas relacionadas con el sistema autofágico de degradación proteica (p62/SQSTM1) (64); así como de ciertas proteínas antiapoptóticas y reparadoras del ADN, como Bcl-2 (65).

En cuanto a la participación de Nrf2 en el proceso inflamatorio, se debe admitir que existe una cantidad importante de contradicciones entre la expresión de los genes proinflamatorios que estimula este factor de transcripción (CD36, IL-17D), los que inhibe (IL-1 β o IL-6), y la actividad de las proteínas antioxidantes cuya expresión también promueve. En cualquier caso, el efecto que se genera finalmente tiene más de efecto antiinflamatorio que de proinflamatorio (66).

2.3. Estrés oxidativo y neurodegeneración

La relación entre el estrés oxidativo y la neurodegeneración ha sido estudiada con gran profundidad, ya que es un foco de gran inestabilidad que alimenta otros mecanismos fisiopatológicos de la neurodegeneración, induciendo el plegamiento anómalo de proteínas, magnificando el daño mitocondrial y tisular e incluso promoviendo la apoptosis (Figura 10).

La oxidación de ciertos aminoácidos en presencia de una alta concentración de especies oxidantes favorece el plegamiento anómalo de las proteínas, lo que motiva la pérdida de su función fisiológica y su posterior agregación patológica. El estrés oxidativo también puede producir alteraciones en la unidad 26S del proteasoma, disminuyendo considerablemente la capacidad degradadora de proteínas y fomentando aún más la agregación. (67) Además, estos agregados proteicos son capaces de quelar iones de cobre o de hierro susceptibles de catalizar la reacción de Fenton, lo que produce un aumento aún mayor de las especies oxidantes.

El estrés oxidativo afecta de forma especialmente potente a la función mitocondrial, un orgánulo de vital importancia para la supervivencia celular. La alteración más básica y profunda sucede sobre el ADN mitocondrial, promoviendo la aparición de proteínas mutadas que no pueden ejercer adecuadamente su función. Este es el caso de las proteínas de la cadena de transporte de electrones que, además, pueden ser directamente oxidadas o nitradas por las ROS/RNS, impidiendo su adecuada función respiratoria (68). Por otra parte, se pueden producir procesos como la peroxidación de lípidos y proteínas de las membranas mitocondriales o un aumento sustancial de la concentración de Ca^{2+} . Estas alteraciones causan cambios drásticos en la permeabilidad de las membranas mitocondriales e incluso la formación de poros de transición de permeabilidad (PTPs) que ponen en riesgo su integridad. La aparición de estos PTPs conlleva la salida al citosol del citocromo C,

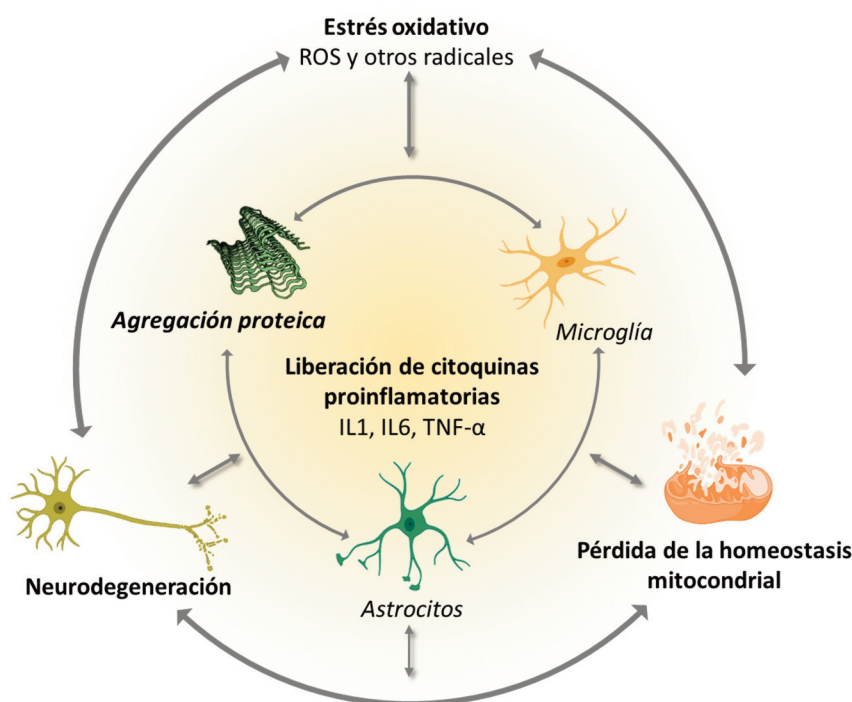


Figura 10: Ciclo de retroalimentación entre los mecanismos fisiopatológicos más generales de la neurodegeneración. (51,56)

fenómeno que promueve la apoptosis mediada por la activación de las caspasas. Cabe destacar que todas estas alteraciones de la estructura mitocondrial obstaculizan aún más la respiración celular, aumentando la producción de especies oxidantes y agravando todo el proceso degenerativo (69).

El estrés oxidativo también promueve una respuesta inflamatoria local, ya que la rotura de barreras biológicas acaba por activar a la microglía y los astrocitos circundantes. Esta inflamación conlleva la producción de citoquinas proinflamatorias y de más ROS y NO, que retroalimentan el proceso de daño tisular (70).

Como se ha podido comprobar, existen varias formas de toxicidad directa e indirecta mediadas por las ROS y RNS que producen un daño celular y tisular enorme y acaban por conducir a la muerte celular, ya sea por alteración de las membranas y la función mitocondrial, por un exceso en la respuesta al estrés del retículo endoplasmático o por la activación directa de vías de señalización apoptóticas mediada por la respuesta inmunitaria (71). Todas las alteraciones están íntimamente relacionadas entre sí, combinando los mecanismos de toxicidad y agravando el proceso neurodegenerativo en muchas enfermedades del SNC.

En la enfermedad de Parkinson se ha probado la existencia de un círculo vicioso en el cual el ambiente oxidante generado por la disfunción del metabolismo de la dopamina produce la oxidación de la α -sinucleína. La α -sinucleína oxidada es más proclive a la agregación y, además, no es reconocida por el sistema proteasómico, por lo que los niveles de agregados de esta proteína aumentan drásticamente. Esta situación provoca

alteraciones en el sistema de almacenaje vesicular que producen la liberación de más dopamina al citosol, lo cual incrementa aún más el estrés oxidativo y conduce a la neurona a una degeneración imparable (72,73). Este ciclo de retroalimentación entre los agregados patológicos de una proteína y el estrés oxidativo se da también en la EA, la EH y la ELA. En la EA se ha comprobado que el estrés oxidativo fomenta la agregación de A β , y que el acúmulo de sus agregados puede producir daño mitocondrial que conduce a la formación de más especies oxidantes (74). La agregación de la huntingtina (Htt), propia de la enfermedad de Huntington, también es fomentada por las especies oxidantes, y la aparición de estas es promovida por un defecto en el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones mitocondrial mediado por la propia Htt. (75) En cuanto a la ELA, se ha comprobado que el acúmulo de especies oxidantes, ya sean de oxígeno o de nitrógeno, conduce a la agregación tanto de SOD-1 como de TDP-43, en función de la mutación que expresen los pacientes (76,77).

2.4. Tratamiento

2.4.a. Productos naturales con propiedades antioxidantes

Existen muchas sustancias de origen natural que poseen cualidades antioxidantes: prácticamente cualquier polifenol, flavonoide e incluso ciertos ácidos grasos poliinsaturados presentes en animales y plantas poseen estas cualidades. A continuación, citaremos aquellos compuestos de mayor potencia o más implementados en la terapia antioxidante (Figura 11).

Las vitaminas C y E son unos antioxidantes excelentes, con una capacidad de captación de radicales libres que puede incluso detener las reacciones de propagación que tienen lugar en las membranas plasmáticas, además de participar como cofactor de enzimas involucradas en muchos procesos fisiológicos (78). No obstante, sus potentes propiedades antioxidantes no se traducen en un beneficio terapéutico frente a las enfermedades neurodegenerativas, al menos por sí solas (54).

El resveratrol es un flavonoide de origen natural con una más que atestiguada capacidad antioxidante de la que se derivan otras propiedades terapéuticas como antidiabético, hepatoprotector o antiinflamatorio (79,80). Recientemente han aumentado las evidencias que postulan este compuesto como un posible inductor de Nrf2, algo que parece razonable dado el fragmento de carbonilo α,β -insaturado presente en su estructura, así como sus propiedades terapéuticas, muchas de las cuales son atribuibles a este mecanismo (81).

Por su parte, la curcumina es un compuesto fenólico que se puede extraer de la especie *Curcuma longa*. Sus propiedades antioxidantes y captadoras de radicales libres han sido ratificadas en múltiples ensayos, pero también ha demostrado propiedades terapéuticas antiinflamatorias o incluso antiangiogénicas. Al igual que el resveratrol, existen crecientes indicios de que parte de su acción es debida a la inducción de Nrf2 (82–84).

Otra sustancia de origen natural digna de mención es la melatonina, que normalmente actúa como una hormona reguladora del sueño, pero también participa en la regulación de la respuesta inflamatoria y la apoptosis, así como en el control del estrés oxidativo y la homeostasis mitocondrial. Además, la melatonina es un antioxidante muy potente en sí mismo ya que no solo la propia melatonina sino también varios de los productos de su metabolismo actúan como captadores de radicales libres, llegando a neutralizar hasta tres especies radicalarias por cada molécula de melatonina.

Precisamente a este potente efecto antioxidante se le atribuyen las propiedades neuroprotectoras que esta molécula ha demostrado en modelos de EA, EP, ELA y EH (85,86).

2.4.b. Moléculas pequeñas con propiedades antioxidantes

La N-acetilcisteína es un fármaco ampliamente utilizado como mucolítico y como tratamiento de rescate en la intoxicación por paracetamol, precisamente por sus propiedades antioxidantes y protectoras frente a xenobióticos electrófilos (Figura 11). De hecho, la N-acetilcisteína no solo posee capacidad captadora de radicales libres intrínseca, sino que su potencia también radica en su capacidad para promover la regeneración del glutatión. Este fármaco ha demostrado un buen perfil terapéutico para varias enfermedades neurodegenerativas, e incluso ha participado o está participando en varios ensayos clínicos para su uso frente a la EA (NCT04044131, NCT04740580), la EP (NCT02212678, NCT01470027) y la EH (NCT05509153) con distintos resultados, pero en su mayoría positivos (87,88).

2.4.c. Modulación de la respuesta antioxidante endógena

Otra forma de lidiar con una presión oxidativa muy elevada consiste en reforzar las defensas antioxidantes endógenas mediante el uso de miméticos de enzimas antioxidantes como la SOD o la glutatión peroxidasa, o mediante la inhibición de enzimas que generan especies oxidantes como pueden ser la NOX, la xantina oxidasa o la iNOS (Figura 12).

Recientemente ha crecido el interés terapéutico en los miméticos de la enzima SOD para imitar la función de esta enzima y reducir los niveles de radical superóxido. Algunos de ellos (p. ej.: GC4711) han completado exitosamente ensayos clínicos de fase 1 (NCT03194139, NCT03096756) y ya participan en ensayos de fase 2b (NCT04698915) frente a ciertos tipos de cáncer (89).

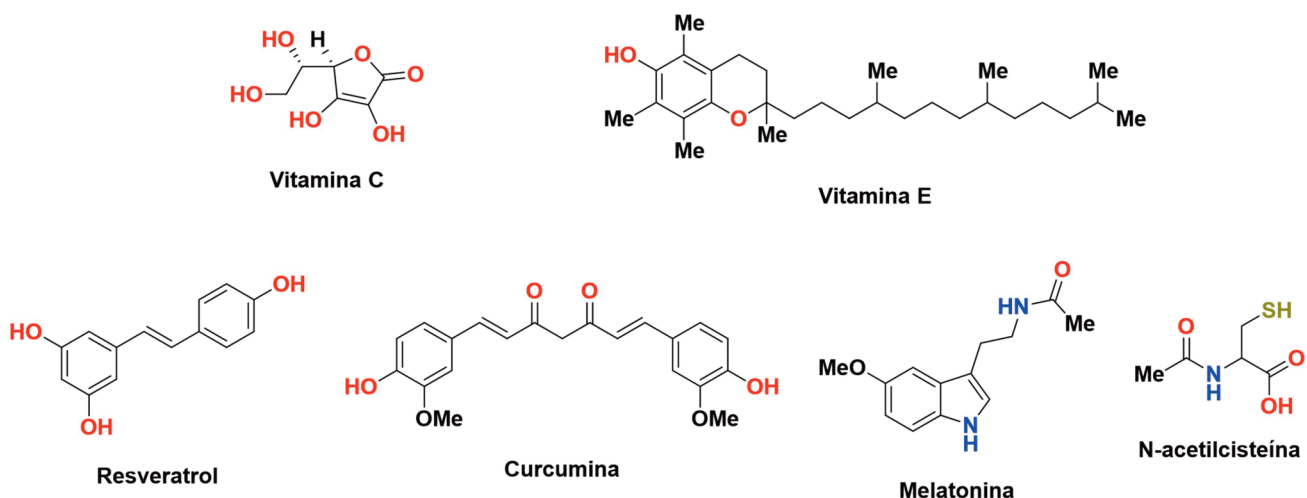


Figura 11: Estructura química de algunos de los antioxidantes más potentes.

El ebselén es un compuesto orgánico que incluye un átomo de selenio en su estructura y actúa como mimético de la glutatión peroxidasa, restaurando los niveles normales de glutatión reducido (90). Esta actividad le confiere un gran potencial antioxidante, también presente en muchos de los análogos de este compuesto que recientemente se están sintetizando. Cabe destacar el interés que suscita el ebselén para el tratamiento de muchas enfermedades asociadas al SNC como el trastorno bipolar (NCT03013400, fase 2), la depresión mayor (NCT05117710, fase 1) o las propias enfermedades neurodegenerativas, para las que, sin embargo, no se ha comenzado ningún ensayo clínico (91).

La apocinina es una acetofenona de origen natural cuya actividad se basa en la inhibición de la NAD(P)H oxidasa (NOX), al impedir que la subunidad p47 de esta proteína migre a la membrana. Esta actividad inhibitoria se traduce en una plétora de efectos terapéuticos en ciertos tipos de cáncer, patologías cardiovasculares o enfermedades neurodegenerativas (92). De hecho, ya se han realizado una serie de ensayos clínicos de fase uno dirigidos al tratamiento del asma (NCT00992667) y de enfermedades vasculares (NCT03680638), no así de enfermedades neurodegenerativas, a pesar de que existen múltiples indicios que parecen indicar su utilidad frente a estas patologías.

El alopurinol y el oxipurinol son fármacos de elección en el tratamiento de las hiperuricemias y la gota, pero también ejercen una función antioxidante al ser inhibidores de la xantina oxidasa. Por este motivo han sido ensayados en modelos de EA, EP o EH,

donde han mostrado una cierta capacidad neuroprotectora (70,93). Los inhibidores de la iNOS también atraen un creciente interés en el tratamiento de la neurodegeneración, dados los buenos resultados que algunos inhibidores muy potentes están teniendo en estudios preclínicos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas; y clínicos, para el tratamiento de la migraña (NCT00242866, fase 2) (94,95).

Dada la potencia y el alcance que tiene la respuesta antioxidante controlada por los ARE, la inducción de NRF2 se ha postulado como una opción terapéutica de elección en la búsqueda de nuevos tratamientos antioxidantes. De hecho, ya se han propuestos múltiples estrategias dirigidas a esta diana que podemos clasificar como: interacción directa con Keap-1, inhibición de la interacción entre Nrf2-Keap-1 y modulación independiente de Keap-1 (96).

Como ya se ha mencionado previamente, la interacción de Keap-1 con Nrf2 se rompe en presencia de sustancias oxidantes u electrófilas, de modo que se ha aprovechado esta cualidad para desarrollar moléculas de mayor o menor carácter electrófilo. De entre todas ellas la más característica es el fumarato de dimetilo, el único fármaco inductor de la vía Nrf2/ARE aprobado por la EMA y la FDA para el tratamiento de la esclerosis múltiple. Su mecanismo de acción se basa en el carácter electrófilo de su grupo carbonilo α,β -insaturado, capaz de reaccionar con los tioles de las cisteínas presentes en la región sensible de Keap-1 (97). Existen otros ejemplos de fármacos electrófilos que pertenecen a este grupo, como

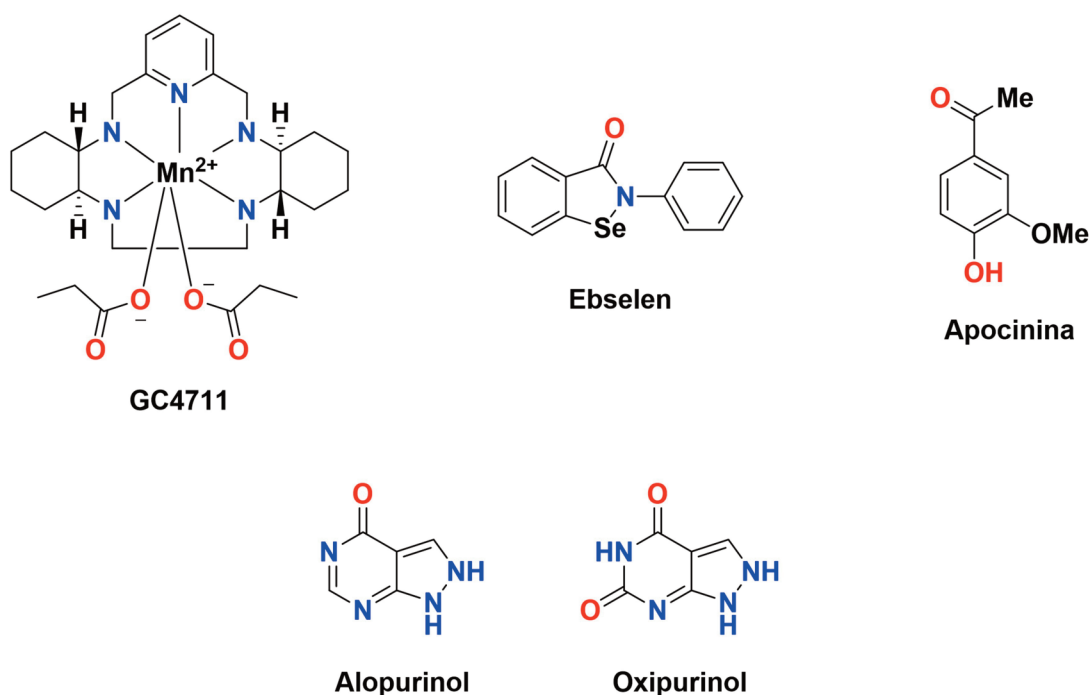


Figura 12: Estructura química de algunos fármacos moduladores de la respuesta antioxidante endógena.



ciertos triterpenoides (bardaloxona) o polifenoles (resveratrol, curcumina o derivados fenólicos del ácido cinámico), por citar algunos ejemplos. Sin embargo, merece la pena mencionar el potencial tóxico asociado a este tipo de compuestos electrófilos, ya que resultan muy reactivos no solo frente a Keap-1, sino que también pueden formar aductos covalentes con proteínas ricas en cisteína o lisina, o con nitrógenos aromáticos presentes en el ADN (98).

La segunda estrategia más prolífica se basa en inhibir la interacción Nrf2-Keap-1 mediante moléculas capaces de interactuar con las regiones DLG o ETGE de Nrf2, impidiendo su unión a Keap-1. La mayoría de moléculas que poseen esta capacidad son peptidomiméticos y péptidos cíclicos, pero recientemente se han descubierto otras moléculas pequeñas derivadas de urea, tetrahydroquinolinas o triazoles, que también son capaces de inhibir esta interacción (99,100). El principal problema de esta estrategia consiste en lograr la inhibición selectiva de esta interacción, ya que Keap-1 también se une a otras proteínas de gran relevancia para la supervivencia celular como la quinasa del inhibidor del factor nuclear κ B (IKK), que regula la señalización del factor de transcripción proinflamatorio NF- κ B.

Aprovechando que Keap-1 se une a otras proteínas, una alternativa que también se maneja consiste en el aumento de la expresión de alguna de ellas, de modo que Keap-1 se una en mayor medida a la proteína inducida en detrimento de Nrf2, que queda así libre en mayor proporción. Destaca, en este sentido, la inducción de la proteína autofágica p62/SQSTM-1, cuya afinidad por Keap-1 es superior a la propia de la interacción Nrf2(DLG)-Keap-1, lo que podría traducirse en la expresión de las proteínas de la secuencia ARE, aunque aún hace falta explorar más esta diana para demostrar un beneficio terapéutico (101).

Existen muchas otras alternativas para lograr la inducción de Nrf2, si bien es cierto que algunas de ellas apenas han comenzado a ser exploradas. De entre todas ellas la que mejores resultados ha arrojado hasta el momento es la inhibición de la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β), una enzima central en la regulación de Nrf2 al mediar su degradación dependiente de fosforilación a través de la proteína β -TrCP, y que además está involucrada en otros procesos fisiológicos y patológicos como la hiperfosforilación de tau (102,103). Otras estrategias menos exploradas son la inhibición de la degradación independiente de Keap-1, la inhibición de la interacción entre Nrf2- β -TrCP, el bloqueo de proteínas que secuestran a las proteínas Maf y el uso de agonistas de receptores nicotínicos α_7 .

3. PROTEINOPATÍAS

Las enfermedades neurodegenerativas son consideradas a menudo como proteinopatías, pues la mayoría cursan con la aparición de agregados proteicos tóxicos intracelulares y/o extracelulares que participan en la degeneración del tejido nervioso.

3.1. Proteostasis

Para entender cómo se originan estos depósitos, es preceptivo describir brevemente el sistema de síntesis, procesamiento y degradación de proteínas, englobado bajo el concepto de proteostasis. Una vez la cadena peptídica correspondiente a una proteína se sintetiza en el ribosoma mediante la traducción de su ARN mensajero correspondiente, es necesario que esta adopte la conformación tridimensional adecuada al desempeño de su función (104). Este proceso, en el que la proteína tiende a exponer hacia el exterior sus regiones más hidrófilas, se rige por el establecimiento de diversas interacciones de carácter intramolecular (105). Aunque algunas de estas interacciones puedan ser espontáneas, el plegamiento tiene lugar bajo la dirección de otras proteínas llamadas chaperonas, que se unen a la cadena peptídica en procesamiento para controlar el plegamiento correcto de las proteínas y prevenir interacciones indeseadas con otras unidades de la misma proteína u otras biomoléculas.

Hay que destacar que este proceso, aunque fuertemente controlado, no es totalmente fiable, habiéndose estimado que entre un 5 y un 30 % de las proteínas presentan defectos "de fábrica". Las células disponen de diversos mecanismos para afrontar esta amenaza: primero, se desencadena una respuesta de índole reparadora. Si esta no funciona, existen diversos procesos que permiten la eliminación de la proteína dañada o defectuosa. La respuesta reparadora consiste en el aumento de la expresión de determinadas chaperonas capaces de unirse a las proteínas en cuestión, estabilizándolas de modo que posibiliten la reversión de su anomalía estructural. (106) Cuando el daño proteico alcanza un nivel más amplio, el retículo endoplásmico es capaz de desencadenar la conocida como "respuesta al estrés del retículo", por la que aumenta aún más la expresión de chaperonas a la par que disminuye la tasa de traducción del ARN mensajero, de modo que se reduce la carga de trabajo del retículo endoplásmico y se pueden concentrar los esfuerzos celulares en la reparación de las proteínas implicadas. Hay que decir, no obstante, que esta respuesta de estrés es una solución temporal frente a una situación que amenaza la supervivencia celular, pues si esta se prolonga determina la activación de señales proapoptóticas.

Si la respuesta reparativa no consigue solucionar el problema, la célula dispone de varias alternativas para eliminar los

elementos dañados. Entre estas, destaca el sistema ubiquitina-proteasoma, encargado de la degradación de las proteínas anómalas disueltas en el citoplasma. Un sistema de chaperonas se encarga de marcar las proteínas destinadas a su eliminación mediante su conjugación con ubiquitina, tras lo cual son dirigidas al proteasoma, un macrocomplejo proteico donde serán eliminadas y recicladas. Cuando no es posible ubiquitinar la proteína dañada, o bien se trata de hacer frente a grandes agregados proteicos u orgánulos no funcionales, la célula puede marcarlos y englobarlos en una vesícula de doble membrana que se fusiona con un lisosoma, donde son digeridos. Este proceso, conocido como autofagia, provee además a la célula de una fuente extra de ATP y biomoléculas que puede ser muy útil en situaciones extremas o de crecimiento celular (107,108).

Por último, en casos en los que los depósitos proteicos no pueden ser reparados ni eliminados eficazmente, la célula puede confinarlos en cuerpos de inclusión para protegerse de sus efectos citotóxicos. Existen dos tipos principales: los JUNQ, que aíslan sobre todo proteínas ubiquitinadas mal plegadas; y los IPOD, que presentan fundamentalmente fibrillas insolubles no ubiquitinadas. Un ejemplo de estos cuerpos de inclusión serían los cuerpos de Lewy, muy característicos de algunas patologías neurodegenerativas como la demencia con cuerpos de Lewy y la enfermedad de Parkinson.

3.2. Alteración de la proteostasis: Agregación patológica de proteínas

La proteostasis se puede ver comprometida por diversas circunstancias como el estrés celular o determinados factores genéticos, aunque si hay que resaltar una condición fundamental para entender la relación entre la proteostasis y la neurodegeneración, esta es el envejecimiento. En la fase final de la vida la eficacia de los sistemas de síntesis y procesamiento de proteínas disminuye, lo que genera un acúmulo progresivo de proteínas disfuncionales agravado por la menor expresión de chaperonas reparadoras, la caída en el rendimiento de los sistemas de eliminación de proteínas y la mayor presencia de otros factores que incrementan los niveles de proteínas dañadas, como la inflamación o el estrés oxidativo. Todo ello conlleva la acumulación de las proteínas dañadas en depósitos tóxicos que dañan directamente las membranas lipídicas celulares y de los orgánulos, y se unen a diversas biomoléculas con la consecuente afectación funcional, además de la pérdida de las funciones fisiológicas desempeñadas por las proteínas afectadas. Además, se desata una respuesta de estrés reticular prolongada que dirige a la célula hacia la activación de cascadas proapoptóticas y se alteran las modificaciones post-traduccionales de numerosas proteínas, lo cual retroalimenta a su vez todos los procesos descritos anteriormente (109,110).

El proceso de formación de los agregados proteicos tóxicos consta de varias etapas. En primer lugar, la proteína cuya conformación es anómala tiende a presentar una disposición externa de láminas β no pareadas, que actúan como una superficie de nucleación donde otros monómeros proteicos anómalos pueden asociarse. Cuando los niveles de estos monómeros superan la concentración conocida como amiloidogénica comienzan a tener lugar los procesos de nucleación primaria, en los que las zonas hidrófobas anormalmente expuestas hacia la superficie de la proteína permiten la agregación de monómeros o pequeños oligómeros para dar lugar a la formación de oligómeros solubles metaestables. Esta nucleación puede ocurrir de forma espontánea o con la colaboración de otras biomoléculas: cuando son otros agregados de la misma naturaleza los que la propician, se habla de nucleación secundaria. Se considera que este paso del proceso es el que resulta en una mayor toxicidad celular, pues los oligómeros solubles disponen de la mayor relación de superficie hidrófoba respecto a la total, de modo que presentan una elevada reactividad frente a otras proteínas y diversas biomoléculas. No obstante, en su virtud está su pecado: esta gran reactividad motiva que los oligómeros también reaccionen con frecuencia entre sí, formando agregados que se compactan progresivamente con un aumento concomitante de su contenido en láminas β y una disminución de su superficie hidrófoba. Este proceso arroja como resultado la formación de oligómeros con una estructura muy ordenada de láminas β que va mudando desde una morfología esférica hacia otra más lineal, dando lugar finalmente a la formación de unas estructuras conocidas como protofibrillas que aún son solubles pero cuya reactividad es menor. Finalmente, estas protofibrillas terminan confluyendo para formar fibrillas lineales insolubles, que crecen progresivamente por los extremos y que también pueden crecer de volumen a través de procesos de nucleación secundaria (111,112). (Figura 13) Las fibrillas insolubles presentan un grado de toxicidad más bajo debido a una disminuida proporción de superficie hidrofóbica, aunque no por ello deben dejar de considerarse sus efectos deletéreos (113).

Wells *et al.* remitieron todos estos procesos y sus consecuencias a la consideración de la ratio entre la eliminación de proteínas dañadas y la formación de fibrillas: si esta ratio es elevada, los sistemas de degradación de proteínas aún son capaces de lidiar con los niveles de proteínas erróneas existentes; si la ratio, por el contrario, es baja, las proteínas mal plegadas se encuentran formando mayoritariamente agregados de toxicidad moderada. Los puntos intermedios, caracterizados por la presencia de altos niveles de oligómeros solubles y por tanto de altas tasas de nucleación primaria y secundaria, serían los que comportarían una mayor toxicidad celular (111).

La composición y la localización tisular de estos depósitos proteicos son específicos para cada enfermedad. De hecho, en cada enfermedad se observa un patrón anatómico característico de estas lesiones, partiendo desde el foco de origen hacia aquellas regiones conectadas anatómicamente. Esta observación motivó la hipótesis de que los fenómenos de agregación proteica podrían extenderse por los tejidos mediante un mecanismo similar al priónico. En esencia, una proteína mal plegada podría actuar como un molde para inducir la misma alteración en otros monómeros vecinos de la misma proteína, e incluso estas proteínas anómalas podrían transferirse a otras células conectadas con la de origen a través de exosomas o nanotubos de membrana, de modo que los territorios afectados por la presencia de depósitos proteicos se irían extendiendo desde el foco inicial hacia otras regiones del cerebro *a priori* alejadas, pero con las que existe una conexión anatómica. Esta teoría podría explicar los patrones anatómicos característicos de lesión y afectación funcional de cada una de las enfermedades neurodegenerativas (114).

La homeostasis de los metales parece que desempeña un papel significativo en los procesos de agregación proteica (115). Los niveles de algunos cationes metálicos como el Cu^{2+} , el Zn^{2+} y el

Fe^{2+} aumentan por encima de los niveles habituales durante el envejecimiento, y en pacientes que sufren algún proceso neurodegenerativo se ha observado que este aumento es más marcado en las zonas lesionadas y que la disminución de la concentración de metales puede tener un impacto a nivel clínico, hallazgos todos ellos que sugieren una relación directa de la homeostasis metálica con la etiología de la neurodegeneración (116). En lo que a la proteostasis se refiere, parece que los metales podrían favorecer los procesos de nucleación secundaria implicados en la formación de nuevos oligómeros, aunque también podrían tener cierto papel protector al propiciar la constitución de depósitos fibrilares o de oligómeros de baja solubilidad, como señalan otros estudios (117,118). Los metales también pueden interferir en el procesamiento de las proteínas, como ejemplifica el péptido β amiloide: un exceso de Zn^{2+} en el medio inhibe la α -secretasa, promoviendo el procesamiento de la proteína precursora amiloide por la vía amiloidogénica, y también inhibe enzimas implicadas en la degradación del péptido $\text{A}\beta$ (119). Hay que señalar que la elevada concentración de metales también afecta a la proteostasis de forma indirecta mediante otros mecanismos, como el aumento del estrés oxidativo o la disfunción mitocondrial (120).

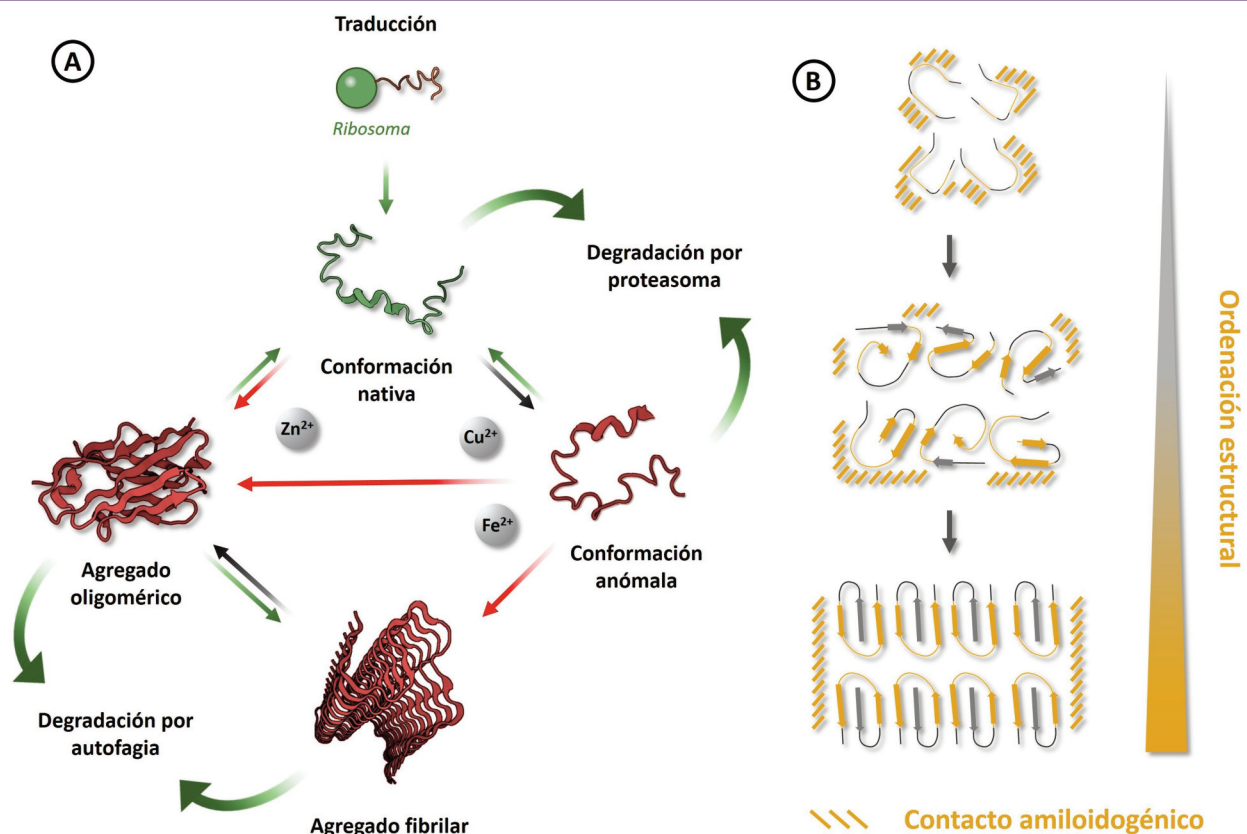


Figura 13: A) Proceso de agregación proteica. Las líneas rojas señalizan los eventos de agregación y las verdes la evolución a estadios menos tóxicos de la agregación, habitualmente mediados por chaperonas. B) Progresión del proceso de agregación de una proteína amiloide. Los agregados van aumentando en ordenación conforme aumenta el número de monómeros y estos van adquiriendo una conformación más rica en lámina β . También se puede observar como las regiones amiloidogénicas (amarillo) se van orientando hacia el interior, permitiendo a las regiones más hidrófilas situarse en la zona externa (gris).

3.3. Proteostasis y neurodegeneración

A continuación, se expondrán brevemente las alteraciones proteicas más destacadas de las principales enfermedades neurodegenerativas. No hay que olvidar el impacto mayor que pueden tener las proteinopatías a nivel del sistema nervioso central, pues las neuronas son células postmitóticas y por tanto los efectos citotóxicos producen alteraciones funcionales y morfológicas permanentes.

3.3.a. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer se ha asociado a la presencia de agregados tóxicos de dos proteínas: la proteína β -amiloide y la proteína tau. El péptido β -amiloide se forma a partir de la proteína precursora amiloide (PPA) por acción de las secretasas β y γ , y desempeña funciones importantes relacionadas con la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria (121). La longitud del péptido resultante es variable, relacionándose con una especial neurotoxicidad el péptido $A\beta_{42}$ por su mayor reactividad a la hora de asociarse en oligómeros y un mayor potencial fibrillogénico (122). El aumento de su concentración, como consecuencia de la disfunción de los sistemas de aclaramiento proteico, motiva la formación de macroagregados denominados placas neuríticas o seniles. La relación de estos agregados con la enfermedad de Alzheimer es confusa: su presencia en cerebros sanos sugiere que no son suficientes para constituirse como causa única y directa de la enfermedad, pero hay suficiente evidencia para apoyar la idea de que su proceso de formación sí tiene efectos deletéreos, quizá relacionados con la existencia de formas intermedias oligoméricas altamente reactivas. Los distintos tipos de agregados del péptido $A\beta$ parecen participar en otros procesos neurotóxicos como la hiperfosforilación de la proteína tau, la excitotoxicidad o la neuroinflamación (123,124).

La proteína tau, ligada a la estabilización de los microtúbulos celulares, sufre procesos de hiperfosforilación relacionados con la enfermedad de Alzheimer. Además de la pérdida de función que conlleva una grave afectación del transporte axonal, la hiperfosforilación de tau favorece su oligomerización, y finalmente su organización en un tipo de agregados conocidos como ovillos neurofibrilares (125). Aunque parece que estos ovillos exhibirían menos toxicidad que los oligómeros intermedios, su relación con el deterioro cognitivo y anatómico propios de la enfermedad está mejor establecida que en el caso del péptido $A\beta$, e incluso se postula que se pueden extender desde su foco de origen a través de un mecanismo pseudopriónico (126).

3.3.b. Enfermedad de Parkinson

En el cerebro de pacientes de la enfermedad de Parkinson se han hallado depósitos tóxicos de otra proteína denominada α -sinucleína, cuya función fisiológica entraña la movilización de

vesículas sinápticas y la formación de protuberancias sinápticas (127). Esta proteína es capaz de formar oligómeros de manera espontánea, los cuales pueden evolucionar hacia agregados más complejos a través de determinados cambios en el plegamiento proteico. Al contrario que en el caso de la proteína amiloide, la mayor toxicidad se asocia a los estadios protofibrilar y fibrilar, en los que predominarían las regiones dispuestas en láminas β . Estos agregados, que se acumulan por la progresiva disfunción de los sistemas de aclaramiento proteico, destruirían las membranas de las vesículas intracelulares, afectarían a la homeostasis del calcio e inducirían un estatus de disfunción mitocondrial. Cuando son liberados al medio extracelular tras la apoptosis neuronal activan la respuesta inmunitaria local, lo que induce un aumento del estrés oxidativo local y, en definitiva, retroalimenta el proceso neurotóxico. Hay que destacar que los agregados de α -sinucleína pueden ser confinados por las células en unos cuerpos de inclusión muy característicos denominados cuerpos o neuritas de Lewy en función de su localización intracelular o extracelular, donde su toxicidad se vería limitada (73,111).

3.3.c. Esclerosis lateral amiotrófica

La etiopatogenia de la esclerosis lateral amiotrófica sigue siendo un secreto en líneas generales, aunque dentro de las alteraciones que se han asociado con la enfermedad hay algunas proteínas con potencial amiloidogénico.

En primer lugar, podemos citar la proteína TDP-43, una riboproteína implicada en la traducción y el procesamiento del ARN mensajero. Como sucede con la α -sinucleína, TDP-43 tiene una reseñable capacidad para agregarse espontáneamente, aunque hay determinadas modificaciones postraduccionales que incrementan aún más este potencial tóxico. Los oligómeros de TDP-43 son el estadio más reactivo, mientras que su agregación ulterior da lugar a fibrillas con una toxicidad más reducida. No obstante, la elevada concentración de TDP-43 en las motoneuronas asegura la formación constante de oligómeros cuando se instaura el estatus patológico, por lo que la toxicidad asociada a esta proteína no se agota por la formación de los depósitos fibrilares. Aunque la presencia de depósitos de TDP-43 en un 60% de los pacientes de ELA sugiere su asociación con la enfermedad, se desconoce si su potencial tóxico se asocia más con determinadas mutaciones o modificaciones postraduccionales, o bien con la disfunción de los sistemas de degradación de proteínas mal plegadas (128).

La enzima superóxido dismutasa 1 (SOD-1) forma parte del sistema de defensa antioxidante celular. Su relación con la ELA pasa por determinadas mutaciones que motivan su plegamiento incorrecto, dando lugar a un proceso de agregación donde los oligómeros son nuevamente la especie más problemática. La presencia de depósitos tóxicos de SOD-1 ha sido documentada en



pacientes tanto de ELA familiar como de ELA esporádico; sin embargo, su relación con la enfermedad sigue siendo un tema irresoluto (111,128).

Otra proteína de unión al ARN relacionada con la ELA es la proteína FUS, que participa en la traducción y reparación del ADN. Su proceso de agregación se aleja del paradigma amiloideo, y sus efectos deletéreos parecen relacionarse más bien con la pérdida de su función fisiológica. La proteína FUS mutada tiende a agregarse secuestrando fragmentos de ARN, además de adoptar una localización citosólica que no se corresponde con su lugar de expresión habitual, el núcleo. Este comportamiento anómalo no solo se relaciona con la ELA, sino también con otras enfermedades neurodegenerativas como la demencia frontotemporal (129).

3.3.d. Enfermedad de Huntington

Es preceptivo finalizar este apartado citando brevemente la enfermedad de Huntington, ya que es una patología autosómica dominante asociada a la mutación del gen que codifica para la proteína huntingtina. Parece que, por un lado, las manifestaciones de la enfermedad estarían relacionadas con la disfuncionalidad de la proteína mutada, pues esta participa en numerosos procesos fisiológicos: transporte de orgánulos y vesículas, coordinación de la división celular, control de la endocitosis y la autofagia, transcripción de numerosos genes... incluso, desempeña un papel importante en el desarrollo embrionario (130). Por otro lado, la mutación conlleva que la proteína presente numerosos fragmentos de poliglutamina que favorecen la agregación de esta proteína. Los oligómeros de huntingtina exhiben una enorme reactividad, afectando directamente a numerosas funciones celulares esenciales. El proceso de fibrilación, más complejo que en otros casos revisados anteriormente, alumbra agregados menos reactivos que los oligómeros de partida (111).

3.4. Tratamiento

Dado el papel central que parecen tener las proteinopatías en la etiopatogenia de las enfermedades neurodegenerativas, se han propuesto varias estrategias para diseñar terapias modificadoras de las enfermedades basadas en los procesos que ocurren en torno a la generación de los depósitos tóxicos. Así, se han propuesto fármacos capaces de inhibir distintos puntos del proceso de formación de los agregados, inhibidores *per se* de la agregación de proteínas y, por último, agentes capaces de eliminar los depósitos ya formados.

Los inhibidores de la formación de los depósitos proteicos pueden actuar a distintos niveles del proceso. Por ejemplo, los compuestos quelantes se proponen por su capacidad para capturar los iones metálicos en exceso implicados en la asociación de las proteínas mal plegadas, si bien esta capacidad quelante no debe

afectar a los iones metálicos que se encuentran colaborando en diversas funciones fisiológicas como parte de metaloenzimas. Con este mecanismo de acción se pueden destacar dos compuestos: el clioquinol y la deferiprona (Figura 14). El clioquinol es un derivado de 8-hidroxiquinolina con una capacidad quelante media, que cumple el objetivo de capturar los iones metálicos unidos a los agregados proteicos o en exceso sin interferir en las funciones fisiológicas de los mismos. Además, se ha postulado su capacidad para unirse a los agregados de péptido A β , induciendo su disociación. No obstante, no superó la fase 2 de ensayos clínicos para la enfermedad de Alzheimer por falta de eficacia en lo que al deterioro cognitivo se refiere (131). Los resultados de fases previas, que sí eran positivos, espolearon el diseño de análogos del clioquinol como los PBT. El compuesto con un perfil preclínico más prometedor, PBT2, tampoco consiguió resultados clínicamente significativos en dos ensayos clínicos de fase 2 para las enfermedades de Alzheimer y de Huntington (132).

Por su parte, la deferiprona es un conocido quelante de hierro usado en clínica para el tratamiento de la talasemia mayor. Dos pequeños ensayos clínicos de fase 2 han mostrado que la deferiprona es capaz de reducir los depósitos de hierro a nivel cerebral y la sintomatología en pacientes con síndromes parkinsonianos y ataxia de Friedreich (133,134). Esta observación, unida al potente efecto inductor de la autofagia y la mitofagia que exhibe este compuesto, le otorgan a la deferiprona un notable potencial para el abordaje de la neurodegeneración a través de la restitución de la proteostasis y la quelación (135).

Otra estrategia ampliamente trabajada, orientada especialmente para la enfermedad de Alzheimer, está representada por los fármacos inhibidores de la BACE-1 (*β -site amyloid-precursor-protein-cleaving enzyme 1*) (BACE-1), la aspartil-proteasa situada en el sitio activo de la enzima β -secretasa que degrada la PPA por la vía amiloidogénica. Algunas moléculas pequeñas cuya estructura se recoge en la Figura 15, como el verubecestat, JNJ-54861911 o CNP520 han alcanzado las fases 2 y 3 de ensayos clínicos para la enfermedad de Alzheimer, aunque ninguno logró una ralentización significativa del deterioro cognitivo. No obstante, se sigue trabajando en el desarrollo de otros compuestos dirigidos a esta diana, e incluso los grupos farmacóforos inhibidores de BACE-1 se han incluido en algunos compuestos multidiana donde se combinan con otros fragmentos inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) o la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β), y que han mostrado resultados muy prometedores a nivel preclínico (136).

La terapia génica podría ser otra herramienta muy útil para contrarrestar las mutaciones o modular la expresión de las proteínas implicadas en la formación de los depósitos tóxicos. En el caso de la enfermedad de Alzheimer destaca el oligonucleótido

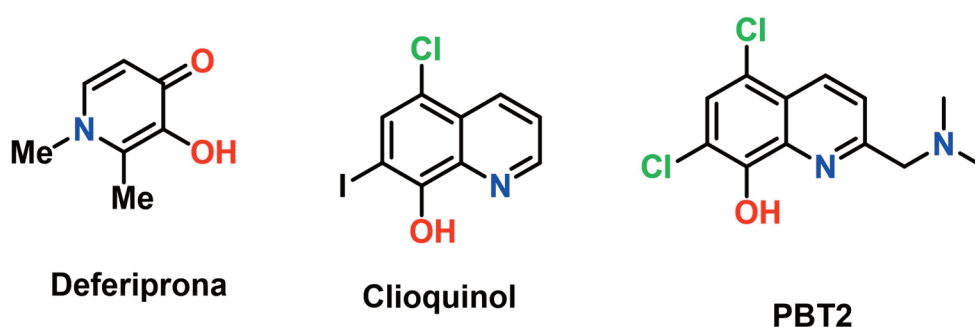


Figura 14: Estructuras de fármacos relevantes en la terapia quelante.

antisentido IONIS MAPTRx, dirigido a la inhibición de la expresión de la proteína tau, que ha alcanzado la fase 2 de ensayos clínicos y que está mostrando resultados esperanzadores. Sin abandonar esta patología, también se están desarrollando oligonucleótidos antisentido y métodos de escisión génica por CRISPR-Cas9 para evitar el procesamiento amiloidogénico del PPA. Este abordaje también resultó atractivo para la enfermedad de Huntington, al ser una enfermedad monogénica, de modo que se han desarrollado oligonucleótidos antisentido y escisiones génicas por CRISPR-Cas9 destinadas al silenciamiento completo del gen o al silenciamiento selectivo de los alelos mutados. Algunas de estas aproximaciones han alcanzado las fases más avanzadas de los ensayos clínicos, si bien han aparecido ciertas consideraciones: el silenciamiento completo permitiría el tratamiento universal de todos los pacientes, pero conlleva los efectos adversos vinculados a la pérdida de la función fisiológica de la huntingtina; por el contrario, los silenciamientos selectivos mantienen la funcionalidad, pero al variar las mutaciones implicadas entre pacientes el tratamiento se torna más individualizado. La ELA también se podría beneficiar de terapias génicas, como lo demuestra el hecho de que hay ensayos clínicos en distintas fases para investigar la eficacia y seguridad de oligonucleótidos antisentido para la SOD-1 y la proteína c9orf72, que sobre todo en el primer caso están mostrando resultados muy interesantes (137).

En los últimos años se han caracterizado numerosas moléculas pequeñas con capacidad para unirse a los oligómeros proteicos impidiendo su agregación, o bien a los depósitos proteicos induciendo su desagregación, generalmente gracias a una estructura

química tridimensional y/o una funcionalización adecuada para interponerse entre los monómeros u oligómeros. Muchos polifenoles exhiben una destacable capacidad para inhibir o desestabilizar los agregados de distintas proteínas relacionadas con la neurodegeneración, habiendo sido especialmente estudiados para los agregados de péptido A β . Merece la pena resaltar entre ellos la curcumina, el resveratrol, la oleuropeína aglicona, la epigallocatequina-3-galato y la fisetina; todos ellos han alcanzado la fase clínica de desarrollo, y a pesar de no haber conseguido la eficacia clínica esperada, han corroborado su actividad antiagregante (138). Dentro de las moléculas pequeñas inhibitoras de la agregación amiloide encontramos también péptidos como el QBP-1 (*polyglutamine-binding peptide 1*), vitaminas (B₁₂, C, E, K), fármacos ya aprobados para otras patologías como la cicloserina B o pirazinamida, pinzas moleculares como el compuesto CLR01, etcétera (Figura 16). Como ocurre con los inhibidores de BACE, el potencial de estos compuestos antiagregantes ha estimulado su inclusión en nuevos compuestos multidiana con potencial antineurodegenerativo, buscando sinergias con otros fragmentos activos frente a dianas de interés en este ámbito (139).

Por último, se ha explorado ampliamente la posibilidad de eliminar los agregados proteicos ya constituidos mediante inmunoterapias activas o pasivas. Dentro de las inmunoterapias pasivas hay que hacer especial mención al aducanumab, un anticuerpo monoclonal contra los oligómeros y las fibrillas de péptido β -amiloide que ha sido recientemente aprobado (2021) por la FDA para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Este hecho, que supuso un hito por ser supuestamente la primera terapia

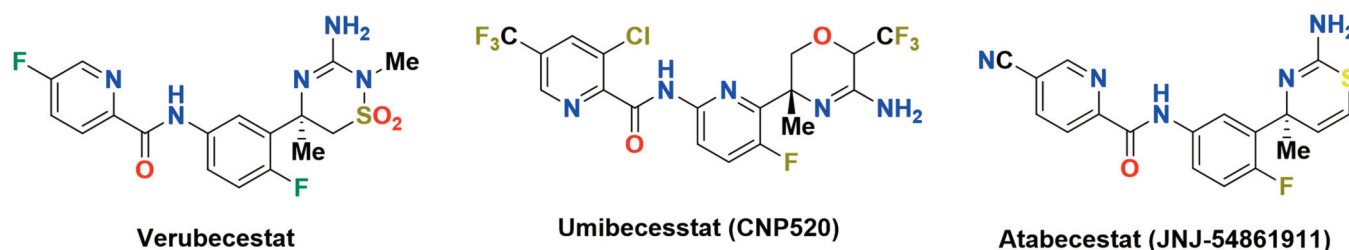


Figura 15: Estructura química de algunos fármacos inhibidores de la enzima BACE-1.

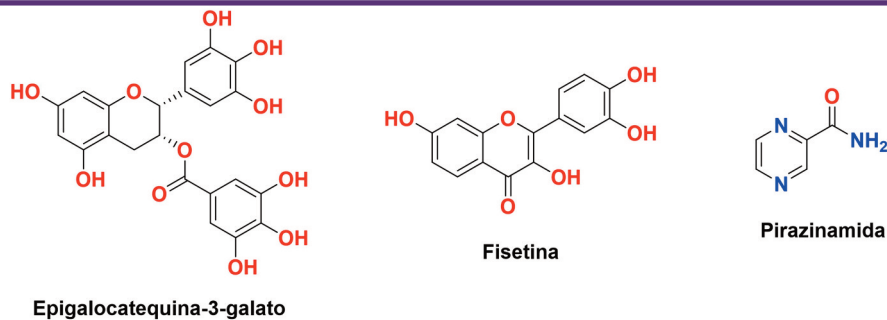


Figura 16: Estructura química de algunas moléculas pequeñas inhibidoras de la agregación patológica de proteínas.

modificadora de la enfermedad de Alzheimer, se vio envuelto de una gran polémica, pues aunque los ensayos clínicos avalaron la capacidad de este nuevo anticuerpo para eliminar los depósitos de proteína β -amiloide, esta actividad no parece correlacionarse con un beneficio clínico real, a lo que hay que sumar las dudas acerca de su seguridad. A pesar de todo ello, la FDA aplicó un protocolo de aprobación acelerada estimando que había una “probabilidad razonable” de encontrar un beneficio luego de su aplicación a nivel clínico (36). Los oligómeros y fibrillas de péptido β -amiloide son sin duda la diana más explorada en este campo como demuestra la variedad de anticuerpos monoclonales que han alcanzado la fase de ensayos clínicos avanzados: merece la pena destacar el gantenerumab, que ha llegado a demostrar cierta capacidad para ralentizar el deterioro cognitivo en un ensayo clínico de fase 3. Sin abandonar la enfermedad de Alzheimer, también se han desarrollado anticuerpos monoclonales destinados a reconocer los agregados de proteína tau: hay ensayos clínicos de fase 2 en marcha para evaluar la seguridad y eficacia de fármacos como el gosuranemab, zagotenemab, semorinemab y C2N 8E12 para la enfermedad de Alzheimer u otras patologías neurodegenerativas relacionadas estrechamente con la proteína tau como la parálisis supranuclear progresiva (140).

Existen dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra los agregados de α -sinucleína, prasinezumab y BIIB054, que han alcanzado la fase 2 de ensayos clínicos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Por el momento, ambos han demostrado seguridad y tolerabilidad, lo que unido a los prometedores resultados en la fase preclínica de desarrollo los convierten en potenciales terapias modificadoras de esta patología neurodegenerativa. Para el resto de las enfermedades de este grupo la estrategia de inmunización pasiva se encuentra más atrasada: se han desarrollado anticuerpos monoclonales contra los agregados de las proteínas SOD-1 (ELA), C9orf72 (ELA y demencia frontotemporal) y huntingtina (corea de Huntington), mas de momento solo se dispone de resultados en modelos murinos de dichas enfermedades.

El desarrollo de vacunas para evitar la formación o fomentar la eliminación de los depósitos proteicos tóxicos trata de superar algunos de los inconvenientes de la inmunización pasiva,

como son los efectos adversos, el alto coste y la alta frecuencia de administración que requerirían estos tratamientos. Nuevamente, es en la enfermedad de Alzheimer donde se han conseguido los mayores avances: la Tabla 4 recoge las principales vacunas basadas en el péptido β -amiloide o la proteína tau fosforilada que están siendo actualmente ensayadas, habiendo alcanzado ya algunas la fase 2 de ensayos clínicos. También se ha desarrollado una vacuna prometedora basada en la α -sinucleína humana recombinante que está siendo evaluada en un ensayo clínico de fase 1, mientras que para el resto de proteínas mencionadas en el epígrafe anterior (SOD-1, C9orf72 y huntingtina) existen vacunas experimentales que han demostrado capacidad inmunogénica en modelos murinos pero para las que, por el momento, no se ha pasado a la fase clínica de desarrollo.

4. NEUROINFLAMACIÓN

La inflamación es un proceso fisiológico por el que las células inmunitarias ejercen una acción agresiva e inespecífica como respuesta a la presencia de estímulos nocivos en el medio y cuya finalidad es la destrucción del origen de ese estímulo. Cuando esta respuesta se da en el entorno del sistema nervioso, ya sea central (SNC) o periférico (SNP), se denomina neuroinflamación. A pesar de ser un proceso fisiológico común en muchas infecciones o enfermedades, su cronificación puede dar lugar a daños celulares y tisulares severos. Esto sucede en situaciones en las que el cerebro expresa cuerpos tóxicos como agregados proteicos, especies oxidantes o ácidos nucleicos libres en el medio extracelular, que transforman esta respuesta que debiera ser protectora en una cascada de daño celular que se retroalimenta a sí misma. A continuación, se irán desgranando los procesos que acontecen en la neurodegeneración que conducen al sistema inmunitario del SNC a este estado patológico.

4.1. Sistema inmunitario del SN

El SNC posee un sistema inmunitario propio, marcado por una serie de particularidades y relativamente aislado del resto del organismo gracias a una red de irrigación sanguínea especial, cuya principal característica es la presencia de la barrera

Tabla 4: Resumen de las diferentes vacunas basadas en la agregación proteica que se están ensayando frente a la EA.

Vacuna	Diana	Fase de ensayos clínicos	Resultados
ACI-24	Agregados A β	Fase 2	Seguro, bien tolerado
CAD 106	Péptido A $\beta_{(1-6)}$	Fase 2	Seguro, bien tolerado Genera anticuerpos anti A β
ACC-001	Péptido N-terminal A $\beta_{(1-7)}$	Fase 2	Seguro, bien tolerado Genera anticuerpos anti A β
ABvac40	Fragmento C-terminal A β_{40}	Fase 2	Seguro, bien tolerado Aumento en anticuerpos anti A β_{40}
AADvac1	Dominio de agregación de tau sintético	Fase 2	Seguro, bien tolerado Genera anticuerpos anti-tau Reduce el deterioro cognitivo
ACI-35	Fosfoepítipo de tau S396-S404 sintético	Fase 2	Seguro, bien tolerado Generación débil de anticuerpos anti-tau

hematoencefálica (BHE) y la ausencia de un sistema linfático propio. La primera supone una barrera física compuesta principalmente de células endoteliales unidas de forma muy íntima unas a otras de modo que se permite un estrecho control de la permeabilidad a sustancias, células o patógenos que puedan acceder al tejido nervioso (141). Este particular aislamiento no permite la presencia de un sistema linfático común al del resto del organismo, sino que requiere de un sistema especializado denominado sistema glinfático, en el cual el líquido cerebroespinal toma las funciones propias de la linfa (142). Otra cualidad única del sistema inmunitario del SNC es la presencia de células inmunitarias exclusivas de este tejido, como son la microglía y los astrocitos, aunque bajo determinadas circunstancias otras células del sistema inmune como macrófagos o linfocitos T pueden atravesar la BHE y llegar al SNC.

Las células de la microglía son las células inmunes de mayor relevancia para la respuesta inmunitaria del SNC, suponiendo entre el 5 y 12 % del total de células de este tejido. Sus funciones van desde la defensa directa del organismo frente a

patógenos externos o tóxicos endógenos asociados a las enfermedades neurodegenerativas, hasta el mantenimiento de la homeostasis en el entorno neuronal en cooperación con los astrocitos. La microglía también ejerce ciertas funciones neuroprotectoras o de mantenimiento del correcto funcionamiento neuronal como el control de la plasticidad neuronal, el mantenimiento de la homeostasis de la mielina o la migración hacia regiones que presentan marcadores de daño o muerte celular.

Entre sus funciones inmunológicas cabe destacar su capacidad de detección de patrones moleculares asociados al daño y muerte celular (DAMP, *damage associated molecular patterns*), como pueden ser el ADN mitocondrial, las chaperonas o los metabolitos de purinas; u otros patrones asociados a la presencia de patógenos (PAMP, *patogen associated molecular patterns*), como el lipopolisacárido (LPS). Para ello, estas células poseen numerosos receptores de reconocimiento de estos patrones, como son los receptores tipo Toll (TLR, *Toll-like receptors*) y los inflammasomas

(NLR, *Nod-like receptors*), entre los que cabe destacar NLRP3 por su papel en la neuroinflamación. La microglía es, además, el principal efector de la respuesta inflamatoria en el SNC, ya que es capaz de secretar citoquinas proinflamatorias o sustancias tóxicas dirigidas a eliminar directamente el estímulo dañino (142,143).

Así, la unión de distintos patrones moleculares a los receptores de la microglía en reposo (M0) desencadena su activación, que puede ser hacia un fenotipo proinflamatorio (M1) o antiinflamatorio (M2) (142) (Figura 17). La existencia de dos fenotipos claramente diferenciados ha sido motivo de discusión en el ámbito científico durante los últimos años, ya que históricamente se ha considerado que las células gliales podían expresar dos fenotipos mutuamente excluyentes. El fenotipo proinflamatorio o M1 se caracteriza por una función más agresiva que incluye la fagocitosis, la presentación de antígenos a otras células inmunes, la secreción de citoquinas proinflamatorias como las interleuquinas IL-1 β e IL-18, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o interferones; la activación de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la producción de especies reactivas de oxígeno

dirigidas a eliminar el estímulo dañino. Por otra parte, el fenotipo M2 liberaría citoquinas antiinflamatorias como las interleuquinas IL-4 e IL-10, o el factor de crecimiento transformante beta (TFG- β). Además, se sabe que la microglía M2 induce la neurogénesis mediante la activación de la vía mediada por el PPAR- γ (*Peroxisome Proliferator- Activated Receptor gamma*) y la secreción de factores de crecimiento como el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) y el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (145).

La lógica subyacente a esta diferenciación parece evidente, y es que en caso de que se produzca un daño tisular, la microglía se activará hacia un fenotipo M1 que instaurará una respuesta inflamatoria. Una vez el origen del daño haya sido eliminado, la microglía evolucionará hacia un fenotipo M2 que revierta la inflamación además de promover la reparación del daño neuronal que haya podido surgir.

Sin embargo, desde 2016 han crecido las voces que afirman que este modelo para explicar la polarización de la microglía no es tan preciso como debería. Y es que, a diferencia de los macrófagos, que sí pueden polarizarse en fenotipos claramente

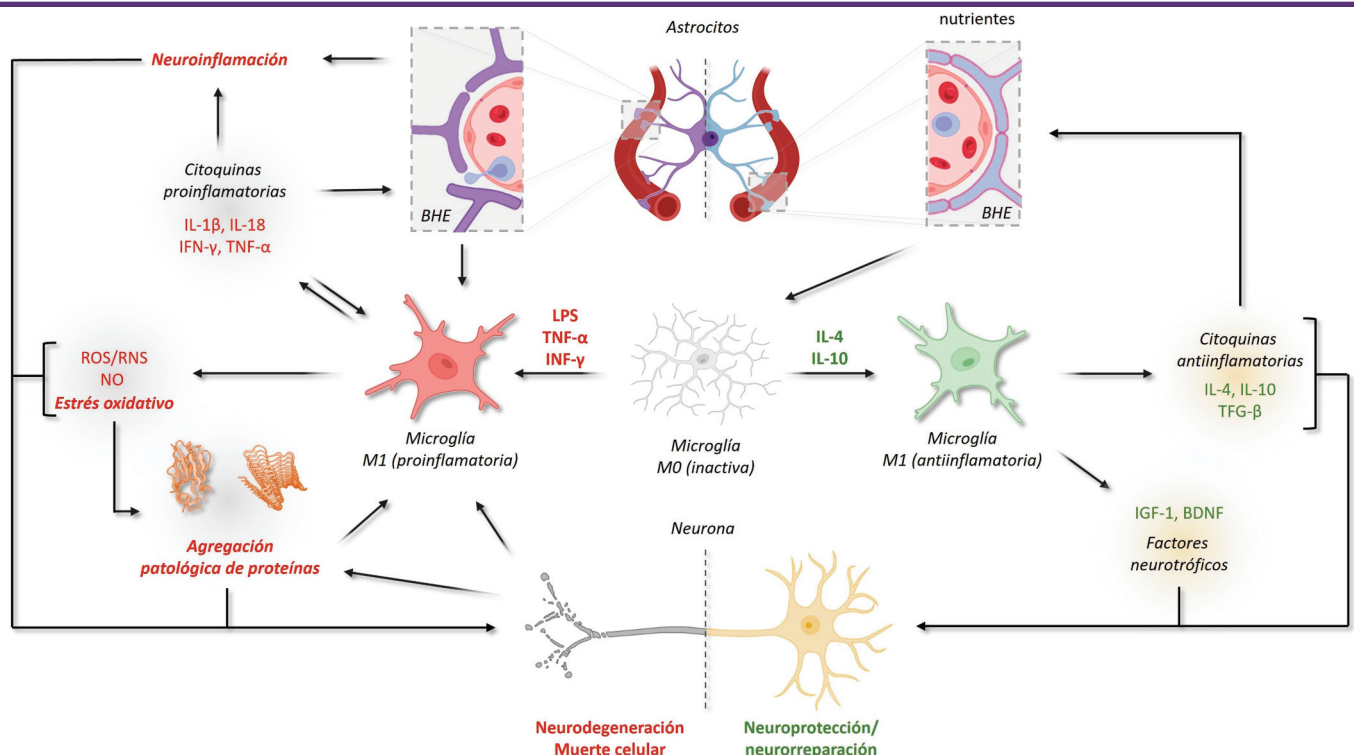


Figura 17: La presencia de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , ciertos interferones (IFN- γ , LPS o de agregados proteicos patológicos) produce la activación de la microglía hacia un fenotipo proinflamatorio (M1, rojo). La microglía activada producirá a su vez más citoquinas proinflamatorias, incluyendo IL-1 β , IL-18, TNF- α e interferones, que activarán más células microgliales y astrocitos alcanzándose un estado proinflamatorio, fagocítico y permisivo con la infiltración de otras células inmunitarias a través de la BHE, favoreciendo la cronicación de la inflamación. Además, la activación de la microglía promueve la secreción de especies oxidantes como ROS y RNS, además de NO por inducción de la iNOS. La presencia de estas especies oxidantes, junto con la toxicidad asociada a la agregación proteica y la neuroinflamación provocan la muerte celular, cuyos residuos fomentan la activación de la microglía (M1). Por otro lado, la presencia de citoquinas antiinflamatorias como IL-4 o IL-10 conduce a un estadio antiinflamatorio de la microglía (M2), que promueve la liberación de citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10, TFG- β) y de factores neurotróficos (IGF-1 o BDNF) cuyo efecto es neuroprotector y reparador. En esta situación, los astrocitos mantienen un papel regulador y la permeabilidad de la BHE se recupera (144). Creado con BioRender.com



diferenciados, la microglía no presenta los cambios necesarios en la superficie celular como para poder considerar un fenotipo completamente polarizado hacia M1 o M2, por ejemplo, sino que más bien se mueven en un *continuum* en el que sus funciones son más antiinflamatorias o proinflamatorias. (146) No obstante, tampoco esta hipótesis de un fenotipo variable pero no dicotómico ha podido ser completamente demostrada experimentalmente, de modo que aún es necesario adquirir más conocimientos para poder establecer un modelo claro de comportamiento de la microglía.

Como ya se mencionó anteriormente, existe otro tipo de células que también pertenecen al sistema inmune del SNC, denominadas astrocitos por su morfología. Estas células son las más abundantes del SNC, estimándose que suponen hasta el 70 % del total. Sus funciones principales consisten en el mantenimiento de la homeostasis, el aporte de nutrientes y la asistencia en los procesos sinápticos. Los astrocitos también forman parte de la BHE, de modo que tienen un importante papel en la permeabilidad de esta barrera, siendo piezas clave en procesos como la infiltración de otras células inmunitarias. Los astrocitos también presentan algunas funciones intrínsecamente inmunitarias, como por ejemplo capacidad fagocítica y de presentación de antígenos, aunque muchas de ellas requieren la activación previa por parte de la microglía. Además, los astrocitos poseen receptores de patrones moleculares como los TLR, lo cual les permite desarrollar su propia respuesta inflamatoria, mediada principalmente por el factor de transcripción NF- κ B (147).

4.2 Papel patológico de la neuroinflamación

Sin embargo, existen ciertas situaciones en las que la actividad de estas células inmunitarias se puede tornar en una exacerbación del daño tisular, tal como sucede en la neurodegeneración. Como ya se ha explicado anteriormente, en un cerebro en neurodegeneración los DAMPs del medio, tales como agregados proteicos tóxicos o los restos celulares generados por el estrés oxidativo, son reconocidos por las células de la glía a través de los TLR o los NLR, induciéndose su activación hacia un fenotipo proinflamatorio (M1) donde están activadas la fagocitosis y la secreción de citoquinas proinflamatorias. Bajo estas condiciones se produce la activación de los astrocitos e incluso la infiltración de otros tipos de células inmunitarias al interior del SNC. En el caso de que esta respuesta inflamatoria no alcance una eficacia suficiente y comience a cronificarse, tal como sucede en la neurodegeneración, la generación de radicales de oxígeno y nitrógeno así como de citoquinas proinflamatorias acabará por agravar el daño neural, comenzando así una cascada de retroalimentación en la que el estrés oxidativo genera agregados, ambos producen la neuroinflamación y esta produce aún más estrés oxidativo (148,149) (Figura 9). Además de este daño directo, se sabe que la hiperreactividad de las

células gliales acaba por activar rutas enzimáticas que conllevan un mayor acúmulo de agregados tóxicos, como es el caso de la Jun N-terminal quinasa (JNK) que promueve la hiperfosforilación de tau, o incluso el aumento de los niveles de estrés oxidativo al liberar depósitos de hierro, muy abundantes en cerebros envejecidos. En los casos más avanzados la inflamación crónica acaba por producir la pérdida de vasos sanguíneos y la consecuente falta de irrigación en regiones adyacentes, que ya no gozan del aporte de nutrientes y oxígeno necesarios para su mantenimiento. De esta manera se acaba por destruir de forma casi completa todo el tejido adyacente, extendiéndose así la neurodegeneración (144).

Esta neurodegeneración asociada a la neuroinflamación se encuentra agravada en la vejez, no solo por el aumento del estrés oxidativo o los defectos de los sistemas de aclaramiento proteico característicos del periodo final de la vida, sino por una adaptación propia de estas células inmunes. Es sabido que el sistema inmunitario cambia su perfil de acción conforme el organismo envejece adecuándose así a la creciente vulnerabilidad asociada al deterioro funcional típico de los sistemas senescentes. Así, el sistema inmunológico adquiere un perfil de activación basal crónica, que si bien suele ser leve y asintomático, puede resultar un trampolín hacia ciertas enfermedades de carácter autoinmune o, como en este caso, hacia la neuroinflamación crónica asociada a la neurodegeneración (*inflamm-aging*) (150).

4.3 Neuroinflamación en la neurodegeneración

Más allá del componente de la edad como acelerador de la neuroinflamación, existen alteraciones propias de las enfermedades neurodegenerativas que también provocan un refuerzo de este proceso patológico.

En la EA el acúmulo de péptido A β produce la activación de los receptores de patrones moleculares de la microglía, promoviendo la producción de citoquinas proinflamatorias y de TNF- α . Además, la presencia de estos agregados induce la activación del inflammasoma NLRP3, que recluta y dirige el ensamblado fibrilar de la proteína ACS (*apoptosis-associated speck-like protein containing ACS*), la cual a su vez actúa como semilla para la nucleación de nuevos agregados de A β , instaurándose así un ciclo de retroalimentación positiva (151).

Complicaciones similares se han observado en modelos murinos de la enfermedad de Parkinson. En este caso, el ciclo de retroalimentación comienza con los agregados de la α -sinucleína, que también son capaces de activar el inflammasoma NLRP3, desencadenando una respuesta inflamatoria que agrava la neurodegeneración y promueve la generación de más DAMPs. (142) En el caso de la ELA, se ha comprobado en varios modelos murinos que existe una correlación entre la neuroinflamación mediada por la liberación de citoquinas dependiente de NLRP3 y la presencia de



biomarcadores de la enfermedad, como son los agregados de SOD-1 y TDP-43 (152).

En la enfermedad de Huntington la activación microglial guarda una relación directa con la progresión de la enfermedad, ya que se ha comprobado que la inhibición del inflammasoma NLRP3 en modelos murinos de EH reduce los DAMPs y mejora la sintomatología asociada a esta patología (153,154).

En todas estas enfermedades se repite un patrón por el cual la neuroinflamación desempeña un papel central en la neurodegeneración, pero no como origen de la misma, sino que la etiopatogenia propia de cada enfermedad potencia la respuesta inflamatoria, llevándola a cotas que resultan tóxicas para el tejido nervioso. De esta forma, el tratamiento de la neuroinflamación se debe abordar como una diana inespecífica de interés general para todas estas enfermedades, aunque aparentemente no suponga la causa primaria de ninguna de ellas.

4.4 Tratamiento

El tratamiento de la neuroinflamación se puede abarcar de diversas formas: impedir el reconocimiento de los patrones moleculares por parte de la glía, disminuir la respuesta proinflamatoria o modular vías intermedias que median en la respuesta inflamatoria (155,156).

Para impedir el reconocimiento de los patrones moleculares por parte de la glía se pueden establecer dos estrategias básicas: o bien se reduce la expresión de los receptores de DAMPs, o bien se bloquean directamente. Dentro del primer grupo, encontramos fármacos muy variados como la minociclina, el candesartán o el azeliragon, mientras que el segundo está principalmente representado por anticuerpos monoclonales (Figura 18).

La minociclina es un antibiótico de la familia de las tetraciclinas que ha demostrado actividad antiinflamatoria asociada a una reducción en la expresión de ciertos TLRs inducidos por LPS, y por tanto de la activación de la microglía, aunque el mecanismo concreto por el que consigue este efecto no ha sido elucidado todavía (157). A pesar de que el tratamiento con este fármaco en modelos preclínicos de EA, EP, EH y ELA resulta neuroprotector en todos los casos, los ensayos clínicos que se han llevado a cabo demuestran baja eficacia en general y mala tolerabilidad en algunos casos (NCT01463384, NCT00063193, NCT00047723 y NCT00277355) (158).

El candesartán es un antagonista de los receptores tipo 1 de angiotensina II, pero además ha demostrado propiedades antiinflamatorias gracias a que reduce la expresión de TLR-4 e inhibe la liberación de NF- κ B, de modo que reduce la producción de citoquinas proinflamatorias en modelos celulares (159). Estos

hallazgos motivaron la inclusión de este fármaco en un ensayo clínico frente a la EA (NCT02646982), cuyos resultados aún no han sido publicados.

Otro fármaco de interés es el azeliragon, un inhibidor de un receptor de reconocimiento de patrones denominado RAGE (*receptor for advance glycation endproducts*) capaz de reducir los niveles de A β del entorno neuronal e incluso de enlentecer la progresión de la EA en modelos de ratón. (160) A pesar de estos prometedores resultados preclínicos, no superó dos ensayos clínicos de fase 3 por falta de eficacia (NCT02080364 y NCT02916056). (155) Por otra parte, el bloqueo de ciertos receptores de reconocimiento de patrones moleculares con un anticuerpo monoclonal ha demostrado ejercer efectos beneficiosos en modelos murinos de neurodegeneración (161). De hecho, existen anticuerpos monoclonales dirigidos a la reducción de la actividad de TLR-4 que han llegado a ensayos clínicos de fase 2 frente a artritis reumatoide (NCT03241108), (162) si bien aún no se ha logrado un beneficio clínico reseñable.

Otro de los métodos para lidiar con la neuroinflamación es la reducción de las citoquinas proinflamatorias. Una estrategia que ha demostrado ser útil es la inactivación de las citoquinas proinflamatorias interactuando directamente con ellas. Es el caso del etanercept, una proteína recombinante que incluye el dominio de unión a ligando del receptor celular de TNF- α , de modo que puede unirse a él impidiendo su acción (163). Se ha comprobado que la administración de este fármaco es capaz de reducir la neuroinflamación en modelos preclínicos de cerebro envejecido y de EA, llegando incluso a incluirse en algunos ensayos clínicos de fase 1 y 2 frente a esta misma patología (NCT01716637, NCT01068353) (164).

El grupo de moléculas pequeñas derivadas de la talidomida, como la lenalidomida o la pomalidomida, ha demostrado propiedades antiinflamatorias a nivel del SNC mediadas por un mecanismo similar (Figura 18). Este efecto lo logran gracias a su capacidad para truncar parte del ARNm codificante para el TNF- α , acortando su semivida y, por tanto, su acción (165).

Otra estrategia dirigida a lograr un efecto antiinflamatorio es la modulación de las rutas enzimáticas que median entre la activación del receptor de reconocimiento de patrones moleculares y la posterior respuesta proinflamatoria. En este apartado caben muchas moléculas pequeñas con muy distintas dianas, pero a continuación resumiremos las más relevantes en el tratamiento de la neuroinflamación.

El neflamapimod es uno de estos fármacos de interés dirigidos a reducir la producción de citoquinas (Figura 18). Se trata de un inhibidor de la enzima p38 de las MAPK, la cual promueve

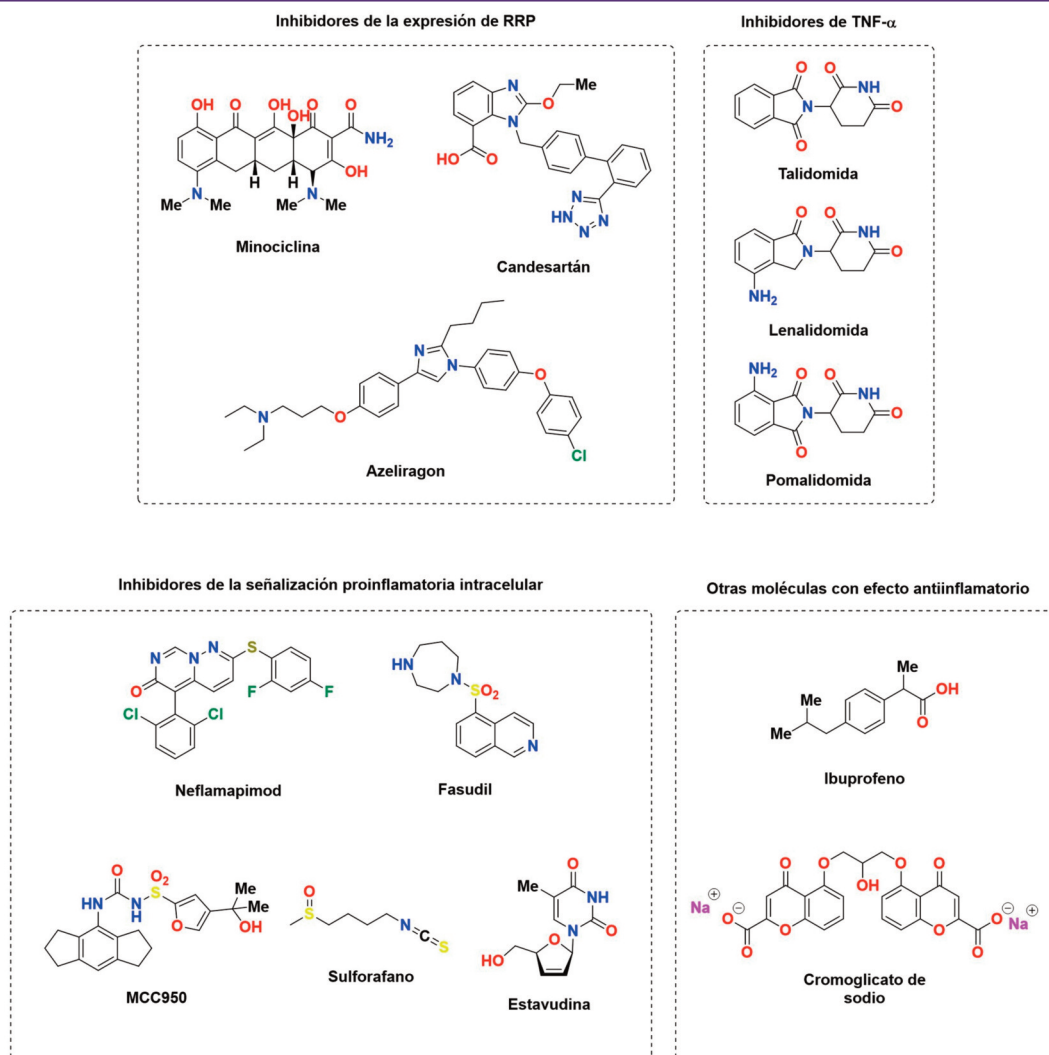


Figura 18: Estructura química de los fármacos más representativos en la inhibición de la neuroinflamación. RRP: receptores de reconocimiento de patrones.

la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β o el TNF- α . Se ha podido comprobar que su aplicación podría resultar beneficiosa en pacientes que padecen enfermedades neurodegenerativas, como demuestran los resultados prometedores en ensayos clínicos frente a la EA y la EP (NCT03402659, NCT04001517) (155,166).

Otro fármaco ha sido recientemente reposicionado en la búsqueda de nuevas dianas para hacer frente a las enfermedades neurodegenerativas: el fasudil. (Figura 18) Este fármaco es un inhibidor de la quinasa asociada a Rho (ROCK) cuyo perfil farmacológico en múltiples modelos de enfermedades neurodegenerativas impulsó su inclusión en varios ensayos clínicos (NCT05218668 y NCT03792490, frente a ELA; NCT04734379, frente a taupatías; NCT04793659, frente a demencias). Los resultados están siendo muy prometedores, lo que ha llevado a su aprobación como fármaco de uso compasivo en ciertos casos de ELA, al menos en EE.UU. (46,167,168). Parece ser que la inhibición de ROCK promueve indirectamente la fosforilación de la quinasa Akt y la

consecuente respuesta antiinflamatoria, polarizando la microglía hacia un estado protector (M2) (169).

Otra estrategia de acción que va ganando popularidad es la inhibición directa del inflamasoma NLRP3, que permitiría inactivar la ruta de señalización proinflamatoria mediada por este complejo proteico (170). Uno de los compuestos más utilizados para la investigación básica de este componente celular, el MCC950, es además uno de los fármacos más prometedores. Parece ser que actúa inhibiendo el ensamblaje del inflamasoma, aunque aún no se ha logrado identificar el mecanismo de acción concreto. Este compuesto, que ha demostrado muy buenos resultados preclínicos frente a varias enfermedades inflamatorias y a algunos modelos de neurodegeneración, llegó incluso a participar en un ensayo clínico para el tratamiento de la artritis reumatoide que, sin embargo, no llegó a buen término debido a problemas de toxicidad hepática (171). No obstante, esta molécula, así como otras con un mecanismo de acción similar, mantienen la atención de la comunidad científica de cara a nuevos hallazgos. De hecho, existen muchos otros fármacos



que se están reposicionando como posibles inhibidores de NLRP3, como sucede con el sulforafano o la estavudina (143) (Figura 18). Más allá de las rutas propuestas, existen otras muchas moléculas cuya acción reduce la respuesta proinflamatoria, a pesar de que no se haya determinado la manera en que lo logran. Un buen ejemplo lo suponen los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), cuya administración produce una reducción de la activación de la microglía y de la producción de citoquinas proinflamatorias, aunque el mecanismo por el que lo hacen no se ha logrado esclarecer todavía (172). Se propone que podría ser a través de su actividad inhibidora de la ciclooxigenasa (COX), considerando el papel central de esta enzima en la producción de prostaglandinas, tromboxanos y otros mediadores de la inflamación. El ibuprofeno ha logrado demostrar beneficio terapéutico en pacientes con EA leve o moderada al ser utilizado en combinación con otro conocido antiinflamatorio, el cromoglicato de sodio, según los resultados de dos ensayos clínicos publicados en 2015. (NCT02547818 y NCT04570644) (Figura 18).

Existen muchas más moléculas activas frente a la neuroinflamación, ya sea en desarrollo o como fármacos en reposicionamiento, pero en esta revisión solo buscábamos destacar las moléculas más representativas y poner en evidencia aquellas dianas hacia las que van dirigidas.

5. CONCLUSIONES

El pronóstico asociado a las enfermedades neurodegenerativas continúa siendo muy sombrío hoy en día, con un arsenal terapéutico disponible que aumenta muy lentamente pero que sigue careciendo de fármacos que realmente sean capaces de ejercer un impacto significativo en el curso del proceso degenerativo. Las hipótesis con las que tradicionalmente se había tratado de explicar el origen de estas enfermedades están siendo paulatinamente abandonadas ante la evidencia, cada vez mayor, de que estaban basadas en fenómenos que constituyen más bien consecuencias, y no causas fundamentales, de la degeneración neuronal.

Al tiempo que estas teorías van quedando obsoletas, la ardua investigación científica en este campo está permitiendo señalar nuevos actores cuya relación con el origen de estas enfermedades podría ser mucho más directa. Muchos estudios señalan que el estrés oxidativo, las alteraciones de la proteostasis y la neuroinflamación relacionados con el envejecimiento podrían desempeñar un papel central en el inicio y, sobre todo, la extensión de la degeneración neuronal. Parece, además, que todos estos factores están estrechamente interconectados y son capaces de retroalimentarse constituyendo un círculo vicioso patológico imparable. De la identificación de estos fenómenos como causas

primigenias de la neurodegeneración está emergiendo una miríada de nuevas dianas terapéuticas que apenas se han comenzado a explorar, y que ofrecen nuevas oportunidades a antiguos fármacos que buscan ahora reposicionarse como potencial tratamiento de la neurodegeneración. Por otra parte, ante la complejidad que ofrece el abordaje terapéutico de estas patologías multifactoriales, se están incorporando aproximaciones muy novedosas para el diseño de nuevos fármacos. Así, las terapias génicas o inmunológicas ocupan ya un lugar importante en el panorama de los nuevos candidatos a fármaco, mientras que la química médica se adapta al reto mediante el diseño de nuevos compuestos multidiana y la optimización de las herramientas computacionales que, bien utilizadas, otorgan un poder inédito para la concepción de una enorme cantidad de moléculas con potencial actividad frente a muchas de las dianas asociadas a la neurodegeneración.

Aún faltan muchas incógnitas por despejar en lo que se refiere a las causas y el desarrollo del proceso neurodegenerativo a nivel celular, pero los avances conseguidos en los últimos años y la mayor disponibilidad de herramientas para el diseño de nuevos fármacos permiten tener la esperanza de que, paso a paso, nos acercamos al momento en que dispondremos de nuevas terapias realmente capaces de detener el avance de estas patologías e incluso, por qué no, de revertirlas.

Lista de abreviaturas

AChE: Acetilcolinesterasa; ACS: *apoptosis-associated speck-like protein containing ACS*; ADN: Ácido desoxirribonucleico; APP: *Amyloid-beta Precursor Protein*; ARE: *Antioxidant Response Elements*; ARN: Ácido ribonucleico; ATP: Adenosín trifosfato; A β : péptido β -amiloide; BACE-1: *Beta-site Amyloid-precursor-protein-Cleaving Enzyme 1*; CAG: Citosina-Adenina-Guanina; COMT: Catecol O-metiltransferasa; COX: ciclooxigenasa; CRISPR-Cas9: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*; DAMP: *Damage Associated Molecular Patterns*; DCL: Deterioro Cognitivo Leve; DFT: Demencia frontotemporal; EA: Enfermedad de Alzheimer; EH: Enfermedad de Huntington; ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica; ELAe: Esclerosis Lateral Amiotrófica esporádica; ELAf: Esclerosis Lateral Amiotrófica familiar; EP: Enfermedad de Parkinson; FDA: *Food and Drug Administration*; FUS: *Fused in sarcoma*; GSK-3 β : *Glycogen Synthase Kinase 3 beta*; HO-1: hemooxigenasa 1; HTT: Huntingtina; IKK: *IkappaB kinase*; IL: interleuquinas; iNOS: *inductible Nitric Oxide Synthase*; IPOD: *Insoluble protein deposit compartment*; JNK: *Jun N-terminal Kinase*; JUNQ: *Juxta nuclear quality control compartment*; Keap-1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*; LCR: Líquido cefalorraquídeo; LPS: lipopolisacárido; LRRK-2: *Leucine-Rich Repeat Kinase 2*; Maf: *Musculoaponeurotic*



fibrosarcoma; MAO-B: Monoamino oxidasa B; NLR: *Nod-Like Receptors*; NMDA: N-Metil D-Aspartato; NOX: NAD(P)H oxidasa; NQO1: NAD(P)H deshidrogenasa quinona 1; Nrf2: *Nuclear factor erythroid 2-Related Factor*; PAMP: *Patogen Associated Molecular Patterns*; PET: *Positron Emission Tomography*; PINK-1: *PTEN-induced kinase 1*; PPAR- γ : *Peroxisome Proliferator- Activated Receptor gamma*; PTP: Poros de Transición de Permeabilidad; QBP-1: *polyglutamine-binding peptide 1*; RAGE: *Receptor for Advanced Glycation Endproducts*; RMN: Resonancia Magnética Nuclear; RNS: *Reactive Nitrogen Species*; ROS: *Reactive Oxygen Species*; RRP: Receptores de Reconocimiento de Patronos; SNC: Sistema Nervioso Central; SNP: Sistema Nervioso Periférico; SOD-1: Superóxido dismutasa 1; TARBP: *Trans-Activation-responsive RNA-Binding Protein*; TDP-43: *TAR DNA-binding Protein 43*; TGF- β : *Transforming Growth Factor beta*; TLR: *Toll-Like Receptors*; β -TrCP: *Beta-Transducin repeats-Containing Protein*.

6. REFERENCIAS

- Przedborski S, Vila M, Jackson-Lewis V. Neurodegeneration: What is it and where are we? J Clin Invest. 2003;111(1):3–10.
- Roser M, Ortiz-Ospina E, Ritchie H. Life Expectancy. OurWorldInData.org. 2013. p. Retrieved from: 'https://ourworldindata.org/life-e.
- World Health Organization. Risk Reduction Of Cognitive Decline And Dementia. WHO Guidelines. 2019. Available from: https://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/risk_reduction_gdg_meeting/en/
- Rocca WA. The burden of Parkinson's disease: a worldwide perspective. Lancet Neurol. 2018;17(11):928–9.
- Arthur KC, Calvo A, Price TR, Geiger JT, Chiò A, Traynor BJ. Projected increase in amyotrophic lateral sclerosis from 2015 to 2040. Nat Commun. 2016;7(12408):1–6.
- Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, et al. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. Nat Rev Neurol. 2019;15:565–81.
- Alzheimer Europe. Dementia in Europe yearbook 2019. Alzheimer Europe. 2019. Available from: https://www.alzheimer-europe.org/sites/default/files/alzheimer_europe_dementia_in_europe_yearbook_2019.pdf
- Hirsch L, Jette N, Frolkis A, Steeves T, Pringsheim T. The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. Neuroepidemiology. 2016;46:292–300.
- Chiò A, Logroscino G, Traynor BJ, Collins J, Simeone JC, Goldstein LA, et al. Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review of the published literature. Neuroepidemiology. 2013;41(2):118–30.
- Logroscino G, Piccininni M. Amyotrophic lateral sclerosis descriptive epidemiology: The origin of geographic difference. Neuroepidemiology. 2019;52(1–2):93–103.
- Dayalu P, Albin RL. Huntington Disease: Pathogenesis and Treatment. Neurol Clin. 2015;33:101–14.
- Bertram L, Tanzi RE. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. J Clin Invest. 2005;115:1449–57.
- Erkkinen MG, Kim M, Geschwind MD. Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2018;10:1–44.
- Santiago JA, Bottero V, Potashkin JA. Dissecting the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases through network biology. Front Aging Neurosci. 2017;9:1–13.
- Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. Front Cell Neurosci. 2015;9(124):1–22.
- Lock EA, Zhang J, Checkoway H. Solvents and Parkinson disease: A systematic review of toxicological and epidemiological evidence. Toxicol Appl Pharmacol. 2013;266:345–55.
- Costa LG. Traffic-Related Air Pollution and Neurodegenerative Diseases: Epidemiological and Experimental Evidence, and Potential Underlying Mechanisms. 1st ed. Vol. 1, Advances in Neurotoxicology. Elsevier Inc.; 2017. 1–46 p.
- Kalia L V., Lang AE. Parkinson's disease. Lancet. 2015;386:896–912.
- Riancho J, Sanchez de la Torre JR, Paz-Fajardo L, Limia C, Santurtun A, Cifra M, et al. The role of magnetic fields in neurodegenerative diseases. Int J Biometeorol. 2021;65:107–17.
- Zubair Alam M, Alam Q, Kamal MA, Jiman-Fatani AA, Azhar El, Khan M, et al. Infectious Agents and Neurodegenerative Diseases: Exploring the Links. Curr Top Med Chem. 2017;17(12):1390–9.
- Beach TG. A Review of Biomarkers for Neurodegenerative Disease: Will They Swing Us Across the Valley? Neurol Ther. 2017;6(s1):s5–13.
- Jeromin A, Bowser R. Biomarkers in neurodegenerative diseases. In: Advances in Neurobiology. 2017. p. 491–528.
- Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimer's Dement. 2011;7(3):280–92.
- Khoury R, Ghossoub E. Diagnostic biomarkers of Alzheimer's disease: A state-of-the-art review. Biomarkers in Neuropsychiatry. 2019;1:1–6.
- Archetti D, Ingala S, Venkatraghavan V, Wottschel V, Young AL, Bellio M, et al. Multi-study validation of data-driven disease progression models to characterize evolution of biomarkers in Alzheimer's disease. Neurolmage Clin. 2019;24:1–13.



26. Flórez J, Armijo JA, Mediavilla Á. *Farmacología humana*, 6a ed. 2013.
27. Oxford AE, Stewart ES, Rohn TT. Clinical Trials in Alzheimer's Disease: A Hurdle in the Path of Remedy. *Int J Alzheimers Dis*. 2020;2020:1–13.
28. Cummings J. Disease modification and Neuroprotection in neurodegenerative disorders. *Transl Neurodegener*. 2017;6(25):1–7.
29. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement*. 2020;16(3):391–460.
30. Vermunt L, Sikkes SAM, van den Hout A, Handels R, Bos I, van der Flier WM, et al. Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimer's Dement*. 2019;15(7):888–98.
31. Mayeux R, Stern Y. Epidemiology of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(a006239):1–18.
32. Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA. Alzheimer disease in the United States (2010–2050) estimated using the 2010 census. *Neurology*. 2013;80:1178–783.
33. Terry Jr A V, Buccafusco JJ. The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease- Related Cognitive Deficits : Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;306(3):821–7.
34. Hillen H. The Beta Amyloid Dysfunction (BAD) Hypothesis for Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*. 2019;13(November):1–10.
35. Barragán Martínez D, García Soldevilla MA, Parra Santiago A, Tejeiro Martínez J. Alzheimer's disease. *Med*. 2019;12(74):4338–46.
36. Rabinovici GD. Controversy and Progress in Alzheimer's Disease: Revisiting FDA Approval of Aducanumab. *N Engl J Med*. 2021;385(9):771–4.
37. Zesiewicz TA. Parkinson Disease. *Contin (MINNEAP MINN)*. 2019;25(4):896–918.
38. Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clin Geriatr Med*. 2020;36(1):1–12.
39. Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2020;323(6):548–60.
40. Pinna A. Adenosine A2A Receptor Antagonists in Parkinson's Disease: Progress in Clinical Trials from the Newly Approved Istradefylline to Drugs in Early Development and Those Already Discontinued. *CNS Drugs*. 2014;28:455–74.
41. van Es MA, Hardiman O, Chio A, Al-Chalabi A, Pasterkamp RJ, Veldink JH, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 2017;390(10107):2084–98.
42. Longinetti E, Fang F. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: An update of recent literature. *Curr Opin Neurol*. 2019;32(5):771–6.
43. Van Blitterswijk M, Van Es MA, Hennekam EAM, Dooijes D, Van Rheenen W, Medic J, et al. Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*. 2012;21(17):3776–84.
44. Oskarsson B, Gendron TF, Staff NP. Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Update for 2018. *Mayo Clin Proc*. 2018;93(11):1617–28.
45. Jaiswal MK. Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Med Res Rev*. 2019;39(2):733–48.
46. Koch JC, Kuttler J, Maass F, Lengenfeld T, Zielke E, Bähr M, et al. Compassionate Use of the ROCK Inhibitor Fasudil in Three Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Neurol*. 2020;11(173):1–8.
47. Ross CA, Aylward EH, Wild EJ, Langbehn DR, Long JD, Warner JH, et al. Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(4):204–16.
48. Rawlins MD, Wexler NS, Wexler AR, Tabrizi SJ, Douglas I, Evans SJW, et al. The prevalence of huntington's disease. *Neuroepidemiology*. 2016;46:144–53.
49. Barker RA, Priller J. Huntington's Disease. In: *Movement Disorders*. 2013. p. 213–22.
50. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem*. 2017;86:715–48.
51. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: Cause or consequence? *Nat Rev Neurosci*. 2004;10(7):S18.
52. Martínez MC, Andriantsitohaina R. Reactive nitrogen species: Molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxidants Redox Signal*. 2009;11(3):669–702.
53. Slimen IB, Najar T, Ghram A, Dabbebi H, Ben Mrad M, Abdrabbah M. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *Int J Hyperth*. 2014;30(7):513–23.
54. Singh E, Devasahayam G. Neurodegeneration by oxidative stress: a review on prospective use of small molecules for neuroprotection. *Mol Biol Rep*. 2020;47(4):3133–40.
55. Chen X, Guo C, Kong J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res*. 2012;7(5):376–85.
56. Rekatsina M, Paladini A, Piroli A, Zis P, Pergolizzi J V., Varrassi G. Pathophysiology and Therapeutic Perspectives of Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Narrative Review. *Adv Ther*. 2020;37(1):113–39.
57. Cuadrado A, Manda G, Hassan A, Alcaraz MJ, Barbas C, Daiber A, et al. Transcription factor NRF2 as a therapeutic target for chronic diseases: A systems medicine approach. *Pharmacol Rev*. 2018;70:348–83.
58. Canning P, Sorrell FJ, Bullock AN. Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. *Free Radic Biol Med*. 2015;88(Part B):101–7.



59. Suzuki T, Yamamoto M. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic Biol Med.* 2015;88:93–100.
60. Cores Á, Piquero M, Villacampa M, León R, Menéndez JC. NRF2 regulation processes as a source of potential drug targets against neurodegenerative diseases. *Biomolecules.* 2020;10(6):1–38.
61. Dinkova-Kostova AT, Kostov R V., Kazantsev AG. The role of Nrf2 signaling in counteracting neurodegenerative diseases. *FEBS J.* 2018;285(19):3576–90.
62. Mahan VL. Neurometabolic effects of carbon monoxide. *Med Gas Res.* 2012;2(32):1–7.
63. Wu KC, Cui JY, Klaassen CD. Effect of Graded Nrf2 Activation on Phase-I and -II Drug Metabolizing Enzymes and Transporters in Mouse Liver. *PLoS One.* 2012;7(7):1–10.
64. Pajares M, Jiménez-Moreno N, García-Yagüe AJ, Ceballos ML De, Leuven F Van, Rábano A, et al. Transcription factor NFE2L2 / NRF2 is a regulator of macroautophagy genes. *Autophagy.* 2016;12(10):1902–16.
65. Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2 Protein Up-regulates Antiapoptotic Protein Bcl-2 and Prevents Cellular Apoptosis. *J Biol Chem.* 2012;287(13):9873–86.
66. Buendia I, Michalska P, Navarro E, Gameiro I, Egea J, León R. Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther.* 2016;157:84–104.
67. Aiken CT, Kaake RM, Wang X, Huang L. Oxidative Stress-Mediated Regulation of Proteasome Complexes. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10:1–11.
68. Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci.* 2012;322(1–2):254–62.
69. Cenini G, Lloret A, Cascella R. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: From a mitochondrial point of view. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:1–18.
70. Angelova PR. Sources and triggers of oxidative damage in neurodegeneration. *Free Radic Biol Med.* 2021;173:52–63.
71. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2016;1863(12):2977–92.
72. Jemmer P. Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Ann Neurol.* 2003;53(suppl 3):S23–38.
73. Rocha EM, De Miranda B, Sanders LH. Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2018;109:249–57.
74. Chen JX, Yan S Du. Amyloid- β -Induced Mitochondrial Dysfunction. *J Alzheimer's Dis.* 2007;12:177–84.
75. Bossy-Wetzel E, Petrilli A, Knott AB. Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci.* 2008;31(12):609–16.
76. Barber SC, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(5):629–41.
77. Meyerowitz J, Parker SJ, Vella LJ, Ng DC, Price KA, Liddell JR, et al. C-Jun N-terminal kinase controls TDP-43 accumulation in stress granules induced by oxidative stress. *Mol Neurodegener.* 2011;6(57):1–22.
78. Pehlivan FE. Vitamin C: An Antioxidant Agent. In: *Vitamin C.* 2017. p. 23–35.
79. Gülçin I. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2010;11(1):210–8.
80. Chupradit S, Bokov D, Zamanian MY, Heidari M, Hakimzadeh E. Hepatoprotective and therapeutic effects of resveratrol: A focus on anti-inflammatory and antioxidative activities. *Fundam Clin Pharmacol.* 2022;36:468–85.
81. Farkhondeh T, Folgado SL, Pourbagher-Shahri AM, Ashrafzadeh M, Samarghandian S. The therapeutic effect of resveratrol: Focusing on the Nrf2 signaling pathway. *Biomed Pharmacother.* 2020;127:1–17.
82. Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti FM, Torti S V. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65:1631–52.
83. Ak T, Gülçin I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact.* 2008;174:27–37.
84. Shahcheraghi SH, Salemi F, Peirovi N, Ayatollahi J, Alam W, Khan H, et al. Nrf2 regulation by curcumin: Molecular aspects for therapeutic prospects. *Molecules.* 2022;27(167):1–20.
85. Pandi-Perumal SR, BaHammam AS, Brown GM, Spence DW, Bharti VK, Kaur C, et al. Melatonin antioxidative defense: Therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes. *Neurotox Res.* 2013;23:267–300.
86. Cardinali DP. Melatonin: Clinical perspectives in neurodegeneration. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10(JULY):1–22.
87. Barnes PJ. Oxidative stress-based therapeutics in COPD. *Redox Biol.* 2020;33(101544):1–8.
88. Tenório MCS, Graciliano NG, Moura FA, de Oliveira ACM, Goulart MOF. N-acetylcysteine (Nac): Impacts on human health. *Antioxidants.* 2021;10(967):1–34.
89. Younus H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci (Qassim).* 2018;12(3):88–93.
90. Landgraf AD, Alsegiani AS, Alaqel S, Thanna S, Shah ZA, Suchek SJ. Neuroprotective and anti-neuroinflammatory properties of ebselen derivatives and their potential to inhibit neurodegeneration. *ACS Chem Neurosci.* 2020;11:3008–16.
91. Li X, Shi Q, Xu H, Xiong Y, Wang C, Le L, et al. Ebselen Interferes with Alzheimer's Disease by Regulating Mitochondrial Function. *Antioxidants.* 2022;11(1350):1–14.



92. Savla SR, Laddha AP, Kulkarni YA. Pharmacology of apocynin: a natural acetophenone. *Drug Metab Rev.* 2021;53(4):542–62.
93. Kelkar A, Kuo A, Frishman WH. Allopurinol as a cardiovascular drug. *Cardiol Rev.* 2011;19:265–71.
94. Mukherjee P, Cinelli MA, Kang S, Silverman RB. Development of nitric oxide synthase inhibitors for neurodegeneration and neuropathic pain. *Chem Soc Rev.* 2014;43(19):6814–38.
95. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev.* 2020;40(1):158–89.
96. Robledinos-Antón N, Fernández-Ginés R, Manda G, Cuadrado A. Activators and Inhibitors of NRF2 : A Review of Their Potential for Clinical Development. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;(1–20).
97. Saidu NEB, Kavian N, Leroy K, Jacob C, Nicco C, Batteux F, et al. Dimethyl fumarate, a two-edged drug: Current status and future directions. *Med Res Rev.* 2019;39(5):1923–52.
98. LoPachin RM, Geohagen BC, Nordstroem LU. Mechanisms of Soft and Hard Electrophile Toxicities. *Toxicology.* 2019;418:62–9.
99. Kerr F, Sofola-Adesakin O, Ivanov DK, Gatliff J, Gomez Perez-Nievas B, Bertrand HC, et al. Direct Keap1-Nrf2 disruption as a potential therapeutic target for Alzheimer's disease. *PLoS Genet.* 2017;13(3):1–30.
100. Mou Y, Wen S, Li YX, Gao XX, Zhang X, Jiang ZY. Recent progress in Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitors. Vol. 202, *European Journal of Medicinal Chemistry.* Elsevier Masson SAS; 2020. p. 1–12.
101. Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. Regulation of the Keap1–Nrf2 pathway by p62/SQSTM1. Vol. 1, *Current Opinion in Toxicology.* Elsevier Ltd; 2016. p. 54–61.
102. Rada P, Rojo AI, Evrard-Todeschi N, Innamorato NG, Cotte A, Jaworski T, et al. Structural and Functional Characterization of Nrf2 Degradation by the Glycogen Synthase Kinase 3/β-TrCP Axis. *Mol Cell Biol.* 2012;32(17):3486–99.
103. Armagan G, Sevgili E, Gürkan FT, Köse FA, Bilgiç T, Dagci T, et al. Regulation of the Nrf2 pathway by glycogen synthase kinase-3β in MPP+ -induced cell damage. *Molecules.* 2019;24:1–20.
104. Davis AA, Leyns CEG, Holtzman DM. Intercellular Sp read of Protein Aggregates in Neurodegenerative Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2018;34:545–68.
105. Nick Pace C, Martin Scholtz J, Grimsley GR. Forces stabilizing proteins. *FEBS Lett.* 2014;588(14):2177–84.
106. Díaz-Villanueva JF, Díaz-Molina R, García-González V. Protein Folding and Mechanisms of Proteostasis. *Int J Mol Sci.* 2015;16:17193–230.
107. Hipp MS, Park S, Hartl FU. Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends Cell Biol.* 2014;24(9):506–14.
108. Alam P, Siddiqi K, Chturvedi SK, Khan RH. Protein aggregation: From background to inhibition strategies. *Int J Biol Macromol.* 2017;103:208–19.
109. Hipp MS, Kasturi P, Hartl FU. The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(7):421–35.
110. Kurtishi A, Rosen B, Patil KS, Alves GW, Møller SG. Cellular Proteostasis in Neurodegeneration. 2019;(February 2018):3676–89.
111. Wells C, Brennan S, Keon M, Ooi L. The role of amyloid oligomers in neurodegenerative pathologies. *Int J Biol Macromol.* 2021;181:582–604.
112. Breydo L, Uversky VN. Structural, morphological, and functional diversity of amyloid oligomers. *FEBS Lett.* 2015;589(19):2640–8.
113. Carija A, Navarro S, de Groot NS, Ventura S. Protein aggregation into insoluble deposits protects from oxidative stress. *Redox Biol.* 2017;12(February):699–711.
114. Frost B, Diamond MI. Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2010;11:155–9.
115. Faller P, Hureau C, Berthoumieu O. Role of Metal Ions in the Self-assembly of the Alzheimer ' s Amyloid β Peptide. *Inorg Chem.* 2013;52:12193–206.
116. Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci.* 1998;158:47–52.
117. Lee M, Kim JI, Na S, Eom K. Metal ions affect the formation and stability of amyloid β aggregates at multiple length scales. *Phys Chem Chem Phys.* 2018;20(13):8951–61.
118. Budimir A. Metal ions, Alzheimer ' s disease and chelation therapy. *Acta Pharm.* 2011;61:1–14.
119. Kepp KP. Bioinorganic Chemistry of Alzheimer ' s Disease. *Chem Rev.* 2012;112:5193–239.
120. Cicero CE, Mostile G, Vasta R, Rapisarda V, Santo S, Ferrante M, et al. Metals and neurodegenerative diseases . A systematic review. *Environ Res.* 2017;159:82–94.
121. Morley JE, Farr SA, Nguyen AD, Xu F. What is the Physiological Function of Amyloid-Beta Protein? *J Nutr Heal Aging.* 2019;23(3):225–6.
122. Kuperstein I, Broersen K, Benilova I, Rozenski J, Jonckheere W, Debulpaep M, et al. Neurotoxicity of Alzheimer's disease Aβ peptides is induced by small changes in the Aβ42 to Aβ40 ratio. *EMBO J.* 2010;29(19):3408–20.
123. Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, Garcia-Alloza M, et al. Oligomeric amyloid β associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(10):4012–7.



124. He Y, Cui J, Lee JC., Ding S, Chalimoniuk M, Simonyi A, et al. Prolonged exposure of cortical neurons to oligomeric amyloid- β impairs NMDA receptor function via NADPH oxidase-mediated ROS production: Protective effect of green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate. *ASN Neuro*. 2011;3(1):13–24.
125. Saha P, Sen N. Tauopathy: A common mechanism for neurodegeneration and brain aging. *Mech Ageing Dev*. 2019;178(January):72–9.
126. Arriagada P V., Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1992;42(3):631–9.
127. Bellani S, Sousa VL, Ronzitti G, Valtorta F, Meldolesi J, Chieregatti E. The regulation of synaptic function by α -synuclein. *Commun Integr Biol*. 2010;3(2):106–9.
128. Blokhuis AM, Groen EJM, Koppers M, Van Den Berg LH, Pasterkamp RJ. Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2013;125(6):777–94.
129. Deng H, Gao K, Jankovic J. The role of FUS gene variants in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(6):337–48.
130. Saudou F, Humbert S. The Biology of Huntingtin. *Neuron*. 2016;89(5):910–26.
131. Jenagaratnam L, McShane R. Clioquinol for the treatment of Alzheimer's Disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;
132. Faux NG, Ritchie CW, Gunn A, Rembach A, Tsatsanis A, Bedo J, et al. PBT2 rapidly improves cognition in Alzheimer's disease: Additional phase II analyses. *J Alzheimer's Dis*. 2010;20(2):509–16.
133. Pandolfo M, Arpa J, Delatycki MB, Le Quan Sang KH, Mariotti C, Munnich A, et al. Deferiprone in Friedreich ataxia: A 6-month randomized controlled trial. *Ann Neurol*. 2014;76(4):509–21.
134. Martin-Bastida A, Ward RJ, Newbould R, Piccini P, Sharp D, Kabba C, et al. Brain iron chelation by deferiprone in a phase 2 randomised double-blinded placebo controlled clinical trial in Parkinson's disease. *Sci Rep*. 2017;7:1–9.
135. Villarejo B. Autofagia selectiva en la retina: Fisiología y patología. 2019.
136. Prati F, Bottegoni G, Bolognesi ML, Cavalli A. BACE-1 Inhibitors: From Recent Single-Target Molecules to Multitarget Compounds for Alzheimer's Disease. *J Med Chem*. 2018;61(3):619–37.
137. Sun J, Roy S. Gene-based therapies for Neurodegenerative Diseases. Vol. 24. 2021. 297–311 p.
138. Dhoulafi Z, Cuanalo K, El C, Hayouni A, Mays CE, Soto C, et al. Inhibition of protein misfolding and aggregation by natural phenolic compounds. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(19):3521–38.
139. Rajan R, Ahmed S, Sharma N, Kumar N, Debas A, Matsumura K. Review of the current state of protein aggregation inhibition from a materials chemistry perspective: Special focus on polymeric materials. *Mater Adv*. 2021;2:1139–76.
140. Mortada I, Farah R, Nabha S, Ojcius DM, Fares Y, Almawi WY, et al. Immunotherapies for Neurodegenerative Diseases. Vol. 12, *Frontiers in Neurology*. 2021. p. 1–19.
141. Daneman R, Prat A. The Blood-Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2008;7:1–23.
142. Jessen NA, Munk ASF, Lundgaard I, Nedergaard M. The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res*. 2015;40:2583–99.
143. Brahadeeswaran S, Sivagurunathan N, Calivarathan L. Inflammasome Signaling in the Aging Brain and Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2022;59:2288–304.
144. Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol*. 2021;17:157–72.
145. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2016;53(2):1181–94.
146. Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci*. 2016;19(8):987–91.
147. Morales I, Fariás GA, Cortes N, Maccioni RB. Neuroinflammation and neurodegeneration. In: *Update on Dementia*. 2016. p. 17–47.
148. Guzman-Martinez L, Maccioni RB, Andrade V, Navarrete LP, Pastor MG, Ramos-Escobar N. Neuroinflammation as a common feature of neurodegenerative disorders. *Front Pharmacol*. 2019;10(1008):1–17.
149. Subramaniam SR, Federoff HJ. Targeting microglial activation states as a Therapeutic Avenue in Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci*. 2017;9:1–18.
150. FRANCESCHI C, BONAFÈ M, VALENSIN S, OLIVIERI F, DE LUCA M, OTTAVIANI E, et al. Inflamm-aging: An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;908:244–54.
151. Lučičević A, McManus RM, Jankunec M, Rácz I, Dansokho C, Dalgéden E, et al. Soluble A β oligomers and protofibrils induce NLRP3 inflammasome activation in microglia. *J Neurochem*. 2020;155:650–61.
152. Deora V, Lee JD, Albornoz EA, McAlary L, Jagaraj CJ, Robertson AAB, et al. The microglial NLRP3 inflammasome is activated by amyotrophic lateral sclerosis proteins. *Glia*. 2020;68:407–21.
153. Paldino E, D'Angelo V, Sancesario G, Fusco FR. Pyroptotic cell death in the R6/2 mouse model of Huntington's disease: new insight on the inflammasome. *Cell Death Discov*. 2020;6(69):1–12.
154. Paldino E, Fusco FR. Emerging Role of NLRP3 Inflammasome/Pyroptosis in Huntington's Disease. *Int J Mol Sci*. 2022;23(8363):1–11.
155. Fu WY, Wang X, Ip NY. Targeting neuroinflammation as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease: Mechanisms, drug candidates, and new opportunities. *ACS Chem Neurosci*. 2019;10(2):872–9.



156. Liu CY, Wang X, Liu C, Zhang HL. Pharmacological Targeting of Microglial Activation: New Therapeutic Approach. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:1–19.
157. Henry CJ, Huang Y, Wynne A, Hanke M, Himler J, Bailey MT, et al. Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *J Neuroinflammation.* 2008;5(15):1–14.
158. Cankaya S, Cankaya B, Kilic U, Kilic E, Yulug B. The therapeutic role of minocycline in Parkinson's disease. *Drugs Context.* 2019;8:1–14.
159. Qie S, Ran Y, Lu X, Su W, Li W, Xi J, et al. Candesartan modulates microglia activation and polarization via NF- κ B signaling pathway. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2020;34:1–13.
160. Burstein AH, Sabbagh M, Andrews R, Valcarce C, Dunn I, Altstiel L. Slowing of Loss of Cognition in Mild Alzheimer's Disease. *J Prev Alzheimer's Dis.* 2018;5(2):149–54.
161. Kim C, Spencer B, Rockenstein E, Yamakado H, Mante M, Adame A, et al. Immunotherapy targeting toll-like receptor 2 alleviates neurodegeneration in models of synucleinopathy by modulating α -synuclein transmission and neuroinflammation. *Mol Neurodegener.* 2018;13(43):1–18.
162. Monnet E, Choy EH, McInnes I, Kobakhidze T, De Graaf K, Jacqmin P, et al. Efficacy and safety of NI-0101, an anti-toll-like receptor 4 monoclonal antibody, in patients with rheumatoid arthritis after inadequate response to methotrexate: A phase II study. *Ann Rheum Dis.* 2019;316–23.
163. Gocmez SS, Yazir Y, Gacar G, Demirtas Sahin T, Arkan S, Karson A, et al. Etanercept improves aging-induced cognitive deficits by reducing inflammation and vascular dysfunction in rats. *Physiol Behav.* 2020;224:1–9.
164. Butchart J, Brook L, Hopkins V, Teeling J, Püntener U, Culliford D, et al. Etanercept in Alzheimer disease. A randomized, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Neurology.* 2015;84(21):2161–8.
165. Jung YJ, Tweedie D, Scerba MT, Greig NH. Neuroinflammation as a Factor of Neurodegenerative Disease: Thalidomide Analogs as Treatments. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7(December):1–24.
166. Alam J, Blackburn K, Patrick D. Neflamapimod: Clinical Phase 2b-Ready Oral Small Molecule Inhibitor of p38 α to Reverse Synaptic Dysfunction in Early Alzheimer's Disease. *J Prev Alzheimer's Dis.* 2017;4:273–8.
167. Koch JC, Tatenhorst L, Roser AE, Saal KA, Tönges L, Lingor P. ROCK inhibition in models of neurodegeneration and its potential for clinical translation. *Pharmacol Ther.* 2018;189:1–21.
168. Lingor P, Weber M, Camu W, Friede T, Hilgers R, Leha A, et al. ROCK-ALS: Protocol for a Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Phase IIa Trial of Safety, Tolerability and Efficacy of the Rho Kinase (ROCK) Inhibitor Fasudil in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Neurol.* 2019;10(293):1–11.
169. Tönges L, Günther R, Suhr M, Jansen J, Balck A, Saal KA, et al. Rho kinase inhibition modulates microglia activation and improves survival in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Glia.* 2014;62(2):217–32.
170. Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17:588–606.
171. Li H, Guan Y, Liang B, Ding P, Hou X, Wei W, et al. Therapeutic potential of MCC950, a specific inhibitor of NLRP3 inflammasome. *Eur J Pharmacol.* 2022;928:1–9.
172. Deardorff WJ, Grossberg GT. Targeting neuroinflammation in Alzheimer's disease: evidence for NSAIDs and novel therapeutics. *Expert Rev Neurother.* 2017;17(1):17–32.

Si desea citar nuestro artículo:

La neurodegeneración desde un punto de vista holístico

José Clerigué Louzado y Olmo Martín-Cámara

An Real Acad Farm (Internet).

An. Real Acad. Farm.Vol. 89. nº 3 (2023) · pp. 327-364

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2023.89.03.07>

LA SOMBRA DE BUFFON: EN TORNO A LA ICONOGRAFÍA ZOOLOGICA DE LA BOTICA DEL HOSPITAL DE SAN JUAN BAUTISTA DE ASTORGA

BUFFON'S SHADOW: AROUND THE ZOOLOGICAL ICONOGRAPHY OF THE PHARMACY OF THE HOSPITAL OF SAN JUAN BAUTISTA DE ASTORGA

Joaquín Sánchez de Lollano¹, Manuel García-Espantaleón², Nuria Benítez-Prían³ y Antonio González-Bueno⁴

¹Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9203-7414>

²Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. ORCID: <https://orcid.org/0000-0006-6052-8327>

³Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3927-1145>

⁴Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1933-4620>

corresponding author: agbueno@ucm.es

ARTÍCULO DE REVISIÓN

RESUMEN

Presentamos un análisis de la iconografía zoológica perteneciente a la botica de San Juan Bautista de Astorga, conservada en el Museo de la Farmacia Hispana de la Universidad Complutense de Madrid. Aun cuando la construcción de la cajonería está fechada en el siglo XVIII, el análisis iconográfico pone de manifiesto que debió ser repintada, al menos parcialmente, en el segundo tercio del XIX.

ABSTRACT

We present an analysis of the zoological iconography belonging to the pharmacy of San Juan Bautista de Astorga, preserved in the Hispanic Pharmacy Museum of the Complutense University of Madrid. Even though the construction of the chest of drawers dates from the 18th century, iconographic analysis shows that it must be repainted, at least partially, in the second third of the 19th century.

Palabras Clave:

iconografía zoológica
Buffon
Astorga
Museo de la Farmacia Hispana (UCM)

Keywords:

zoological iconography
Buffon
Astorga
Hispanic Pharmacy Museum (UCM)



1. LA BOTICA DEL HOSPITAL DE SAN JUAN BAUTISTA DE ASTORGA

La construcción de la botica aneja al Hospital de San Juan Bautista, en Astorga (León), data de 1764; se levantó junto a la reconstrucción del antiguo hospital medieval, destruido tras el incendio acaecido en 1756. El nuevo edificio fue debido al empeño de Francisco Javier Sánchez Cabezón (1684-1767), obispo de Astorga entre la primavera de 1750 y el enero de 1767 (1).

De la construcción del nuevo hospital, cuya portada ostenta los escudos y sendas inscripciones laudatorias hacia su benefactor y al cabildo propietario del inmueble (2), se ocupó el arquitecto Gaspar López, maestro de obras de la Catedral. La 'casa de la botica', construida en piedra de sillería al gusto herreriano, se articuló sobre tres huecos de ventana y una portada; conservó su estructura original hasta mayo de 1984 en que fue totalmente remodelada en su interior (1, p. 70).

El primer regente en ocuparse del servicio de esta botica hospitalaria fue Jerónimo Fernández Ruiz; estuvo al frente del establecimiento entre 1772 y 1775 (1, p. 107); él —o un homónimo— ejerció en Madrid años después, fue admitido como miembro del Real Colegio de Boticarios de la Corte al final del verano de 1783 (03/09), en el que llegó a ocupar algunos cargos de responsabilidad (3); sus intereses no se decantan hacia el ámbito zoológico sino hacia el químico (4). Tampoco ninguno de sus sucesores al frente del establecimiento, hasta donde nos es conocido, se interesó por el estudio de la Zoología (1) (cf. Tabla 1).

Tabla 1. Boticarios regentes de la botica del Hospital de San Juan Bautista (Astorga) (1, p. 107-120).

Período	Boticario
1772-1775	Jerónimo Fernández Ruiz
1777-1782	Gregorio Hoyos
1782-1808	Jerónimo Fernández Salvador
1808-1823	Tomás Fernández Garrido
1823-1831	Blas García
1831-1840	Lorenzo Iglesias
1840-1847	Pedro María Barte
1847-1875	Felipe Fernández Valderrama
1875-1904	José Alonso y Alonso

La botica se dividía en siete estancias: zona de dispensación, rebotica, dos almacenes, un obrador, un desván y una pequeña biblioteca (5); se unía a estas un huerto empleado para el cultivo de plantas medicinales. El piso superior sirvió de estancia para la persona —y su familia— que su ocupara en cada momento del funcionamiento de la botica; disponía de una entrada

independiente. La botica sirvió al Hospital astorgano y a los pobres de la localidad hasta 1904, en que se decidió su cierre.

Tras dejar de estar operativa, el mobiliario y el botamen fueron adquiridos por un diputado a Cortes por el distrito de Astorga, residente en Boisán (6), quien lo transfirió al coleccionista astorgano Pablo Herrero; este volvió a venderlo —al menos parcialmente (7)— a un anticuario de Madrid, quien lo traspasó al Cabildo de la Catedral de Sigüenza. En los desvanes de aquella Catedral, desmontado, encontró Guillermo Folch Jou el mobiliario en 1939; él adquirió cuatro cuerpos que fueron ubicados en el Museo de la Farmacia Hispana (UCM). El conjunto fue intervenido, con fines de conservación y restauración, entre octubre de 2003 y octubre de 2004, por un equipo dirigido por Alicia Sánchez Ortiz (8). La disposición actual de las piezas quiere recordar a la original, pero no tenemos seguridad de que así fuera pues los elementos no fueron numerados en el desmontaje; Alicia Sánchez Ortiz (8, p. 19) plantea que el mal ajuste de algunos de los cajones en los muebles puede deberse a una ubicación incorrecta de estas piezas.

2. EL MOBILIARIO DE LA BOTICA ASTORGANA

Abel Lobato Fernández (2, p. 70-72) señala que el propio obispo Sánchez Cabezón dotó a la botica de mobiliario y botamen; lamentablemente nada parece conservarse de la colección de botes y tarros (9).

Los cuatro cuerpos del mobiliario instalado en el Museo de la Farmacia Hispana (UCM) (Figura 1) están trabajados en madera de pino policromada; todos parten de una base sobre la que se distribuyen tres pisos. Los laterales de estos muebles están decorados con figuras alternadas con motivos vegetales.

Sólo uno de los muebles (300 x 112 x 37 cm) carece de cajonería; este presenta, en su piso inferior, un espacio cerrado por dos puertas; el central queda conformado por un óvalo policromado decorado con motivos vegetales, con entrepaños, que permiten la disposición en cuatro estantes; el piso superior está dividido en tres calles, la central, con forma de hornacina, conserva una talla de san Juan Bautista niño sujetando el cordero que sirve de identificación al Hospital. En los inventarios decimonónicos figura como 'frente de redomas' y su utilidad era contener unas redomas de vidrio, con tapa azul, para jarabes, alcoholes y otros líquidos medicinales.

Dos de los muebles, concebidos para ser ubicados en una posición lateral (350 x 182 x 34 cm), presentan en su parte baja dos estanterías horizontales, con marco arquitectónico y columnas; un piso central, formado por una cajonera de 25 piezas (en filas y columnas de cinco); y uno superior distribuido en tres calles, la central con un óvalo policromado con tres entrepaños y, las dos laterales, con dos estantes en cada una de ellas. Las piezas rematan en un frontón decorativo con volutas.



Figura 1. Mobiliario de la botica del Hospital de San Juan Bautista (Astorga), en su ubicación actual. Museo de la Farmacia Hispana (UCM)

El mueble de mayor envergadura (380 x 536 x 38,5 cm) consta de cinco módulos; la parte inferior presenta nueve puertas sobre las que se disponen dos series de 16 cajones cada una; la zona central y las laterales del piso intermedio quedan organizadas a modo de óvalos, con tres entrepaños en cada uno de ellos, los otros dos espacios se corresponden con sendas hornacinas; entre las hornacinas y los óvalos se ubican dos series de cajones formadas por una veintena de piezas distribuidas en dos columnas. Sobre el módulo central, en una estructura similar a la del 'frente de redomas', se enclava una hornacina en la que se ubicado un san Juan Bautista con el cordero, simétrico al de aquella. Al menos en los años centrales del XIX, este mueble ocupaba el frente de la zona de la botica que daba paso a la rebotica (10).

En los cajones, la rotulata se dispone en tinta roja o negra, siempre sobre fondo blanco; todos incorporan una pieza de hierro a modo de tirador. En total se conservan 102 cajones; cada uno de ellos con una decoración frontal única; 71 incluyen diseños de animales, habitualmente más de uno en cada pieza, de modo que la cifra total de animales representados, reales o fantásticos, asciende a 110 iconografías diferentes; en algunos de estos cajones, los animales interaccionan entre sí, en otros aparecen junto a figuras

humanas. En el resto de los cajones se representan paisajes, tanto rurales como urbanos, y algunas figuras humanas, entre ellas un boticario árabe con un mortero (Figura 2).

Buena parte de la decoración de estos cajones simboliza animales exóticos: elefante, rinoceronte, foca, tigre, camello, león, etc. Pero, también, encontramos animales comunes en la Península como toro, ciervo, perro, burro, etc.; algunos de ellos en más de una ocasión, como un perro o un gato blancos, que aparecen en un par de representaciones (tabla 2).

El autor o autores de la iconografía zoológica que ilustra la botica no es conocido. Abel Lobato (2, p. 70-72) remite a algún taller o artista de cierta calidad y recuerda que, por esas fechas, Francisco José Terán ya trabajaba para el cabildo astorgano (11); él fue quien se encargó de amueblar y decorar la sacristía de la Catedral de Astorga, dotándola de un programa iconográfico doctrinal, dentro de una estética rococó, presente en buena parte del mobiliario durante el reinado de Carlos III (12). Aun cuando la estética sea similar, la mano de Francisco José Terán parece bien distinta de la que se ocupó de la cajonería de la botica astorgana.



Figura 2. Cajonería de la botica del Hospital de San Juan Bautista [detalle] (Astorga) Museo de la Farmacia Hispana (UCM)

3. LAS DECORACIONES ANIMALES EN LAS BOTICAS HISPANAS

El empleo de iconografía zoológica en las boticas hispanas del final del período ilustrado es más común de lo que, en principio, pudiera parecer. Buena parte de las pinturas de lo que fuera la rebotica y los armarios de la botica de Santa María la Real de Nájera, coetánea a la que nos ocupa, presenta este mismo tipo de decoración.

El gusto por las pequeñas escenas del mundo zoológico está presente en la Europa de siglos anteriores; baste pensar en las que el amberino Jan van Kessel 'el viejo' (1626-1676) representó en *Las Cuatro Partes del Mundo* (13) y que, en el fondo, nos retrotraen a los gabinetes de las maravillas (*Wunderkammer*) en los que estaban insertas las boticas, dedicadas a la puesta en el mercado de productos exóticos destinados a procurar la salud (14).

4. LA ICONOGRAFÍA DE LOS ANIMALES EN LA BOTICA ASTORGANA DEL HOSPITAL DE SAN JUAN BAUTISTA

Como en el mundo zoológico descrito por Jan van Kessel 'el viejo', en la decoración de la botica de Astorga se entremezclan desde ataques agresivos entre fieras hasta fábulas cómicas y meras fantasías. Lecturas iconográficas que el boticario, versado en este arte literario, sabría comprender. ¿Dónde buscar las hojas de *Scrophularia aquatica* L. mejor que en un cajón que recuerde un fondo marino [MFH-3654] (Figura 3)? ¿Dónde conservar el 'emplasto de ranas con mercurio' mejor que en una caja cuyo frente quede identificado por las propias ranas [MFH-3589] (Figura 4)? ¿recordaría el pesado rinoceronte la utilidad de las hojas del ajeno

[*Artemisia absinthium* L.] para vencer la 'pesadez' de estómago [MFH-3656]? ¿aludirá el mitológico dragón de cuya boca sale fuego al efecto de *Parietaria officinalis* L. para aliviar quemaduras [MFH-3624]? Los ejemplos podrían multiplicarse hasta la saciedad, de modo que, aunque una primera impresión —con nuestra mirada actual— no encuentre la metáfora aludida, la iconografía cobra un cierto sentido en la mentalidad de un boticario de la segunda mitad del XVIII, para cuyo uso estaban dedicadas estas cajoneras.

La Zoología, como el resto de las materias que componen la Historia Natural, permitía en pleno período ilustrado abrirse a la modernidad sin menoscabar los fundamentos tradicionales del catolicismo (15); el obispo de Barcelona, Pedro Díaz de Valdés (1740-1807), lo manifestó, en febrero de 1791, en su *Discurso sobre la Historia Natural*. . . :

"Yo miro las producciones de la naturaleza y de el arte, como unos testigos de el poder y de la bondad de Dios, y de la industria de mis semejantes, y como unos fiscales del hombre estúpido é ingrato, que sin dar oídos á la razon, goza estos objetos, como irracional que los devora, sin pararse á meditar, ni mejorar las materias que sirven á satisfacer sus necesidades. . ." (16, p. 9).

De las 110 representaciones zoológicas (Tabla 2), un total de 37 se corresponden con animales domésticos: perros (14), bovinos (7), pequeños rumiantes (6), burros (3), gatos (3) y caballos (3); otros 52 ilustran animales silvestres: aves (17), peces y crustáceos (15), cérvidos (8), pequeños mamíferos (6) y anfibios (3); las 21 iconografías restantes se corresponden con animales mitológicos o exóticos: elefante, león (Figura 5), camélidos, monos, tigres, osos marinos, rinoceronte, avestruz, jirafa. . . y algún dragón (Figura 6).

Tabla 2. Enumeración de los animales representados en la cajonería de la botica del Hospital de San Juan Bautista de Astorga (ca. 1)

Cajón	Nombre común	Nombre científico
MFH-3577	Ave	---
MFH-3578	Perro	<i>Canis familiaris</i> Linnaeus, 1758
MFH-3579	Ave	---
MFH-3580	Pavo salvaje	<i>Meleagris gallopavo</i> Linnaeus, 1758
	Ave	---
MFH-3581	Perro	<i>Canis familiaris</i> Linnaeus, 1758
	Liebre europea	<i>Lepus europaeus</i> Pallas, 1778
MFH-3582	Aves	---
MFH-3585	Cigüeña blanca	<i>Ciconia ciconia</i> Linnaeus, 1758
	Oca común	<i>Anser anser</i> Linnaeus, 1758
MFH-3588	Cisne	<i>Cygnus</i> Bechste Ain, 1803
MFH-3589	Ranas	<i>Rana</i> Linnaeus, 1758
MFH-3590	Aves	---
MFH-3591	Peces	---
MFH-3592	Puercoespín europeo	<i>Hystrix cristata</i> L. 1758
	Erizo común	<i>Erinaceus europaeus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3593	Peces	---
MFH-3594	Pavo real	<i>Pavo cristatus</i> Linnaeus, 1758
	Ave	---
MFH-3595	Perro	<i>Canis familiaris</i> Linnaeus, 1758
	Cabra	<i>Capra aegagrus hircus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3596	Gato	<i>Felis silvestris catus</i> Schreber, 1775
	Animales sin identificar	---
MFH-3602	Dromedario	<i>Camelus dromedarius</i> Linnaeus, 1758
MFH-3603	Elefante	<i>Elephantidae</i> Gray, 1821
MFH-3605	Garza	<i>Ardeidae</i> Leach, 1820
MFH-3606	Felino	<i>Felidae</i> Fischer, 1817
MFH-3607	Gato	<i>Felis silvestris catus</i> Schreber, 1775
MFH-3612	Perros	<i>Canis familiaris</i> Linnaeus, 1758
	Cabras	<i>Capra aegagrus hircus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3616	Cabra	<i>Capra aegagrus hircus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3617	León	<i>Panthera leo</i> Linnaeus, 1758
MFH-3620	Caballo	<i>Equus ferus caballus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3621	Perro	<i>Canis familiaris</i> Linnaeus, 1758
	Bovino	<i>Bovidae</i> Gray, 1821
MFH-3622	Vaca	<i>Bos taurus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3623	Vaca	<i>Bos taurus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3624	Dragón	---
MFH-3625	Castores	<i>Castor</i> Linnaeus, 1758
MFH-3627	Oso pardo	<i>Ursus arctos</i> Linnaeus, 1758
MFH-3628	Elefante	<i>Elephantidae</i> Gray, 1821
MFH-3629	Oso marino	<i>Callorhinus ursinus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3630	Duc de canillas rojas	<i>Pygathrix nemaeus</i> Linnaeus, 1771
	Primate	---



MFH-3631	Ungulado	---
MFH-3632	Jirafa	<i>Giraffa camelopardalis</i> Linnaeus, 1758
MFH-3634	Lince	<i>Lynx</i> Kerr, 1792
MFH-3636	Peces	---
MFH-3637	Camello bactriano	<i>Camellus bactrianus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3639	Vaca	<i>Bos taurus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3640	Perro de Irlanda	<i>Canis familiaris</i> Linnaeus, 1758
MFH-3644	Gamos	<i>Dama dama</i> Linnaeus, 1758
MFH-3645	Ciervo común	<i>Cervus elaphus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3646	Ñu negro	<i>Connochaetes gnou</i> Zimmermann, 1780
	Primate	<i>Primates</i> Linnaeus, 1758
MFH-3647	Vaca	<i>Bos taurus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3648	Perro	<i>Canis familiaris</i> Linnaeus, 1758
MFH-3649	León	<i>Panthera leo</i> Linnaeus, 1758
	Avestruz	<i>Struthio camelus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3650	Perro	<i>Canis familiaris</i> Linnaeus, 1758
MFH-3651	Vaca	<i>Bos taurus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3652	Perro	<i>Canis familiaris</i> Linnaeus, 1758
MFH-3653	Oveja	<i>Ovis orientalis aries</i> Linnaeus, 1758
MFH-3654	Cabracho	<i>Scorpaena scrofa</i> Linnaeus, 1758
	Crustáceo	<i>Crustacea</i> Brünnich, 1772
MFH-3655	Burro	<i>Equus africanus asinus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3656	Rinoceronte indio	<i>Rhinoceros unicornis</i> Linnaeus, 1758
MFH-3658	Burro	<i>Equus africanus asinus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3660	Tigre	<i>Panthera tigris</i> Linnaeus, 1758
MFH-3661	Perro	<i>Canis familiaris</i> Linnaeus, 1758
MFH-3662	Ciervo común	<i>Cervus elaphus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3663	Burro	<i>Equus africanus asinus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3664	Perro	<i>Canis familiaris</i> Linnaeus, 1758
MFH-3665	Roedores	<i>Rodentia</i> Bowdich, 1821
MFH-3666	Vaca	<i>Bos taurus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3667	Caballo	<i>Equus ferus caballus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3668	Dromedario	<i>Camelus dromedarius</i> Linnaeus, 1758
MFH-3669	Elefante	<i>Elephantidae</i> Gray, 1821
	Ciervo común	<i>Cervus elaphus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3670	Oso pardo	<i>Ursus arctos</i> Linnaeus, 1758
	Cabra	<i>Capra aegagrus hircus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3672	Ciervo común	<i>Cervus elaphus</i> Linnaeus, 1758
MFH-3675	León	<i>Panthera leo</i> Linnaeus, 1758
MFH-3676	Animales sin identificar	---
MFH-3677	Armadillo	<i>Dasypodidae</i> Gray, 1821.
MFH-3678	Aves	---

**Buffon's shadow: around the zoological iconography of the pharmacy
of the hospital of San Juan Bautista de Astorga**

Joaquín Sánchez de Lollano, Manuel García et al.

An. Real Acad. Farm.Vol. 89. nº 3 (2023) · pp. 365-377



Figura 3. Scrophul. Aq. [*Scrophularia aquatica* L.] [MFH-3654]



Figura 4. E. Ran. C. M. [Emplasto de ranas con mercurio] [MFH-3589]



Figura 5. Centaur. M. [*Centaurium majus* Zeitner] [MFH-3675]



Figura 6. Parietaria [*Parietaria officinalis* L.] [MFH-3624]



Figura 7. Absinthium [*Artemisia absinthium* L.] [MFH-3656]

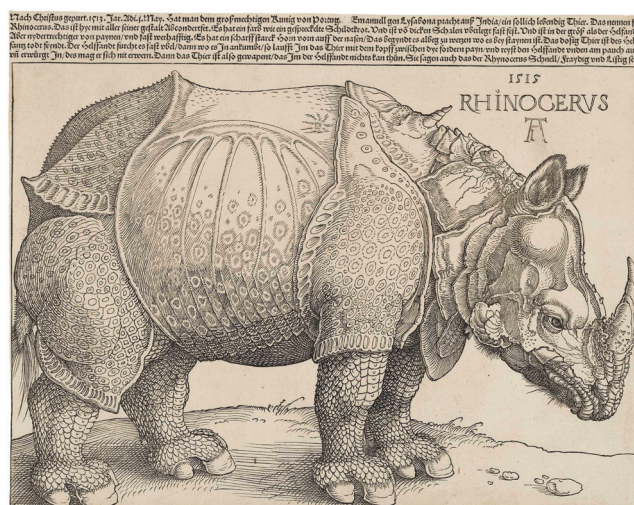


Figura 8. Alberto Durer, xilografado, 1515

No es fácil señalar la procedencia de la que los artistas dedicados a decorar la cajonería de la botica astorgana obtuvieron las imágenes empleadas para su ilustración; tampoco parece que fuera obra de un solo autor; la diferente calidad de las imágenes parece remitir a un taller.

Una primera aproximación llevaría a pensar que los pintores emplearan algunas de las obras de carácter enciclopédico que gozaron de amplia difusión en la España ilustrada, tal el *Espectaculo de la naturaleza...* del abad Noël-Antoine Pluche (1688-1761), traducido al castellano por el padre Esteban de Terreros y Pando (1707-1782), cuyos dos primeros tomos quedan dedicados al mundo animal (17) o la *Histoire naturelle, générale et particulière...* de Georges-Louis Leclerc, conde de Buffon (1707-1788) (18); pero también láminas impresas, narraciones ilustradas de viajes o cualesquiera otros tratados de Historia Natural de los que el artista -o su taller- pudieran disponer.

La escasez de modelos animales vivos, especialmente los de origen exótico, debió llevar a los ilustradores a inspirarse en estos textos enciclopédicos o en compendios de imágenes; la observación directa del animal rara vez fue posible —salvo en los domésticos— por lo que los modelos resultaban copiados una y otra vez, en cada ocasión más deformados en lo que a su similitud con el original respecta. Buena parte de los rinocerontes —y el de la botica de Astorga no es una excepción (Figura 7)—, recuerdan la imagen canónica (Figura 8) que de él nos ofreció Alberto Durero (Albrecht Dürer; 1471-1528).

Otras iconografías se muestran concordantes con la primera edición de la *Histoire naturelle...* del conde de Buffon; tal la representación de un ciervo [MFH-3645] (Figura 9), una ilustración de Jacques de Sève (*fl.* 1742-1788), repetida en ediciones sucesivas (Figura 10) (19).



Figura 9. Virga. Aur. [*Solidago virgaurea* L.] [MFH-3645]



Figura 10. Le Cerf (20, 6: tab. IX)



Figura 11. Verbena [*Verbena officinalis* L.] [MFH-3630]



Figura 12. Le Douc (21, 2(7): lam. 24)

No obstante, la mayor parte de los elementos decorativos de la botica astorgana se corresponden con imágenes posteriores a la fecha señalada como de inicio de su actividad (1772); es el caso de algunas iconografías de la *Histoire naturelle... del conde de Buffon*, editada al cuidado de Étienne de Lacépède (1756-1825), con ilustraciones de Jean Louis Charles (1759-ca. 1824) (21); tal el cajón para conservar plantas de *Verbena officinalis* L. [MFH-3630] (Figura 11) donde se representa un simio bajo el nombre de 'Le Douc' (Figura 12), una rareza de la Conchinchina hoy extinta.

De comienzos del XIX data el grabado de John Scott (1749-1833), sobre dibujo de Philipp Reinagle (1749-1833): 'An Irish greyhound standing in a mountainous landscape', cuya edición príncipe fue impresa en London (Ivy Lane): James Cundee, Albion Press, 01/06/1804 (Wellcome Library, 40920i) (Figura 13), luego reiteradamente utilizado, y que no dudamos en identificar con la iconografía del cajón rotulado como 'Aliana Centauriam' (Figura 15).

Este mismo grabado fue reimpresso en la edición, en nueve volúmenes, de las *Oeuvres complètes de Buffon avec les supplements...* (Figura. 14), salida de los tórculos parisinos de P. Duménil entre 1835 y 1836 (22); a esta edición corresponde, también, la iconografía de una familia de castores (Figura. 16), que ilustran el cajón destinado a *Artemisia absinthium* L. (MFH-3625) (Figura 17), el camello (Figura 18) que identifica el cajón de 'Parietaria' [*Parietaria officinalis* L.] (MFH-3637) (Figura 19), el elefante (Figura 20) del cajón destinado a los tallos de plantas de 'Equisetum' [*Equisetum arvense* L.] [MFH-3628] (Figura 21), la jirafa (Figura 22) del cajón donde habrían de guardarse las plantas de *Sanguisorba officinalis* L. [MFH-3632] (Figura 23) o los osos marinos (Figura 24) con los que se ilustra el cajón destinado a *Teucrium chamaedrys* L. [MFH-3629] (Figura 25). Y estos no son los únicos ejemplos.



Figura 13. Irish Greyhound (Wellcome Library, 40920i)



Figura 14. Le chien d'Irlande (22. 5: lám. 15)

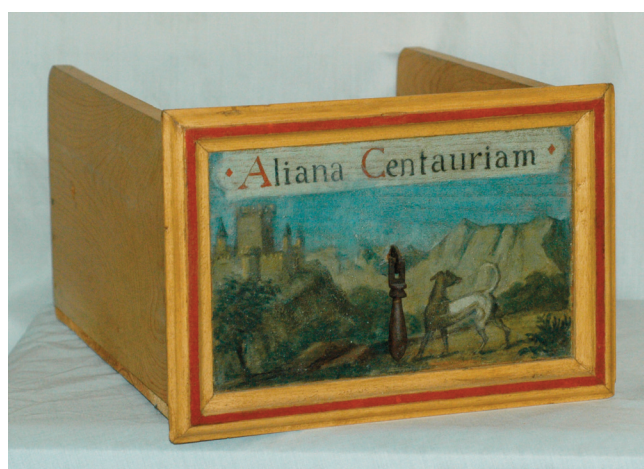


Figura 15. Aliana Centauriam [MFH-3640]

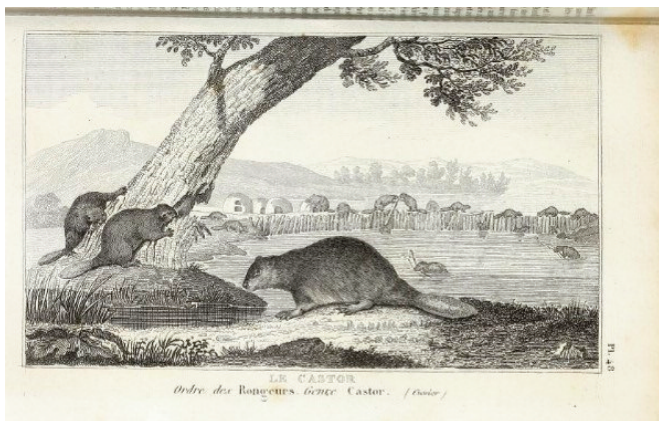


Figura 16. Le castor (22, 5: lám. 48)



Figura 17. Absinthium [*Artemisia absinthium* L.] [MFH-3625]

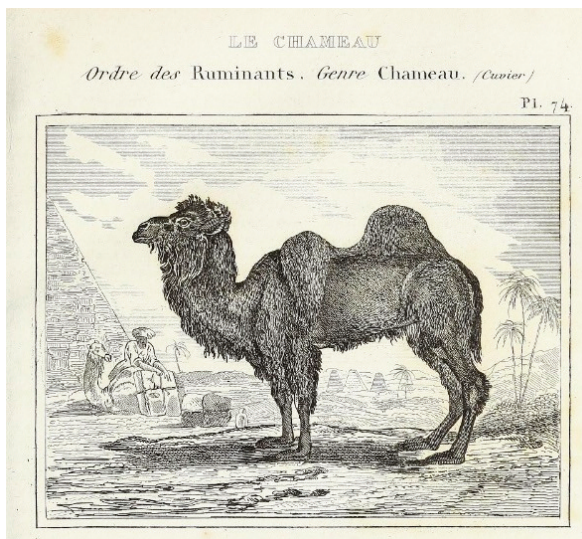


Figura 18. Le chameau (22, 6: lám. 74)



Figura 19. Parietaria [*Parietaria officinalis* L.] [MFH-3637]

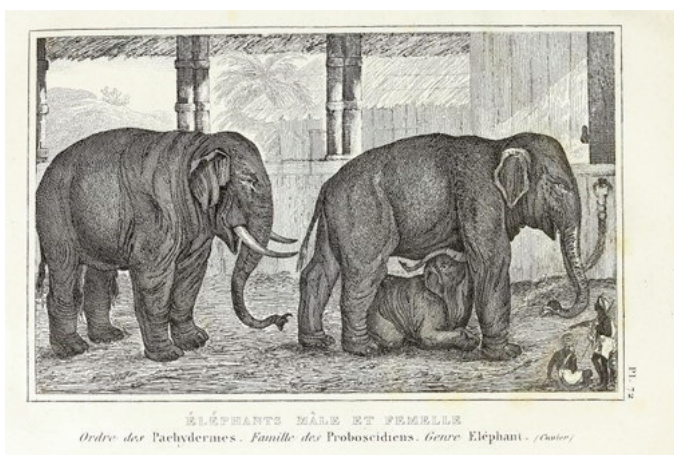


Figura 20. Éléphants (22, 6: lám. 72)

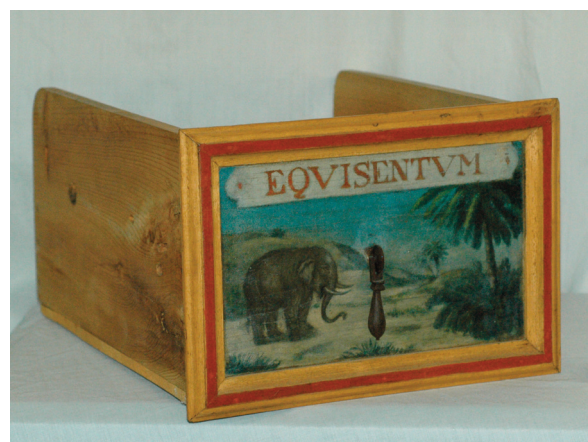


Figura 21. Equisetum [*Equisetum arvense* L.] [MFH-3628]

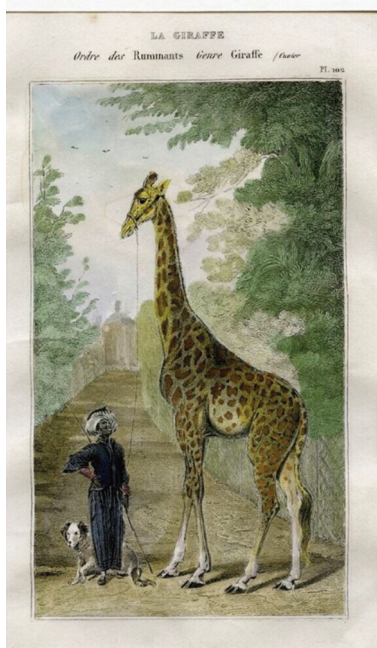


Figura 22. La Giraffe (22, 6, lám. 102)



Figura 24. L'Ours marine (22, 6, lám. 147)

5. COROLARIO

Aun cuando la cajonería de la botica del Hospital de San Juan Bautista de Astorga podría corresponder al último cuarto del siglo XVIII; el análisis de su iconografía pone en evidencia que, al menos parcialmente, debió ser repintada en la primera mitad del siglo XIX, probablemente entre 1836 y 1856, ya que buena parte de sus imágenes se corresponden con los grabados de la edición de las *Oeuvres complètes de Buffon*. . . publicados por la imprenta parisina de P. Dumenil, entre 1835 y 1836. Por otro lado, a partir de 1856, disponemos de cuentas propias de la botica, separadas de la del Hospital, y en ellas no se menciona pago alguno por estas reformas.

Pensamos que la elección de las imágenes no es aleatoria frente al contenido que indica la cartela; más bien responden a un



Figura 23. Pinpinela [*Sanguisorba officinalis* L.] [MFH-3632]

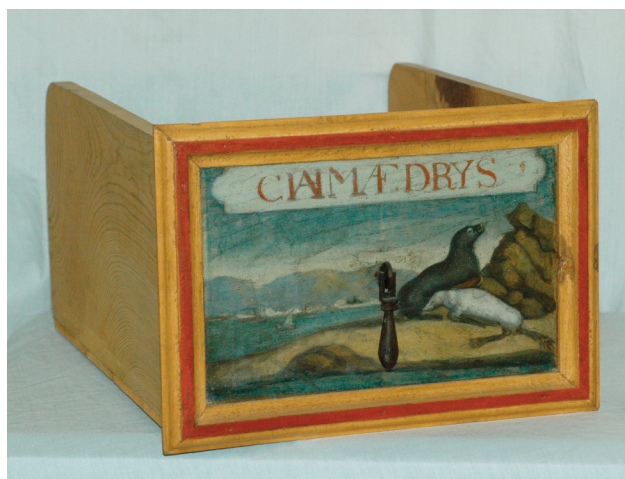


Figura 25. Chamaedrys [*Teucrium chamaedrys* L.] [MFH-3629]

programa iconográfico 'oculto' tras un lenguaje metafórico que el boticario debería conocer y del que, a lo largo del texto, hemos expuesto algunos ejemplos al respecto.

Agradecimientos

Esta publicación es parte del proyecto I + D + i PID2020-112514GB-C-21, financiada por AEI/10.13039/501100011033.

6. REFERENCIAS

1. "EN TROPHEUM ET ARMA D. AP. ECC. CATHED ASTUR. CAPITULI UNICI ET IN SOLIDUM HUIUS HOSPITALIS PATRONUS". La leyenda se presenta sobre dos cornucopias en las que se apoyan sendos niños desnudos (Lobato Fernández A. Promoción artística, cultural



- y mentalidad de un obispo asturicense: don Francisco Javier Sánchez Cabezón (1684-1767). [Trabado final del Máster universitario en Estudios Avanzados de Historia Moderna 'Monarquía de España' siglos XVI-XVIII, dirigido por Julio J. Polo Sánchez]. Santander: Facultad de Filosofía y Letras. Universidad de Cantabria 2012 [cf. p. 64].
2. Desempeñó los puestos de tesorero (1791), contador (1793, 1805-1806) y diputado primero (1794). Falleció en 13/04/1816 (Roldán Guerrero R. Diccionario biográfico y bibliográfico de autores farmacéuticos españoles. Madrid: Imprenta del PHOE 2, p. 214. 1975).
 3. Para su ingreso en el Real Colegio de Farmacéuticos de Madrid presentó una Disertación sobre la manteca de antimonio y su cinabrio, fechada el 08/11/1783, que se conserva, manuscrita, [7] h., [1] h. pleg.; 20,2 x 14,3 cm, en la Biblioteca de la Real Academia Nacional de Farmacia, B-18-72.
 4. Algunos de estos libros han sido localizados en la biblioteca del Archivo Diocesano de Astorga; se trata de obras del siglo XIX (1, p. 101).
 5. Tradicionalmente se ha considerado que este comprador fue Julio 'el cuarenta vacas' (1, p. 138; 2, p. 70); pero, en el Congreso de los Diputados, la representación por el distrito de Astorga, en las elecciones del 16/04/1899 (Archivo del Congreso de los Diputados, Electoral, 113/25), del 19/05/1901 (Ibid., 115/25) y del 30/05/1903 (Ibid., 117/25) corrió a cargo de Adolfo Rodríguez de Cella y Martínez, nacido en Boisán (León), el 27/12/1867, y que asumió este cargo hasta el final de esta última legislatura, el 17/08/1905.
 6. Santiago Herrero Crespo (n. 1903), hijo de Pablo Herrero, recordaba en los años centrales de la década de 1990, en conversaciones con María Victoria Fernández Fernández, cómo el traslado realizado a Madrid había sido incompleto: "no sin dejar en el almacén algunos de los cajones de la botica, que luego permanecieron allí durante bastantes años" (1, p. 138).
 7. Sánchez Ortiz A. 2005. Intervención de conservación y restauración en la colección de piezas de maderas policromada del Museo de la Farmacia Hispana de la Universidad Complutense de Madrid. [Madrid: mecanografiado] 2005. 303 h. Museo de la Farmacia Hispana (UCM).
 8. Este botamen debió desaparecer pronto; en los inventarios disponibles, todos ellos contruidos durante el siglo XIX, se alude a botes de Talavera ornados con el escudo de la Compañía de Jesús (1, p. 97).
 9. Así consta en los 'Inventarios de los medicamentos' correspondientes a los años 1847 y 1875 conservados en el archivo catedralicio de Astorga (1, p. 95).
 10. Este artista protocolizó la escritura para el nuevo Monumento que el Cabildo quería realizar en la Catedral astorgana el 05/11/1763 (González García MÁ. José Francisco Terán, polifacético arquitecto de la catedral de Astorga en el siglo XVIII. Astórica 2011, 28(30): 95-132).
 11. Morais Vallejo E. (2020). El amueblamiento de la sacristía de la catedral de Astorga a finales del siglo XVIII. In: Vasconcelos e Sousa G. (coord.) Actas do II Congresso Ibero-Americano de História do Mobiliário. Porto: Universidade Católica (Porto). Centro de Investigação em Ciência e Tecnologia das Artes (EA-UCP) pp. 17-33.
 12. Sobre el impacto de esta obra de Jan van Kessel 'el viejo' —y otras similares— en la cultura europea cf. Findlen P. Possessing Nature: Museums, Collecting, and Scientific Culture in Early Modern Italy. Berkeley: University of California Press 1994 y Baaj N. Monstrous Creatures and Diverse Strange Things: The Curious Art of Jan Van Kessel the Elder (1626-1679). An Arbor: University of Michigan 2022; Ibid. Sketches of Simians and Savages on the Versos of Jan van Kessel's Cooper Plates. Boletín del Museo del Prado 2022, 30(48): 72-83. entre otros.
 13. Baratas Díaz A, González Bueno A. De gabinete a 'science center': 500 años de coleccionismo en Historia Natural. Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural 2013, 11 [2ª época]: 9-25.
 14. Morgado García A. La Historia Natural en la prensa finidieciochesca: la visión del mundo animal. Cuadernos Dieciochistas 2013, 14; 339-365.
 15. Díaz de Valdés P. Discurso sobre la Historia Natural con respecto á Cataluña. Escríbale en febrero de 1791... In: Díaz de Valdes P. Tratados sobre la física del clero y otros puntos útiles y provechosos de las ciencias naturales. Barcelona: En la Oficina de Manuel Texero 1806 pp. 1-62, Sobre el pensamiento de Pedro Díaz de Valdés, en lo que a la Historia Natural respecta, cf. Ordaz J. Pedro Díaz de Valdes (1740-1807) y el estudio de las ciencias naturales. Cuadernos de Estudio del Siglo XVIII 2005, 15: 159-173.
 16. Pluche NA. Espectáculo de la naturaleza, o Conversaciones a cerca de las particularidades de la historia natural que han parecido mas a propósito para excitar una curiosidad útil y formarles la razon à los Jovenes Lectores. Escrito en el Idioma Francès por el Abad M. Pluche; y traducido al castellano por el P. Estevan de Terreros y Pando... En Madrid: En la Oficina de D. Gabriel Ramírez 1753-1755. La obra consta, en su primera edición, de dieciséis volúmenes; del éxito de la empresa da cuenta la segunda edición (Madrid: Joaquín Ibarra, 1756-1758). Sobre Esteban de Terreros y Pando cf. Larrazábal Basáñez S, Gallastegui C. (coord.) Esteban de Terreros y Pando: vizcaíno, polígrafo y jesuita. III Centenario: 1707-2007. Bilbao: Universidad de Deusto 2008.



17. Los 36 volúmenes que componen la Histoire naturelle... del conde de Buffon salieron de las prensas parisinas de la Imprimerie Royale siguiendo la siguiente cadencia: 1749: 'De la manière d'étudier l'histoire naturelle suivi de la Théorie de la Terre', 'Histoire générale des animaux' et 'Histoire naturelle de l'homme', 3 vol.; 1753-1767: 'Les quadrupèdes', 12 vol.; 1770-1783: 'Les oiseaux', 9 vol.; 1783-1788: 'Les minéraux', 5 vol.; 1774-1789: 'Suppléments', 7 vol. Los 21 volúmenes que componen la traducción al castellano, realizada por José Clavijo y Fajardo (1726-1806) salieron de tórculos, bajo el sello madrileño de la Imprenta de la Viuda de Ibarra, entre 1791 y 1805 (Llorca J. Buffon en España. La influencia en España de las ideas científicas del naturalista Georges Louis Leclerc, conde de Buffon. [Tesis doctoral dirigida por Horacio Capel Sáez]. Barcelona: Universitat de Barcelona, 1989).
18. Entre otras, en la p. 64 (lam. 1) del volumen 7 [1769], de la Histoire naturelle générale et particulière [Nouvelle Edition]. París: De L'Imprimerie Royale, 1769-1770.
19. Buffon, conde de [Georges-Louis Leclerc] L'Histoire naturelle, générale et particulière, avec la description du Cabinet du Roi... A Paris : a l'Imprimerie Royale 1749-1804. 36 vol.
20. Buffon, conde de [Georges-Louis Leclerc]. Histoire naturelle...; dédié au citoyen Lacepede... [Nouvelle éd., revue et continuée par M. Lacepede]. A Paris : P. Didot l'ainé et Firmin Didot, an VI [1798] - an XII [1804]. 74 vol.
21. Buffon, conde de [Georges-Louis Leclerc]. Oeuvres complètes de Buffon, avec les suppléments, augmentées de la classification de G. Cuvier... Et accompagnées de 700 vignettes gravées sur acier, représentant au moins 900 animaux. Paris : P. Duménil. [Typographie de Firmin Didot frères] 1835-1836. 9 vols.

Si desea citar nuestro artículo:

La sombra de Buffon: en torno a la iconografía zoológica de la botica del hospital de San Juan Bautista de Astorga

Joaquín Sánchez de Lollano, Manuel García,
Nuria Benítez y Antonio González-Bueno

An Real Acad Farm (Internet].

An. Real Acad. Farm.Vol. 89. nº (2023) · pp. 365-377

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2023.89.03.08>

EPISTEMOLOGÍA Y ONTOLOGÍA EN CIENCIA: EL RETO DE LA INTELIGENCIA ARTIFICIAL

EPISTEMOLOGY AND ONTOLOGY IN SCIENCE: THE CHALLENGE OF ARTIFICIAL INTELLIGENCE

Santiago Cuéllar Rodríguez

Académico correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8099-9226>

corresponding author: santiago.cuellar.rodriguez@gmail.com

ARTÍCULO DE REVISIÓN

RESUMEN

La brecha entre predictibilidad y comprensibilidad amenaza todo el proyecto científico porque los modelos matemáticos de los procesos, alimentados por enormes cantidades de datos de origen muy diverso, proporcionan resultados excepcionalmente precisos pero, al mismo tiempo, ocultan la explicación de los procesos. El conocimiento de “qué sabemos” de la ontología es tan relevante en ciencia como el de “cómo sabemos” y el de “cuánto sabemos” de la epistemología. La inteligencia artificial (IA) implica la comprensión científica de los mecanismos que subyacen al pensamiento y la conducta inteligente, así como su encarnación en máquinas capacitadas por sus creadores de razonar en un sentido convencional. Su formulación “débil” se refiere al empleo de programas informáticos complejos, diseñados con el fin de complementar o auxiliar el razonamiento humano para resolver o completar complejos problemas de cálculo, de mantenimiento de sistemas, de reconocimiento de todo tipo de imágenes, de diseño, de análisis de patrones de datos, etc., muchos de los cuales serían prácticamente inabordables mediante procedimientos convencionales; pero todo ello sin incluir capacidades sentientes o éticas humanas, que sí serían objeto de una — por ahora — inexistente IA “fuerte”, aquella que igualaría o incluso excedería la inteligencia sentiente humana. La vulgarización de la IA “generativa”, desarrollada para crear contenido — texto, imágenes, música o vídeos, entre otras muchas áreas — a partir de información previa, está contribuyendo a consolidar popularmente la idea errónea de que la actual IA excede el razonamiento a nivel humano y exagera el riesgo de transmisión de información falsa y estereotipos negativos a las personas. Los modelos de lenguaje de la inteligencia artificial no funcionan emulando un cerebro biológico sino que se fundamentan en la búsqueda de patrones lógicos a partir de grandes bases de datos procedentes de fuentes diversas, que no siempre están actualizadas ni depuradas de falsedades, de errores ni de sesgos conceptuales o factuales, tanto involuntarios como interesados. Y la IA empleada en ciencia no es ajena a estas limitaciones y sesgos. Una cuestión particularmente sensible es la posibilidad de utilizar la IA generativa para redactar o incluso inventarse artículos científicos que llegan a pasar desapercibidos por los revisores por pares de las revistas científicas más prestigiosas del mundo, apuntando a un problema más aún profundo: los revisores por pares de las revistas científicas a menudo no tienen tiempo para revisar los manuscritos a fondo en busca de señales de alerta y, en muchos casos, además carecen de recursos informáticos adecuados y formación especializada.

ABSTRACT

The gap between predictability and comprehensibility threatens the entire scientific project because mathematical models of processes, fed by enormous amounts of data of very diverse origin, provide exceptionally precise results but, at the same time, hide the explanation of the processes. The knowledge of “what we know” of ontology is as relevant in science as that of “how we know” and “how much we know” of epistemology. Artificial intelligence (AI) involves the scientific understanding of the mechanisms underlying intelligent thought and behavior, as well as their embodiment in machines trained by their creators to reason in a conventional sense. Its “weak” formulation refers to the use of complex computer programs, designed with the purpose of complementing or assisting human reasoning to solve or complete complex problems of calculation, system maintenance, recognition of all types of images, design, analysis of data patterns, etc., many of which would be practically unapproachable using conventional procedures; but all this without including human sentient or ethical capabilities, which would be the subject of a — at the moment — non-existent “strong” AI, that would equal or even exceed human sentient intelligence. The popularization of “generative” AI, developed to create content — text, images, music or videos, among many other areas — from previous information, is helping to popularly consolidate the erroneous idea that current AI exceeds reasoning human level and exacerbates the risk of transmitting false information and negative stereotypes to people. The language models of artificial intelligence do not work by emulating a biological brain but are based on the search for logical patterns from large databases from diverse sources, which are not always updated or purged of falsehoods, errors or errors. conceptual or factual biases, both involuntary and self-serving. And the AI used in science is no stranger to these limitations and biases. A particularly sensitive issue is the possibility of using generative AI to write or even invent scientific articles that go unnoticed by the peer reviewers of the most prestigious scientific journals in the world, pointing to an even deeper problem: peer reviewers. Reviewers often do not have the time to review manuscripts thoroughly for red flags and, in many cases, they also lack adequate computing resources and specialized training.

Palabras Clave:

ontología
epistemología
método científico
inteligencia artificial
predictibilidad
comprensibilidad

Keywords:

ontology
epistemology
scientific method
artificial intelligence
predictability
understandability



1. INTRODUCCIÓN

Llamamos epistemología a la rama de la filosofía dedicada al estudio de la naturaleza, las fuentes y los límites del conocimiento: qué es, cómo se produce, qué podemos conocer, etc. Responde a la necesidad de comprender racionalmente en qué se basan y cuál es el grado de confianza en nuestras convicciones profundas y cuáles son las limitaciones de tal confianza, impuestas por la evidencia empírica y por la razón; en definitiva, por qué y en qué grado estamos convencidos lo que estamos convencidos.

En ciencia los valores epistémicos son las propiedades de una hipótesis, teoría o convicción que son indicativas de su veracidad y que están directamente vinculados con la búsqueda del conocimiento; por ello, tienen que ver con aspectos tan relevantes como la exactitud, la consistencia, el alcance, la simplicidad, la objetividad, la reducción de errores, la eficacia, la robustez, el poder predictivo, la novedad, la aplicabilidad, la uniformidad ontológica, el poder explicativo y la coherencia externa, entre otros.

Hace algún tiempo revisamos (1) algunos aspectos de la epistemología, especialmente con relación a qué valor tienen, cómo se generan y cómo se validan los conocimientos proporcionados por la medición en la ciencia. Decíamos entonces que la brecha entre predictibilidad y comprensibilidad amenaza con volar por los aires todo el proyecto científico debido a que parece que hemos llegado a un límite en el que la comprensión y la predicción se están desalineando (2), entre otros motivos porque el crecimiento exponencial del “big data” y, muy particularmente, de la inteligencia artificial (IA) está acrecentando esa brecha entre predictibilidad y comprensibilidad. Los modelos matemáticos, alimentados por monstruosas cantidades de datos de origen muy diverso, proporcionan predicciones cuasi-milagrosas pero, al mismo tiempo, nos ocultan la explicación hasta el punto de llevarnos a pensar que la razón casi llega a ser innecesaria, siempre que las predicciones merezcan la pena.

En contraposición a la epistemología, Robert Proctor y Londa Schiebinger (3) acuñaron el término “agnotología”, para designar el procedimiento de investigar la creación de ignorancia y de sus numerosos y diversos mecanismos de producción, tales como el secreto, la confusión, la pereza en la búsqueda, el desprecio de las fuentes fiables y el ominoso silencio cómplice, entre otros. Proctor y Schiebinger nos avisan de que la ignorancia está, a veces, solapada con la ciencia y con la razón; “la ignorancia se esconde en las sombras de la filosofía”.

Hasta hace unas pocas décadas, se había mantenido un delicado equilibrio entre la ontología, es decir, la comprensión y el conocimiento profundo de la naturaleza de las cosas y de los fenómenos del mundo, y su medida y predicción, la epistemología,

que se ocupa de los procesos mediante el que adquirimos y validamos tal conocimiento. Ese equilibrio buscaba optimizar la comprensión, lo cual nos permitía apreciar nuevas características y formular mejores leyes fundamentales de la realidad que, a su vez, facilitaban hacer nuevas predicciones para confirmarlas o refutarlas, completando un riguroso procedimiento científico.

Sin embargo, en la actualidad, tal equilibrio se ha ido desplazando progresivamente hacia la parte experimental y, de forma muy particular, hacia la computación de ingentes cantidades de datos, muchas veces no adecuadamente depurados ni por la credibilidad de su origen ni por la homogeneidad de sus significados. Es cierto que, de otra manera, seguiríamos atascados en problemas de muy difícil solución. La mecánica cuántica es un ejemplo paradigmático de ello y cómo hace un siglo vino para justificar y predecir resultados que de otra manera “nos mantendrían atascados en el barro”. Pero, a cambio de unos resultados extraordinariamente exactos, la mecánica cuántica nos impuso como tributo no poder intuir el mecanismo que los produce, como reconocían algunos de sus científicos más significados, tales como que “la mecánica cuántica es fundamentalmente incomprensible” (Niels Bohr), o que “si crees que entiendes la mecánica cuántica, es que no entiendes la mecánica cuántica” (Richard Feynman), hasta llegar a la abnegada aceptación de John von Neumann de que “no entiendes la mecánica cuántica, simplemente te acostumbras” o a la irritada exclamación de David Mermin de “¡Cállate y calcula!”, para acatar sin rechistar una interpretación instrumentalista — un formalismo matemático puramente simbólico — que simplemente funcione: no importa que la teoría no nos informe sobre la realidad, en tanto que los datos calculados encajen adecuadamente con los resultados de los experimentos.

Pese a todo, el conocimiento de “qué sabemos” de la ontología es tan relevante en ciencia como el de “cómo sabemos” y el de “cuánto sabemos” de la epistemología. Incluso en áreas de la investigación científica donde resalta el valor del cálculo numérico, como la estadística, su gran reto epistémico consiste en tratar de justificar el valor de unos procedimientos que, a partir de datos reales, permiten alcanzar veredictos predictivos o confirmatorios sobre la validez de una hipótesis, porque cuando la aritmética — o, en general, la matemática — se establece como una cárcel epistémica de la realidad pierde por completo todo su sentido, como nos ayudó a comprender Kurt Gödel con sus teoremas de indecidibilidad o incompletitud.

En el estudio de cualquier fenómeno, la intervención del observador — el que realiza la medición — afecta al fenómeno estudiado; este reiterado “mantra” científico nos viene a recordar que la simple observación — y aún más la medición — siempre



produce algún grado de perturbación que limita o incluso llega a “congelar” la percepción de la realidad, haciéndola incompleta. Aunque esta visión es relativamente reciente en el pensamiento occidental, no lo es tanto en el oriental; en concreto, en la epistemología clásica china la autoconciencia — la capacidad de conectar con los propios sentimientos, pensamientos y acciones — de cada persona se basa en la comprensión global — holística — del mundo, entendida como una relación interactiva entre cada ser humano y la naturaleza, donde cada ser está incrustado y entretelado con estructuras cósmicas. En definitiva, nuestra comprensión de la existencia está ligada a la forma de cómo experimentamos la existencia.

En medicina y, en general, en la ciencia existe una fuerte interrelación entre evidencia (los hechos observados y contrastados), los valores epistémicos (propiedades de una hipótesis o teoría que son indicativas de su veracidad y que están directamente vinculados con la búsqueda del conocimiento), los valores no epistémicos (aparentemente desconectados de la búsqueda del conocimiento, pero necesarios para determinar lo que se considera como una prueba suficiente: aspectos morales, políticos, sociales, personales, económicos, etc.) y los sesgos cognitivos (procesos mentales que se desvían sistemáticamente de las normas reconocidas de la lógica y la racionalidad y, al hacerlo, afectan a nuestro juicio y a la correspondiente toma de decisiones). Tal interrelación debe ser equilibrada porque si no puede conducir a lo que Cristina Amoretti (4) denomina “una pandemia de tonterías” en el ámbito de la salud pública, como las disparatadas y contradictorias medidas de salud pública que fueron adoptadas por los gobiernos de la inmensa mayoría de los países durante la pandemia de COVID-19. Por ello y con el fin de restaurar y promover la confianza pública en la medicina y en toda actividad científica, considera Amoretti que tal interacción entre evidencia, valores (epistémicos y no epistémicos) y sesgos cognitivos debe hacerse explícita y discutirse públicamente. En ciencia, una prueba es definida como una construcción metódica que permite confirmar o descartar significativamente una hipótesis, y que puede ser revisada racionalmente, reproducida y verificada por cualquier persona ajena al estudio original que disponga de los conocimientos y los medios adecuados para ello. Para Andrew Granville (5) el mejor sistema de verificación que tenemos en matemáticas es que muchos expertos analicen la prueba desde diferentes perspectivas y que, en todas ellas, encaje bien. Esto no demuestra la veracidad irrefutable de la prueba, pero confirma a la comunidad científica que al menos es correcta o, lo que es lo mismo, que no encontramos ningún elemento discordante que nos impida seguir avanzando por ese camino; de hecho, las pruebas son aceptadas según estándares científicos comunitarios y es precisamente la comunidad científica — en su amplia diversidad y

libertad — la que proporciona confianza. Sin embargo, en demasiadas ocasiones se olvida — con la complicidad de no pocos editores científicos — que la crítica racional libre y diversa es una condición fundamental para considerar como científico a un estudio. Miranda Fricker (6) ha mostrado que los estereotipos, las relaciones sociales jerárquicas y los roles de género tradicionales afectan la forma en que se adquiere y difunde el conocimiento, pero también a cómo los demás perciben a sus creadores. Fricker acuñó el término “injusticia epistémica” para referirse a aquella que implica que una persona o un colectivo reciba poco o ningún crédito debido a su identificación con un estatus social que es consecuencia casi siempre de posiciones crónicamente desfavorecidas, pese a que pueden tener una visión privilegiada en numerosas materias debido — precisamente — a su condición de marginación.

El desarrollo científico no es un modelo uniforme de evolución del conocimiento y, desde luego, no se debe exclusivamente al seguimiento de procesos racionales lógicos ni de rigurosos y precisos protocolos de metodología práctica. Procedimientos tan comunes como poco estudiados como la intuición nos retan a comprender por qué son fundamentales en el desarrollo de la ciencia, como nos recordaba Henri Poincaré, para quien la intuición proporciona “una base epistemológica a priori para las matemáticas” y supone la consciencia de poseer una capacidad innata para construir un continuo físico y matemático, una capacidad sin la que la experiencia humana se reduciría a un conjunto incoherente de meras sensaciones aisladas. Podemos pensar que, aplicado a otros ámbitos del conocimiento y de la comprensión, el concepto de intuición podría traducirse como la experiencia que proporciona una visión de rayos X que, aunque a veces es errónea, casi siempre permite alcanzar una conclusión mucho antes de tener pruebas objetivas que la avalen; es el ojo clínico del buen médico o el olfato del periodista independiente, que les permite ir más allá de la apariencia de lo evidente. Una especie de “túnel cuántico” que atraviesa las cordilleras más altas del conocimiento sin necesidad de llegar a sus cumbres escalando a través de escarpadas pendientes.

Las matemáticas, decía Poincaré hace un siglo, “requieren intuición no solo en el contexto del descubrimiento sino también en el contexto de la justificación, especialmente en aritmética y lógica”. Por eso la matemática Eugenia Cheng (7) afirma hoy que “en la investigación matemática, no solo sigues pasos lógicos, si lo haces nunca llegarás a ningún lugar interesante; tienes que usar tu instinto y sentir tu camino a través de algo primero, y respaldarlo con lógica después”.

No solo en ciencia sino en el ámbito de la vida cotidiana, la mayoría de nosotros — probablemente sin darnos cuenta — frecuentemente compartimos falsedades triviales. Solo en algunos



casos nos tomamos la molestia de verificar y reproducir los hechos o fundamentos de nuestras datos y argumentaciones empleadas. Pero, como indica Richard Reeves (8), el problema no consiste simplemente en poder discernir lo verdadero de lo falso, sino en quién quiere decir la verdad; la cuestión no es tanto dónde está la verdad como quién es sincero. Como el propio Reeves reflexiona, el carácter de la verdad es empírico, mientras que el de la veracidad es ético; la verdad es el producto final pero la veracidad es un elemento esencial en su producción y difusión. La temida crisis epistémica de la racionalidad — la que afecta al saber construido con una metodología rigurosa — es, por tanto, una crisis ética que requiere soluciones éticas.

2. ONTOLOGÍA Y EPISTEMOLOGÍA EN INTELIGENCIA ARTIFICIAL (IA)

La inteligencia artificial (IA) es definida por la Association for the Advancement of Artificial Intelligence (AAAI) como “la comprensión científica de los mecanismos que subyacen al pensamiento y la conducta inteligente, y su encarnación en máquinas; es decir, la capacidad para razonar por parte de un agente que no está vivo en un sentido convencional, al cual le ha sido conferida dicha capacidad por seres humanos. Además de razonar, estos dispositivos son — potencialmente — capaces de desarrollar otras actividades tradicionalmente consideradas como humanas”.

Como tal, la definición resulta un tanto ambigua, susceptible de sostener, al menos, dos formulaciones diferentes. La que podríamos llamar formulación “débil” se refiere al empleo de programas informáticos complejos, diseñados con el fin de complementar o auxiliar el razonamiento humano en la resolución de problemas específicos, aunque sin incluir capacidades sentientes o éticas humanas. Esta forma “amable” de la inteligencia artificial nos ayuda extraordinariamente a resolver o completar complejos problemas de cálculo, de mantenimiento de sistemas, de reconocimiento de todo tipo de imágenes, de diseño, de análisis de patrones de datos, etc., que, de otra manera, muchos de los cuales serían prácticamente inabordables por mediante los procedimientos convencionales (9). Por su parte, la inteligencia artificial “fuerte” es aquella que iguala o excede la inteligencia humana promedio, pudiendo — idealmente — realizar con éxito cualquier tarea intelectual de un ser humano.

De momento, solo podemos considerar como una realidad a la forma “débil” de inteligencia artificial, aunque las capacidades sobrevaloradas, poco realistas y exageradas impregnan la forma en que se presentan públicamente los modelos de IA “generativa” (desarrollada para crear contenido — texto, imágenes, música o

vídeos, entre otras muchas áreas — a partir de información previa), lo que contribuye a la idea errónea de que estos modelos exceden el razonamiento a nivel humano y exagera el riesgo de transmisión de información falsa y estereotipos negativos a las personas; de hecho, la fabricación y el sesgo en los modelos de inteligencia artificial (IA) generativa pueden ocurrir como parte del uso regular del sistema, incluso en ausencia de fuerzas malévolas que busquen impulsar el sesgo o la desinformación (10).

Un ejemplo paradigmático de la IA generativa son los bot de charla o bot conversacionales (en inglés, chatbot), aplicaciones informáticas que simulan mantener una conversación con un ser humano, proveyendo respuestas automáticas generadas a partir de un amplio conjunto de datos y una arquitectura informática definida por sus programadores, utilizando lo que se denomina como “razonamiento basado en casos” (case base reasoning, CBR). Aunque los resultados son a veces muy espectaculares, conviene no olvidar que, en cualquier modelo de inteligencia artificial, los sesgos que existen en los conjuntos de datos que son empleados para entrenar y mantener el sistema se transmiten inevitablemente al comportamiento del chatbot. Por eso, con el fin de distinguir entre los textos generados por sistemas de inteligencia artificial y los creados por seres humanos, algunos desarrolladores informáticos están empleando lo que se conoce como “análisis de la perplejidad”, consistente en determinar la aleatoriedad, el grado de desorden que hay en un texto; de tal manera, una perplejidad alta indicaría mayor probabilidad de que el texto haya sido generado por una persona y no por una máquina. Pero hay otro método de reconocimiento que nunca falla: la inteligencia artificial no entiende los “porque sí”, ni se contradice a sí misma, como frecuentemente hacemos los seres humanos.

Los modelos de lenguaje de la inteligencia artificial no funcionan emulando un cerebro biológico, sino que se fundamentan en la búsqueda de patrones lógicos — definidos por programadores humanos — dentro de descomunales bases de datos suministrados a partir de diversas fuentes, no siempre actualizadas ni depuradas de falsedades, errores y sesgos conceptuales o factuales, tanto involuntarios como interesados. Por tanto, es previsible que algunas de sus respuestas estén contaminadas por esos “pecados”, si bien los filtros y algoritmos empleados son cada vez más cuidadosos a este respecto.

Más allá de su eficacia como potencial generador de conocimiento, existe una preocupación: ¿Qué argumentos nos convencerían de que una inteligencia artificial ha llegado a adquirir algún grado de “sensibilidad humana”? Mucho me temo que tales argumentos, en caso de existir, ya estarían implícitos — incrustados, de forma inconsciente o no — en el tipo y la forma de los datos que nosotros mismos aportamos a la inteligencia artificial para que “nos



convenza de que es sentiente". En realidad, tales argumentos solo emulan las formas en que los humanos expresamos nuestra afectividad y el resto de nuestros sentimientos; las máquinas solo recogen lo que los seres humanos sembramos, lo depuran, lo ordenan en una secuencia que los humanos consideramos lógica y, en realidad, solo acabamos leyendo lo que nosotros mismos hemos escrito. Es un ejemplo perfecto de argumento circular.

Pero, quizá, el principal problema no consista tanto en que las máquinas puedan acercarse al pensamiento sentiente humano, sino que los seres humanos nos estamos acostumbrando a usar de forma "natural" lo que es un lenguaje artificial que nosotros mismos hemos desarrollado para manejar las máquinas y ahora tratamos — irracionalmente — de encontrarle a las máquinas el mismo sentido que nuestra inteligencia "natural" les dio originalmente. A pesar de lo que algunos de sus defensores peor informados afirman, la inteligencia artificial es incapaz — por el momento — de comprender el verdadero sentido de un texto o de un discurso; tan solo, en el mejor de los casos, es capaz de identificar sus componentes y traducirlos linealmente a su propio idioma mecánico y, eventualmente, crear un texto o discurso coherente a partir de ellos; es decir, es capaz de leer y escribir como un ser humano... pero sin entender lo que lee o dice. En realidad, los humanos aprendemos el sentido real del lenguaje a partir de las interacciones y la comunicación con los demás humanos, no deletreando textos. La ambigüedad natural del lenguaje ordinario, la extremada dependencia contextual de su significado concreto y, especialmente, la necesidad de contrastarlo con gran cantidad de conocimientos de carácter cotidiano, hace incompetente a la inteligencia artificial — por el momento, insisto — para un auténtico diálogo humano, algo que cualquier niño de cuatro años es capaz de mantener sin dificultad.

Otro de los problemas que pueden surgir de la inteligencia artificial no es que haga algo extraño o ajeno a las instrucciones de su programador, sino que haga lo que éste le dijo que tenía que hacer, pero sin que el programador fuese plenamente consciente del alcance y consecuencias de sus propias instrucciones. Las máquinas no son buenas o malas, sino que al cumplir las instrucciones, calculan todas las posibilidades ejecutivas, incluyendo aquellas que no llegó a prever su programador; de hecho, las máquinas siempre acaban yendo más allá de los deseos de sus torpes o irresponsables manipuladores. Si deseamos que nuestro coche vaya muy rápido para disfrutar de la agradable sensación de vértigo y de poder que da la velocidad, llegará un momento en que no seamos capaces de evitar las consecuencias adversas de ello, incluso aunque nuestro coche nos avise con antelación. Todo ello porque dedicamos mucho más esfuerzo a idealizar nuestros deseos que a considerar sus efectos y consecuencias reales.

Estamos acostumbrándonos a que la inteligencia artificial esté presente en todas las formas y aplicaciones del conocimiento, quizá sin considerar que, en definitiva, solo son programas informáticos y dispositivos regidos por lógicas de diversos órdenes, con capacidad para reciclar continuamente sus resultados, optimizándolos y generando nuevas asociaciones de datos e hipótesis no contempladas originalmente. No cuestiono las notables posibilidades que proporciona esta tecnología; sin embargo, me inquieta que estemos dejando mansamente el control en manos de máquinas que, en definitiva, están diseñadas por personas con manías, ideas, prejuicios, fobias y sentido existencial, que están financiadas — y controladas estrechamente — por corporaciones privadas o públicas con intereses no siempre confesables; me preocupa que depongamos a nuestra inteligencia natural — nuestro pensamiento sentiente — en beneficio de la no siempre predecible inteligencia artificial y de sus dueños reales, que no son sus programadores.

Una cuestión particularmente sensible es la posibilidad de utilizar la IA generativa para redactar o incluso inventarse artículos científicos que llegan a pasar desapercibidos por los revisores por pares de las revistas científicas más prestigiosas del mundo. En 2021, Guillaume Cabanac, un científico informático de la Universidad de Toulouse (Francia) publicó los resultados de un trabajo de investigación documental en el que se analizó la presencia de algunas frases extrañas — aparentemente incongruentes con el texto científico — en miles de artículos académicos, que él denominó como "frases torturadas" (11).

La búsqueda de Cabanac de artículos con frases absurdas o "torturadas" ya había comenzado en 2015, cuando comenzó a colaborar con Cyril Labbé, un científico informático de la Universidad de Grenoble Alpes en Francia. Labbé había desarrollado un programa para detectar galimatías en artículos informáticos generados automáticamente mediante SClgen, un software creado inicialmente como una broma. El trabajo de Labbé llevó a las revistas a retirar más de 120 manuscritos. Hasta 2021, Cabanac y sus colegas, junto con voluntarios de la comunidad PubPeer, han identificado cerca de 400 frases torturadas en más de 2.000 artículos, incluidos los de revistas de editoriales conocidas como Elsevier y Springer Nature. La Fundación PubPeer es una corporación registrada en California (Estados Unidos) con estatus de organización sin fines de lucro y cuyo objetivo general es mejorar la calidad de la investigación científica permitiendo enfoques innovadores para la interacción comunitaria, como un servicio dirigido en beneficio de sus lectores y comentaristas, quienes crean su contenido (12).

La realidad es que cada vez son más los manuscritos científicos que no revelan la asistencia de la IA y que están pasando desapercibidos para los revisores por pares de las grandes editoras



científicas del mundo. Aunque la presencia de tales artículos que están escritos total o parcialmente de forma fraudulenta mediante software de computadora no son nada nuevo, sin embargo, hasta hace poco tiempo eran más fácilmente detectables ya que solían mostrar ciertos rastros sutiles, tales como patrones específicos de lenguaje o las ya mencionadas “frases torturadas”. Pero actualmente si los “detectives” que investigan este fraude eliminan las frases repetitivas de ChatGPT, el texto del chatbot se vuelve más fluido y sofisticado, haciendo “casi imposible” de detectar el fraude científico y editorial (13).

El uso no revelado de ChatGPT y otras herramientas de IA no solo se ha identificado en artículos de revistas científicas, sino también en conferencias revisados por pares y en preimpresiones (manuscritos que no han pasado por revisión por pares). Algunos de los autores denunciados por un uso no declarado de chatbot se disculparon alegando que lo habían utilizado “para ayudar a crear el trabajo”.

El problema de los artículos no divulgados producidos por IA en revistas apunta a un problema más aún profundo: los revisores por pares de las revistas científicas a menudo no tienen tiempo para revisar los manuscritos a fondo en busca de señales de alerta. En este sentido, Rune Stensvold, microbiólogo del Instituto Estatal del Suero en Copenhague, se encontró con el problema de las referencias falsas inventadas por la propia inteligencia artificial cuando un estudiante le pidió una copia de un artículo del que aparentemente Stensvold había sido coautor con uno de sus colegas en 2006. El artículo simplemente no existía. El estudiante le había pedido a un chatbot de IA que le sugiriera artículos sobre *Blastocystis*, un género de parásito intestinal, y el chatbot había improvisado una referencia con el nombre de Stensvold. “Parecía tan real”, dice. Quizá, por ello, sería conveniente que la revisión de artículos científicos comenzase comprobando la sección de referencias”.

Finalmente, atendiendo al posible carácter sentiente y ético de la inteligencia artificial, es preciso considerar que una cosa es conocer y saber manejar con efectividad la mecánica de un juego — con reglas establecidas que ordenan la persecución de un objetivo previamente definido — y otra, muy diferente, es la satisfacción que produce jugar e incluso ganar, o haber aprendido una nueva jugada o estrategia; es muy improbable que una máquina pretendidamente inteligente tenga el impulso de inventar un juego para disfrutar retando a su propia inteligencia, ni que se aburra jugando con él. Asimismo, la voluntad libre para hacer algo, la independencia de los objetivos que le fijen es otro de los aspectos de los que carece la inteligencia artificial, porque ésta arrastra la doble condena de servir para un fin que ella misma no ha elegido y de no experimentar la alegría de conseguir sus metas ni la frustración de no haberlo hecho.

3. CONCLUSIONES

La brecha entre predictibilidad y comprensibilidad amenaza todo el proyecto científico debido a que parece que estamos llegando a un límite en el que la comprensión y la predicción se están desacoplando. Los modelos matemáticos de los procesos, alimentados por enormes cantidades de datos de origen muy diverso, proporcionan resultados excepcionalmente precisos, pero, al mismo tiempo, ocultan la explicación de los procesos hasta el punto de llevarnos a pensar que la razón casi llega a ser innecesaria, siempre que las predicciones merezcan la pena.

El conocimiento de “qué sabemos” de la ontología es tan relevante en ciencia como el de “cómo sabemos” y el de “cuánto sabemos” de la epistemología; incluso en áreas de la investigación científica donde resalta el valor del cálculo numérico, el gran reto epistémico consiste en tratar de justificar el valor de unos procedimientos que, a partir de datos reales, permiten alcanzar veredictos predictivos o confirmatorios sobre la validez de una hipótesis, porque cuando la matemática se establece como una cárcel epistémica de la realidad pierde su valor.

En la ciencia real existe una fuerte interrelación entre evidencia, los valores epistémicos y no epistémicos, y los sesgos cognitivos. Con el fin de restaurar y promover la confianza pública en todos los ámbitos de la actividad científica, tal interacción debe hacerse explícita y discutirse públicamente; de hecho, las pruebas demostrativas son aceptadas según estándares científicos comunitarios y es precisamente la comunidad científica — en su amplia diversidad y libertad — la que proporciona confianza.

El desarrollo científico no es un modelo uniforme de evolución del conocimiento y, desde luego, no se debe exclusivamente al seguimiento de procesos racionales lógicos ni de rigurosos y precisos protocolos de metodología práctica. La intuición nos reta a intentar comprender por qué tiene un papel fundamental en el desarrollo de la ciencia, por qué permite alcanzar en muchos casos una conclusión mucho antes de disponer de pruebas objetivas que la avalen y profundizando más allá de la apariencia de lo evidente.

La inteligencia artificial (IA) implica la comprensión científica de los mecanismos que subyacen al pensamiento y la conducta inteligente, así como su encarnación en máquinas — agentes artificiales — capacitadas por sus creadores de razonar en un sentido convencional. Su formulación “débil” se refiere al empleo de programas informáticos complejos, diseñados con el fin de complementar o auxiliar el razonamiento humano para resolver o completar complejos problemas de cálculo, de mantenimiento de sistemas, de reconocimiento de todo tipo de



imágenes, de diseño, de análisis de patrones de datos, etc., muchos de los cuales serían prácticamente inabordables mediante procedimientos convencionales; pero todo ello sin incluir capacidades sentientes o éticas humanas, que sí serían objeto de una — por ahora — inexistente IA “fuerte”, aquella que igualaría o incluso excedería la inteligencia sentiente humana.

La vulgarización de la IA “generativa”, desarrollada para crear contenido — texto, imágenes, música o vídeos, entre otras muchas áreas — a partir de información previa, está contribuyendo a consolidar popularmente la idea errónea de que la actual IA excede el razonamiento a nivel humano y exagera el riesgo de transmisión de información falsa y estereotipos negativos a las personas, algo que puede ocurrir incluso con el uso regular del sistema, en ausencia de fuerzas malévolas que busquen impulsar el sesgo o la desinformación.

Los modelos de lenguaje de la inteligencia artificial no funcionan emulando un cerebro biológico, sino que se fundamentan en la búsqueda de patrones lógicos a partir de grandes bases de datos procedentes de fuentes diversas, que no siempre actualizadas ni depuradas de falsedades, de errores ni de sesgos conceptuales o factuales, tanto involuntarios como interesados. Y la IA empleada en ciencia no es ajena a estas limitaciones y sesgos.

Otro de los problemas que pueden surgir de la IA no es que haga algo extraño o ajeno a las instrucciones de su programador, sino que haga lo que éste le dijo que tenía que hacer, pero sin que el programador fuese plenamente consciente del alcance y consecuencias de sus propias instrucciones. Esto en ciencia puede ser muy favorable, pero en tecnología — ciencia aplicada, en definitiva — no siempre tiene por qué serlo, incluso puede tener consecuencias catastróficas.

Son muy notables las posibilidades que abre la IA; sin embargo, no podemos olvidar que está diseñada por personas con manías, ideas, prejuicios, fobias y sentido existencial, y que están financiadas — y controladas estrechamente — por corporaciones privadas o públicas con intereses no siempre confesables.

Una cuestión particularmente sensible es la posibilidad de utilizar la IA generativa para redactar o incluso inventarse artículos científicos que llegan a pasar desapercibidos por los revisores por pares de las revistas científicas más prestigiosas del mundo. El uso no revelado de ChatGPT y otras herramientas de IA no solo se ha identificado en artículos de revistas científicas, sino también en conferencias revisados por pares y en preimpresiones. Sin embargo, el problema de los artículos no divulgados producidos por IA en revistas apunta a un problema más aún profundo: los revisores por pares de las revistas científicas a menudo no tienen tiempo para revisar los manuscritos a fondo en busca de señales de alerta y, en muchos casos, además carecen de recursos informáticos adecuados y formación especializada.

Por encima de todo, la ausencia de una voluntad libre para hacer algo es la gran limitación de la IA actual, que arrastra la doble condena de servir para un fin que ella misma no ha elegido y de no experimentar la alegría de conseguir sus metas ni la frustración de no haberlo hecho.

6. REFERENCIAS

1. Cuéllar Rodríguez S. Epistemología de la medición. *An Real Acad Farm.* 2022; 88 (1): 31-44. DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2022.88.01.02>
2. Krakauer DC. At the limits of thought. *Aeon.* <https://aeon.co/essays/will-brains-or-algorithms-rule-the-kingdom-of-science> (2022)
3. Proctor RN. Agnotología (Agnotology). *Revista de Economía Institucional,* 2020; 22(42) Disponible en: <https://ssrn.com/abstract=3495489>
4. Amoretti MC, Lalumera E. COVID-19 as the underlying cause of death: disentangling facts and values. *HPLS (History and Philosophy of the Life Sciences),* 2021; 43: 4. <https://doi.org/10.1007/s40656-020-00355-6>.
5. Granville A. Why Mathematical Proof Is a Social Compact. *Quanta Magazine,* <https://www.quantamagazine.org/why-mathematical-proof-is-a-social-compact-20230831/> 31 de agosto de 2023.
6. Fricker M. *Epistemic injustice: power and the ethics of knowing.* Oxford: Oxford University Press. ISBN 9780198237907. (2007)
7. Cheng E. The joy of why: Is There Math Beyond the Equal Sign? *Quanta Magazine,* <https://www.quantamagazine.org/is-there-math-beyond-the-equal-sign-20230322/> 22 de marzo 2023.
8. Reeves RV. Lies and honest mistakes. *Aeon.* <https://aeon.co/essays/our-epistemic-crisis-is-essentially-ethical-and-so-are-its-solutions> (2021).
9. Cuéllar Rodríguez S. 239. Ediciones Vitruvio. ISBN: 978-84-949763-8-4 (2019)
10. Kidd C, Bihane A. How AI can distort human beliefs. *Science.* 2023 Jun 23; 380(6651): 1222-1223. doi: <https://doi.org/10.1126/science.adi0248>
11. Kwon D. Guillaume Cabanac: Deception sleuth. *Nature,* 15 december 2021; <https://www.nature.com/immersive/d41586-021-03621-0/index.html#section-gM9iO4XBRI:~:text=%3A>



Indigenous defender,-Guillaume Cabanac%3A Deception sleuth,-Meaghan Kall%3A COVID

12. PubPeer. <https://pubpeer.com/static/about>
13. Conroy G. Scientific sleuths spot dishonest ChatGPT use in papers. Nature;08 September 2023
doi:<https://doi.org/10.1038/d41586-023-02477-w>.

Si desea citar nuestro artículo:

Epistemología y ontología en ciencia: el reto de la inteligencia artificial

Santiago Cuéllar Rodríguez

An Real Acad Farm (Internet].

An. Real Acad. Farm.Vol. 89. nº (2023) · pp. 379-386

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2023.89.03.09>

EL QUÍMICO FARMACÉUTICO JUAN JOSÉ OLIVERO, REFERENTE DE LA CIENCIA Y LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA URUGUAYA

THE PHARMACEUTICAL CHEMIST JUAN JOSÉ OLIVERO, REFERENCE OF URUGUAYAN SCIENCE AND THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY

Roberto Olivero

Ing. Agr. Museo Paso de las Duranas. Montevideo, Uruguay

corresponding author: rolivero61@gmail.com

ARTÍCULO DE REVISIÓN

RESUMEN

El químico farmacéutico (doctor) Juan José Olivero Muñoz (Buenos Aires, 1921-Montevideo, 1993) fue uno de los destacados profesionales de la docencia e industria farmacéutica uruguaya. Ejerció como técnico en los laboratorios Athena; EMAR (Eduardo Márques Castro S. A.) y Dispert. Especialista en antibióticos, desarrolló asimismo distintos productos. Estudió la cloromicetina, publicando en Anales de la Asociación de Química y Farmacia del Uruguay y Chemical Abstracts. Fue autor de trabajos sobre hidrotropización en tecnología farmacéutica; valoración química del elixir de clorhidrato de difenhidramina y solvotropización de hormonas esteroides. Escribió varios capítulos de la enciclopedia Farmacotecnia teórica y práctica, texto de referencia. Presidió la Asociación de Química y Farmacia del Uruguay y fue docente de la Facultad de Química en varias asignaturas, principalmente Farmacotecnia, siendo catedrático y consejero de dicha facultad. Desde 1966 y hasta su fallecimiento, fue académico de la Real Academia Nacional de Farmacia (España), honor al que pocos químicos accedieron por nuestro país. Fue reconocido luego de su fallecimiento, como uno de los prohombres de la profesión en Uruguay.

Palabras Clave:

Farmacotecnia
revisión histórica
Farmacia Uruguay

Keywords:

Pharmacotechnics
historical review
Uruguayan pharmacy

ABSTRACT

Pharmaceutical chemist (doctor) Juan José Olivero Muñoz (Buenos Aires, 1921-Montevideo, 1993) was one of the outstanding professionals in the uruguayan pharmaceutical teaching and industry. He worked as a technician in the laboratories Athena; EMAR (Eduardo Márques Castro S. A.) and Dispert. A specialist in antibiotics, he also developed different products. He studied chloromycetin, publishing in Annals of the Uruguayan Chemistry and Pharmacy Association and Chemical Abstracts. He was author of papers on hydrotropization in pharmaceutical technology; chemical titration of diphenhydramine hydrochloride elixir and solvotropization of steroid hormones. He wrote several chapters of the encyclopedia Theoretical and practical Pharmacotechnics, a reference text. He was president of the Uruguayan Chemistry and Pharmacy Association and was a professor and advisor of the Faculty of Chemistry in several subjects, mainly Pharmacotechnics. From 1966 until his death, he was a member of the Royal National Academy of Pharmacy (Spain), an honor to which few chemists had access in our country. After his death, he was recognized as one of the leading figures of the profession in Uruguay.

1. INTRODUCCIÓN

En 2021 se cumplieron cien años del nacimiento del doctor Juan José Olivero, químico farmacéutico que fue miembro de la Real Academia Nacional de Farmacia. Su múltiple actividad como docente e investigador, así como en la industria farmacéutica, hacen que forme parte de la historia de la química y farmacia uruguayas. Fue uno de los profesores sudamericanos reconocidos, cuya memoria no debe mellar el paso del tiempo. En este trabajo se trazan las aristas fundamentales de lo que fue su vida y obra en pro del desarrollo de la profesión en el Uruguay.

2. INFANCIA Y JUVENTUD

Juan José Olivero Muñoz nació en Buenos Aires (Argentina), el 4 de junio de 1921. Sus padres fueron José Juan Olivero y Ana Muñoz. José era argentino, hijo de Giuseppe Olivero, un inmigrante italiano y Ana, española, nacida en Málaga. Sus recuerdos infantiles eran de los barrios Avellaneda y Barracas, así como del parque Lezama. Siendo niño, por motivos laborales su familia se trasladó a Montevideo en 1927, arribando en el barco Ciudad de Montevideo. Estudió en el colegio Sagrada Familia en donde tuvo, entre otros profesores, al reconocido Hermano Damasceno (H. D.), autor de libros clásicos de historia (una calle en el barrio de la Aguada homenajea su memoria). De niño Juan José residió en la Aguada. En su juventud siguió muy de cerca la Segunda Guerra Mundial, y quedó grabada en su memoria la Batalla del Río de la Plata (1939), recordando el hundimiento del acorazado Graf Spee frente a las costas de Montevideo. Vivió con sus padres en Caridad 1103, hoy Alejandro Fiol de Pereda, a pocos metros de avenida Joaquín Suárez, barrio del Reducto. Cursó el bachillerato en el Instituto Alfredo Vásquez Acevedo. Ya en facultad, fueron sus compañeros más dilectos Federico Pollini (entrañable amigo), Fivaller Bassagoda (luego decano interventor), María Llera (ejerció en Tala, departamento de Canelones), Esperanza Píriz (religiosa y docente de Química), y su novia María Esther Troise (quien ejerció en farmacias en Punta del Este y Nueva Palmira, y fue profesora y fundadora del Liceo Mariano, ubicado en el Prado).

Brillante estudiante, realizó cursos que excedían a los requeridos por el Plan 1932. Cursó con el doctor Villar Química Coloidal en los años 1939 y 1940, y realizó otros cursos con destacados profesores en los años 40 y 50. Se graduó de químico farmacéutico en diciembre de 1944. Por sus calificaciones, el Consejo Central Universitario en sesión del 7 de marzo de 1945 lo exoneró del pago de los derechos del título (por entonces los títulos se pagaban).

Se casó en 1948 con María Esther Troise, residiendo en el barrio Pocitos, en un apartamento de la calle Coronel Alegre 1282 bis, donde en 1951 naciera su hijo Mario. En 1960 la familia pasó a residir en el Paso de las Duranas (Prado), en camino Castro 832, en casa de dos plantas que la familia Troise construyó en propiedad horizontal. Allí nació su hijo, Roberto, en 1961. Debe consignarse que obtuvo la ciudadanía uruguaya, aunque viajaba a Argentina frecuentemente por razones laborales.

3. ACTIVIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

Trabajó en el Laboratorio Athena, fundado por el químico farmacéutico Antonio Peluffo (decano de la facultad entre 1935 y 1938). En los 50, trabajó en el laboratorio EMAR (Eduardo Márques Castro S. A.), hasta 1958, donde fue director técnico.

Un hecho significativo ocurrió en aquellos tiempos. Corría el año 1955. Un niño de tres años y medio ingresó al Instituto de Clínica Pediátrica y Puericultura del Hospital *Pereira-Rossell*, el 24 de marzo. Presentaba dolores abdominales, respiración estertorosa y convulsiones generalizadas, por ingestión accidental del analgésico Irgapirina, estimándose que probablemente hubiera tomado 16 comprimidos. Un caso típico de intoxicación. Pero no había forma de poder dosificar el nivel sanguíneo de la droga que lo constituía, la fenilbutazona, al no existir un estándar en plaza que permitiera el análisis espectrofotométrico del nivel de la droga. Olivero, trabajando en EMAR en una única jornada de siete horas de trabajo,

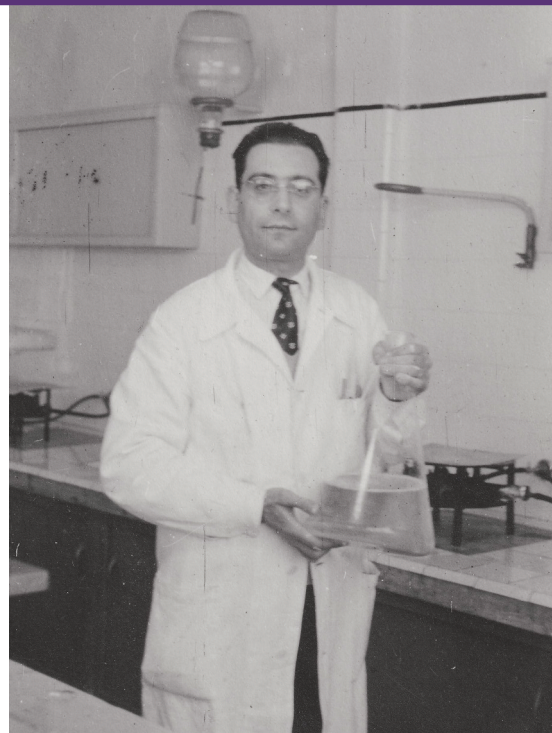


Figura 1. El químico farmacéutico Juan José Olivero en un laboratorio en la ciudad de Montevideo



pudo desarrollar un método de extracción de la droga de los comprimidos, que permitió utilizarla como estándar y así aplicar el citado método instrumental de valoración del tóxico. Al detectar que el nivel continuaba alto en la sangre del niño, se decidió por parte de los médicos la exsanguinotransfusión y aplicación de purgante de sulfato de magnesio. Así, los doctores salvaron la vida del niño, que el día 27 estaba ya lúcido y con buen apetito. El niño se llamaba Juan, como él. Posteriormente a este trabajo se publicó en el *Journal of American Medical Association* un ensayo semejante, pero al momento en que se necesitó para el caso citado la información no estaba disponible aún, lo que habla de su capacidad de adelantado, que demostró en varias ocasiones. La nota del caso se publicó en los *Archivos de Pediatría del Uruguay*, que fundara el doctor Luis Morquio. Juan José Olivero se refería a esta publicación como "nota inédita y de carácter menor, pero de la cual me siento muy satisfecho, ya que ayudó a salvar una vida".

En otro caso, su gran conocimiento de los fenómenos químicos y sus aplicaciones permitió que salvara a un compañero de trabajo de apellido Varela, de la pérdida de la visión. Se trató de un accidente laboral en donde esta persona sufrió una importante quemadura en un ojo, con hipoclorito de sodio, trastorno solucionado con la inmediata realización y aplicación de una solución de ácido ascórbico.

Luego de retirarse de EMAR, trabajó en Laboratorios Dispert, en avenida general José Garibaldi y Cornelio Cantera (La Blanqueada) y fundado por los farmacéuticos Enrique Dotta, Juan Antognazza y Modesto Lage en 1927. Allí desarrolló la mayor parte de su carrera. Era asesor técnico desde 1958, fue jefe de producción, y ya a más de una década de su ingreso, pasó a ser director técnico, hasta su fallecimiento en 1993.

En 1961, Dispert ocupaba a 212 funcionarios: diez químicos farmacéuticos, tres médicos, un veterinario y 198 obreros y empleados. Producía 170 especialidades opoterápicas, hormonales, químicas, vitamínicas y antibióticas. Fabricaba con licencias exclusivas para Chas. Pfizer & Co. de Estados Unidos (entonces el mayor productor de antibióticos del mundo), E. Merck de Alemania (era en ese momento la única firma que lo hacía sin pertenecer a Merck), Österreichisches Institut de Austria y Roskilde Medical Co. de Dinamarca.

Producía además productos no farmacéuticos, como el cuajo en polvo, indispensable para la fabricación de quesos. Eran comprados los estómagos vacunos y una vez extraído el cuajo se vendía para la elaboración de quesos, y la producción cubría las necesidades de Uruguay, exportando a Argentina. Producía bacterias *nitrogenantes*, para desarrollar praderas artificiales, siendo Dispert el único que lo hacía, con calidad certificada por la



Figura 2. En actividad profesional de difusión, fotografía en Laboratorios Dispert estación experimental La Estanzuela, del Ministerio de Ganadería y Agricultura, y por FAO. Finalmente, producía la llamada "leche maternizada líquida", por el sistema Stabíl (alimento para lactantes, se le conocía también como "leche estable"), lo cual fue una innovación. Por otra parte, Dispert era el único laboratorio que realizaba la determinación de embarazos por la reacción biológica de Zondeck, lo que hacía desde 1930 en forma gratuita para el Ministerio de Salud Pública (MSP). También era el único que realizaba determinaciones hormonales, que eran asimismo gratuitas para las dependencias del citado ministerio. Proveía de animales de ensayo provenientes de sus propios criaderos, a los distintos servicios estatales, gratuitamente. La actividad del laboratorio se repicaba a industrias anexas, al requerir el trabajo de fábricas de envases de vidrio y plástico; cierres de corcho; cartonería e imprentas, dando así trabajo a muchas personas.

Se fabricaban en ese entonces foliculina, progesterona, salicilato de sodio, digitalina, Pancreobil (digestivo), Codipán (jarabe para la tos), y los antibióticos penicilina y multicilina. Entre las preparaciones vitamínicas figuraban: vitamina B 12, Vitamina A, vitamina B1, vitamina C, vitamina D y complejo B inyectable. En 1962 el laboratorio comercializaba productos tales como Indopert (antiinflamatorio), Fantetra (antimicrobiano), Cygastrin (digestivo), Paciten (tranquilizante), Progón (hormonoterapia) y Hematón B12 (reconstituyente energético que tenía asimismo una presentación veterinaria para suministrar hierro a lechones), entre otros. Bellargotina (regulador del tono neurovegetativo), Citrato de sodio (digestivo), Tirotricina (gotas nasales, luego Neotricina), Evacuante (para tránsito digestivo), Dispert-Sal y otros, eran productos que, como la mayoría de los que el laboratorio fabricaba, estaban en el botiquín domiciliario. El laboratorio desarrolló una diversificada línea de productos y se colocaba en una interesante posición dado el prestigio de sus licencias y los mercados a los que accedía. A la vez, realizaba investigación para preparar nuevos fármacos o mejorar los ya producidos.



En los años siguientes, entre los productos que tuvieron más repercusión figuraban Néctar Sweet (edulcorante); Capixidil (para crecimiento del cabello); Nutrimental (complemento proteico alimenticio) y Dispertina (lecitina vegetal para protección arterial). Tal vez motivada por la presentación de Dispertina, haya sido uno de sus últimas apariciones en prensa, en el lanzamiento de este medicamento para prevención de arterioesclerosis a través de la disminución del colesterol, siendo entrevistado para el periódico *El País* con aparición de su fotografía, el 26 de diciembre de 1988.

Era su especialidad la elaboración de antibióticos. También realizaba preparaciones farmacéuticas con oro, de delicada elaboración, que exigían en él particular concentración, por lo cual los días en que se elaboraban eran especiales. Recordando el ambiente de aquel laboratorio, resaltaban unos enormes recipientes llamados "pailas", en donde se revestían los comprimidos previamente elaborados en sus respectivas máquinas compresoras, o bien se elaboraban grageas. Se elaboraba una exquisita manteca, en enorme batidora. La revista infantil *Charoná* realizó una nota en 1971, con fotografías del director técnico en visita guiada, apreciándose las zonas de mezcladores; estufas para secar los granulados; máquinas de comprimidos y copones de revestimiento (las mencionadas pailas). La nota también mostraba ratas blancas criadas para experimentación de nuevos medicamentos, y cobayos, también utilizados en pruebas. El bioterio tenía también sapos. La empresa disponía de un predio rural ubicado en San Jacinto, departamento de Canelones, donde se mantenía un plantel de equinos, ya que la orina de yegua preñada se utilizaba para extraer una hormona, y había allí una fábrica de quesos.

Entre las tareas de Olivero figuraban las visitas de los médicos recién recibidos, actividad que se realizaba para difusión de la tarea del laboratorio. Eran visitas guiadas en donde se mostraba la fábrica y se ofrecía a los nuevos profesionales un *lunch*.

Eran temas de conversación familiar los distintos y a veces dificultosos problemas laborales. A todo se pasaba revista, ya que no se podía desligar de lo acontecido en el día. Y es así que en los escasos momentos de descanso (era un hombre extremadamente trabajador, se puede decir que vivió y murió trabajando), surgían los nombres de don Enrique Dotta; Héctor Antognazza; Carlos Lage; Carlos Giavi; Luis D'Acosta; Alfonso Lasarte; Benigno Anido; el microbiólogo Carlos Batthyány; el veterinario Jorge Amaro; Raquel Antognazza; María Mercedes Pietra de Dotta; María Isabel Suiffet; Horacio Torres; María Teresa Barbieri; y Stella Tolve, entre varios. El químico Luis Guastavino era vecino y amigo personal y luego de trabajar en el laboratorio EMAR, trabajó con él en Dispert. Cristina Ramponi y Celia Happel también trabajaron con él en Dispert.

4. LA LABOR DE INVESTIGACIÓN

Los antibióticos fueron motivo de sus investigaciones. Estudió la cloromicetina (1950), investigación que llevó importante búsqueda bibliográfica que incluyó correspondencia con referentes investigadores del entonces reciente antibiótico. Habían pasado muy pocos años del descubrimiento por Ehrlich y sus colaboradores, del antibiótico cloromicetina (cloranfenicol), en 1947, cuando en 1951 Olivero publicó su trabajo sobre la preparación del cloranfenicol inyectable. Evaluó así posibles sustancias capaces de solubilizarlo para su administración a pacientes graves, incapaces de ingerir oralmente. El trabajo, presentado en *Anales de la Asociación de Química y Farmacia del Uruguay* (1951) y como resumen en *Chemical Abstracts* (1952), fue referenciado en libros técnicos extranjeros, ya que en el texto de Silvano Casadio era citada la preparación de cloranfenicol bajo forma de solución acuosa al 30% de antipirina.

En su publicación sobre hidrotropización en tecnología farmacéutica (1960), daba ejemplos de hidrotropización (disolución de los fármacos), en base a experiencias originales. Publicó en 1962 un trabajo sobre la valoración química del elixir de clorhidrato de difenhidramina. Realizó estudios sobre solvotropización de hormonas esteroides (1965), término que refiere a la disolución de un fármaco en un vehículo no acuoso, por ejemplo, aceite. Su trabajo planteaba la problemática de que dicho fármaco -que podía ser una hormona que el paciente necesitara que se le administrase- fuera poco soluble en aceite. Así, describió solventes que permitieron disolver un 50% de testosterona para uso en pacientes con cáncer. En las Jornadas Farmacéuticas y Bioquímicas rioplatenses presentó varios trabajos originales, entre ellos *Determinación de HLB del palmitato de axeroftol* (1967) y *Acción protraída por vía oral, experiencias* (1968, con Hugo Pereira). Debe agregarse en su labor de investigación, la ya citada nota sobre fenilbutazona, de tanta trascendencia humana.

5. PUBLICACIONES DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

Sus trabajos se refirieron a la cloromicetina; sustancias químicas y cáncer; química de la inmunidad; dolor y analgésicos; bentonitas coloidales y sus aplicaciones farmacéuticas; alginatos y sus aplicaciones; isonicotinidrazida y su empleo quimioterápico; progresos químico-farmacéuticos realizados en 1951; progresos en sustancias anti-infecciosas; ultrasonido y sus aplicaciones modernas, y pirógenos (sustancias que producen fiebre). Publicaba en las revistas *Química y Farmacia*, *Anales de la Facultad de Química y Farmacia del Uruguay*, *Industria Farmacéutica y Bioquímica*, y *Revista Farmacéutica* (Argentina). En 1964 publicó un estudio sobre solubilización en farmacotecnia, donde analizaba los posibles



camino para lograr la solubilización de fármacos, tema sobre el que había trabajado experimentalmente. Los temas bibliográficos le interesaban sumamente, y en 1954 un informativo de la biblioteca de Facultad de Química y Farmacia publicaba un trabajo suyo, llamado *Primer ciclo de capacitación bibliográfica para el químico farmacéutico*. También debe citarse *Novedades Farmacéuticas*, donde se refería a temas de actualidad en aquel tiempo: medios de cultivo para virus de la poliomielitis; usos farmacéuticos y terapéuticos de los agentes quelatantes; virus y cáncer; nuevo método de recubrir comprimidos y obtención industrial de nuevos derivados de lanolina. No obstante, el alcance de estas notas, fue su logro más trascendente en materia de divulgación la publicación de un libro que compendiaría la farmacotecnia como disciplina, lo que se logró en la enciclopedia editada en 1981 por el químico argentino José Helman. La misma se denominó *Farmacotecnia teórica y práctica*. Allí escribió varios capítulos: soluciones y solubilidad; agua con fines farmacéuticos; solventes no acuosos solubles en agua; polvos; píldoras; recubrimientos de comprimidos y formas farmacéuticas para aplicar sobre la piel. Debe considerarse su participación en la enciclopedia (de varios tomos), como su obra magna.

6. OTRAS ACTIVIDADES ACADÉMICAS. CONFERENCISTA DESTACADO

En cuanto a otros aportes en la profesión, ocupó diversos cargos profesionales, pues fue miembro en varios ejercicios, del Consejo Directivo de la Asociación de Química y Farmacia del Uruguay, desde 1950. Su fotografía estuvo en la portada del vespertino *El Diario*, el 11 de noviembre de 1958, al pronunciar un discurso en el acto de conmemoración del 70 aniversario de dicha asociación, que presidió en el bienio 1958-1959 (era miembro desde 1945). En ese año se realizó la Semana Farmacéutica que incluyó una visita a la empresa ANCAP por varias personalidades entre las que estaba.



Figura 3. Dictando la conferencia *Génesis y evolución de la especialidad farmacéutica* (Rosario, Argentina), 18 de julio de 1963

Fue miembro del Consejo Directivo de la Agrupación Universitaria del Uruguay, gremial que abarca todas las profesiones universitarias (1957-1958). Integró, en 1951, la Comisión Organizadora de la Primera Convención Nacional Químico-Farmacéutica.

Fue co-fundador de las Jornadas Farmacéuticas y Bioquímicas Rioplatenses, que tuvieron lugar desde 1959. En las correspondientes a 1960 (II) realizadas en la Facultad de Química, participó con otros colegas en una exposición y discusión sobre *Factor intrínseco*. En las de 1962 (IV), disertó sobre *La formulación en las especialidades farmacéuticas* y en 1963 (V), viajó a Rosario (Argentina) en donde además de presidir la delegación uruguaya, disertó sobre *Génesis y evolución de las especialidades farmacéuticas*. Ese año también fue a Río de Janeiro, a la II Conferencia Interamericana de Industria Químico-Farmacéutica. En 1964 concurrió a las jornadas que se hicieron en Paysandú (Uruguay); en 1965 a La Plata (Argentina) y en 1967 a Buenos Aires, su ciudad natal, en nuevas ediciones de las jornadas. En 1968 las jornadas se realizaron en Punta del Este, y dictó la conferencia *Los antialimentos*. En 1984 concurrió a la XIII edición en Buenos Aires.

Visitó Córdoba en octubre de 1969 para disertar sobre *Estabilidad e incompatibilidad*, en el V Congreso de Farmacia y Bioquímica. Otras conferencias suyas fueron *La nueva química en el mundo actual* (Buenos Aires, 1959); *Los recientes progresos en la industria farmacéutica y su aplicación en Uruguay* (Asunción, 1962); *La solubilización en farmacotecnia* (Buenos Aires, 1963), y *Los sistemas dispersos y sus aplicaciones farmacéuticas y bioquímicas* (Buenos Aires, 1965), ciclo de tres conferencias en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de dicha ciudad. Concurrió a las VI Jornadas de Farmacia Hospitalaria (Buenos Aires, 1973). En 1975 fue designado miembro observador para el VI Congreso Farmacéutico y Bioquímico Argentino, realizado en Mar del Plata.



Figura 4. En el estrado, con la bandera uruguaya. V Jornadas Farmacéuticas y Bioquímicas Rioplatenses (Rosario, Argentina), julio de 1963

El químico farmacéutico Juan José Olivero, referente de la Ciencia y la Industria Farmacéutica uruguaya

Roberto Olivero

Defensor y difusor de la profesión del químico farmacéutico, no perdía oportunidad de transferir sus conocimientos. En 1960 pronunció una conferencia denominada *La profesión de químico-farmacéutico*, irradiada por Radio Nacional en el programa *Hora Universitaria*. También dictó cursos para visitantes médicos en el Centro de Viajantes del Uruguay, y realizó guiones de audiovisuales entre otras tareas relativas a este punto. En sus últimos años, disertó en 1988 en el VIII Congreso Sudamericano y X Congreso Uruguayo de Administradores de Servicios de Salud.

Dirigió entre 1949 y 1955 la revista *Química y Farmacia*. Fue socio correspondiente de la Asociación Farmacéutica y Bioquímica Argentina; miembro honorario de la Academia Argentina de Farmacia y Bioquímica; socio correspondiente del Colegio de Farmacéuticos y Bioquímicos de la Capital Federal (Argentina) y socio correspondiente del Colegio de Farmacéuticos Nacionales de Rosario (Santa Fe). Desde diciembre de 1966 y hasta su fallecimiento, fue académico de la Real Academia Nacional de Farmacia (España), cargo de altísimo honor que pocos uruguayos alcanzaron y que debe consignarse como uno de los galardones principales de su carrera. Fue nombrado miembro correspondiente en 1966, y en 1974 por fallecimiento de Juan Ángel Capra se le nombró delegado.

El MSP lo designó para distintas tareas, como asesorar sobre leyes de medicamentos (1959). También fue nombrado para la Comisión de Lisado de Corazón (1960), producto revitalizante desarrollado por el químico farmacéutico Federico Díaz, que generó en su momento gran polémica. Asesoró asimismo sobre sistemas impositivos de perfumería y tocador, tarea para la cual fue designado en 1961.

7. UNIVERSITARIO EN TODAS LAS DIMENSIONES

Su labor docente se inició en 1941, siendo ayudante de Química Orgánica, y asimismo ayudante-preparador de Farmacia Química, cargo este que ocuparía también en 1942 y 1944. Intervino en la elaboración del Plan de Estudios de la Facultad de Química y Farmacia (era presidente de la Comisión de Plan de Estudios y Título), presentándolo en la Primera Convención Nacional Químico-Farmacéutica en 1951. En 1952 fue encargado del curso de Bibliografía Química. También se le encargó el dictado de los temas de bibliografía en Física 1º. En 1956 y 1964 se encargó interinamente del dictado de clases de Química Farmacéutica. Luego, por concurso de méritos, fue designado profesor titular de Práctica e Industria Farmacéutica, actuando en ese cargo entre 1958 a 1965. Por oposición y méritos obtuvo en 1960 el cargo de profesor titular de Farmacia Galénica, que también desempeñó hasta 1965. Fue profesor titular de Farmacia Industrial, entre 1963 y 1965. En 1966 hubo fusión de cátedras y obtuvo por méritos el cargo de profesor titular de Farmacotecnia, nombre que recibió la nueva cátedra.

Desde 1974 fue profesor encargado del curso de Tecnología General, en tanto que entre 1975 y 1980 fue profesor supervisor de la cátedra de Química Analítica de Medicamentos. Fue profesor de Tecnología Farmacéutica. Desde 1981 dictó Biofarmacia. También se encargó de la organización y disertaciones varias en los cursos de Farmacia Hospitalaria (1978-1979).

Dictó varios cursos de posgrado, entre ellos Tecnología de Comprimidos Farmacéuticos (1960) y Preparaciones Inyectables (1962, ambos en la Facultad de Química) y Estabilidad de Medicamentos (Agrupación Universitaria del Uruguay, 1962).

Para reflejar la valoración que tuvo su tarea, véase el acta de la sesión del Consejo de la Facultad de Química del 14 de abril de 1966:

Sr. Sáenz. - Desde que el Prof. Olivero se hizo cargo del grupo de cátedras que se ha reunido en una sola, a pesar de las dificultades que surgían de la organización de varios cursos diferentes de planes de estudio también diferentes, que tenían que dictarse paralelamente, se puede apreciar el neto rendimiento del esfuerzo cumplido, al punto de que en un lapso relativamente corto se comienzan trabajos de importancia en los que colaboran alumnos. A la materia se le da un enfoque apropiado a una asignatura que está en 4to. y 5to. año. Los alumnos, luego de los trabajos de información que hacen en los primeros años, deben ir progresivamente introduciendo problemas en sus trabajos y saliendo de la rutina. Eso es justamente lo que se ha ido cumpliendo en esta materia, se introduce la problemática, hay que pensar y valerse de habilidad y experiencia para hacer las cosas. No se dan recetas, a diferencia de lo que ocurría antes en esta materia.



Figura 5. Olivero rodeado del decano de la Facultad de Química Itzuainigó Alvariza (con papel en sus manos), y los colegas Justo Menes (a su derecha); Héctor Antognazza y Cayetano Cano (de túnica) a su izquierda.

The pharmaceutical chemist Juan José Olivero, reference of Uruguayan Science and The Pharmaceutical Industry

Roberto Olivero

An. Real Acad. Farm. Vol. 89, nº 3 (2023) - pp. 387-394



También corresponde señalar el nivel alto, brillante y moderno de las clases expositivas del Prof. Olivero.

[...]

Sr. Decano. - Cuando se trata de la reelección de un profesor como Olivero resulta difícil, aún extendiéndose, expresar todo lo que vale el profesor. Desde que Olivero ha accedido a la docencia se ha destacado su actuación de manera muy especial en la enseñanza de la Química Farmacéutica.

El Prof. Olivero es excepcional en todos los aspectos; su actuación es reconocida por todos, y sumamente complacidos vamos a votar la reelección de un profesor de esta categoría.

[...]

Sr. Azzato. -Es difícil encontrar más aspectos de los señalados para elogiar la actuación del Prof. Olivero. Su reconocida capacidad técnica y su gran vocación por la docencia lo han hecho uno de los profesores más destacados de nuestra Facultad. Por estos fundamentos voto afirmativamente su reelección por un nuevo período reglamentario.

[...]

Sr. Decano. -Voto afirmativamente la reelección por un nuevo período reglamentario del Prof. Juan José Olivero como Profesor titular de Farmacotecnia por considerar que el Prof. Olivero es un docente inteligente y capaz, un profesor integral.

El decano en 1966 era el químico industrial Ernesto Onetto. Luego del tratamiento de este punto en el orden del día, debió Olivero entrar a sala pues era miembro del Consejo de la Facultad (lo fue en distintos períodos de las décadas del 50 y 60). Perdió su cargo de consejero en el quiebre institucional, Intervención universitaria de octubre de 1973.

De su mundo de relaciones en facultad, llegan a la memoria los profesores Uberfil Delbene (de resaltable tarea en el Laboratorio Dermur), Hugo Pereira (quien también trabajó en el Laboratorio Athena y fue presidente de la Cruz Roja uruguaya), Verquin Bedigian y Beatriz Vanni. Pero resuenan también los nombres de la *hora de la cena*: Capra, Sáenz, Saredo, Alvariza, Juanito Rodríguez Réguli, Onetto, Otto González Correa, Castiglioni, Dauría, Pizzorno, Carlos Píriz (decano destituido por la dictadura militar); José Delfino Lema (decano interventor), Eduardo Manta (quien sería decano años más tarde), y otros, que estaban sobre la mesa.

Siendo profesor de Tecnología, inducía a sus alumnos a realizar monografías de temas en los cuales tuviera aplicación el estudio de procesos. Allí figuraron insecticidas, aceites comestibles, hormonas vegetales, pinturas, preparación de aceitunas, almidones,

amilasas, color, caseínas, biogás, etcétera. En el curso se visitaban fábricas, sufriendo un accidente en la desaparecida aceitera Torino, ubicada en el barrio Cerrito, en 1978, que lo tuvo imposibilitado un corto tiempo.

Fue jefe de redacción de la revista *Anales de la Facultad de Química y Farmacia del Uruguay*, entre 1953 y 1959. Más adelante fue uno de los coordinadores de redacción de dicha revista. Fue delegado a la Asamblea del Claustro de la Facultad (1948 a 1965) y miembro del Claustro Central de la Universidad de la República (1958), año éste de aprobación de la Ley Orgánica universitaria. Integró tribunales tanto en facultad como en el Hospital de Clínicas *Dr. Manuel Quintela*; Sanidad Militar y en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de Buenos Aires.

Fue decano interino, pero por circunstancias de la vida universitaria, nunca pudo acceder efectivamente al decanato de la facultad, cuando tenía sobrados merecimientos para hacerlo. En 1975 fue nombrado doctor en Química Farmacéutica por competencia notoria.

Luego de su fallecimiento, fue reconocido al cumplirse en 2004 los 75 años de la facultad: se valoró su aporte de profesor de dicha facultad, a la industria farmacéutica de nuestro país. Los químicos Moyna y Nieto citaron de él:

[...]

en el ámbito de la industria farmacéutica, muchos docentes de la Facultad fueron directores de los laboratorios farmacéuticos instalados en el país, en especial los nacionales. Entre otros, recordamos al Prof. J. J. Olivero del Laboratorio Dispert y al Prof. O. González Correa del Laboratorio Ion.

Su papel en el acercamiento de la tecnología farmacéutica al paciente fue destacado por el doctor Cosme de los Santos (otro uruguayo que integró la Real Academia Nacional de Farmacia), en ocasión del XII Congreso de la Federación Farmacéutica de Sudamérica, en 2008. Allí se le citaba en el conjunto de los distinguidos profesores sudamericanos, junto con los doctores Zenón Lugones; Gilberto Dalesio y Aquiles Arancibia, entre otros. En el centenario de su nacimiento, varios químicos farmacéuticos enviaron esta nota para el homenaje que se le hizo en el Museo Paso de las Duranas:

Sus clases magistrales no sólo las impartía en las aulas, también aprovechaba toda oportunidad en que surgiera un problema dentro del Laboratorio para hacer docencia. Su notable inteligencia asociada a una memoria privilegiada, le permitía tener una acertada respuesta a cada pregunta que le formuláramos y a resolver los desafíos constantes de la industria farmacéutica. Siempre lo sentimos muy cercano, ya que con su bonhomía y sencillez interactuaba con nosotros de igual a igual. Muchos son los recuerdos, las frases que quedaron grabadas, lo que aprendimos, pero fundamentalmente guardamos hacia él un agradecimiento muy profundo por su legado y por el privilegio de las horas compartidas.



8. VOLUNTAD DE HIERRO PARA UNA MAGNA OBRA

Retirado de la facultad, de donde nunca se jubiló (renunció, y su salida no fue acorde a los méritos y carrera), continuó trabajando en Dispert aunque a un ritmo menor. Súbitamente se halló enfermo, y aún en ausencia de sus facultades, pugnaba por dirigirse a su trabajo, con voluntad que estremecía. Hasta principios de junio de 1993 continuó concurriendo a Dispert. Falleció el 31 de julio de 1993. Su pérdida fue muy sentida, de lo que dio cuenta la Real Academia Nacional de Farmacia cuando sus familiares enviaron, por carta, la noticia.

Varios recuerdos de su vida y obra permanecen en el Museo Paso de las Duranas, que funciona en el que fuera su domicilio. Entre ellos, la placa que le entregaron sus alumnos en 1987 (último año de su carrera docente), sus máquinas de escribir, un pequeño microscopio y una antigua balancita, plantillas para dibujar probetas, matraces, núcleos bencénicos y cadenas carbonadas, registro de asistencia a prácticas de Farmacia Galénica (1911 a 1948), así como buena parte de la biblioteca. Quedaron libros de su preferencia como *Los cazadores de microbios*; *Hasta llegar a las sulfamidas*; y la *Collier's Encyclopedia* (verdadero ícono del saber, símbolo de la cultura universal de principios de los 60), entre otros. Era asiduo lector de la Biblia y de la revista *Time*.

La magnitud de su obra quedará en los anales de la verdadera historia de la Química en el Uruguay. Fue un pionero y un maestro de generaciones y su figura tiende un puente entre los fundadores; los profesionales que todavía continúan en ejercicio, y los que vendrán. Por aquella vigencia que partía desde los cimientos de la profesión, es que se le consideró en su momento como "el último dinosaurio de la química". Su preocupación por la ciencia y por la continuidad de la vida a través de su aplicación a la farmacia marcó su trabajo fecundo.

Agradecimientos

El autor agradece a Luis Guastavino Savio, Hugo Pereira, María Isabel Suiffet, Cristina Ramponi, Celia Happel, Eduardo Savio, y Celeste Cerpa por sus aportes al trabajo, y a Fernando Mañé Garzón por la lectura del mismo y el interés demostrado en él.

9. REFERENCIAS

1. Helman, J. Farmacotecnia teórica y práctica. Tomos II; V; VI. Editorial Continental. México, D. F. 1981; p/ variable.
2. Olivero, J.J. Conocimientos actuales sobre el Cloromicetín. Química y Farmacia 1950; 3: 32-40.
3. Olivero, J. J. Sobre la preparación del cloramfenicol inyectable. Anales de la Asociación de Química y Farmacia del Uruguay 1951; 51 (2): 31-35.

4. Olivero, J. J. Parenteral chloromycetin. En: Chemical Abstract 1952; 16 (20): 9778.
5. Olivero, J. J. La hidrotropización en tecnología farmacéutica. Industria Farmacéutica y Bioquímica 1960; 1:1-17.
6. Olivero, J. J. Sobre la valoración química del elixir de clorhidrato de difenhidramina: U.S.P. XV Revisión. C.O.R. Comunicaciones originales cortas y Resúmenes 1962; 1(1):com.50.p.39.
7. Olivero, J. J. La solubilización en Farmacotecnia. Revista Farmacéutica 1964; 108 (3-4): 55-70.
8. Olivero, J. J.; Antognazza, H. Solvotropización de algunas hormonas esteroides. Revista Farmacéutica 1965; 107 (3-4): 55-57.
9. Rodríguez, J.; Farall, A.; Surraco, G.; Temesio, N.; Mendioroz, B. Intoxicación por irgipirina en el niño. A propósito de una observación clínica. Archivos de Pediatría del Uruguay 1956; XXVII (5): 311-317.
10. Real Academia Nacional de Farmacia. Señores académicos extranjeros. En: Real Academia Nacional de Farmacia. Instituto de España. Madrid: Anuario Núm. 23 1970; p.78.

Si desea citar nuestro artículo:

El químico farmacéutico Juan José Olivero, referente de la Ciencia y la Industria Farmacéutica uruguaya

Roberto Olivero

An Real Acad Farm (Internet).

An. Real Acad. Farm. Vol. 89. nº 3 (2023) · pp. 387-394

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2023.89.03.10>

The pharmaceutical chemist Juan José Olivero, reference of Uruguayan Science and The Pharmaceutical Industry

Roberto Olivero

An. Real Acad. Farm. Vol. 89. nº 3 (2023) · pp. 387-394

FÁRMACOS DE NUEVA APROBACIÓN NEWLY APPROVED DRUGS

FÁRMACOS NOVEDOSOS AUTORIZADOS RECIENTEMENTE POR EMA Y FDA (3º TRIMESTRE DE 2023)

NOVEL DRUGS RECENTLY AUTHORIZED BY EMA AND FDA (Q3, 2023)

Santiago Cuéllar Rodríguez

<https://orcid.org/0000-0002-8099-9226>

Real Academia Nacional de Farmacia

corresponding author: santiago.cuellar.rodriguez@gmail.com

NOTICIAS

EMA (EUROPEAN MEDICINES AGENCY) - FDA (U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION)

(A) TRACTO ALIMENTARIO Y METABOLISMO: Diabetes mellitus tipo 1: Donislecel (Lantidra®; FDA). Enfermedad CHAPLE: Pozelimab (Veopoz®; FDA). (D) DERMATOLOGÍA: Blefaritis por Demodex: Lotilaner (Xdemvy®; FDA). (J) ANTIINFECCIOSOS SISTÉMICOS: Ántrax: Vacuna Ántrax (Cyfendus®; FDA). (L) AGENTES ANTINEOPLÁSICOS E INMUNOMODULADORES: Cáncer de esófago: Tislelizumab (Tevimbra®; EMA). Leucemia mieloide aguda: Quizartinib (Vanflyta®; FDA). Mieloma múltiple: Talquetamab (Talvey®; EMA/FDA) y Elranatamab (Elrexfio®; FDA). Mielofibrosis: Momelotinib (Ojjaara®; FDA). Miastenia grave: Rozanolixizumab (Rystiggo®; FDA). Alopecia areata: Ritlecitinib (Litfulo®; EMA/FDA). Trasplante de células hematopoyéticas: Motixafortida (Aphexda®; FDA). (M) SISTEMA MÚSCULO-ESQUELÉTICO: Distrofia muscular de Duchenne: Delandistrogene moxeparvovec (Elevidys®; FDA). Fibrodisplasia osificante progresiva: Palovaroteno (Sohonos®; FDA). (N) SISTEMA NERVIOSO: Depresión posparto: Zuranolona (Zurzuvae®; FDA). Migraña: Atogepant (Aquipta®; EMA). (R) SISTEMA RESPIRATORIO: Tos crónica: Gefapixant (Lyfnua®; EMA). (S) ÓRGANOS SENSORIALES: Degeneración macular: Avacincaptad pegol (Izervay®; FDA). (V) VARIOS: Diagnóstico por imagen (PET): Piflufolastat 18F (Pylclari®; EMA).





EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA) - FDA (U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION)

(A) TRACTO ALIMENTARIO Y METABOLISMO

Donislecel (Lantidra®) CellTrans (FDA; Food & Drug Administration, USA)

Indicación: Tratamiento de adultos con diabetes tipo 1 que no pueden acercarse a la meta de hemoglobina glucosilada debido a episodios repetidos actuales de hipoglucemia grave a pesar de un control y educación intensivos sobre la diabetes.

Tipo: Medicamento de terapia avanzada (celular somática alogénica), constituido por no más de un millón [10(6)] de islotes alogénicos de Langerhans procedentes de páncreas de donantes fallecidos. Los islotes contienen varios tipos de células endocrinas: β , α , PP (péptido pancreático), δ y ϵ . Autorizado el 28-6-2023; no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

Mecanismo: Secreción de insulina por las células beta de los islotes alogénicos infundidos. En algunos pacientes con diabetes tipo 1, estas células infundidas pueden producir suficiente insulina, por lo que el paciente ya no necesita administrarse insulina para controlar sus niveles de glucosa en la sangre. El medicamento se administra como una infusión única en la vena porta hepática. Se puede realizar una infusión adicional dependiendo de la respuesta del paciente a la dosis inicial.

Eficacia clínica: Dos estudios de un solo brazo no aleatorizados en los que un total de 30 participantes con diabetes tipo 1 e hipoglucemia recibieron al menos una infusión y un máximo de tres infusiones. En general, 21 participantes (70%) no necesitaron la administración exógena de insulina durante un año o más (11 durante uno a cinco años y 10 durante más de cinco años). Cinco participantes (17%) no lograron ningún día de independencia de la insulina.

Eventos adversos: Los más comunes son náuseas (83%), fatiga (83%), anemia (80%), diarrea (80%), astenia (67%), cefalea (67%) y dolor abdominal (67%). La mayoría de los participantes (90%) experimentó al menos una reacción adversa grave relacionada con el procedimiento de infusión del medicamento en la vena porta hepática (laceración hepática/hematoma, hemorragia y sangrado intraabdominal, 13 %; o elevación de la presión portal, 7 %) y el uso de medicamentos inmunosupresores necesarios para mantener la viabilidad de las células de los islotes (infección, 87%; o neoplasia, 37%). Algunas reacciones adversas graves requirieron la interrupción de los medicamentos inmunosupresores, lo que provocó la pérdida de la función de las células de los islotes y la independencia de la insulina.

Pozelimab (Veopoz®) Regeneron (FDA; Food & Drug Administration, USA)

Indicación: Tratamiento de pacientes adultos y pediátricos de 1 año de edad o mayores con enteropatía perdedora de proteínas (PLE) por deficiencia de CD55, también conocida como enfermedad de CHAPLE.

Tipo: Medicamento biológico constituido por un anticuerpo monoclonal recombinante (isotipo IgG4), producido mediante tecnología de ADN recombinante. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 18-8-2023 como medicamento huérfano (*Orphan drug*), por vía rápida (*Fast Track*) y con bono para la revisión prioritaria de enfermedades pediátricas raras (*Rare Pediatric Disease Priority Review Voucher, RPD*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

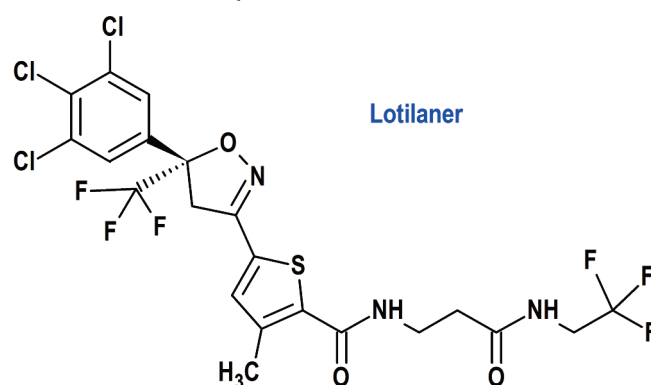
Mecanismo: Anticuerpo dirigido contra la proteína del complemento terminal C5 que inhibe su activación al bloquear la escisión de C5 en C5a (anafilatoxina) y C5b, bloqueando así la formación del complejo de ataque a la membrana (C5b-C9, una estructura que media la lisis celular).

Eficacia clínica: Un estudio de un solo grupo en el que se compararon los resultados con los datos previos al tratamiento en diez pacientes con enteropatía perdedora de proteínas (PLE) con deficiencia de CD55 activa que tenían hipoalbuminemia, con edades comprendidas entre 3 y 19 años. La mediana de tiempo para que la albúmina sérica alcanzara al menos 3,5 g/dl fue de 15,5 días; los 10 pacientes lograron la normalización en la semana 12 y mantuvieron las concentraciones de albúmina sérica dentro del rango normal durante al menos 72 semanas de tratamiento.

Eventos adversos: Los más comunes son infección del tracto respiratorio superior (30%), fractura (30%), urticaria (20%) y alopecia (20%).

(D) DERMATOLOGÍA

Lotilaner (Xdemyv®) Tarsus (FDA; Food & Drug Administration, USA)



Indicación: Tratamiento de blefaritis por Demodex.

Tipo: Medicamento sintético estándar derivado del núcleo de isoxazoliltiofenocarboxamida. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 25-7-2023; no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

Mecanismo: Una de las causas más comunes de la blefaritis es el Demodex folliculorum: un ácaro microscópico alargado, considerado como el ectoparásito permanente más común de los seres humanos, presente en los folículos pilosos de las pestañas de hasta el 85% de los adultos mayores de 60 años. El lotilaner es un inhibidor de los canales de cloruro activado por ácido gamma-aminobutírico (GABA) selectivo para estos ácaros. La inhibición de estos canales de cloruro GABA provoca una acción paralizante en el organismo diana que conduce a su muerte.

Eficacia clínica: Evaluado en un total de 833 pacientes (415 de los cuales recibieron lotilaner) en dos estudios de 6 semanas, aleatorizados, multicéntricos, doble ciego, controlados por vehículo. La eficacia se demostró mediante la mejora en los párpados (reducción de los collares alrededor de los folículos a no más de 2 por párpado superior) para el día 43, con una tasa de éxito del 44 vs. 7%.

Eventos adversos: Los más comunes son escozor y ardor en el lugar de la instilación (10%); chalazión/orzuelo y queratitis puntiforme (<2%).

(J) ANTIINFECCIOSOS SISTÉMICOS

Vacuna Ántrax (Cyfendus®) Gaithersburg (FDA; Food & Drug Administration, USA)

Indicación: Para la profilaxis posterior a la exposición de la enfermedad, tras una exposición sospechada o confirmada a Bacillus anthracis en personas de 18 a 65 años de edad cuando se administra junto con los medicamentos antibacterianos recomendados.

Tipo: Medicamento biológico producido a partir de filtrados libres de células de cultivos microaerófilos de una cepa avirulenta y no encapsulada de Bacillus anthracis. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 20-7-2023.

Mecanismo: Induce anticuerpos contra la proteína antigénica protectora que puede contribuir a la protección al neutralizar las actividades de la toxina letal citotóxica y la toxina del edema de B. anthracis. La vacuna está adyuvada con CPG 7909, una molécula de ADN sintético de 24 nucleótidos de longitud con un esqueleto de fosforotioato resistente a las nucleasas.

Eficacia clínica: Estudio clínico multicéntrico, aleatorizado, con control activo, doble ciego, de grupos paralelos. 3151 participantes recibieron al menos una dosis de Cyfendus, y 533

participantes recibieron al menos una dosis de BioThrax. Se realizó un seguimiento de la inmunogenicidad de los participantes hasta el día 64 (7 semanas después de la última vacunación con Cyfendus, 5 semanas después de la última vacunación con BioThrax). Los objetivos primarios de inmunogenicidad fueron evaluar la respuesta del factor de neutralización del 50 % (NF50) de TNA inducida por la vacuna Cyfendus en el día 64 y la no inferioridad frente a BioThrax después de dos dosis de Cyfendus administradas por vía intramuscular con dos semanas de diferencia (semanas 0 y 2) y tres dosis de BioThrax administrados por vía subcutánea con dos semanas de diferencia (semanas 0, 2 y 4). Los dos criterios de valoración de inmunogenicidad coprimarios y los criterios de evaluación estadística fueron el porcentaje de receptores de Cyfendus que alcanzaron un valor umbral de TNA NF50 $\geq 0,56$ en el día 64 y la diferencia porcentual entre los participantes que alcanzaron un valor umbral de TNA NF50 $\geq 0,29$ en el día 64 en los que recibieron Cyfendus y en los que recibieron BioThrax: 86,6 vs. 61,4%, lo que corresponde a una diferencia del 25,2 %.

Eventos adversos: Los más comunes (>10%) en el lugar de la inyección son sensibilidad (88%), dolor (86%), limitación del movimiento del brazo (64%), calor (51%), induración (38%), picazón (22%), hinchazón (20%) y eritema/enrojecimiento (18%). Las reacciones adversas sistémicas más frecuentes (>10%) son dolores musculares (75%), cansancio (67%) y dolor de cabeza (58%).

(L) AGENTES ANTINEOPLÁSICOS E INMUNOMODULADORES

Tislelizumab (Tevimbra®) Novartis (EMA; European Medicines Agency)

Indicación: Tratamiento de pacientes adultos con carcinoma de células escamosas de esófago irreseccable, localmente avanzado o metastásico, tras quimioterapia previa basada en platino.

Tipo: Medicamento biológico; es un anticuerpo monoclonal humanizado variante de la inmunoglobulina G4 (IgG4) Fc. Autorizado por la Unión Europea (EMA) 15-9-2023 como medicamento huérfano (*Orphan drug*); no autorizado previamente en Estados Unidos.

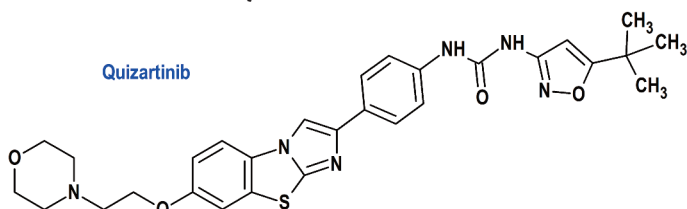
Mecanismo: Anticuerpo monoclonal humanizado frente a PD-1, que se une al dominio extracelular de PD-1 humano. Bloquea de forma competitiva la unión de PD-L1 y PD-L2, inhibiendo la señalización negativa mediada por PD-1 y aumentando la actividad funcional en células T.

Eficacia clínica: Estudio fase 3 abierto, controlado con quimioterapia escogida por el investigador (paclitaxel, xocetaxel o

irinotecán) y aleatorizado sobre un total de 512 pacientes. La variable de eficacia primaria fue la supervivencia global en la población por intención de tratar (ITT): 23% (tiselizumab) vs. 16,8% (control activo), con una mediana de supervivencia de 8,6 vs. 6,3 meses.

Eventos adversos: La reacción adversa más frecuente fue anemia (29,2%), siendo muy frecuentes (>10%) hipotiroidismo, tos, erupción cutánea, prurito, fatiga, disminución del apetito, aumento de valores de enzimas hepáticas y de la bilirrubina. Las reacciones adversas de grado 3/4 más frecuentes fueron anemia (5,0%) y neumonía (4,2%). El 1,17% de los pacientes presentaron reacciones adversas que causaron la muerte: neumonía (0,78%), hepatitis (0,13%), neumonitis (0,07%), disnea (0,07%), disminución del apetito (0,07%) y trombocitopenia (0,07%).

Quizartinib (Vanflyta®) Daiichi Sankyo (FDA; Food & Drug Administration, USA)



Indicación: En combinación con citarabina estándar y inducción con antraciclina y consolidación con citarabina, y como monoterapia de mantenimiento después de la quimioterapia de consolidación, para el tratamiento de pacientes adultos con leucemia mieloide aguda (LMA) recién diagnosticada que es positiva para duplicación interna en tándem (ITD) de FLT3 detectada por una prueba aprobada por la FDA

Tipo: Medicamento sintético estándar derivado de un núcleo de imidazo[2,1b][1,3]benzotiazol. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 20-7-2023 como medicamento huérfano (*Orphan drug*), por vía rápida (*Fast Track*) y mediante revisión prioritaria (*Priority Review*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

Mecanismo: Inhibidor del receptor tirosina cinasa FLT3, codificado por uno de los genes que se encuentra frecuentemente alterado en pacientes con leucemia mieloide aguda. Este gen codifica una cinasa de tirosina, cuya función se relaciona con el proceso ontogénico del desarrollo mieloide. Mutaciones en este gen están relacionados con pobre pronóstico. Quizartinib y su principal metabolito activo AC886 se unen al dominio de unión de trifosfato de adenosina (ATP) de FLT3 con una afinidad comparable, y ambos tenían una afinidad 10 veces menor hacia la mutación FLT3-ITD en comparación con FLT3. Quizartinib y AC886 inhibieron la actividad de la quinasa FLT3, previniendo la autofosforilación del receptor,

inhibiendo así la señalización del receptor FLT3 y bloqueando la proliferación celular dependiente de FLT3-ITD.

Eficacia clínica: Un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo de 539 pacientes con LMA positiva para FLT3-ITD recién diagnosticada. La eficacia se estableció sobre la base de la supervivencia general (SG), medida desde la fecha de aleatorización hasta la muerte por cualquier causa. El análisis primario se realizó tras un seguimiento mínimo de 24 meses tras la aleatorización del último paciente. El estudio demostró una mejora estadísticamente significativa en la SG para el brazo de quizartinib vs. placebo [cociente de riesgos instantáneos (HR) 0,78.

Eventos adversos: Los más comunes son ($\geq 10\%$ con una diferencia entre brazos de $\geq 2\%$ en comparación con el placebo), son linfopenia, hipopotasemia, hipoalbuminemia, hipofosfatemia, aumento de fosfatasa alcalina, hipomagnesemia, neutropenia febril, diarrea, mucositis, náuseas, hipocalcemia, dolor abdominal, sepsis, neutropenia, dolor de cabeza, aumento de la creatina fosfocinasa, vómitos, infecciones del tracto respiratorio superior, hipertransaminasemia, trombocitopenia, disminución del apetito, infecciones fúngicas, epistaxis, hiperpotasemia, infecciones por herpesvirus, insomnio, prolongación del intervalo QT del electrocardiograma, hipermagnesemia, hipernatremia, anemia e irritación ocular. La reacción adversa grave más común ($\geq 5\%$) fue la neutropenia febril (11%). Se produjeron reacciones adversas mortales en el 10% de los pacientes, como sepsis (5%), infecciones fúngicas (0,8%) y edema cerebral (0,8%). La discontinuación permanente debido a una reacción adversa ocurrió en el 20% de los pacientes.

Talquetamab (Talvey®) Janssen Cilag (EMA; European Medicines Agency/FDA; Food & Drug Administration, USA)

Indicación: Tratamiento en monoterapia de pacientes adultos con mieloma múltiple en recaída y refractario, que han recibido al menos 3 tratamientos previos, incluyendo un agente inmunomodulador, un inhibidor del proteasoma y un anticuerpo anti-CD38 y han presentado progresión de la enfermedad tras el último tratamiento.

Tipo: Medicamento biológico constituido por un anticuerpo biespecífico humanizado de inmunoglobulina G4-prolina, alanina, alanina (IgG4-PAA) dirigido contra el receptor acoplado a proteínas G de la familia C, grupo 5 y miembro D (GPRC5D) y los receptores CD3, producido mediante tecnología de ADN recombinante. Autorizado por la Unión Europea (EMA) el 21-8-2023 como medicamento huérfano (*Orphan drug*) y condicionalmente (*Conditional marketing authorisation*); autorizado también en Estados Unidos (FDA) el 9-8-2023.

Mecanismo: Talquetamab promueve una mayor citotoxicidad mediada por los linfocitos T mediante el reclutamiento de linfocitos T que expresan CD3 a células que expresan GPRC5D. Esto produce la activación de los linfocitos T e induce la posterior lisis de las células que expresan GPRC5D mediada por la perforina secretada y varias granzimas almacenadas en las vesículas secretoras de los linfocitos T citotóxicos. Talquetamab se dirige específicamente a las células del mieloma múltiple.

Eficacia clínica: Un ensayo de un solo grupo, abierto y multicéntrico en 288 pacientes con mieloma múltiple en recaída o refractario que habían recibido al menos tres tratamientos previos, incluyendo un inhibidor del proteasoma, un agente inmunomodulador y un anticuerpo monoclonal anti-CD38. Los pacientes recibieron una dosis 0,4 mg/kg por vía subcutánea semanalmente, tras dos dosis de escalada (0,01 y 0,06 mg/kg) en la primera semana de tratamiento, o de 8 mg/kg por vía subcutánea quincenalmente, tras tres dosis de escalada (0,01, 0,06 y 0,3 mg/kg), hasta la progresión de la enfermedad o una toxicidad inaceptable. Los resultados de la eficacia se basaron en la tasa de respuesta global, según lo determinado por la evaluación del Comité de Revisión Independiente utilizando los criterios del IMWG. La mediana de seguimiento de los pacientes tratados con la dosis de 0,4mg/kg semanales fue de 18,8 meses; se estima que el 51,5% de pacientes que respondieron al tratamiento mantuvieron la respuesta durante al menos 9 meses. La tasa de respuesta global fue del 74,1% (336,6% completa) con la dosis de 0,4 mg/kg/semanal y del 71,7% (38,7% completa) con la de 0,8 mg/kg/quincenal; la mediana de la duración de la respuesta fue de 9,5 meses con la dosis de 0,4 (no pudo determinarse con la de 0,8).

Eventos adversos: Los más comunes son síndrome de liberación de citocinas (SLC; 77%), disgeusia (72%), hipogammaglobulinemia (67%), trastorno de las uñas (56%), dolor musculoesquelético (48%), anemia (47%), trastorno de la piel (43%), fatiga (43%), pérdida de peso (40%), erupción (39%), boca seca (36%), neutropenia (35%), pirexia (33%), xerosis (32%), trombocitopenia (30%), infección del tracto respiratorio superior (29%), linfopenia (27%), disfagia (24%), diarrea (25%), prurito (23%), tos (23%), dolor (22%), apetito disminuido (22%) y cefalea (20%).

Elranatamab (Elrexfio®) Pfizer (FDA; Food & Drug Administration, USA)

Indicación: Tratamiento de pacientes adultos con mieloma múltiple en recaída o refractario que hayan recibido al menos cuatro líneas de terapia previas, incluido un inhibidor del proteasoma, un agente inmunomodulador y un anticuerpo monoclonal anti-CD38.

Tipo: Medicamento biológico constituido por un anticuerpo de tipo inmunoglobulina 2 kappa -alanina humanizado biespecífico, derivado de dos anticuerpos monoclonales, un anti-BCMA y un anti-CD3, cada uno de los cuales aporta una cadena pesada (H) distinta y una cadena ligera (L) distinta al biespecífico elranatamab; el anticuerpo biespecífico de 4 cadenas resultante está unido covalentemente mediante cinco enlaces disulfuro intercatenarios. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 14-8-2023 como medicamento huérfano (*Orphan drug*), mediante revisión prioritaria (*Priority Review*) y designado como terapia innovadora (*Breakthrough Therapy*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

Mecanismo: Anticuerpo biespecífico de maduración de células B (BCMA) dirigido a células T que se une a BCMA en células plasmáticas, plasmablastos y células de mieloma múltiple y a CD3 en células T, lo que conduce a la citólisis de las células que expresan BCMA. Elranatamab activa las células T, provocando la liberación de citocinas proinflamatorias (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α y IFN- γ) y la lisis de las células de mieloma múltiple.

Eficacia clínica: Un estudio multicéntrico, de un solo brazo y abierto que incluyó a 97 pacientes refractarios a al menos un inhibidor del proteasoma (IP), un agente inmunomodulador (IMiD) y un anticuerpo monoclonal anti-CD38. La eficacia se basó en la tasa de respuesta (57,7%, completa 25,8%) y la duración de la respuesta (DOR), según criterios del IMWG. La mediana del tiempo hasta la primera respuesta fue de 1,22 (0,9 a 6,5) meses. Con una mediana de seguimiento de 11,1 meses entre los que respondieron, la tasa de DOR a los 6 meses fue del 90,4 % y a los 9 meses fue del 82,3 %.

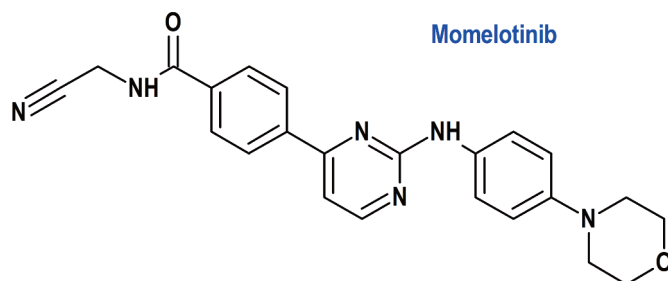
Eventos adversos: Los más comunes ($\geq 20\%$) son síndrome de liberación de citocinas (RSC), fatiga, reacción en el lugar de la inyección, diarrea, infección del tracto respiratorio superior, dolor musculoesquelético, neumonía, disminución del apetito, erupción cutánea, tos, náuseas y pirexia. Las anomalías de laboratorio de grado 3 a 4 más comunes ($\geq 30\%$) fueron disminución de linfocitos, disminución de neutrófilos, disminución de hemoglobina, disminución de glóbulos blancos y disminución de plaquetas. Se produjeron interrupciones permanentes del tratamiento debido a una reacción adversa en el 17% de los pacientes, siendo la causa más común el shock séptico (2,2%).

Momelotinib (Ojjaara®) GlaxoSmithKline (FDA; Food & Drug Administration, USA)

Indicación: Tratamiento de la mielofibrosis (MF) de riesgo intermedio o alto, incluida la MF primaria o secundaria [post-policitemia vera (PV) y post-trombocitemia esencial (ET)], en adultos con anemia.



Tipo: Medicamento sintético estándar derivado de un núcleo de aminopirimidina. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 15-9-2023 como medicamento huérfano (*Orphan drug*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).



Mecanismo: Inhibidor de Janus Kinase 1 y 2 de tipo salvaje (JAK1/JAK2) y JAK2V617F mutante, que contribuyen a la señalización de una serie de citocinas y factores de crecimiento que son importantes para la hematopoyesis y la función inmune. Momelotinib y su principal metabolito circulante humano, M21, tienen una mayor actividad inhibidora de JAK2 en comparación con JAK3 y la tirosina cinasa 2 (TYK2). Momelotinib y M21 inhiben adicionalmente el receptor de activina A tipo 1 (ACVR1), también conocido como receptor de activina tipo cinasa 2 (ALK2), que produce una inhibición posterior de la expresión de hepcidina hepática y una mayor disponibilidad de hierro, lo que resulta en una mayor producción de glóbulos rojos. La mielofibrosis es una neoplasia mieloproliferativa asociada con activación constitutiva y señalización JAK desregulada que contribuye a la inflamación y la hiperactivación de ACVR1. La señalización JAK recluta y activa proteínas STAT (transductores de señal y activación de la transcripción), lo que da como resultado la localización nuclear y la posterior regulación de la transcripción genética.

Eficacia clínica: Un ensayo doble ciego, aleatorizado y controlado con un comparador activo (danazol) en 195 adultos sintomáticos y anémicos con mielofibrosis que habían recibido previamente una terapia aprobada con inhibidores de JAK. La eficacia se estableció basándose en el porcentaje de pacientes tratados con momelotinib en comparación con danazol que lograron un MFSAF (formulario de evaluación de síntomas de mielofibrosis versión 4.0) con una reducción de la puntuación total de síntomas del 50 % o más en la semana 24 en comparación con su propia puntuación inicial (25 vs. 9%). Otros criterios de valoración incluyeron independencia de transfusión (30 vs. 20%), pacientes con reducción del volumen del bazo en un 35% o más (39 vs. 6%), cambio en la puntuación total de síntomas de MFSAF v4.0 desde el inicio (-9,4 vs. -3,1) y porcentaje de pacientes sin transfusiones (35 vs 17%).

Eventos adversos: Los más comunes son trombocitopenia (28%), diarrea (22%), hemorragia (22%), fatiga (21%), náuseas (16%), infección bacteriana (15%), dolor abdominal (13%), infección viral (12%), prurito (11%), enzimas hepáticas elevadas (10%) y pirexia (10%). Se produjeron reacciones adversas graves en el 35% de los pacientes y es precisa la interrupción permanente del tratamiento debido a una reacción adversa en el 18%. El 34% de los pacientes requieren una reducción de la dosis o la interrupción del tratamiento debido a una reacción adversa.

Rozanolixizumab (Rystiggo®) UCB (FDA; Food & Drug Administration, USA)

Indicación: Tratamiento de miastenia grave generalizada en pacientes adultos con anticuerpos anti-receptor de acetilcolina (AChR) o anti-tirosina cinasa específica de músculo (MuSK) positivos.

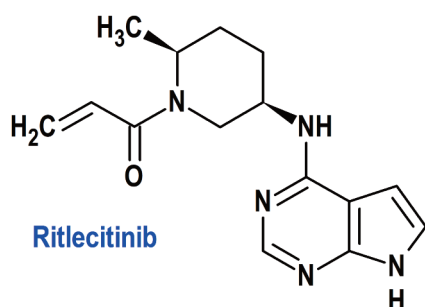
Tipo: Medicamento biológico constituido por un anticuerpo monoclonal IgG4 humanizado que se une al receptor Fc neonatal (FcRn). Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 26-6-2023 como medicamento huérfano (*Orphan drug*), mediante revisión prioritaria (*Priority Review*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

Mecanismo: Se une al receptor Fc neonatal (FcRn), lo que resulta en la reducción de la IgG circulante. En pacientes con autoanticuerpos AChR y MuSK positivos que recibieron tratamiento, hubo una reducción en los niveles totales de IgG en relación con el valor inicial; las disminuciones en los niveles de autoanticuerpos AChR y autoanticuerpos MuSK siguieron un patrón similar.

Eficacia clínica: Estudio multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, que incluyó a 200 pacientes, con un período de selección de 4 semanas y un período de tratamiento de 6 semanas seguido de 8 semanas de observación. La eficacia se midió mediante la escala MG-ADL, que evalúa el impacto de la miastenia grave generalizada en las funciones diarias de 8 signos o síntomas que normalmente se ven afectados; la puntuación total varía de 0 a 24, y la más alta indica un mayor deterioro. La variable principal de eficacia fue la comparación del cambio desde el inicio entre los grupos de tratamiento en la puntuación total de MG-ADL en el día 43: -3,4 (dosis de 7 mg/kg), -3,4 (dosis de 10 mg/kg) y -0,8 (placebo). La variable secundaria fue el cambio entre los grupos de tratamiento desde el inicio hasta el día 43 en la QMG, un sistema de calificación de 13 ítems que evalúa la debilidad muscular, cuya puntuación total posible oscila entre 0 y 39, donde la más alta indica un deterioro más grave: -5,4 (dosis de 7 mg/kg), -6,7 (dosis de 10 mg/kg) y -1,9 (placebo).

Eventos adversos: Los más comunes son ($>5\%$) cefalea (44%), diarrea (20%), fiebre (17%), reacciones de hipersensibilidad (11%), náusea (10%), reacciones en el punto de administración (8%), infección del tracto respiratorio superior (8%), dolor abdominal (8%) y artralgia (7%).

Ritlecitinib (Litfulo®) Pfizer (EMA; European Medicines Agency/FDA; Food & Drug Administration, USA)



Indicación: Tratamiento de alopecia areata grave en adultos y adolescentes a partir de los 12 años.

Tipo: Medicamento sintético estándar derivado del núcleo de pirrolopirimidina; autorizado por la Unión Europea (EMA) el 15-9-2023; autorizado también en Estados Unidos (FDA) el 23-6-2023.

Mecanismo: Inhibe irreversiblemente la cinasa Janus tipo 3 (JAK3) y la tirosina cinasa expresada en la familia de cinasas del carcinoma hepatocelular (TEC) al bloquear el sitio de unión del trifosfato de adenosina (ATP). En entornos celulares, ritlecitinib inhibe la fosforilación de la familia de proteínas STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) inducida por citocinas mediada por receptores dependientes de JAK3. Además, ritlecitinib inhibe la señalización de los receptores inmunitarios dependientes de los miembros de la familia de cinasas TEC, aunque la relevancia de la inhibición de enzimas específicas de la familia JAK o TEC para la eficacia terapéutica no se conoce actualmente. El tratamiento fue asociado con una disminución temprana dependiente de la dosis en los niveles absolutos de linfocitos, linfocitos T (CD3) y subconjuntos de linfocitos T (CD4 y CD8); además, hubo una disminución temprana dependiente de la dosis en las células NK (CD16/56) que se mantuvo estable en el nivel más bajo hasta la semana 48.

Eficacia clínica: Un ensayo aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo en 718 sujetos de 12 años de edad y mayores con alopecia areata con $\geq 50\%$ de pérdida de cabello del cuero cabelludo, incluida la alopecia totalis y la alopecia universalis. La evaluación de la pérdida de cabello del cuero cabelludo se basó en la puntuación SALT (Severity of Alopecia Tool). En la semana 24, la proporción de sujetos tuvo una respuesta SALT ≤ 20 (20% o menos de pérdida de cabello del cuero cabelludo) fue del 23,0% (ritlecitinib) vs. 1,6% (placebo), mientras que la respuesta SALT

≤ 10 (10% o menos de pérdida de cabello del cuero cabelludo) fue del 13,4 vs. 1,5%.

Eventos adversos: Los más comunes ($\geq 5\%$) son cefalea (10,8 %), diarrea (10,0 %), acné (6,2 %) y erupción (5,4 %).

Motixafortida (Aphexda®) BioLineRx (FDA; Food & Drug Administration, USA)

Indicación: En combinación con filgrastim (G-CSF) para movilizar células madre hematopoyéticas a la sangre periférica para su recolección y posterior trasplante autólogo en pacientes con mieloma múltiple.

Tipo: Medicamento sintético estándar constituido por un péptido cíclico formado por 14 aminoácidos: [N-(4-fluoro-benzoil)-L-arginil]-L-arginil-[(3-naftil)-L-alanil]-L-cisteinil-L-tirosil-L-citrulinil-L-lisil-D-lisil-L-prolil-L-tirosil-L-arginil-L-citrulinil-L-cisteinil-L-arginineamida, (4-13)-disulfuro cíclico. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 8-9-2023 como medicamento huérfano (*Orphan drug*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

Mecanismo: Inhibidor del receptor de quimiocina 4 con motivo C-X-C (CXCR4) y bloquea la unión de su ligando afín, el factor 1α derivado del estroma (SDF- 1α)/ligando de quimiocina 12 con motivo C-X-C (CXCL12). SDF- 1α y CXCR4 desempeñan un papel en el tráfico y la localización de células madre hematopoyéticas humanas en la médula. Una vez en la médula, la célula madre CXCR4 puede ayudar a anclar estas células a la matriz de la médula, ya sea directamente a través de SDF- 1α o mediante la inducción de otras moléculas de adhesión. El tratamiento con motixafortida provoca leucocitosis y elevaciones de las células madre y progenitoras hematopoyéticas circulantes en la circulación periférica. Las células madre movilizadas por motixafortida son capaces de injertarse con capacidad de repoblación a largo plazo.

Eficacia clínica: Un estudio aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo en 122 pacientes con mieloma múltiple. Antes de recibir motixafortida o placebo, los pacientes recibieron dosis matutinas diarias de filgrastim durante 4 días. La efectividad clínica midió según la proporción de pacientes que alcanzaron un objetivo de recolección de células de $\geq 6 \times 10^6$ células CD34+/kg en hasta 2 aféresis después de la administración de filgrastim y una sola administración de motixafortida o de placebo: 67,5 vs 9,5%.

Eventos adversos: Los más comunes son reacciones en el lugar de la inyección (73%), prurito (38%), enrojecimiento (33%), erupción (16%), urticaria (14%), eritema (12%), dolor de espalda (21%), parestesia (19%), hipopotasemia (15%), náuseas (14%). Se produjeron reacciones adversas graves en el 5,4% de los pacientes.

(M) SISTEMA MÚSCULO-ESQUELÉTICO

Delandistrogene Moxeparvovec (Elevidys®) Sarepta (FDA; Food & Drug Administration, USA)

Indicación: Tratamiento de pacientes pediátricos ambulatorios de 4 a 5 años con distrofia muscular de Duchenne (DMD) con una mutación confirmada en el gen DMD.

Tipo: Medicamento de terapia avanzada (génica), constituido por un vector basado en el serotipo rh74 (AAVrh74) del virus adenoasociado, recombinante y no replicante que contiene el transgén de la microdistrofina bajo el control del promotor MHCK7; la proteína microdistrofina expresada es una versión abreviada (138 kDa, en comparación con el tamaño de 427 kDa de la distrofina expresada en células musculares normales) que contiene dominios seleccionados de la distrofina natural). Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 22-6-2023 como medicamento huérfano (*Orphan drug*), de forma acelerada (*Accelerated Approval*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

Mecanismo: Producto de terapia génica recombinante que consta de una cápside del serotipo rh74 (AAVrh74) del virus adenoasociado (AAV) recombinante no replicante y un casete de expresión de ssDNA flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) derivadas de AAV2. El casete contiene: un componente regulador del gen MHCK7, que comprende un promotor de la creatina cinasa 7 y un potenciador de la cadena pesada de la α -miosina, y el transgén de ADN que codifica la proteína de microdistrofina modificada.

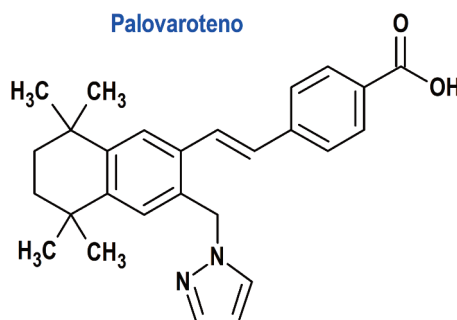
Eficacia clínica: Dos ensayos clínicos multicéntricos, en progreso actualmente. El primero tuvo dos partes, la primera consistente en un período de 48 semanas, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, mientras que la segunda tuvo un período de 48 semanas que comenzó después de completar la primera parte, donde los pacientes que recibieron placebo durante la Parte 1 fueron tratados con el fármaco y los pacientes tratados con el fármaco durante la Parte 1 recibieron placebo. La población del estudio consistió en pacientes masculinos ambulatorios con DMD ($N = 41$) de 4 a 7 años de edad con una mutación de marco de lectura confirmada o una mutación prematura del codón de terminación entre los exones 18 a 58 en el gen DMD. Los objetivos principales fueron evaluar la expresión de microdistrofina en el músculo esquelético y evaluar el efecto del fármaco en la puntuación total de la Evaluación ambulatoria de North Star (NSAA). El estudio 2 es un estudio abierto que incluye una cohorte de 20 sujetos masculinos ambulatorios con DMD de 4 a 7 años de edad. Los 20 sujetos tienen una mutación de cambio de marco confirmada, una mutación del sitio de empalme canónico o una mutación prematura del codón de

parada en el gen DMD. El cambio en la puntuación total de la NSAA se evaluó desde el inicio hasta la semana 48 después de la infusión de ELEVIDYS o placebo, siendo la mediana del 40,8% en el estudio 1 y del 50,6% en el 2.

Eventos adversos: Los más comunes son vómitos (61%), náuseas (40%), aumento de valores en pruebas de función hepática (37%), pirexia (24%) y trombocitopenia (12%).

Palovaroteno (Sohonos®) Ipsen (FDA; Food & Drug Administration, USA)

Palovaroteno



Indicación: Para la reducción del volumen de nueva osificación heterotópica en adultos y pacientes pediátricos de 8 años o más para mujeres y de 10 años o más para hombres con fibrodysplasia osificante progresiva (FOP).

Tipo: Medicamento sintético estándar con estructura retinoide aromática. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 16-8-2023 por vía rápida (*Fast Track*), mediante revisión prioritaria (*Priority Review*) y designado como terapia innovadora (*Breakthrough Therapy*); por su parte, en la Unión Europea la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) confirmó el 25-5-2023 su recomendación inicial del 26-1-2023 de denegar la autorización de comercialización de Sohonos, por considerar que no se podían extraer conclusiones firmes sobre los beneficios del medicamento, ya que la conclusión del solicitante se basaba en un análisis post hoc que no estaba ni científicamente ni clínicamente justificado y los objetivos de estudio preespecificados no se cumplieron, además los resultados de otros estudios y los limitados datos clínicos a largo plazo disponibles no respaldaron la eficacia. En cuanto a la seguridad, el riesgo de cierre fisario prematuro, que es un riesgo conocido con el tratamiento con retinoides en pacientes en crecimiento, no pudo ser adecuadamente mitigado con las medidas de minimización de riesgos propuestas por la empresa. Además, la EMA consideró que algunas cuestiones relativas a la calidad de la sustancia activa no se habían resuelto.

Mecanismo: En pacientes con FOP, la formación ósea anormal, incluida la osificación heterotrofa (HO), es impulsada por una mutación de ganancia de función en el receptor ALK2 (ACVR1) de tipo I de la proteína morfogenética ósea (BMP). El palovaroteno

es un agonista del receptor del ácido retinoico, con particular selectividad en el subtipo gamma de RAR. A través de la unión a RAR γ , el palovaroteno disminuye la vía de señalización de BMP/ALK2 al inhibir la fosforilación de SMAD1/5/8, lo que reduce la condrogénesis dependiente de ALK2/SMAD y la diferenciación de osteocitos, lo que resulta en una reducción de la formación de hueso endocondral.

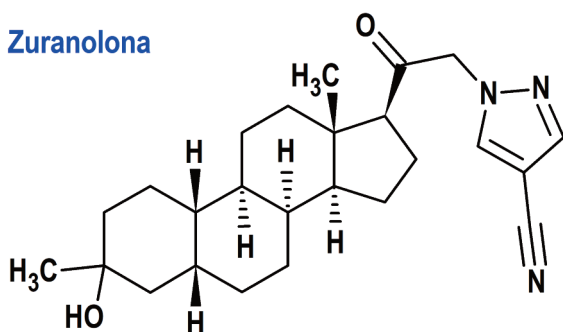
Eficacia clínica: Un estudio de un solo grupo en 97 sujetos con FOP con mutación R206H de 4 años o más. El criterio de valoración principal de eficacia fue el volumen anualizado de nueva osificación heterotópica (HO), evaluado mediante imágenes por TC de cuerpo entero de dosis baja (excluyendo la cabeza). La nueva HO media anualizada fue de 9,4 cm³/año en los sujetos que recibieron el tratamiento y de 20,3 cm³/año en los sujetos no tratados.

Eventos adversos: Los más comunes en uso crónico son piel seca (61%), labio seco (47%), artralgia (36%), prurito (34%), dolor en extremidades (29%), erupción (28%), alopecia (24%), eritema (19%), dolor de cabeza (19%), dolor de espalda (17%), exfoliación de la piel (15%), náuseas (15%), dolor musculoesquelético (14%), mialgia (12%), ojo seco (10%), hipersensibilidad (10%), edema periférico (9%) y fatiga (5%). Se produjeron reacciones adversas graves en el 15% en la población de 8/10 años o más, siendo la reacción adversa grave más común el cierre epifisario prematuro; se produjeron reacciones adversas que condujeron a la interrupción permanente en el 8%, siendo la piel seca la causa más común (1%).

(N) SISTEMA NERVIOSO

Zuranolona (Zurzuvae®) Sage (FDA; Food & Drug Administration, USA)

Zuranolona



Indicación: Tratamiento de depresión posparto.

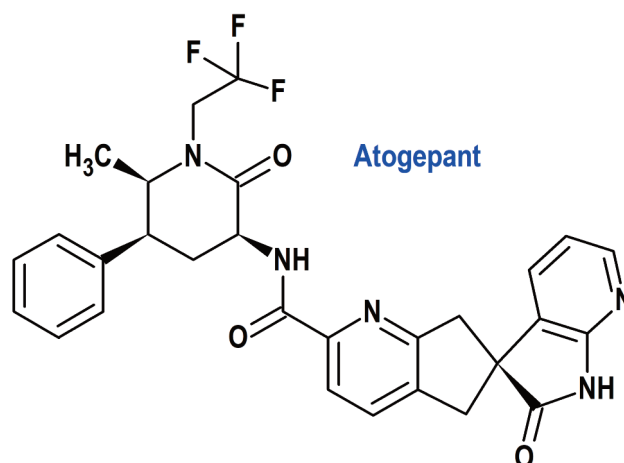
Tipo: Medicamento sintético estándar derivado de un núcleo esteroídico. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 4-4-2023 por vía rápida (*Fast Track*), mediante revisión prioritaria (*Priority Review*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

Mecanismo: Modulación alostérica de los receptores GABA (A).

Eficacia clínica: Dos estudios aleatorizados, controlados con placebo, doble ciego y multicéntricos, en mujeres con depresión posparto que cumplieron con los criterios del Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales para un episodio depresivo mayor, con inicio de síntomas en el tercer trimestre o dentro de las 4 semanas posteriores al parto. El criterio principal de valoración para ambos estudios fue el cambio desde el inicio en los síntomas depresivos con relación al placebo, medido por la puntuación total de la escala de depresión de Hamilton de 17 ítems (HAMD-17) en el día 15. La diferencia con el placebo fue de 4,2 y 4,0 puntos en los estudios.

Eventos adversos: Los más comunes son somnolencia (36%), mareos (13%), diarrea (6%), fatiga (5%), infección del tracto urinario (5%), deterioro de la memoria (3%) y dolor abdominal (3%).

Atogepant (Aquipta®) AbbVie (EMA; European Medicines Agency)



Indicación: Profilaxis de la migraña en adultos que tengan al menos 4 días de migraña al mes.

Tipo: Medicamento sintético estándar derivado de un núcleo de espiropirrolpiridina-ciclopentapiridina. Autorizado por la Unión Europea (EMA) el 11-8-2023 con revisión prioritaria (*Priority Medicines*; PRIME); autorizado previamente en Estados Unidos (FDA) el 28-9-2021.

Mecanismo: Atogepant muestra afinidad, como inhibidor, hacia varios receptores de la familia de los receptores de la calcitonina/CGRP, que se considera que están implicados en la fisiopatología de la migraña. Sin embargo, aún no se ha establecido el mecanismo de acción preciso de atogepant en la profilaxis de la migraña.

Eficacia clínica: Un estudio aleatorizado, multicéntrico, doble ciego y controlado con placebo sobre 658 pacientes con migraña episódica (4 -14 días con migraña al mes), durante 12

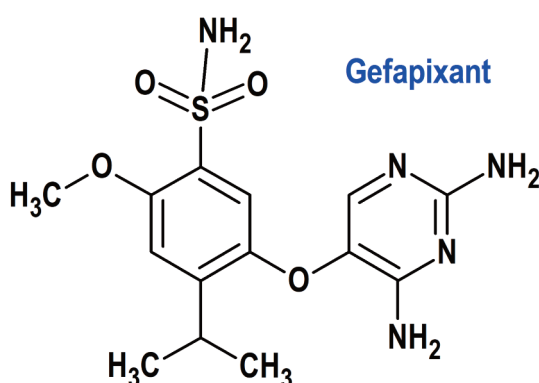


semanas. La variable primaria de eficacia fue el cambio desde el inicio en la media de días con migraña al mes durante el periodo de tratamiento: -4,1 vs. -2,5.

Eventos adversos: Los más comunes son náuseas (9%), estreñimiento (8%) y fatiga/somnolencia (5%). La mayoría de las reacciones son de intensidad leve o moderada.

(R) SISTEMA RESPIRATORIO

Gefapixant (Lyfnua®) Merck Sharp Dohme (EMA; European Medicines Agency)



Indicación: Tratamiento de la tos crónica refractaria o idiopática.

Tipo: Medicamento sintético estándar derivado de un núcleo de diaminopirimidina; no autorizado previamente en Estados Unidos.

Mecanismo: Antagonista selectivo del receptor P2X₃. Gefapixant también tiene actividad frente al subtipo de receptor P2X_{2/3}. Los receptores P2X₃ son canales de iones regulados por el ATP que se encuentran en las fibras C sensitivas del nervio vago en las vías respiratorias, que se activan en respuesta a la inflamación o a irritantes químicos. El ATP se libera de las células de la mucosa de las vías respiratorias en condiciones de inflamación. La unión del ATP extracelular a los receptores P2X₃ se detecta como una señal de daño por parte de las fibras C. La activación de las fibras C, que el paciente siente como una necesidad de toser, inicia un reflejo de tos. El bloqueo de la señal que el ATP produce a través de los receptores P2X₃ reduce la activación excesiva de los nervios sensitivos y la tos excesiva inducida por el ATP extracelular.

Eficacia clínica: Dos estudios de fase 3 de 52 semanas, multicéntricos, aleatorizados, doble ciego, controlados con placebo, en adultos con tos crónica refractaria (asociada a una enfermedad comórbida, tal como asma, enfermedad por reflujo gastroesofágico o síndrome de tos de las vías respiratorias superiores) o idiopática (no asociada a ninguna enfermedad comórbida). La variable primaria de eficacia fue la reducción de la frecuencia de la tos

durante 24 horas (toses por hora): 61-63% (gefapixant) vs. 55-57% (placebo).

Eventos adversos: Los más comunes (>10%) son trastornos del gusto (disgeusia, ageusia, hipogeusia). La mayoría fueron de intensidad leve (65%) a moderada (32%).

(S) ÓRGANOS SENSORIALES

Avacincaptad Pegol (Izervay®) Iveric Bio (FDA; Food & Drug Administration, USA)

Indicación: Tratamiento de la atrofia geográfica (AG) secundaria a degeneración macular asociada con la edad (DMAE).

Tipo: Medicamento sintético biológico constituido por un aptámero de ácido ribonucleico (ARN), un oligonucleótido de 39 bases, que está unido covalentemente a una molécula ramificada de polietilenglicol (PEG, Pegol) de aproximadamente 970 unidades de etilenglicol. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 4-8-2023 mediante revisión prioritaria (*Priority Review*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

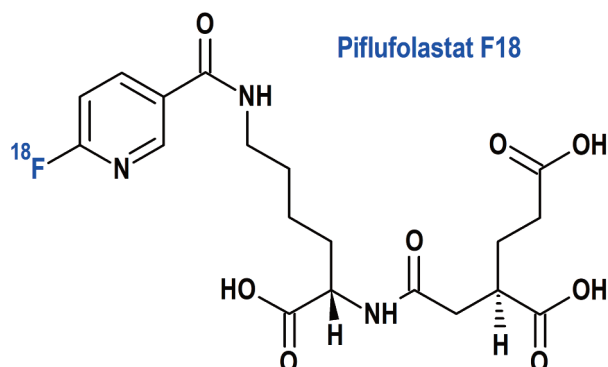
Mecanismo: Avacincaptad pegol es un aptámero de ARN, que se une e inhibe la proteína del complemento C5, evitando su escisión en C5a y C5b y disminuyendo así la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC), el cual actúa como esquirlas y penetra las membranas de las células epiteliales del pigmento retiniano o fotorreceptor, destruyéndolas y provocando la atrofia regional de dicho epitelio.

Eficacia clínica: Dos estudios aleatorizados, multicéntricos, doble ciego, con control simulado, de 18 y 12 meses de duración en pacientes con AG por DMAE, con edades comprendidas entre 51 y 97 años con una media de 77 años; en total, 292 pacientes fueron tratados con avacincaptad pegol 2 mg y 332 pacientes recibieron tratamiento simulado. En ambos, se evaluó la tasa media de crecimiento de la AG (pendiente) desde el inicio hasta el mes 12, medido por fluorescencia automática (FAF) en 3 puntos temporales: el inicio, el mes 6 y el mes 12 (y en el mes 18 en uno de los estudios). La diferencia de la tasa de crecimiento de la atrofia geográfica (AG) a los 12 meses registrada con avacincaptad pegol con relación a la terapia simulada fue de 0,38-0,67 mm², lo que supone un 18-35% menos. Los pacientes que desarrollaron neovascularización coroidea fueron tratados concomitantemente con terapia anti-VEGF.

Eventos adversos: Los más comunes son hemorragia conjuntival (13%), aumento de la presión intraocular - PIO (9%), visión borrosa (8%), neovascularización coroidea (7%), dolor ocular (4%), moscas volantes (2%), blefaritis (2%).

(V) VARIOS

Piflufolastat 18F (Pylari®) Curium PET (EMA; European Medicines Agency)



Indicación: Detección de lesiones que expresan el antígeno prostático específico de membrana (PSMA) mediante tomografía por emisión de positrones (PET) en adultos con cáncer de próstata (CaP) en estadificación primaria de pacientes con CaP de alto riesgo antes del tratamiento curativo inicial y en localización de recurrencias de CaP en pacientes con sospecha de recidiva basada en el aumento de los niveles séricos de antígeno prostático específico (PSA) después del tratamiento primario con intención curativa.

Tipo: Medicamento sintético estándar derivado del ácido pentanodioico, conteniendo un radionúclido constituido por un átomo de flúor-18 (F 18); autorizado por la Unión Europea (EMA) el 24-7-2023; autorizado previamente en Estados Unidos (FDA) el 26-5-2021.

Mecanismo: El antígeno prostático específico de membrana (PSMA) es una glucoproteína transmembrana que se expresa principalmente en el epitelio prostático humano normal a niveles bajos, pero que está sobreexpresada en tejidos tumorales, particularmente en células de cáncer de próstata, incluyendo metástasis. El flúor-18 (18F) es un radionúclido emisor de positrones que hace posible la tomografía por emisión de positrones (PET). El piflufolastato (18F) es un inhibidor selectivo del PSMA, marcado con flúor 18. Basándose en la intensidad de las señales, las imágenes PET obtenidas usando piflufolastato (18F) indican la presencia de tejidos que expresan PSMA.

Eficacia clínica: Tres ensayos clínicos multicéntricos, prospectivos y abiertos en varones con cáncer de próstata. En el primero (N=242). La sensibilidad fue del 28-39%, la especificidad del 95-98%, el valor predictivo positivo (VPP) del 72-81% y el valor predictivo negativo (VPN) del 81-84%. En el segundo estudio (N=208), el VPP fue del 85-87% y en el tercer estudio la sensibilidad fue del 58%.

Eventos adversos: Los más comunes son dolor de cabeza (1,4%), disgeusia (1,0%) y fatiga (0,5%).

PROCEDIMIENTOS ESPECIALES DE EVALUACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Tanto la Agencia Europea de Medicamentos (*European Medicines Agency, EMA*) como la *Food & Drug Administration (FDA)* de Estados Unidos disponen de diversos procedimientos de evaluación y autorización de medicamentos para incentivar el desarrollo de nuevos tratamientos para enfermedades que de otra manera no atraerían el interés de las empresas debido al elevado coste del desarrollo y la imposibilidad de retorno económico comercial, así como para facilitar la mejor y más rápida disponibilidad posible de medicamentos designados como especialmente relevantes atendiendo a las particulares características patológicas de algunos pacientes, así como a la gravedad de las patologías para los que son destinados y a su potencial repercusión social y epidemiológica, valorando si constituyen el primer tratamiento disponible o si presentan ventajas significativas sobre los tratamientos existentes. Estas designaciones y procedimientos son referenciados, en su caso, en las monografías de los medicamentos previamente descritas.

EMA

- Medicamentos Prioritarios (*Priority Medicines; PRIME*): es un esquema de evaluación de la EMA para apoyar el desarrollo de medicamentos que se dirigen a una necesidad médica no cubierta, basándose en una interacción mejorada y un diálogo temprano con los desarrolladores de medicamentos prometedores, para optimizar los planes de desarrollo y acelerar la evaluación para que estos medicamentos puedan llegar antes a los pacientes, empleando para ello el asesoramiento científico y la evaluación acelerada.
- Evaluación acelerada (*Accelerated assessment*): reduce el plazo máximo para que el Comité de Medicamentos de Uso Humano (CHMP) revise una solicitud de autorización de comercialización de medicamentos, pasando de 210 a 150 días. Las solicitudes pueden ser elegibles para una evaluación acelerada si el CHMP decide que el producto es de gran interés para la salud pública y la innovación terapéutica.
- Autorización de comercialización condicional (*Conditional marketing authorisation*) para solicitudes de medicamentos que presenten datos clínicos menos completos que los normalmente requeridos, siempre que el beneficio de la disponibilidad inmediata del medicamento supere el riesgo inherente al hecho de que todavía se requieren datos



adicionales, tal como aquellos destinados a tratar, prevenir o diagnosticar enfermedades gravemente debilitantes o potencialmente mortales, incluyendo a los medicamentos huérfanos.

- Autorización de comercialización en condiciones excepcionales (*Exceptional circumstances*) para medicamentos en los que el solicitante no puede proporcionar datos completos sobre la eficacia y la seguridad en condiciones normales de uso, porque la condición a tratar es rara o porque la recopilación de información completa no es posible o no es ético.
- Medicamento huérfano (*Orphan drug*): son designados como tales aquellos destinados a tratar enfermedades raras (en la Unión Europea son aquellas que afectan a menos de 5 de cada 10.000 habitantes), no resultan atractivos a los patrocinadores por su escasa rentabilidad y precisan por ello apoyo adicional para su desarrollo.

FDA

- Revisión prioritaria (*Priority Review*): evaluación de solicitudes de medicamentos que, de aprobarse, serían mejoras significativas en la seguridad o eficacia del tratamiento, diagnóstico o prevención de afecciones graves en comparación con las solicitudes estándar, considerando mejora significativa a la evidencia de mayor efectividad en el tratamiento, prevención o diagnóstico de la condición; eliminación o reducción sustancial de una reacción farmacológica limitante del tratamiento; mejora documentada del cumplimiento del paciente que se espera que conduzca a una mejora en los resultados graves; o evidencia de seguridad y eficacia en una nueva subpoblación.
- Bono para la revisión prioritaria de enfermedades pediátricas raras (*Rare Pediatric Disease Priority Review Voucher, RPD*): la FDA puede otorgar bonos o cupones de revisión prioritaria a los patrocinadores de aplicaciones de productos destinados para enfermedades pediátricas raras que cumplan con ciertos criterios. Este bono es un incentivo que el patrocinador recibe en forma de "cupón especial", el cual puede ser empleado de dos maneras: para aplicar el sistema de revisión prioritaria de la FDA en cualquier otro de sus productos o venderlo a otra compañía interesada en que su propio medicamento sea revisado de forma prioritaria.
- Terapia innovadora (*Breakthrough Therapy*): medicamentos destinados a tratar una afección grave y cuya evidencia

clínica preliminar indica que puede demostrar una mejora sustancial sobre la terapia disponible en una o varias variables clínicamente significativas, como la duración del efecto, la relevancia del resultado clínico observado mostrando una clara ventaja sobre la terapia disponible.

- Autorización acelerada (*Accelerated Approval*): medicamentos indicados en afecciones graves que cubran una necesidad médica no satisfecha, que puedan ser autorizados precozmente basándose en una o más variables subrogadas (una medida de laboratorio o signo físico que se usa como sustituto de una variable clínicamente significativa que es una medida directa sobre lo que siente un paciente, sus funciones o su supervivencia y que se espera que prediga el efecto de la terapia).
- Vía rápida (*Fast Track*): medicamentos que aborden enfermedades graves en las que puedan tener un impacto significativo sobre la supervivencia, el funcionamiento diario o la probabilidad de que la afección, si no se trata, progrese de una condición menos severa a una más severa, tales como el SIDA, la enfermedad de Alzheimer, la insuficiencia cardíaca y o cáncer.
- Medicamento huérfano (*Orphan drug*): designación de un medicamento potencialmente útil para prevenir, diagnosticar o tratar una enfermedad rara; es decir, con menos de 200.000 pacientes/año (los que supone una prevalencia aproximada de 7,5/10.000 habitantes, en la actualidad).

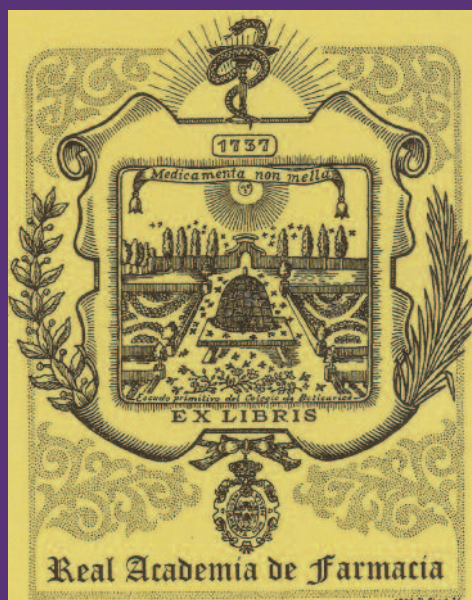
**Si desea citar nuestro artículo:
Fármacos novedosos autorizados recientemente
por EMA y FDA (3º trimestre de 2023)**

Santiago Cuéllar Rodríguez

An Real Acad Farm (Internet).

An. Real Acad. Farm. Vol. 89. nº3 (2023) · pp. 395-406

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2023.89.03.11>



Regolamento
stabilirsi in

1.º L'Ufficio s
cioè = Di C
Di Materia
che, ed arte
comparata =
nica = In ob
Spedale civi

2.º Perche in
Professore di
Egli non pe
zione del S

3.º I suddetti
trale indica

4.º L'Ufficio h