

Índice

	Pág.
Cartas de bienvenida	III
Jesús Aguilar Santamaría Presidente del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España	III
Antonio Mingorance Presidente del Consejo Andaluz de Colegios Oficiales de Farmacéuticos	IV
Manuel Pérez Presidente del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Sevilla	V
Política editorial	VI
Tipos de artículos	VI
Información para los autores / (Normas de publicación)	VII
Consejo Editorial, Comité Editorial y Comité Científico	X
 Artículos	
Peroxisomas y síndrome de Zellweger. Revisión sistemática de las terapias vigentes <i>Peroxisomes and Zellweger syndrome. Systematic review of current therapies</i> Bendala-Tufanisco E, López-Ruiz MA, Grisolia S	1-12
El farmacéutico, siempre al tanto de las innovaciones terapéuticas: las células CAR-T <i>The pharmacist, always aware of therapeutic innovations: CAR-T</i> Zaragozá F, Zaragoza C	13-17
Redirigiendo las estrategias terapéuticas en la Enfermedad de Alzheimer <i>Reframing the therapeutic approaches for Alzheimer's Disease</i> Muñoz-Castro C, Romero-Molina C, Vitorica J	18-33
Actualización de conocimientos en la enfermedad celíaca y otras patologías relacionadas con el gluten <i>Update of knowledge in celiac disease and other gluten-related pathologies</i> Moreno ML, Sousa C	34-44
Gotas para la presbicia: ¿mito o realidad? <i>Presbyopia eyedrops: myth or reality</i> Romero L, Ortega N	45-51
Un nuevo método de impresión 3D de medicamentos <i>A novel 3D printing method of medicines</i> Real JP, Palma SD	52-59
Pandemia COVID-19: Análisis Clínicos, Laboratorios Clínicos, Medicina de Laboratorio <i>Pandemic COVID-19: Clinical Analysis, Clinical Laboratories, Laboratory Medicine</i> Gómez Canga-Argüelles C	60-65

Nueva alternativa a la cirugía en la queratopatía neurotrófica. Formulación de liposomas deformables de extracto de membrana amniótica <i>New alternative to surgery in neurotrophic keratopathy. Formulation of amniotic membrane extract-loaded deformable liposomes</i> Rodríguez-Ochoa JL, Arroyo-García CM, Rabasco AM, González-Rodríguez ML	66-78
Escorbuto o la enfermedad de los nautas. Aportación de los navegantes españoles a su conocimiento y tratamiento <i>Scurvy or the disease of the navigators. Contribution of spanish navigators to their knowledge and treatment</i> Herrera J.....	79-84
Información aerobiológica desde la farmacia comunitaria. La red aerobiológica de la región de Murcia <i>Aerobiological information from the community pharmacy. The aerobiological network in región of Murcia</i> Moreno-Grau S, Elvira-Rendueles, B, García-Moreno SI, Tovar I, Sierra S, Moreno JM.....	85-97
Conocer el pasado es predecir el futuro: a propósito de la covid-19 <i>Knowing the past is predicting the future: about the covid-19</i> Ramos A, Venegas C, Moreno E.....	98-105

Ciencias Farmacéuticas, hoy más importantes que nunca

La ciencia es la base de todo conocimiento, algo que hoy más que nunca tiene una importancia fundamental. La relevancia y urgencia de la pandemia generada por el COVID-19 es actualmente el gran reto sanitario mundial en un momento en el que la ciencia es el único horizonte capaz de devolver la normalidad deseada a la humanidad.

A nivel farmacológico es un gran desafío en un siglo XXI en el que la evolución de la medicina de precisión, la aplicación de modelos predictivos, la genómica, los medicamentos biológicos y biotecnológicos y la innovación disruptiva con medicamentos como los nuevos CAR-T, hace prever mejoras muy importantes en el tratamiento y curación de enfermedades.

La consecución de la vacuna frente COVID-19 es un horizonte que todos deseamos alcanzar cuanto antes, una carrera contrarreloj por alcanzar la meta de un medicamento seguro, con la mayor eficacia posible y que nos garantice el mayor tiempo de protección.

Y en todo este contexto, el Colegio de Farmacéuticos de Sevilla arranca un proyecto apasionante y fundamental, la publicación de una nueva revista para profundizar en el conocimiento, la **Revista Española de Ciencias Farmacéuticas (RESCIFAR)**. Una iniciativa importante en un momento crucial, para seguir dando soporte a los farmacéuticos colegiados, con herramientas que permitan una actualización permanente de conocimientos para estar al día de todas las novedades en torno al medicamento para el ejercicio de la profesión.

Enhorabuena a toda la Junta de Gobierno del Colegio de Sevilla por el acierto y por permanecer siempre atentos a las necesidades del día a día de los farmacéuticos para seguir prestando un servicio de excelencia al conjunto de la sociedad española.

Jesús Aguilar Santamaría

Presidente del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España

La importancia de la investigación

Es para mí un honor, y también una satisfacción, introducir este número inaugural de RESCIFAR, la Revista Española de Ciencias Farmacéuticas, una meritoria y acertada iniciativa del Colegio de Farmacéuticos de Sevilla para estimular la investigación y la transferencia de conocimiento en el ámbito farmacéutico, que es probablemente uno de los aspectos en los que esta profesión puede y debe seguir avanzando. Como ocurre con muchas otras profesiones y especialidades sanitarias volcadas en la práctica clínica, estamos muy orientados en la satisfacción del paciente, y esa vocación asistencial debemos sin duda mantenerla, pero sin descuidar la faceta científica, siendo conscientes de que invertir tiempo en publicar y generar comunidad científica es propiciar el avance profesional y por ende la mejora del servicio prestado a sus usuarios.

El compromiso con la investigación es tanto más necesario cuando vivimos en un mundo en constante cambio, donde las innovaciones tecnológicas se suceden a velocidad cada vez mayor, y es necesario discriminar las que realmente suponen avances y mejoras para el paciente y las que no. Del mismo modo, no podemos ignorar que también la sociedad sobre la que debemos intervenir no solo ha cambiado, sino que se reorganiza constantemente y de forma cada vez más acelerada y profunda, de modo que también los retos sanitarios a los que debemos enfocarnos han experimentado una variación sustancial y requieren por ello de una investigación contrastada y con resultados aquilatados.

Es conocido en este sentido que el envejecimiento de la población, la creciente prevalencia de las patologías crónicas, la complejidad cada vez mayor de los tratamientos y la concurrencia de múltiples patologías en pacientes cada vez mayores y más polimedcados representan un escenario nuevo, de desafiantes retos para el sistema sanitario, ante el que los profesionales que trabajamos en él no podemos volver la cara.

Del mismo modo, la emergencia sanitaria por COVID19 ha puesto de manifiesto la necesidad de un reseteo completo de las políticas sanitarias, evidenciando la insuficiencia del énfasis en los tratamientos y revelando la importancia de incidir en las políticas de salud pública basadas en la epidemiología, la prevención, la detección precoz, el control de los pacientes, etcétera. Asimismo, la pandemia también ha supuesto una invitación a reforzar los canales de atención digital, que no podemos descartar sin más ni pensar que solo son un recurso de emergencia, porque la realidad es que han llegado para quedarse.

Todos estos retos conciernen naturalmente a la farmacia, que tiene además en el desarrollo de la cartera de nuevos servicios un ámbito de investigación y experimentación tan apasionante como fundamental si realmente aspiramos a consolidarlo y a reforzar el rol de la farmacia como primer eslabón de acceso del sistema sanitario. Cualquier incorporación de nuevas prestaciones farmacéuticas a la cartera de servicios de la administración sanitaria requerirá investigación y experimentación previa y somos los profesionales farmacéuticos los que debemos liderarla y protagonizarla, en beneficio propio, del sistema sanitario y de sus usuarios.

Estoy convencido de que RESCIFAR será revista útil para todos estos objetivos, un valioso instrumento que ayudará a promover y capitalizar los resultados de la investigación farmacéutica, y por ello, desde estas líneas, quiero expresar mi enhorabuena y agradecimiento a quienes la han hecho posible, así como invitar a todos los farmacéuticos andaluces a participar en ella con sus publicaciones.

Antonio Mingorance

Presidente del Consejo Andaluz de Colegios Oficiales de Farmacéuticos

RESCIFAR

(Revista Española de Ciencias Farmacéuticas)

Culminamos el sueño.

Anhelábamos desde hace tiempo que nuestro Colegio dispusiera de instrumentos para ayudar y facilitar a los compañeros Farmacéuticos a dejar constancia de sus trabajos de investigación mediante la publicación de los mismos.

Es amplísima, y muy meritoria, la labor desarrollada por todos y cada uno de los Farmacéuticos españoles en su actividad diaria, pero, salvo excepciones, es totalmente desconocida para el mundo de la Ciencia y de la Sanidad. Los pacientes la valoran, la sociedad la agradece y los poderes públicos cuentan con ella porque coadyuva las actuaciones del resto de Profesiones Sanitarias. Pero no podemos, ni debemos, conformarnos sólo con eso y quedarnos ahí; hay que avanzar.

El mencionado desconocimiento es plural, siendo numerosas las razones que conducen a él. Una de ellas es la ausencia generalizada de trabajos realizados por Farmacéuticos en publicaciones profesionales, aunque haberlos haylos, siendo una distinguida minoría la de los compañeros que se deciden a hacerlo. Otra de las razones es el escaso número de publicaciones científicas que existe en el universo farmacéutico, así como el desconocimiento de cómo acceder a ellas para publicar y las dificultades encontradas para hacerlo.

Con el objeto de subsanar los inconvenientes mencionados y abrir una puerta para dar a conocer el colosal y valioso trabajo desarrollado por los profesionales del mundo de la Farmacia, nace RESCIFAR, la Revista Española de Ciencias Farmacéuticas, gracias al trabajo de la Junta de Gobierno del Real e Ilustre Colegio Oficial de Farmacéuticos de la Provincia de Sevilla, bajo la coordinación de nuestro Vocal de Industria, Investigación y Docencia, Profesor D. Antonio María Rabasco Álvarez, que comanda el Consejo Editorial junto a un servidor de ustedes y los también Profesores D. Antonio Ventosa Utero y Dña. Ana María Cameán Fernández.

RESCIFAR, la Revista Española de Ciencias Farmacéuticas, es un instrumento para el desarrollo profesional, que nace en Sevilla con vocación internacional por iniciativa de su Colegio Provincial. Es una puerta abierta a la divulgación del conocimiento que cuenta con importantes apoyos del mundo de la Ciencia: Incluir en este primer número colaboraciones de relevantes científicos, como los Profesores Grisolia, Zaragoza o Vitorica, indica nuestra vocación y el camino que iremos trazando entre todos.

Como decía, culminamos el sueño. Han sido muchas horas de trabajo, de las que se ha obtenido el fruto deseado: La Revista Española de Ciencias Farmacéuticas.

Manuel Pérez

Presidente del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Sevilla

REVISTA ESPAÑOLA DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS

POLÍTICA EDITORIAL

La REVISTA ESPAÑOLA DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS (nombre abreviado según norma ISO-4: *Rev Esp Cienc Farm* y acrónimo RESCIFAR) es una revista científica internacional de carácter multidisciplinar en el ámbito de la Farmacia. Aceptará para su estudio y evaluación, trabajos originales, no publicados ni remitidos simultáneamente a otras publicaciones, que se refieran a los distintos aspectos relacionados con el medicamento y los productos sanitarios. Concretamente, aceptará estudios sobre medicamentos, su análisis, aplicaciones en Farmacia Hospitalaria o comunitaria, Farmacia Clínica, Atención Farmacéutica, Farmacoterapia, Tecnología Farmacéutica, Microbiología, Nutrición, Legislación y Gestión, Historia, Farmacia asistencial, Industria Farmacéutica, Distribución, etc.

Es la revista científica oficial del Real e Ilustre Colegio Oficial de Farmacéuticos de Sevilla, con periodicidad cuatrimestral (febrero, junio y octubre), de manera ininterrumpida. Acepta manuscritos en español e inglés.

La revista publica, artículos originales, originales breves, casos clínicos, revisiones completas, mini revisiones y comunicaciones breves. Las lecciones de aprendizaje, comentarios y cartas al director también pueden ser considerados para su publicación. También se podrán incluir fe de erratas y retractaciones. La revista RESCIFAR se adhiere a las recomendaciones de uniformidad para manuscritos enviados a revistas biomédicas elaboradas por el Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, cuyo texto oficial se encuentra disponible en: <http://www.icmje.org/recommendations/>

Todos los manuscritos presentados para su publicación serán sometidos inmediatamente a una revisión por pares (*peer-review journal*), por los miembros del Consejo Editorial y con evaluadores externos. Los autores obtendrán información sobre el artículo, aceptación, revisión o rechazo en un tiempo máximo de 60 días tras la recepción del trabajo.

La revista RESCIFAR se reserva el derecho de admitir publicidad comercial relacionada con diferentes aspectos de las Ciencias de la Salud, si lo cree oportuno.

TIPOS DE ARTÍCULOS

Revisiones. Estos artículos proporcionan un resumen exhaustivo de temas de interés general de amplio alcance para los científicos farmacéuticos. Se incluirán bajo esta tipología los estudios bibliométricos, las revisiones sistemáticas, los metaanálisis y las metasíntesis. Deben estar estructurados en los siguientes apartados: Introducción, Métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones. La extensión máxima del artículo será de 5000 palabras y se admite un número máximo de 10 tablas y figuras. Tendrán un máximo de 100 referencias bibliográficas. Además, debe aparecer un resumen estructurado de no más de 500 palabras (en inglés y español). Se incluirán un mínimo de 3 palabras clave y un máximo de 6 (en inglés y español).

Originales. Son descripciones completas de resultados experimentales y / o teóricos significativos y originales que se ajustan al alcance de RESCIFAR. Se requiere que los manuscritos sean escritos de manera clara y concisa y que incluyan únicamente datos relevantes para llegar a sus conclusiones finales. Deben estar estructurados en los siguientes apartados: Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones. Preferiblemente, los manuscritos no deben exceder las 5000 palabras de texto y un total de 8 figuras y / o tablas. Los datos extra experimentales y / o teóricos en forma de figuras y tablas se deben depositar en Información Suplementaria. Los trabajos originales incluirán un resumen estructurado de 300 palabras como máximo (en inglés y español). Se recomienda un máximo de 40 referencias bibliográficas. Además, incluirán un mínimo de 3 palabras clave y un máximo de 6 (en inglés y español).

Originales breves. Trabajos de las mismas características que los originales, pero que pueden ser publicados de forma abreviada por

la concreción de sus objetivos y resultados. La extensión máxima del texto será de 2000 palabras, con un máximo de 3 tablas o figuras (para las normas de tablas y figuras véase más adelante). La estructura de estos trabajos será la misma que la de los originales, con un resumen estructurado de 150 palabras (en inglés y español) y 20 referencias bibliográficas como máximo. Además, incluirán un mínimo de 3 palabras clave y un máximo de 5 (en inglés y español).

Comunicaciones breves. Se trata de publicar resultados preliminares experimentales y/o teóricos significativos y originales que se ajustan al alcance de la revista. Los resultados deben ser de suficiente importancia, originalidad e interés general para justificar la publicación acelerada. Se les pide a los autores que escriban sus manuscritos de manera clara y concisa y que incluyan solo datos cruciales para llegar a sus conclusiones finales. Preferiblemente los manuscritos no deben exceder las 2000 palabras de texto y un total de 4 figuras y/o tablas. Los datos extra experimentales y / o teóricos en forma de figuras y tablas se deben depositar en Información Suplementaria.

Casos clínicos. Esta sección tiene como objeto comunicar experiencias de práctica profesional en los diversos ámbitos de la salud pública y la farmacia, que contengan componentes novedosos y relevantes para el ejercicio profesional. La extensión máxima del texto será de 1200 palabras y como máximo se admitirán 2 tablas o figuras. Además, tendrán un máximo de 10 referencias bibliográficas. No es necesario que el texto se estructure formalmente, pero deberá guardar la lógica narrativa (introducción, desarrollo de la experiencia, conclusiones) e incluir un resumen de 150 palabras como máximo y un mínimo de 3 palabras clave y un máximo de 6 (en inglés y español).

Lecciones de aprendizaje. Son artículos cortos (600 palabras) que proporcionan a los autores un medio para informar a otros científicos sobre temas críticos, experiencias y observaciones, cuyas descripciones no serían apropiadas para un artículo de investigación, comunicación, nota, comentario o revisión típica. Los ejemplos incluyen, entre otros, información clave sobre un problema de fabricación imprevisto,

conocimiento acumulado para el desarrollo de un método analítico o de formulación dada. Cada artículo será revisado directamente por un editor con experiencia en el área científica relevante. Debido a que cada uno de estos artículos representa la opinión personal, la experiencia y/o las percepciones del autor, no se requieren datos (si bien, podrían incluirse) ni es necesario divulgar la identidad de un medicamento determinado. Los artículos pueden contener hasta tres referencias clave.

Comentarios. Se presentan los comentarios de salud en su globalidad, así como comentarios de temas especiales (solo por invitación), considerando opiniones de los autores sobre temas científicos o técnicos dentro del alcance de RESCIFAR. Si el Comentario critica el contenido de un Artículo o Nota publicada en la revista, los autores del artículo original tendrán la oportunidad de presentar un Comentario de “respuesta” y un Comentario “crítico”. Los autores interesados en preparar este tipo de aportación, deben proporcionar un breve resumen al Editor, solicitando invitaciones para enviar manuscritos en esta categoría.

Cartas al director. Esta sección pretende incluir de manera prioritaria observaciones científicas y de opinión formalmente aceptables sobre trabajos publicados en fecha reciente en la revista, o sobre otros temas relevantes y actuales sobre salud pública y la farmacia. La extensión máxima será de 700 palabras, y se admitirán una tabla o figura y hasta 5 referencias bibliográficas. Se dará oportunidad de réplica a los autores del trabajo comentado.

Fe de erratas y retractación. Si se encuentran errores en el documento publicado, el autor debe enviar una corrección del error al Editor Jefe para su publicación en la Sección de Erratas de la revista. También se publicarán retractaciones cuando se ha detectado algún tipo de fraude en la preparación o en los resultados de una investigación publicada. La retractación del manuscrito será comunicada a los autores y a las autoridades o la directiva de la institución a que pertenezcan.

INFORMACIÓN PARA LOS AUTORES / NORMAS DE PUBLICACIÓN

Cada trabajo, en función del tipo de artículo anteriormente expresado, deberá estar estructurado según se ha comentado. El trabajo debe presentarse de acuerdo con la plantilla que se encuentra en la web de la revista.

Los artículos se enviarán en castellano, por ser el idioma oficial de la revista; no obstante, también se aceptarán artículos en inglés.

Durante la elaboración del manuscrito podrán añadirse abreviaturas, las cuales serán previamente identificadas y especificadas en su primera aparición. Se recomienda el uso de abreviaturas comunes en el lenguaje científico. No se permitirá el uso de abreviaturas en el título ni el resumen, únicamente en el cuerpo principal del manuscrito. Se deberá hacer especial hincapié en la expresión correcta y adecuada de las unidades de medida. Las palabras en latín o en otros idiomas deben ponerse en cursiva. Para asegurar que todos los caracteres especiales utilizados estén incrustados en el texto, deben insertarse como un símbolo en un formato de estilo que no lo pierda tras la conversión del texto a PDF/XML u otros procesos de maquetación. Las ecuaciones químicas, nombres químicos, símbolos matemáticos, unidades de medidas, concentraciones y unidades de física y química deben ajustarse al sistema internacional de unidades (SI) y al *Chemical Abstracts* o IUPAC. Todas las mediciones deben ser rotuladas solo en SI.

Los manuscritos se presentarán de acuerdo con el siguiente orden y estructura:

Título

Los títulos adquieren gran importancia, ya que deben describir adecuadamente el contenido del trabajo. Su redacción debe ser breve, clara e informativa sobre los contenidos del manuscrito (máximo 120 caracteres sin espacios). Deben evitarse símbolos, fórmulas o abreviaturas arbitrarias, excepto símbolos químicos para indicar la estructura de los compuestos. El título debe proporcionarse en castellano y en inglés.

Autores

A continuación, se debe especificar el nombre y apellidos de cada uno de los autores teniendo en cuenta la forma de firma para indexación en bases de datos internacionales (véase <http://www.accesowok.fecyt.es/>) y según la firma bibliográfica de cada autor. Se identificará la afiliación de los autores con números arábigos en superíndice, remitiendo al nombre de la institución, departamento o centro, y el país al que pertenecen. Se incluirá el correo electrónico del autor de correspondencia.

Resumen y palabras clave

• Resumen

El resumen, que debe redactarse en castellano y en inglés, deberá incluirse en los originales, en las revisiones y en los originales breves. Tendrá una extensión máxima de 300 palabras. Es aconsejable que incluya, al menos, los siguientes apartados: objetivos, métodos, resultados y conclusiones. En él deberá quedar plasmado el problema y el enfoque experimental y establecer los principales hallazgos y conclusiones. No se pueden usar notas al pie o abreviaturas indefinidas.

• Palabras clave

Se proporcionarán de 3 a 6 palabras clave, en castellano y en inglés, que reflejen el contenido científico del manuscrito.

Además de facilitar la indexación de artículos, nuestro sistema de palabras clave ayuda en la asignación de revisores cualificados para el manuscrito.

Texto y cuerpo del manuscrito con sus diferentes apartados

Introducción. Debe fundamentar el estudio mediante exposición de los antecedentes y resumiendo su marco, sin necesidad de revisar de manera exhaustiva el tema. Se debe finalizar con una exposición clara del objetivo del trabajo. Se incluirán sólo aquellas referencias estrictamente necesarias según criterios de actualidad y relevancia en relación con los fines del estudio.

Material y Métodos. Es la parte fundamental y más crítica del manuscrito. Los procedimientos experimentales deben describirse con suficiente detalle para permitir que otros repitan los experimentos.

En el caso de trabajos de investigación en laboratorio, deben incluirse los nombres de productos y fabricantes, con ciudad y país. Los nuevos procedimientos experimentales deben describirse en detalle, pero los procedimientos publicados deben referirse meramente a la bibliografía que cita las modificaciones originales y publicadas. Cuando se trate de trabajos experimentales en que se hayan utilizado grupos humanos, hay que especificar el lugar, la población del estudio por sexo y edad, y el momento de su realización. Debe especificarse el proceso para la selección de los sujetos o los fenómenos estudiados, incluyendo la información necesaria acerca del diseño, los procedimientos, los instrumentos de medida y los métodos de análisis empleados. Esta sección debe incluir información suficiente para que otros/as autores/as puedan replicar el trabajo.

La investigación con animales, los autores deben indicar si los procedimientos seguidos están de acuerdo con las normas establecidas en la octava edición de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-Laboratory-animals/), publicado por la *National Academy of Sciences, The National Academies Press, Washington, DC*).

Asimismo, los manuscritos que contienen datos generados a partir de estudios en animales y/o humanos, se debe especificar el comité y la institución que aprobó los protocolos experimentales utilizados para generar estos datos y, en todo caso, si se han respetado los acuerdos de la Declaración de Helsinki en su revisión de octubre del año 2000, elaborada por la Asociación Médica Mundial (<http://www.wma.net/>). No deben utilizarse los nombres ni las iniciales de las personas que hayan participado formando parte de la muestra estudiada.

Resultados. Deben ser claros, concisos y bien explicados. Las tablas y figuras deben estar diseñadas para maximizar la presentación y la comprensión de los datos experimentales. Se recomienda no repetir información de las tablas o gráficos en el texto.

Como regla general, la interpretación de los resultados debe reservarse para la sección de discusión; no obstante, en algunas circunstancias puede ser conveniente combinar los resultados y la discusión en una sola sección.

Discusión. La finalidad de esta sección es interpretar los resultados y relacionarlos con el conocimiento existente en el campo de la manera más clara y breve posible. Deben señalarse las fortalezas y limitaciones del estudio, y comentar sus posibles implicaciones en la interpretación de los resultados.

La información dada en otra parte del manuscrito no debe repetirse en la discusión y se deben evitar extensas revisiones de la literatura.

Conclusiones. Se deberán destacar los aspectos más importantes de los datos obtenidos de forma breve y con mensajes directos

Bibliografía. Se incluirán las citas que hayan sido utilizadas en la elaboración del manuscrito y que quede constancia de ellas en el texto. Deberán ser ordenadas según su aparición en el texto y ser incluidas dentro del mismo entre paréntesis y con números arábigos. Las referencias seguirán estrictamente las normas de Vancouver. Cada trabajo citado deberá tener un número único asignado por estricto orden de citación. Aunque una obra sea citada en más de una ocasión, mantendrá el mismo número en todas las referencias.

Tablas. Se recomienda la tabulación de los resultados experimentales cuando ello conduce a una presentación más efectiva o a un uso más económico del espacio.

Las tablas se numerarán con números arábigos consecutivamente de acuerdo con su aparición en el texto y se deben citar dentro de este.

Cada tabla será incluida en una página en solitario y deberá ser numerada de forma correlativa a su aparición en el texto con números arábigos (Tabla 1, Tabla 2,...) y un título breve, pero suficientemente explicativo, en su parte superior. Cada columna de la tabla ha de tener un breve encabezado. Se incluirán las necesarias notas explicativas a pie de tabla, y dentro de la tabla las llamadas irán con letras minúsculas en superíndice y en orden alfabético (a, b...).

En la plantilla se indicará claramente la ubicación de cada una de las tablas.

Figuras. Tanto gráficos como fotografías, dibujos o esquemas se consideran figuras. Estas no deben repetir datos ya presentados en el texto o en las

tablas. Las leyendas de las figuras se incluirán al pie. Las figuras se identificarán con números arábigos que coincidan con su orden de aparición en el texto. Los autores deben asegurarse de citar las figuras dentro del texto. Las leyendas y los pies de las figuras deberán contener información suficiente para poder interpretar los datos presentados sin necesidad de recurrir al texto. Para las notas explicativas a pie de figura se utilizarán llamadas con letras minúsculas en superíndice y en orden alfabético (a, b...). Deben presentarse cada una en una página por separado.

En la plantilla se indicará claramente la ubicación de cada una de las figuras.

Opcionalmente, se podrá incluir al final de la plantilla los siguientes apartados:

Agradecimientos. Esta sección debe reconocer el apoyo de financiación, la asistencia técnica, el asesoramiento científico, obsequios, etc.

Contribuciones de los autores.

Financiación.

Conflicto de interés.

CONSEJO EDITORIAL

El Consejo Editorial estará formado por el Comité Editorial y el Comité Científico.

El Comité Editorial se responsabilizará de la administración general de la publicación, así como de establecer la política y estrategia de la revista con el fin de lograr una posición significativa en la Sociedad.

Estará formado por presidente, vicepresidente, secretario, tesorero y 4 vocales.

El Comité Científico se encargará de gestionar el proceso de revisión de los manuscritos recibidos, tutelar la calidad de los trabajos publicados y mantener adecuadas relaciones con la comunidad científica.

Estará formado por 3 Editores Jefe y un número de Editores que oscilará entre un mínimo de 20 y un máximo de 40 personas.

Edita: Real e Ilustre Colegio Oficial de Farmacéuticos de Sevilla

Maquetación y producción: Euromedia Comunicación

COMITÉ EDITORIAL

Presidente: Manuel Pérez Fernández
Vicepresidente: Manuel Ojeda Casares
Secretario: Juan Pedro Vaquero Prada
Tesorero: Juan Luis Barea Ledesma
Vocal: María Álvarez de Sotomayor Paz
Vocal: Pedro Bueno López
Vocal: Ana Isabel del Moral García
Vocal: Leopoldo Gutiérrez-Alviz Conradi

COMITÉ CIENTÍFICO

Editores Jefe

Antonio María Rabasco Álvarez
Ana María Cameán Fernández
Antonio Ventosa Uceró

Editores

María Isabel Andrés Martín
Carolina Arjona Murube
Antonio Blanes Jiménez
Fernando Cansino Calvo
Fernando Caro Cano
Santiago Cuéllar Rodríguez
María de Toro Crespo
María de la Matta Martín
María Teresa Díaz Carmona
María Luisa González Rodríguez
Ana Herranz Alonso
Joaquín Herrera Carranza
María Dolores Herrera González
Gema Herrerías Esteban
Antonio Hoys García
Alejandra León Botubol
Pilar León Lozano
María de Lourdes Moreno Amador
Esteban Moreno Toral
Juan Núñez Valdés
Milagros Olías Valdés
Domingo Ortega López
Santiago D. Palma
Marisol Pedrosa Carrera
Manuel Posada de la Paz
Antonio Ramos Carrillo
Claudio J. Salomón
Matilde Sánchez Reyes
Francisco Zaragoza García

Impresión: Imprenta Galán

Depósito Legal: SE-1252-2020

ISSN: 2660-6364



Revisión

Peroxisomas y síndrome de Zellweger. Revisión sistemática de las terapias vigentes

Peroxisomes and Zellweger syndrome. Systematic review of current therapies

Bendala-Tufanisco E^{1*}, López-Ruiz MA¹, Grisolia S²

¹Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad CEU Cardenal Herrera. 46115 Alfara del Patriarca. Valencia, España

²Premio Príncipe de Asturias de Investigación Científica y Técnica de 1990

*Correspondencia: elena.bendala@uchceu.es

Recibido: 24.06.20; aceptado: 28.06.20

Resumen: El síndrome de Zellweger causa degeneración hepática, renal y del sistema nervioso central, por alteración de algunas de las vías de los peroxisomas, debido a la mutación en genes que codifican peroxinas. La Dra. Martínez descubrió la relevancia del ácido docosahexaenoico en el síndrome de Zellweger y desarrolló un tratamiento por suplementación. Objetivos: revisar el tratamiento en trastornos del espectro Zellweger y evaluar los avances del manejo clínico debido a los recientes descubrimientos de la biología de los peroxisomas y su función. Método de búsqueda: revisión sistemática usando bases de datos para recopilar artículos sobre tratamientos de trastornos del espectro Zellweger en la última década. Inclusión de los ensayos clínicos con los diferentes tratamientos en humanos diagnosticados de cualquier forma de síndrome de Zellweger en la última década. Los dos artículos encontrados fueron revisados por todos los autores que extrajeron independientemente los datos. Principales resultados: se analizaron ambos artículos en profundidad. Murieron muchos participantes durante los ensayos, como cabía esperar por la gravedad de los casos. En ambos ensayos la administración de los lípidos deficitarios mejoró ligeramente el peso y talla y algunos de los síntomas, sin mejora de la visión o la calidad de vida de los pacientes. Conclusiones: se necesita un diagnóstico precoz de los pacientes para iniciar el tratamiento antes del comienzo de la neurodegeneración. La terapia génica en estos pacientes debe considerarse en cuanto se logre un protocolo seguro. Las evidencias son insuficientes para determinar la efectividad de la suplementación de los deficitarios en pacientes con PBD, aunque queda demostrada su seguridad.

Abstract: Zellweger syndrome produces a progressive degeneration of liver, kidneys and central nervous system due to disruption in some of the pathways of peroxisomes, produced as a mutation in the peroxins' genes. Dr. Martínez, discovered the relevance of the docosahexaenoic acid in the Zellweger syndrome and developed a supplementation treatment. Objectives: review of the treatment of Zellweger syndrome and evaluation of the advances in the clinical management due to the last discoveries in the peroxisomes biology and function. Search method: systematic review, using data bases to retrieved articles about treatment of Zellweger syndrome in the last 10 years. Inclusion of the clinical trials with different treatments in patients diagnosed of Zellweger Spectrum Disorder the last decade. Two articles found were read for the authors who extracted outcome data independently. Main results: the two articles were deeply analyzed. The number of participants who died during the trials was high, as expected given the gravity of the cases. In both trials the administration of the lost lipids was slightly improving the weight and height and some of the symptoms but was not affecting the vision or the quality of life of the patient. Conclusions: it is necessary a logarithm of early diagnosis of the patients, in order to initiate

the treatment before the neurodegeneration will start. Gene therapy in these patients should be considered if a safety protocol could be achieved. We found insufficient evidence to determine the effectiveness of deficient lipids supplementation in PBD patients even though safety is demonstrated.

Palabras clave: Desórdenes de la biogénesis de peroxisomas, síndrome de Zellweger: genes PEX, peroxinas, terapia génica, tratamiento suplementario de los lípidos deficitarios. **Keywords:** Peroxisome biogenesis disorders, Zellweger' síndrome, PEX genes, peroxin, gene therapy, deficient lipids' supplementation treatment.

Abreviaturas: PBD, peroxisome biogenesis disorder. ZSD, Zellweguer Spectrum disorder. PEX#p, peroxin proteins. ROS, reactive oxygen species. DHA, Ácido docosahexanoico. AA, Ácido Araquidónico. VLCFA, Very long chain fatty acids (ácidos grasos de cadena muy larga). RBC, Red blood cells (eritrocitos). AST, Aspartato transferasa. ALT, Alanina transferasa. Thesaurus MeSH, The Medical Subjects Headings thesaurus.

1. Introducción

Aunque en 1954 un doctorando del Instituto Karolinska describió por primera vez la presencia de unos corpúsculos vesiculares en las células eucariotas [1], fue de Duve quien los denominó peroxisomas por la presencia de enzimas productoras de peróxido de hidrógeno [2-4]. Son estructuras recubiertas por una doble membrana lipídica que contiene más de 50 proteínas, si bien algunas de las catálisis pueden también establecerse en el citoplasma celular u otras estructuras, y no exclusivamente en los peroxisomas [5].

Los peroxisomas son estructuras muy fluidas y ampliamente implicadas en rutas metabólicas, cuya biogénesis se originan por dos vías: la principal es el crecimiento y la división de los peroxisomas existentes [6], y otra de novo, por la formación de nuevas vesículas a partir del retículo endoplásmico [7]. Este dinamismo en la biogénesis [8] y degradación o pexofagia [9] de los peroxisomas es una respuesta a factores externos, como niveles de electrolitos [10] y otras sustancias, regulada a través de algunas de las proteínas que contienen, las peroxinas. Algunas peroxinas y lípidos del peroxisoma, han sido implicadas en una cascada para la biogénesis de peroxisomas a demanda, propuesta por Honsho et al. [11].

Gran parte del interés que han despertado estos orgánulos en medicina se debe a su relación con un amplio cuadro metabólico incluido entre las enfermedades raras, que comenzaron con la descripción realizada en 1964 por Hans

Zellweger de un cuadro autosómico recesivo de múltiples defectos congénitos, que incluían afectación del sistema nervioso central [12]. Años más tarde se le dio su apellido al síndrome, porque este suizo que había pasado unos años en África con el Premio Nobel de la Paz Albert Schweitzer, resultaba mucho más adecuado para ser homenajeado que el Dr. Lindenberg, jefe del laboratorio firmante del trabajo; uno de los científicos nazis llevados a Estados Unidos durante la "Operación Paperclip".

El síndrome congénito multiorgánico que describieron da una amplia variedad de cuadros clínicos que, dependiendo de las enzimas afectas, oscila entre leve, medio y muy grave. Son cuadros que aparecen en la infancia, muchas veces desde el nacimiento, y que se agrupan en los llamados desórdenes del Espectro Zellweger. En España, según los criterios de FEDER, la frecuencia de la enfermedad oscila entre 1/25.000 y 1/100.000 nacidos vivos e incluye alteraciones neurológicas graves y dimorfismo craneofacial [13]. Además, el descriptor Thesaurus MesH, junto a las alteraciones hepáticas, renales, la degeneración del sistema nervioso central, la hipotonía muscular y las malformaciones craneofaciales, incluye una sordera progresiva, una creciente degeneración retiniana, que provoca la pérdida visual que puede originar ceguera y la aparición de convulsiones tónico-clónicas, probablemente debidas a la ausencia de una adecuada mielinización neuronal.

La relación entre el síndrome de Zellweger (o cerebro hepato renal) y la ausencia de peroxisomas en los niños afectados, no se produjo

hasta 1973, cuando se describió la carencia de dichos orgánulos en células hepáticas y renales de los enfermos [14]. En un principio, se distinguieron 3 cuadros diferentes debidos a las alteraciones en la función de los peroxisomas: el síndrome de Zellweger, la enfermedad de Refsum infantil y la adreno-leukodistrofia neonatal, cuyo tratamiento con el aceite de Lorenzo [15] inició la terapia sustitutoria en estos pacientes.

Se conocen al menos 50 proteínas presentes en los peroxisomas y que tienen relación con muy diversas vías metabólicas que pueden sintetizarse en seis, tal como hacen Waterham et al. [16]:

1. Alfa-oxidación de ácidos grasos, proceso catabólico
2. Beta-oxidación de ácidos grasos, proceso catabólico
3. Detoxificación de glioxilato, proceso catabólico
4. Biosíntesis de éter fosfolípidos, proceso anabólico
5. Metabolismo redox celular, las productoras de H₂O₂, procesos del metabolismo del oxígeno, la inactivación de diversos radicales libres (ROS) y de especies reactivas de nitrógeno, parcialmente acopladas a las otras vías, se incluyen en esta ruta.
6. Síntesis de ácidos biliares y ácido docosahexaenoico (DHA), proceso anabólico.

La Dra. Manuela Martínez Regúlez, experta en la química de los lípidos y su papel en la formación de mielina, descubrió que el cerebro humano es más vulnerable a las agresiones nutricionales [17], que la mielina pura de neonatos y lactantes humanos son muy similares a la mielina adulta [18] y, que el síndrome de Zellweger se asocia a un déficit severo de ácido docosahexaenoico que dificulta la síntesis normal de mielina [19]. Por ello, comenzó a tratar al pequeño grupo de niños afectados de este síndrome con suplementos de ácido docosahexaenoico ralentizando la progresión de los síntomas neurológicos y mejorando la mielinización [20-22].

A finales de la década de los 90 del siglo pasado, surgen los primeros datos de la relación de

mutaciones de algunas peroxinas, y lo que, para entonces, empezó a llamarse desórdenes de la biogénesis de los peroxisomas (PBDs). A la más de una veintena de genes que codifican peroxinas se les llamó genes PEX seguidos de un número. Hoy se sabe que algunos de esos genes codifican diferentes peroxinas en función del "splicing" o ensamblado alternativo de sus exones.

Pronto se asociaron mutaciones de al menos 14 de esos genes en los PBDs. En más de la mitad de los casos se encontró la mutación de la llamada PEX1, una ATPasa necesaria para la incorporación de proteínas en la matriz mitocondrial. De hecho, Reuber et al., incluso identificaron un alelo responsable del 50% de los sujetos afectados por cualquier forma de desorden de la biogénesis de los peroxisomas [23]. Más tarde se descubrió que el complejo formado por PEX1/PEX6, dos ATPasas que trabajan conjuntamente en la incorporación de proteínas en el peroxisoma es responsable, cuando sufren alteraciones, de más del 60% de los síndromes [24 - 26]; además de que regulan la actividad de PEX5 [27]. Hoy, las peroxinas presentes en los peroxisomas se dividen en 3 grupos, según el trabajo de revisión de Fujiki [28]:

1. las responsables de la biogénesis de los peroxisomas, un grupo de genes, que incluyen las proteínas PEX 3p, PEX 16p y PEX 19p, las cuales intervienen en dos vías metabólicas distintas en los peroxisomas y se han implicado en los cuadros más severos de síndromes de Zellweger y otras PBD en humanos [29], PEX 3p también está implicada, junto con el peróxido de hidrógeno y otras vías en la degradación de los peroxisomas en mamíferos;
2. las implicadas en la división de los peroxisomas, que incluyen algunas formas de PEX11p, y cuyas mutaciones, extremadamente raras, parecen ser letales en un breve plazo; y, por último,
3. las peroxinas implicadas en la importación al interior de la matriz del peroxisoma de otras alteraciones, como las ya mencionadas PEX1/PEX6. En cualquier caso, en la revisión de Fujiki [28] se recogen 13 peroxinas implicadas en la aparición del Síndrome de Zellweger de distinta intensidad.

Recientemente se han asociado mutaciones en PEX1, PEX6, PEX 10, PEX 12 o PEX 26 como causa del 90% de los casos de PBDs estudiados [30].

Martínez Regúlez recibió el Premio Rey Jaime I en 2001 por su “estudio del desarrollo cerebral y los desórdenes metabólicos de los niños”, y siguió investigando el efecto del DHA en estos enfermos hasta su muerte [31]. En el décimo aniversario de su fallecimiento procedimos a revisar los tratamientos actuales de los enfermos de PBDs.

Con la existencia de rápidas y selectivas formas de cribado analítico de genes por secuenciación de alto rendimiento, o por los nuevos microarrays, que permiten una identificación de la mutación, y, dada la existencia de novedosas y satisfactorias terapias génicas en enfermedades monogénicas, buscamos los posibles tratamientos con terapia génica en estos niños, a los que pensábamos realizar una revisión sistemática con el método PRISMA.

2. Objetivos

Objetivo principal: analizar la evolución del tratamiento de los desórdenes de la biogénesis de los peroxisomas en los últimos diez años.

Objetivos secundarios:

1. Comprobar los métodos de terapia génica usados para el tratamiento de estos pacientes
2. Comparar la implantación de la terapia génica frente a los tratamientos tradicionales de reposición de sustancias deficitarias como consecuencia de la inhibición de vías metabólicas en los peroxisomas [32], tales como ácido docosahexaenoico, aceite de Lorenzo, ácido cólico, precursores de plasmalógeno o citrato (administrado para prevenir la formación de cálculos renales

de oxalato cálcico en pacientes que posean niveles elevados de oxalato en plasma) [33].

La pregunta PICO fue: Cuáles son los tratamientos actuales para enfermos de desórdenes de la biogénesis de los peroxisomas y mejoras que aportan frente a los tratamientos de reposición de sustancias deficitarias.

3. Material y método

Se realizó una búsqueda sistemática de artículos en las bases de datos Medline a través del motor de búsqueda de libre acceso Pubmed. Se buscaron análisis clínicos en niños afectados de desórdenes de la biogénesis de los peroxisomas o síndrome de Zellweger y tratamientos aplicados con las palabras claves localizadas en MESH peroxins, Zellweger Syndrome, drug treatment, peroxins, gene therapy y los operadores booleanos “and” y “or” El tiempo fueron 10 años, y se seleccionaron artículos en inglés.

De Pubmed se obtuvieron 6.945 resultados.

Se decidió acotar la búsqueda a *Zellweger Syndrome treatment* y se fue también a Cochrane. En ambos casos, sólo se obtuvieron los dos artículos que se analizan.

En la base Scielo no aparecieron artículos con los citados criterios de búsqueda.

Se procedió a buscar *peroxins and gene therapy*, y el único artículo encontrado en Pubmed no tenía relación con el tema. No hubo resultados en Cochrane.

Con *peroxisomes and gene therapy* reclutamos un estudio más en Cochrane en que se administraba aceite de pescado, que descartamos por no disponer de publicaciones accesibles.

Finalmente, realizamos una última búsqueda en Pubmed de PEX genes, con el que se obtuvieron dos artículos que serán utilizados en la discusión.

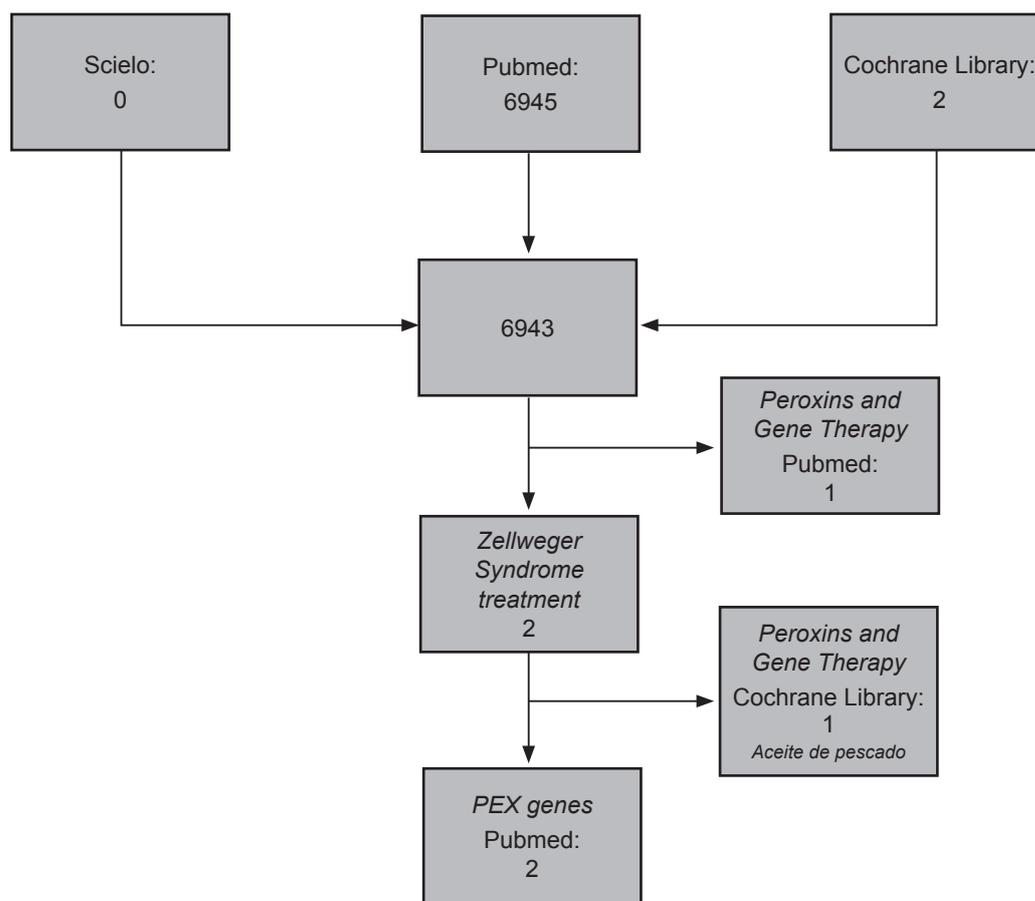


Figura 1. Diagrama de flujo sobre el procedimiento de selección de las publicaciones.

Evaluación del sesgo de los datos

Aun siendo conscientes de la dificultad de disponer de pacientes con PBDs, no esperábamos tan reducido número de ensayos en 10 años, lo que descarta completamente la duplicación de resultados e imposibilita la realización de un gráfico en embudo. En cuanto a los datos no aportados, consideramos de especial relevancia la ausencia de tipificación de la mutación existente en cada paciente, lo que dificulta evaluar la oportunidad del tratamiento y los resultados obtenidos.

4. Resultados

Los artículos hallados fueron publicados en 2010 (Paker et al.) [34] y 2017 (Heubi et al.) [35] respectivamente.

La comparación entre ambos estudios aparece en la tabla 1. Cabe destacar que el estudio más reciente es un ensayo abierto de brazo único en

fase 3 longitudinal de carácter compasivo, y no un estudio randomizado a doble ciego, como sí lo es el de Paker, lo que dificulta la evaluación de los resultados.

También son diferentes los suplementos lipídicos administrados, y parece probable que la conjunción de DHA y ácido cólico de manera conjunta pueda ser beneficiosa en algunos casos, pero ello requiere una identificación individualizada de la mutación de cada paciente y las vías metabólicas afectas.

Es destacable el elevado número de pacientes con ZSD incluidos en el estudio de Paker, 50, dado lo infrecuente de la enfermedad y lo difícil que resulta reclutar pacientes en un solo centro, probable causa de la ausencia de más ensayos clínicos y de que la mayoría de las publicaciones refieran casos clínicos aislados. De hecho, en 18 años, el estudio de Heubi sólo obtuvo 20 pacientes con ZSD.

Tabla 1. Comparación entre los estudios de Paker AM et al. y Heubi JE et al.

	Paker AM et al.	Heubi JE et al.	
Tipo de estudio	Randomizado doble ciego Casos y controles	Brazo abierto de brazo único (Fase 3) Longitudinal	
Duración	1 año	18 años	
Tratamiento	Grupo experimental: 100mg/kg/día DHA (47%) y AA, V.O. (polvo microencapsulado) Grupo placebo: 100mg/kg/día Aceite Soja, V.O. (polvo microencapsulado)	10 - 15 mg/kg/día ácido cólico, V.O.	
Participantes	50 pacientes: 25 grupo experimental y 25 grupo placebo	85 pacientes	
Pacientes que finalizaron el estudio (%)	Grupo experimental: 65%	70 pacientes	
Defunciones	Grupo placebo: 76% Grupo experimental: 22% Grupo placebo: 16%	Casos SED: 14% Casos: ZSD: 28%	
Edad participantes (al comienzo del estudio)	1 mes - 144 meses (12 años)	0 - 16 años	
Efectos Adversos	No se describen	16% EAM Severos 10% progresión enfermedad 3% diarrea 3% ITU 3% deshidratación	Casos ZSD 59% EAM 22% EAM severos No muerte
Grado Evidencia	Clase II Esperado: normalización niveles VLCFA y RBC	Clase I Sólo efectivo en pacientes sin grave deterioro	
V.O: vía oral EAM: Efectos adversos medicamentosos ITU: Infección del tracto urinario			
Análisis datos	Niveles plasmáticos de VLCFA, DHA y plasmalógenos en RBC (cada 3 meses)	Niveles séricos ALT, AST y Bilirrubina sérica	
	Percentiles: estatura y peso (inicio y fin tratamiento)	Ácido biliar en orina (espectrometría)	
	Electrorretinograma (inicio y fin tratamiento)	Peso y estatura Biopsia hepática (inicio tratamiento y control: mes-10 meses)	
Resultados	Grupo experimental: No mejoría visión ni crecimiento No modificaciones: niveles VLCFA, plasmalógenos RBC Grupo placebo: No mejoría visión ni crecimiento No modificaciones: niveles VLCFA, plasmalógenos RBC	Reducción: ALT y Bilirrubina Solo bilirrubina directa * Reducción AST en ZSD pero marcado en SED Peso* y estatura: aumento Biopsia hepática 4 SED: Al compararse: descenso número células gigantes, menor necrosis y colestasis 0 ZSD	

*Resultados estadísticamente significativos

El elevado porcentaje de defunciones en ambos estudios habla de la ineficacia de los tratamientos suplementarios como único procedimiento, y demuestra la necesidad de encontrar un tratamiento más efectivo, siempre que sea posible, restableciendo la función de las vías metabólicas afectas. Ello sería especialmente urgente en los casos más graves, para evitar las lesiones neurodegenerativas y los fracasos renal y hepático.

Dado la gravedad de los cuadros, la mayoría de los pacientes mueren en edades tempranas, lo que coincide con los resultados de ambos trabajos.

Evaluados los efectos adversos en los pacientes, destaca que el 10% de los presentados en el trabajo de Heubi fueron severos, aunque sólo dos son considerados relacionados con la administración de ácido cólico: un único paciente tuvo malestar e ictericia y otro una lesión cutánea.

Aunque relacionados con la evolución de la enfermedad, y no con el tratamiento con ácido cólico, 13% de los pacientes sufrieron efectos adversos severos que, en 4 de ellos (6%), obligaron a dejar el estudio.

De los 28 efectos adversos severos encontrados, en el 10% de los casos, estuvieron relacionados con la progresión de la enfermedad, 3% se debieron a diarrea, 3% a infección del tracto urinario y 3% a deshidratación.

Centrados en los casos de ZSD, 59% sufrieron efectos adversos durante el tratamiento, más relacionados con la progresión de la enfermedad y 22% fueron severos aunque en ningún caso causaron la muerte.

Paker y cols. no mencionan efectos adversos, debidos a la ingesta de la asociación DHA-AA, si bien algunos de los pacientes fallecieron por complicaciones relacionadas con la enfermedad.

En cuanto al grado de evidencia de los resultados obtenidos, el estudio randomizado a doble ciego indica evidencias de Clase II, es decir, que las opiniones resultaron contradictorias respecto a los efectos del DHA sobre la mejora de la función visual y el crecimiento de los niños durante el año de tratamiento.

Los autores también esperaban la normalización de los niveles plasmáticos de VLCFA y de los

niveles de plasmalógeno en eritrocitos (RBC), lo que no se observó.

Heubi y cols. en su ensayo de brazo único en fase 3 consideran que obtuvieron evidencias de Clase I, luego el tratamiento era beneficioso y bien tolerado por los pacientes. Aunque sólo resultó efectivo en pacientes que no presentaban un grave deterioro general por la progresión de la enfermedad.

En cuanto a las medidas de control de datos, Paker y cols. optaron por:

- Medición de niveles plasmáticos de VLCFA, DHA y de plasmalógenos en RBC por metodología standard de laboratorio al inicio y otras 4 determinaciones durante el tratamiento.
- Crecimiento físico por el número estándar de desviaciones (Z score) de los percentiles de estatura y peso al inicio del tratamiento y al año.
- Función visual se midió por electroretinograma al inicio del tratamiento (dividiéndolos en 4 grupos: extinto, muy bajo, bajo y moderado) y al año, cuando se compararon y se clasificaron como empeora, estable o mejora.

Y Heubi y cols. midieron:

- Valores séricos de alanina y aspartato aminotransferasa, y bilirrubina sérica, se con métodos estándar a intervalos regulares durante el tratamiento
- Concentración de ácido biliar en orina con espectrometría de masas de ionización por bombardeo con átomos rápidos.
- Variaciones de peso y estatura a intervalos regulares.
- Biopsia hepática, se realizaron cuando, especialmente en los pacientes con ZSD, no aumentaban el riesgo de empeoramiento del estado general. En los casos en que fue posible se hizo una biopsia antes de iniciar el tratamiento y otra entre el mes y los diez meses de tratamiento. En ambos casos se buscó la presencia de inflamación, fibrosis, necrosis, presencia de células gigantes y colestasis. Finalmente se compararon las dos biopsias en los pacientes en que pudieron realizarse para analizar si hubo mejoría del cuadro.

Con todo, los resultados de los trabajos difieren de los publicados en la década anterior.

Paker y cols. no observaron mejora estadísticamente significativa ni de la visión de los niños, ni de su crecimiento, a diferencia de los datos de los estudios de Martínez, ya que tanto la visión como el crecimiento mejoraron también en el grupo placebo, afirmación que resulta sorprendente.

No hubo modificaciones en los niveles plasmáticos de VLCFA ni de plasmalógenos en RBC entre ambos grupos.

Heubi y cols. indican que todos los pacientes mostraron una reducción de los valores séricos de alanina transferasa (ALT) y en todos los tipos de bilirrubina, que sólo fue estadísticamente significativa para la bilirrubina directa. El descenso de la aspartato transferasa (AST) en los ZSD fue menos marcado que en los SED.

El peso y la altura aumentaron en todos los pacientes, aunque sólo el peso mostró un incremento estadísticamente significativo.

La biopsia hepática sólo tuvo dos muestras en cuatro de los pacientes SED y en ninguno de los ZSD. En los casos en que pudo compararse, el tratamiento redujo o, al menos, mantuvo los niveles de inflamación con un descenso del número de células gigantes, menor necrosis y colestasis.

Con todos estos resultados, podemos concluir que los tratamientos de administración de algunos de los lípidos que debieran ser sintetizados en los peroxisomas no revierten la progresión de la enfermedad ni recuperan la función visual una vez deteriorada. Probablemente, los resultados publicados por la Dra. Martínez se debieron a un diagnóstico más temprano de la deficiencia y un inicio del tratamiento precoz, capaz de mielinizar las neuronas cuando todavía tenían capacidad de regeneración.

En el estudio de Paker no figura la edad de los pacientes a la detección del síndrome, pero en el de Heubi sólo el 27% de los pacientes fueron diagnosticados en los primeros 3 meses de vida y un 35% cuando tenían más de un año, momento en el que probablemente muchas de las lesiones en sistema nervioso central son difícilmente recuperables.

5. Discusión

La diversidad de ZSD se debe a las diversas mutaciones asociadas a 14 de los genes PEX conocidos, pese a lo cual el diagnóstico en un elevado número de casos se realiza por fenotipo, pues los desórdenes de los peroxisomas no se incluyen en los tests de cribado al nacimiento, aunque algunos países sí incluyen los trastornos de los ácidos grasos mitocondriales. Debieran incluirse análisis de los niveles de VLCFA, DHA, plasmalógenos y microarrays para los genes PEX1 y PEX6 de rutina en neonatos con dimorfismos, disfunciones hepáticas y neurológicas o hipotonía, para detectar en torno al 60% de los casos. Empieza a utilizarse la secuenciación como método diagnóstico [36], todo lo cual permitiría la implantación precoz de las terapias de sustitución de los productos ausentes. Las mutaciones no se reducen a cambios puntuales de un aminoácido, si no que incluyen muy variadas posibilidades de distinta extensión y gran amplitud de consecuencias, que deben ser estudiadas.

En España hubo en la primera década de este siglo un movimiento de atención al diagnóstico precoz de estos casos [37] que podría justificar el éxito de las terapias aplicadas y del que han cesado las publicaciones.

Otra ventaja de la secuenciación es la correcta adscripción de trastornos visuales, que ahora se catalogan de amaurosis congénita de Leber, una de las cegueras más beneficiadas por la terapia génica [38]. Evidencias indican que se trataría de ZSDs leves mal diagnosticados [39]. Estudios en células en cultivo, han demostrado que la terapia con transcritos nonsense, es capaz de mejorar tanto el anabolismo como el catabolismo de los lípidos peroximales aportando una nueva posibilidad terapéutica [40].

El verdadero reto al que se enfrenta la terapia génica en estos pacientes es el compromiso del sistema inmune asociado a varios de los ZSDs [41] y el frecuente estado de malnutrición de los bebés, lo que dificulta la administración de un vector viral que causara la menor respuesta inmunológica. Cada vez está más clara la importancia del peróxido de hidrógeno como molécula reguladora del estado redox en procesos inflamatorios y de envejecimiento, y muy probablemente la oxidación de grupos SH en proteínas sea un

mecanismo de señalización controlado por H₂O₂ generado por los peroxisomas. Por ello, la adecuada elección del virus vector de los genes a los tejidos constituirá uno de los peldaños fundamentales en la obtención de un tratamiento seguro a la vez que eficaz.

6. Conclusiones de los autores

Se requiere un logaritmo de diagnóstico precoz de los pacientes para iniciar el tratamiento en las primeras semanas de vida, a fin de prevenir la neurodegeneración y deterioro de las funciones hepática y renal de los casos más graves. Si se consigue un protocolo seguro de terapia, debe implantarse en mutaciones puntuales.

Los ensayos analizados no muestran evidencias suficientes de la efectividad de la suplementación con los lípidos deficitarios en los pacientes PBD, si bien sí evidencian la seguridad de su administración en los niños.

Como respuesta decepcionante a los objetivos marcados, podemos afirmar que no hay evidencias publicadas de un intento de tratamiento de los casos de PBDs con terapia génica, una de las más prometedoras terapias de la medicina personalizada.

Claramente hay una necesidad de: -1. una identificación completa del sitio en que la mutación se produce y las implicaciones en la función de la proteína peroxina afecta en cada paciente; -2. desarrollar terapias efectivas o mejores tratamientos paliativos que mejoren la calidad de vida de los bebés afectados.

7. Implicaciones clínicas

Es perentorio disponer de un diagnóstico lo más temprano posible de estos cuadros, que deben ser sospechados por la exploración clínica inicial. Los métodos de diagnóstico incluso

intraútero tanto de imagen como por análisis del genoma de las vellosidades coriónicas, deben explorarse como una alternativa. Sin este paso, la calidad de vida de los pacientes y sus familias será siempre insatisfactoria. Los desarrollos en terapias génicas para otros cuadros generan expectativas en un futuro a medio plazo que deben asociarse a los actuales de terapias de sustitución que tan pobres resultados demuestran.

La realización de ensayos clínicos multicéntricos, bien diseñados, que permitan evaluar la efectividad de los tratamientos, pasa necesariamente por el diagnóstico precoz y la identificación exacta de la mutación de cada paciente. Conocemos la enorme limitación de tener grupos homogéneos extensos, pero la afectación de la función de las peroxinas con el envejecimiento puede ampliar el número de pacientes en el estudio y la obtención de resultados con beneficios reales a amplios sectores de la población.

8. Implicaciones en investigación

La existencia de una medicina traslacional, ahora tan cara, pero que probablemente sea el mejor camino para hacer sostenible la sanidad en el futuro, pasa por una apuesta decidida por la investigación básica, incluidas las numerosas vías metabólicas anabólicas y catabólicas de los peroxisomas y su relación con las mitocondrias y el retículo endoplásmico. En estos momentos de pandemia, es ilusorio pedir un aumento de la financiación de líneas de investigación para enfermedades minoritarias. Pero el estudio de los orgánulos celulares a nivel bioquímico sigue siendo uno de los pilares del avance terapéutico.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

1. Rhodin J. Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal tubule cells of the mouse kidney [Tesis Doctoral]. Estocolmo: Instituto Karolinska; 1954.
2. de Duve C, Baudhuin P. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev.* 1966 Abr;46(2):323-57. doi: 10.1152/physrev.1966.46.2.323

3. de Duve C. Biochemical studies on the occurrence, biogenesis and life history of mammalian peroxisomes. *J Histochem Cytochem.* 1973;21(11):941-8. doi: 10.1177/21.11.941
4. de Duve C. The peroxisome in retrospect. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;804:1-10. doi: 10.1111/j.1749-6632.1996.tb18603.x.
5. Wanders RJ, Waterham HR. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem.* 2006;75:295-332. doi: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133329
6. Schrader M, Bonekamp NA, Islinger M. Fission and proliferation of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(9):1343-57. doi:10.1016/j.bbadis.2011.12.014
7. Hettema EH, Erdmann R, van der Klei I, Veenhuis M. Evolving models for peroxisome biogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2014;29(100):25-30. doi:10.1016/j.ceb.2014.02.002
8. Wolf J, Schliebs W, Erdmann R. Peroxisomes as dynamic organelles: Peroxisomal matrix protein import. *FEBS J.* 2010;277(16):3268-78. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07739.x.
9. Oku M, Sakai I. Peroxisomes as dynamic organelles: autophagic degradation. *FEBS J.* 2010;277(16):3289- 94. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010. 07741.x.
10. Calero-Muñoz N, Expósito-Rodríguez M, Collado-Arenal AM, Rodríguez-Serrano M, Laureano-Marín AM, Santamaría ME, Gotor C, Díaz I, Mullineaux PM, Romero-Puertas MC, Olmedilla A, Sandalio LM. Cadmium induces ROS-dependent pexophagy in Arabidopsis leaves. *Plant Cell & Environment.* 2019;42(9):2696-714. doi: 10.1111/pce. 13597
11. Honscho M, Yamashita SI, Fujiki Y. Peroxisome homeostasis: mechanisms of division and selective degradation of peroxisomes in mammals. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(5):984-91. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.09.032
12. Bowen P, Lee CS, Zellweger H, Lindenberg R. A familial syndrome of multiple congenital defects. *Bull John Hopkins Hosp.* 1964;114:402-14.
13. Federación Española de Enfermedades Raras; [consultado jun 2020]. Disponible en: <https://enfermedades-raras.org/>
14. Goldfischer S, Moore CL, Johnson AB, Spiro AJ, Valsamis MP, Wisniewski HK, Ritch RH, Norton WT, Rapin I, Gartner LM. Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. *Science.* 1973;182(4107):62-4. doi: 10.1126/science.182.4107.62
15. Zellweger H, Maertens P, Superneau D, Wertelecki W. History of the cerebrohepatorenal syndrome of Zellweger and other peroxisomal disorders. *South Med J.* 1988;81(3):357-64. doi:10.1097/00007611-198803000-00017.
16. Waterham HR, Ferdinandusse S, Wanders RJ. Human disorders of peroxisome metabolism and biogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(5):922-33. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.11.015.
17. Martínez M. Myelin lipids in the developing cerebrum, cerebellum, and brain stem of normal and undernourished children. *J Neurochem.* 1982;39:1684-92. doi: 10.1111/j.1471-4159.1982.tb08003.x.
18. Martínez M. Myelin in the developing human cerebrum. *Brain Res.* 1986;364(2):220-32. doi: 10.1016/0006-8993(86)90834-6.
19. Martínez M. Severe deficiency of docosahexaenoic acid in peroxisomal disorders. A defect of delta 4-desaturation? *Neurology.* 1990;40(8):1292-8. doi: 10.1212/wnl.40.8.1292.
20. Martínez M, Vázquez E, García-Silva MT, Manzanares J, Bertran JM, Castelló F, Mougán I. Therapeutic effects of docosahexaenoic acid ethyl ester in patients with generalized peroxisomal disorders. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(1Suppl):376S- 85S. doi: 10.1093/ajcn/71.1.376s.
21. Martínez M, Vázquez E. MRI evidence that docosahexaenoic acid ethyl ester improves myelination in generalized peroxisomal disorders. *Neurology.* 1998;51(1):26-32. doi: 10.1212/wnl.51.1.26.
22. Martínez M. Restoring the DHA levels in the brains of Zellweger patients. *J Mol Neurosci.* 2001;16(2-3):309-16. doi: 10.1385/JMN:16:2-3:309.

23. Reuber B, Germain-Lee E, Collins C, Morrell JC, Ameritunga R, Moser HW, Valle D, Gould SJ. Mutations in PEX1 are the most common cause of peroxisome biogenesis disorders. *Nat Genet.* 1997;17(4):445-8. doi: 10.1038/ng1297-445
24. Geisbrecht BV, Collins CS, Reuber BE, Gould SJ. Disruption of a PEX1-PEX6 interaction is the most common cause of the neurologic disorders Zellweger syndrome, neonatal adrenoleukodystrophy, and infantile Refsum disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(15):8630-5. doi: 10.1073/pnas.95.15.8630.
25. Ciniawsky S, Grimm I, Saffian D, Girzalsky W, Erdmann R, Wendler P. Molecular snapshots of the PEX1/6 AAA+ complex in action. *Nat Commun.* 2015;6:7331. doi: 10.1038/ncomms8331.
26. Falkenberg KD, Braveman NE, Moser AB, Steinberg SJ, Klouwer FC, Schlüter A, Ruiz M, Pujol A, Engvall M, Naess K, van Spronsen F, Körver-Keularts I, Rubio-Gozalbo E, Ferdinandusse S, Wanders RJA, Waterham HR. Allelic expression imbalance promoting a mutant PEX6 allele causes Zellweger spectrum disorder. *Am J Hum Genet.* 2017;101(6):965-75. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.11.007.
27. Miyata N, Fujiki Y. Shuttling mechanism of peroxisome targeting signal type 1 receptor PEX5: ATP independent Import and ATP dependent Export. *Mol Cell Biol.* 2005;25(24):10822-32. doi: 10.1128/MCB.25.24.10822-10832.2005.
28. Fujiki Y. Peroxisome biogenesis and human peroxisome-deficiency disorders. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2016;92(10):463-77. doi: 10.2183/pjab.92.463.
29. Fujiky Y, Yagita Y, Matsuzaki T. Peroxisome biogenesis disorders: molecular basis for impaired peroxisomal membrane assembly - In metabolic functions and biogenesis de peroxisomes in health and diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(9):1337-42. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.06.004.
30. Yik WY, Steinberg SJ, Moser AB, Moser HW, Hacia JG. Identification of novel mutations and sequence variation in the Zellweger syndrome spectrum of peroxisome biogenesis disorders. *Hum Mutat.* 2009;30(3):E467- E80. doi: 10.1002/humu.20932.
31. Noguer MT, Martínez M. Visual follow-up in peroxisomal disorder patients treated with docosahexaenoic acid ethyl ester. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(4):2277-85. doi: 10.1167/iovs.09-4020.
32. Klouwer FC, Berendse K, Ferdinandusse S, Wanders RJA, Engelen M, Poll-The BT. Zellweger spectrum disorders: clinical overview and management approach. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10:151. doi: 10.1186/s13023-015-0368-9.
33. van Woerden CS, Groothoff JW, Wijburg FA, Duran M, Wanders RJ, Barth PG, Poll-The BT. High incidence of hyperoxaluria in generalized peroxisomal disorders. *Mol Genet Metab.* 2006;88(4):346-50. doi: 10.1016/j.ymgme.2006.03.004.
34. Parker AM, Sunnes JS, Brereton NH, Speedi LJ, Albanna L, Dharmaraj S, Moser AB, Jones RO, Raymond GV. Docosahexaenoic acid therapy in peroxisomal diseases: Results of a double-blind, randomized trial. *Neurology.* 2010;75(9):826-30. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181f07061.
35. Heubi JE, Bove KE, Setchell KDR. Oral cholic acid is efficacious and well tolerated in patients with bile acid synthesis and Zellweger Spectrum Disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017;65(3):321-6. doi:10.1097/PMG.0000000000001657.
36. Ventura MJ, Wheaton D, Xu M, Birch D, Bowne SJ, Sullivan LS, Daiger SP, Whitney AE, Jones RO, Moser AB, Chen R, Wangler MF. Diagnosis of a mild peroxisomal phenotype with next-generation sequencing. *Mol Genet Metab Rep.* 2016;9:75-8. doi: 10.1016/j.ymgme.2016.10.006. eCollection 2016 Dec.
37. López-Pisón J, Pérez-Delgado R, García-Oguiza A, Lafuente-Hidalgo M, García-Jiménez M, Calvo-Ruata ML, Peña-Segura JL, Rabage V, Girós-Blasco M, Coll MJ, Balldellou-Vázquez A. Nuestra experiencia diagnóstica en enfermedades peroxisomales con alteración del perfil de ácidos grasos. *Rev Neurol.* 2008;47(1):1-5. doi: <https://doi.org/10.33588/rn.4701.2008033>.
38. Kumaran N, Michaelides M, Smith AJ, Ali RR, Bainbridge JWB. Retinal gene therapy. *Br Med Bull.* 2018;126(1):13-25. doi: 10.1093/bmb/ldy005.

39. Argyriou C, Polosa A, Cecyre B, Hsieh M, Di Pietro E, Cui W, Bouchard JF, Lachapelle P, Braverman N. A longitudinal study of retinopathy in the PEX1-Gly844Asp mouse model for mild Zellweger Spectrum disorder. *Exp Eye Res.* 2019;186:107713. doi:10.1016/j.exer.2019.107713.
40. Dranchak PK, di Pietro E, Snowdenn A, Oesch N, Braverman NE, Steinberg SJ, Hacia JG. Nonsense suppressor therapies rescue peroxisome lipid metabolism and assembly in cells from patients with specific PEX genes mutations. *J Cell Biochem.* 2011;112(5):1250–8. doi:10.1002/jcb.22979.
41. Crane DI. Revisiting the neuropathogenesis of Zellweger syndrome. *Neurochem Int.* 2014;69:1-8. doi:10.1016/j.neuint.2014.02.007.

MesH terms: Peroxins, Zellweger syndrome, Lorenzo's Oil, Genetic Therapy, docosahexaenoic acids, peroxisomal disorders.

Este trabajo debe ser citado como:

Bendala-Tufanisco E, López-Ruiz MA, Grisolia S. Peroxisomas y síndrome de Zellweger. Revisión sistemática de las terapéuticas vigentes. *Rev Esp Cien Farm.* 2020;1(1):1-12.



Revisión

El farmacéutico, siempre al tanto de las innovaciones terapéuticas: las células CAR-T

The pharmacist, always aware of therapeutic innovations: CAR-T

Zaragoza F*, Zaragoza C

Departamento de Ciencias Biomédicas. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares. España

*Correspondencia: francisco.zaragoza@uah.es

Recibido: 03.07.20; aceptado: 08.07.20

Resumen: En el presente trabajo se ha realizado una recopilación reciente sobre la terapia a base de células CAR-T, sustentada en buena parte, en experiencias farmacológicas propias de los autores. Adicionalmente, se relacionan algunos de sus efectos negativos con aplicaciones provechosas que se extraen para el tratamiento de Covid-19.

Abstract: In this work, a recent compilation has been made on CAR-T cell-based therapy, taken mostly on the authors' own pharmacological experiences. Additionally, some of its negative effects are related to beneficial applications extracted on Covid-19 treatment.

Palabras clave: CAR-T, citoquinas, Covid-19. **Keywords:** CAR-T, cytokines, Covid-19.

Desde sus comienzos, el año 2020 está siendo diferente en su sentido socio-sanitario. Es evidente que las infecciones por SARS-CoV-2 han revolucionado lo revolucionario desde el punto de vista terapéutico, no solo por la novedad intrínseca de la propia COVID-19, sino porque ha provocado una auténtica convulsión en la carrera para hallar nuevos fármacos que, controlando la infección, salven vidas antes de la elaboración adecuada de la vacuna.

En este punto hemos de insistir, como farmacéuticos, para utilizar nuestros conocimientos sobre medicamentos, optimizar la capacidad de relación y, sobre todo, el sentido común.

Analícemos estas afirmaciones.

En el trascurso de 2015 a 2019, veíamos cómo diferentes compañías farmacéuticas iban introduciendo algo absolutamente innovador

en el tratamiento del cáncer. Me refiero a ciertos anticuerpos monoclonales diseñados para bloquear receptores inhibidores de linfocitos T (anti-PD1) o para unirse al ligando de las células tumorales (anti-PDL1). Son los que familiarmente se denominaron bloqueantes de "check-point" o bloqueantes de puntos control. Algunos tumores generan un ligando que, uniéndose a uno de estos puntos de las células T, anulan su capacidad inmunogénica. Pero la administración de uno de estos antagonistas hace revivir al linfocito T, permitiéndole que luche contra el tumor, ya que la inhibición de un inhibidor se traduce en estimulación. En definitiva, se trata de una activación inmunológica con excelentes resultados que brinda nuevas (o ya no tan nuevas) perspectivas en cáncer.

Poco tiempo antes se había iniciado una cruzada anti-hepatitis C con la introducción de los inhibidores de la polimerasa del ARN del virus (VHC) como el sofosbuvir y los que vinieron

inmediatamente después, que cambiaron el paradigma del tratamiento de la enfermedad puesto que ofrecen curación aproximadamente en un 98% de los pacientes, evitando trasplantes, ingresos innecesarios, patologías concomitantes, etc.

Por cierto, parece que a algunos sectores les preocupa el impacto sobre los presupuestos con estas terapias que estamos comentando, pero aún no hemos visto estudios económicos a medio plazo sobre el ahorro que ha supuesto su introducción en terapéutica, por no hablar de las vidas humanas que están salvando ambos grupos de fármacos.

Pues bien, mientras contemplamos estos hallazgos y cuando apenas hemos tenido tiempo de aprender sus mecanismos de acción y sus cualidades, irrumpen en terapéutica los tratamientos antineoplásicos llevados a cabo con las denominadas células CAR-T o linfocitos T modificados por terapia celular adoptiva, que forma parte de las conocidas como Terapias Avanzadas.

De estas últimas hemos oído muchas cosas y leído muchos artículos, pero no se han registrado hasta recientemente auténticos medicamentos. Si acaso, alguno de terapia celular que tuvo escaso éxito.

Las disposiciones legales contemplan tres tipos de Terapias Avanzadas: Medicamentos de terapia celular somática, Medicamentos de terapia génica y Productos de ingeniería tisular, incluyendo también los medicamentos combinados de terapia avanzada.

La terapia celular somática es la que ha avanzado más tempranamente. Consiste en la administración de células dirigidas a restaurar funciones o a reparar tejido dañado, para lo cual se suelen elegir células madre embrionarias con el fin de restaurar lesiones como úlceras tórpidas cutáneas, enfermedades neurodegenerativas, cartílago en artrosis, miocitos en infarto de miocardio, etc.

En España, a lo largo de 2019, se han obtenido dos importantes medicamentos encuadrados en este concepto. De ellos, tal vez el más mediático ha sido el darvadstrocel, registrado como Alofisel®, que fue desarrollado por TiGenix y fabricado por Takeda íntegramente en nuestro país. Se trata de

células madre humanas alogénicas, expandidas y extraídas del tejido adiposo. Combate fístulas perianales y abdominales refractarias a otros tratamientos, generalmente en enfermedad de Crohn, administrándose directamente en el tracto fistuloso.

El segundo medicamento de este tipo al que aludimos es algo diferente al anterior, pero comparte su funcionamiento. Es el llamado NC-1, que se emplea para el tratamiento de las lesiones medulares traumáticas con el fin de minimizar sus secuelas. Fue obtenido en el Hospital Puerta de Hierro de Madrid y está formado por células mesenquimales troncales adultas, autólogas, de médula ósea y de plasma humano.

Estos medicamentos forman parte del arsenal terapéutico, aunque parezcan ser muy especiales, y tendremos que irnos acostumbrando a ellos e incluirlos de modo natural en nuestros estudios independientemente del lugar de ejercicio profesional.

Ocurre igual que con los biofármacos que, habiendo alcanzado un alto grado de seguridad, la mayoría de ellos se administran en régimen ambulatorio, por lo que conviene conocerlos en profundidad para saber sus peculiaridades, sus posibles interacciones y las reacciones adversas que puede generar su administración, ya que el paciente, una vez que ha retirado su producto del hospital, suele hacer vida normal como cualquier otro y acudirá al farmacéutico.

Células CAR-T.- Forman parte de la denominada Inmunoterapia celular adoptiva, que consiste en manipular genéticamente las propias células de la inmunidad específica del organismo (linfocitos T) para que combatan a las células tumorales.

Dicho de otra manera, es un tipo de inmunoterapia en la que se emplean las células inmunitarias del propio paciente, es decir, los linfocitos T modificados genéticamente para que expresen un receptor de antígeno quimérico (siglas CAR) capaz de identificar y atacar a las células tumorales, con la ventaja de que las células T del propio paciente son extraídas previamente para ser modificadas y, luego, ser reintroducidas en el individuo enfermo, de modo que las células sanas no se ven afectadas.

Forman parte de las terapias personalizadas, de precisión o “a la carta”, como se les suele denominar en lenguaje coloquial. Últimamente se han convertido en la Terapia avanzada que más posibilidades brinda en el tratamiento curativo del cáncer.

A priori, presentan, al menos, las siguientes aportaciones y requerimientos:

- Resultados espectaculares en determinados tipos de cáncer.
- Selectividad de actuación sin afectar a las células del organismo, puesto que consiste en extraer linfocitos del propio paciente para modificarlos genéticamente *ex-vivo* e introducirlos en la sangre del propio paciente.
- Administración única.
- Experiencia en el manejo de las posibles reacciones adversas.

Pero, ¿cómo surgió la idea de esta manipulación celular y qué receptor se debe incluir? Todo hay que examinarlo en un contexto histórico donde el desarrollo de la Biología molecular y la Biotecnología jugaron un papel crucial. Por un lado, la primera comenzó a ofrecernos la posibilidad de reprogramar genes mediante una transfección vírica, de modo que se pudieran transformar los ácidos nucleicos de los genes para dar órdenes que se traduzcan en la expresión de un receptor de membrana previamente diseñado como un anticuerpo quimérico, que fuera capaz de unirse específicamente a algún antígeno de membrana de las células tumorales. En este caso, se diseñó para que se uniera (interceptándolo) a un CD-19. Recordemos que las siglas CD significan clúster o cúmulos de diferenciación, que son moléculas antigénicas marcadoras que el tumor, en este caso, expresa en su superficie celular. Hay muchos antígenos CD caracterizados y bien conocidos a los que la Biología molecular les asigna un número o algún signo, una vez que se identifican al menos con dos anticuerpos específicos monoclonales diferentes.

Pues bien, en 1989, Gros, Woks y Echar lograron introducir una especificidad tipo anticuerpo dentro del receptor de la célula T. Los primeros linfocitos CAR-T comenzaron su andadura. Esta especificidad provenía del fragmento variable de

un anticuerpo monoclonal, por lo que se amplió considerablemente el número de antígenos tumorales que puede reconocer el linfocito T, de modo que el CAR puede proporcionar a los linfocitos la especificidad contra el antígeno que interese.

Pero, como todos los grandes descubrimientos, este ha ido acompañado de experiencias llamativas, como ocurrió hace años con las células He-La (Henrietta Lacks) inmortales de adenocarcinoma en la Universidad de John Hopkins. Tal vez sin ser tan llamativo como este hecho, en 2010, la niña Emily Whitehead salvó la vida cuando tenía 5 años, gracias a la administración de un CAR-T anti-CD19. Sufrió una leucemia linfoblástica aguda (LLA) en recaída, sin alternativas terapéuticas. Esto ocurrió en la Universidad de Pensilvania y fue el inicio de una terapia de efectos rápidos, que está revolucionando al mundo por sus resultados y por las posibilidades que ofrece.

Por el momento, hay dos medicamentos autorizados por la EMA y la FDA: tisagenlecleucel y axicabtagén ciloleucel, indicados en LLA y en algunos linfomas, pero no pasará mucho tiempo hasta que veamos claros resultados en otros tumores de mal pronóstico, incluso sólidos.

De modo sucinto, diremos que la obtención de las células CAR-T no está al alcance de cualquier laboratorio; incluso requiere el envío de las células a un laboratorio especializado (por ejemplo, en la Universidad de Pensilvania), en el cual se realizan las actuaciones que describimos brevemente a continuación y que suelen tardar aproximadamente un mes.

La técnica consiste en extraer sangre del paciente por leucoaféresis, separando los linfocitos del resto de las células sanguíneas, con el fin de actuar solamente sobre aquellos. Para la transfección, se suelen emplear vectores víricos como lentivirus o retrovirus, con los que se ha adquirido una gran experiencia, y **que garantizan el mantenimiento de la expresión transgénica a largo plazo**, lo que se traduce en un hecho clave: la durabilidad del efecto por el diseño.

Este proceso necesita unas semanas en un biorreactor, lo que implica un alto coste para cumplir los elevados requerimientos de calidad

exigidos por las agencias reguladoras. En este punto entra el laboratorio externo especializado, que también incrementa el coste del proceso.

Una vez que los linfocitos T han sido modificados genéticamente, han de sufrir una expansión ex-vivo, con nutrientes, oxígeno e incubación adecuada (con criopreservación) para alcanzar el número de células idóneo para cada paciente. De este modo, una vez envasadas las células, el medicamento queda listo para su administración.

Durante este proceso, el paciente ha de estar un tiempo de espera en estrecha vigilancia, debiendo recibir una terapia depletiva a base de citostáticos, sincronizada con la llegada de su medicamento.

Descripción esquemática de su actuación.- Las células T, una vez administradas, reconocen a las células tumorales, se unen a ellas y las atacan induciéndolas apoptosis por varios mecanismos de los que se pueden derivar efectos adversos:

- Lisis de células tumorales asociadas al ligando FAS, que activa el programa de apoptosis.
- Liberación de citoquinas que inducen destrucción.
- Lisis de células tumorales por proteínas citotóxicas (granzima y perforina). Este mecanismo es sinérgico con los anteriores.

Este conjunto de actuaciones puede ocasionar efectos adversos que se han de tratar específicamente, por lo que el farmacéutico debe conocerlos para realizar una adecuada atención farmacéutica. Los más importantes son:

- Síndrome de liberación de citoquinas (SLC).
- Síndrome de lisis tumoral.
- Toxicidad neurológica.
- Aplasia de células B.
- Reacciones anafilácticas.

El SLC es, sin duda, el más importante y de cuyo conocimiento podemos sacar provecho si lo orientamos hacia otras patologías como veremos enseguida.

Obedece a una liberación explosiva de citoquinas por los linfocitos T y los macrófagos, por la presencia del receptor nuevo incorporado; de las citoquinas que se liberan, la que más intensamente lo hace es la IL-6 que presenta propiedades inflamatorias muy potentes, sobre todo en el árbol respiratorio. Los síntomas de dicha tormenta son: baja saturación de oxígeno, disnea, fiebre, taquicardia, fatiga, miastenia, confusión, trastornos de la coagulación, disociación de la hemoglobina con aumento de ferritina e insuficiencia renal. El tratamiento adecuado consiste en administrar fármacos como tocilizumab, siltuximab o sarilumab, dado que son anti-IL-6.

El empleo de corticoides no parece apropiado en este caso por el riesgo de provocar la pérdida de linfocitos-T.

Relación con COVID-19.- En este punto llamamos la atención por la coincidencia de dichos efectos adversos con los que produce SARS-CoV-2. En efecto, los síntomas respiratorios que produce esta variedad de coronavirus que estamos padeciendo en el Mundo como una pandemia, **coinciden claramente con los descritos para las CAR-T**, ya que en ambos casos obedecen a un síndrome de liberación de citoquinas (especialmente IL-6), por lo que sería muy aconsejable que los enfermos de COVID-19 fueran tratados con antagonistas de IL-6 como tocilizumab, sirolumab o, mejor aún, con un antagonista de la propia IL-6 como siltuximab, aunque originariamente tengan otras indicaciones.

Recordemos reiterativamente que los síntomas comunes que sufren ambos tipos de pacientes son: hipoxia, disnea, fatiga, dolores musculares, fiebre, ferritina elevada, trastornos de la coagulación (que requieren altas dosis de heparina de bajo p.m.), etc. Pues bien, **en el caso de COVID-19**, a parte de fármacos antagonistas de IL-6, **los corticoides potentes como dexametasona, podrían suplirlos con éxito**, puesto que lo que se desea es un efecto inmunodepresor sobre las células T.

No olvidemos estos temas ante un posible rebrote de COVID.

Referencias bibliográficas

- Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther - Oncolytics*. 2016;3:16011. doi:10.1038/mto.2016.11
- Gross G, Gorochov G, Waks T, Eshhar Z. Generation of Effector T Cells Expressing Chimeric T Cell Receptor With Antibody Type-Specificity. *Transplant Proc*. 1989;21(1 Pt 1):127-30.
- Hannah E. Hughes-Parry, Ryan S. Cross and Misty R. Jenkins. The Evolving Protein Engineering in the Design of Chimeric Antigen Receptor T Cells *Int J Mol Sci* 2020;21(1):204. <https://doi.org/10.3390/ijms21010204>
- Li D, Li X, Zhou WL, Huang Y, Liang X, Jiang L, Yang X, Sun J, Li Z, Han WD, Wang W. Genetically engineered T cells for cancer immunotherapy. *Signal Transduct Tar*. 2019;4:35. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0070-9>
- Miliotou AN, Papadopoulou LC. CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol*. 2018;19(1):5-18.
- Santomasso B, Bachier C, Westin J, Rezvani K, Shpall EJ. The Other Side of CAR T-Cell Therapy: Cytokine Release Syndrome, Neurologic Toxicity, and Financial Burden. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2019;39:433-44.
- Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL et al. Axicabtagene Ciloleucele CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2017;377:2531-44.
- Maude SL, Laetsch TW, Buechner J et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378:439-48.
- Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2019;380:45-56.
- Subklewe M, von Bergwelt-Baildon M, Humpe A. Chimeric Antigen Receptor T Cells: A Race to Revolutionize Cancer Therapy. *Transfus Med Hemother*. 2019;46:15-24.
- van der Stegen S, Hamieh M, Sadelain M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14:499–509. <https://doi.org/10.1038/nrd4597>

Este trabajo debe ser citado como:

Zaragoza F, Zaragoza C. El farmacéutico, siempre al tanto de las innovaciones terapéuticas: las células CAR-T. *Rev Esp Cien Farm*. 2020;1(1):13-17.

Revisión

Redirigiendo las estrategias terapéuticas en la Enfermedad de Alzheimer

Reframing the therapeutic approaches for Alzheimer's Disease

Muñoz-Castro C, Romero-Molina C, Vitorica J*

Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. Instituto de Biomedicina de Sevilla. CIBERNED. Sevilla. España

*Correspondencia: vitorica@us.es

Recibido: 02.07.20; aceptado: 12.07.20

Resumen: La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo progresivo e irreversible que constituye la principal causa de demencia en personas mayores de 65 años. Se caracteriza por un cúmulo de placas seniles (conformadas principalmente por A β) y ovillos neurofibrilares (agregados de la proteína Tau), una pérdida neuronal y sináptica y una respuesta neuroinflamatoria. Aunque se han ensayado multitud de compuestos, en la actualidad no existe ningún tratamiento efectivo que cure o modifique el curso de esta enfermedad. En las últimas décadas, la mayoría de las estrategias terapéuticas se han basado en atenuar la patología amiloide, propuesta como posible causa de la enfermedad de Alzheimer (hipótesis de la cascada amiloide). Aunque algunos de estos fármacos han sido efectivos en la disminución de A β , hasta el momento no se ha obtenido una adecuada relación riesgo-beneficio, lo que, sumado a otros factores, cuestiona la validez de la hipótesis de la cascada amiloide. Paralelamente, dado que la patología Tau es la que mejor correlaciona con el déficit cognitivo en la enfermedad, numerosos compuestos que disminuyen la fosforilación y agregación de Tau han sido evaluados, sin éxito. Debido al fracaso terapéutico obtenido hasta la fecha, y teniendo en cuenta los estudios genéticos que han asociado ciertos polimorfismos en genes implicados en la respuesta glial con un mayor riesgo de padecer la enfermedad, la neuroinflamación está cobrando gran importancia, siendo una potencial diana terapéutica. El papel de la microglía en la EA no se conoce con exactitud y, mientras que las investigaciones en modelos animales apoyan un papel pro-inflamatorio y altamente reactivo, el estudio de muestras humanas podría sugerir un fenotipo microglial disfuncional e incluso degenerativo. Numerosos factores, como el grado de desarrollo de las patologías A β y Tau, posibles mutaciones en genes relacionados con la función microglial o patologías vasculares, determinan el fenotipo microglial de cada región cerebral en los diferentes estadios de la enfermedad, lo que genera una elevada heterogeneidad. Por otro lado, los astrocitos presentan funciones esenciales para el correcto funcionamiento y mantenimiento del sistema nervioso central, que en la enfermedad de Alzheimer pueden verse comprometidas, debido a un aumento en la reactividad astrogliar y una pérdida de funciones homeostáticas como consecuencia de una posible disfunción metabólica. Por tanto, resulta esencial conocer en profundidad el papel de estas células gliales en la progresión de la EA para poder desarrollar estrategias terapéuticas que permitan curar o, al menos, frenar esta patología en un futuro próximo.

Abstract: Alzheimer's Disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder, being the leading cause of dementia in elder people. It is characterized by an accumulation of A β plaques, neurofibrillary tangles (formed by Tau aggregations), neuronal and synaptic loss and neuroinflammation. Although many clinical trials have been conducted, nowadays there is no cure for this disease. In the last decades, following the amyloid cascade hypothesis, which establish that A β is the major trigger of the disease, many therapies were focused on ameliorating A β pathology. Despite some drugs being

effective in reducing A β levels, no treatment has been found to improve the cognitive deficit, which contribute to query the amyloid cascade hypothesis. In parallel, knowing that Tau progression is the pathology that best correlates with cognitive decline, some compounds targeting Tau phosphorylation and aggregation have also been evaluated, with no success. Due to treatment failure and considering genetic studies which have identified high-risk polymorphisms in genes implied in the glial response, neuroinflammation is growing in importance, being a potential therapeutic approach. Microglial role in AD* has not been clearly elucidated yet. Mouse models research suggest that microglia has a pro-inflammatory and hyperreactive role in EA, whereas human samples studies have described a dysfunctional or even degenerative phenotype. Several factors, such as A β and Tau progression, mutations in genes related with microglial function or vascular pathologies, define microglial phenotype in every brain region during each stage of disease, which leads to a wide heterogeneity. On the other hand, astrocytes are essential for brain homeostasis, but in AD its functions may be compromised due to an increase in reactivity and a loss of homeostatic functions, which might be a consequence of a metabolic dysfunction. All in all, determining the role of glial cells in AD progression will enable greater innovation in the choice of novel molecular targets which may slow down or even cure AD.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, terapia, Abeta, Tau, microglía, astrocito. **Keywords:** Alzheimer's Disease, therapy, Abeta, Tau, microglia, astrocyte.

1. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo e irreversible que constituye la primera causa de demencia en personas mayores de 65 años y conlleva un deterioro de las funciones cognitivas y alteraciones conductuales [1]. Las lesiones histopatológicas principales de esta enfermedad, ya enunciadas por Alois Alzheimer en 1907 [2], y posteriormente caracterizadas, son las placas seniles (agregaciones extracelulares de A β) y los ovillos neurofibrilares (agregaciones intracelulares de Tau). Además, se registra una marcada pérdida sináptica y neuronal acompañada de un proceso neuroinflamatorio (Figura 1). En la actualidad, la EA representa el 60-70% de los 50 millones de casos diagnosticados de demencia y se estima que en 2050 se alcancen los 152 millones de afectados a nivel mundial (OMS 2020). Estos datos revelan que la demencia es un serio problema de salud pública, siendo la tercera causa principal de muerte en los países desarrollados (OMS 2016).

Se diferencian al menos dos tipos de EA, que difieren en la edad de inicio, incidencia y causa principal que provoca su aparición, pero que comparten la misma sintomatología y lesiones histopatológicas.

- El *Alzheimer familiar* representa entre el 1-3% de los casos y se manifiesta generalmente entre los 35 y 40 años. Etiológicamente es debido a la presencia de mutaciones autosómicas dominantes,

con total penetrancia, en los genes de la proteína precursora amiloide (APP, cromosoma 21) o de las presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2, cromosomas 14 y 1, respectivamente) [4]. Interesantemente, estos tres genes están implicados en la producción del péptido β -amiloide (A β) presente en las placas extracelulares comentadas anteriormente. Se han descrito 60 mutaciones en APP, más de 300 en PS1 (es la causa más común de Alzheimer familiar) y 56 en PS2 relacionadas con la enfermedad (<http://www.alzforum.org/mutations>).

- El *Alzheimer esporádico* representa la mayoría de los casos de EA (97-99%), afecta al 3-4% de la población entre 60-65 años y aumenta exponencialmente con la edad, llegando a afectar a casi un 50% de los mayores de 85 años. A diferencia del Alzheimer familiar, sus causas son desconocidas y se le otorga un origen multifactorial, aunque la edad es el principal factor de riesgo. Dentro de los factores hereditarios se han descrito polimorfismos en más de 20 genes que influyen en el inicio, progresión y severidad de la patología [4, 5]. Muchos de ellos se expresan preferencialmente en células implicadas en la respuesta inflamatoria del sistema nervioso central (SNC), como por ejemplo la Apolipoproteína E, el receptor TREM2 o la proteína CD33 (Figura 2). Por otro lado, la obesidad, el estrés, la hipertensión, la inactividad física y mental, la depresión, las enfermedades vasculares, el tabaco, el traumatismo cerebral y la diabetes mellitus son factores modificables que parecen contribuir al desarrollo de la EA esporádica [5, 6].

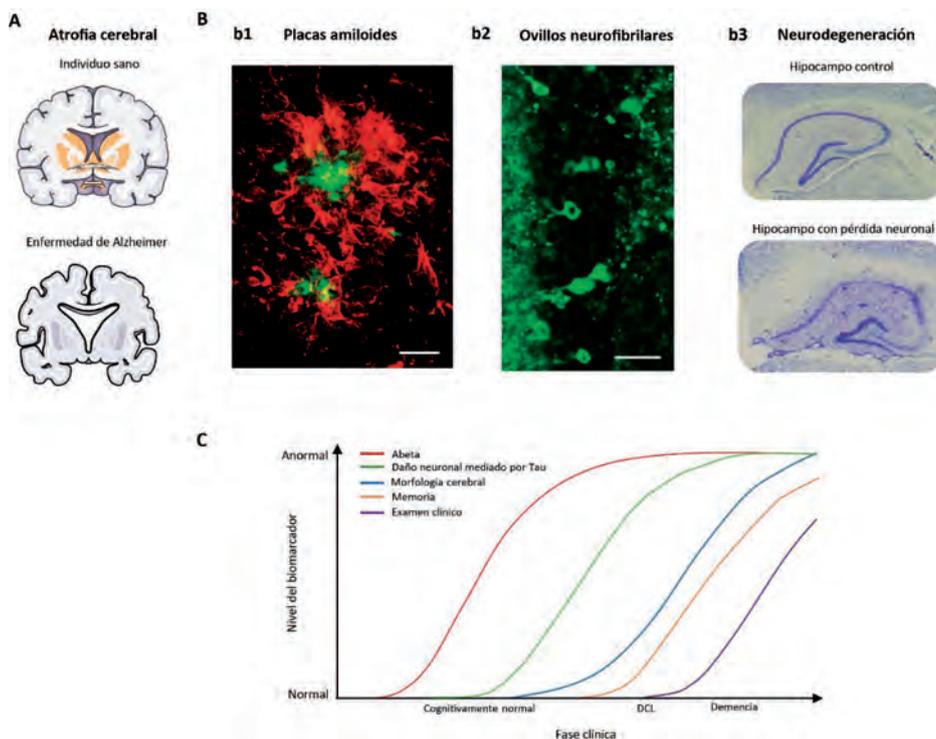


Figura 1. A) Alteraciones macroscópicas en la Enfermedad de Alzheimer (EA). El esquema comparativo entre un individuo sano y un paciente con EA refleja la atrofia cerebral y dilatación ventricular típicas de la enfermedad. B) Alteraciones microscópicas en la EA: placas amiloides, ovillos neurofibrilares y neurodegeneración. También se produce una importante reactividad glial. b1. Las placas amiloides son marcadas con ThioS (verde) y la microglía con Iba1 (rojo) en un ratón APP751SL/+. b2. Los ovillos neurofibrilares son marcados con AT8 (verde) en ratones Tau MAPT.pP301S/+. b3. Marcaje de los núcleos neuronales mediante NeuN (violeta) en modelos TAU P301S. Barra de escala: 20 μm (b1), 10 μm (b2), 200 μm (b3). C) Dinámica de los biomarcadores en la EA. Cuando el deterioro cognitivo se manifiesta, las alteraciones neuropatológicas presentan niveles muy elevados. Datos tomados de Jack et al., 2013 [3]; Aβ se mide por el contenido de Aβ42 en LCR, la disfunción mediada por Tau se mide por contenido de Tau en LCR o por PET-fluorodeoxiglucosa y la morfología cerebral se cuantifica por RMI. DCL=deterioro cognitivo leve.

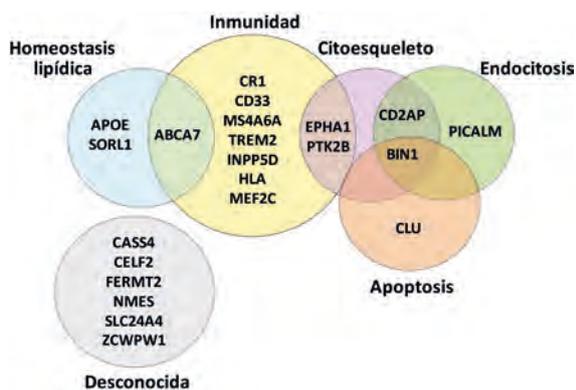


Figura 2. Factores de riesgo genéticos del Alzheimer esporádico en base a sus funciones fisiológicas. La mayoría de los genes asociados con un inicio anterior de la patología y un aumento de su severidad se encuentran asociados a la respuesta inmune y función glial. Datos tomados de Kunkle et al., 2019 [7], Sancesario y Bernardini, 2018 [8].

Desde el punto de vista clínico, la EA se clasifica en 3 fases: la fase “preclínica”, aún asintomática, pero ya con amiloidosis cerebral; la fase prodrómica o de “deterioro cognitivo leve” en la que la patología progresa hacia distintas áreas de la corteza cerebral; y la fase de “demencia”, consecuencia de la pérdida de sinapsis y neuronas en las regiones cerebrales responsables de los procesos cognitivos [6]. Generalmente, el curso clínico dura de 4 a 8 años tras los primeros signos de la enfermedad, aunque se puede alargar hasta los 20 [9]. Aunque una de las claves para el éxito terapéutico en esta enfermedad podría ser el diagnóstico precoz, a día de hoy el diagnóstico se apoya principalmente en la historia clínica y en los exámenes neuropsicológicos [10]. A pesar de que se aúnan esfuerzos para poder identificar los síntomas iniciales de la enfermedad, la ausencia de buenos marcadores biológicos hace que sólo el análisis neuropatológico *post mortem* permita su diagnóstico definitivo.

Actualmente no existe ningún tratamiento efectivo que cure la enfermedad, ni siquiera que modifique su curso clínico. De ahí que también hayan cobrado gran importancia las estrategias de soporte no-farmacológicas como el establecimiento de rutinas, la simplificación de su entorno o la terapia conductista cognitiva [11]. Por su parte, los fármacos aprobados a día de hoy se centran en compensar el desbalance entre neurotransmisores generado por la progresiva destrucción neuronal y que da lugar a los déficits cognitivos observados en la EA [12]. En primer lugar, los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) aprobados (donepezilo, galantamina y rivastigmina) intentan compensar la denervación colinérgica que tiene lugar en la EA. La hipótesis colinérgica sugiere que la degeneración neurofibrilar que tiene lugar en el prosencéfalo basal es la causa principal de la muerte de las neuronas colinérgicas de esta región y da lugar a la progresiva pérdida de inervación colinérgica en los sistemas límbicos y neocortical, que es crítica para el declive de las funciones cognitivas [13]. Por consiguiente, los inhibidores de la AChE aumentan la disponibilidad de acetilcolina en las sinapsis y han sido probados clínicamente como útiles herramientas para retrasar el déficit cognitivo en la EA, al menos durante el primer año de tratamiento [14].

Por otro lado, el antagonista no competitivo, de baja afinidad, del receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) memantina es otro agente terapéutico aprobado para los estadios de Alzheimer de moderado a severo [14]. La memantina se une preferencialmente a los receptores NMDA abiertos bloqueando el flujo iónico y atenuando así los efectos perjudiciales generados por niveles patológicamente elevados de glutamato [15]. De esta forma, tanto en monoterapia como combinada con los inhibidores de la AChE, combate la disfunción neuronal por la hiperexcitabilidad asociada a glutamato [16]. En cualquier caso, los beneficios, únicamente sintomáticos, generados por ambas aproximaciones son mínimos [17], y no modifican o frenan el curso de la patología, por lo que se requieren nuevas estrategias terapéuticas para abordar esta enfermedad.

Desde 2003, la FDA no ha aprobado ningún medicamento para el tratamiento de la EA, siendo más de 200 compuestos los que han fracasado a lo largo de las distintas etapas de experimentación y ensayos clínicos [10]. A ras-

gos generales, encontramos varias razones subyacentes al fracaso terapéutico en la EA. Por un lado, la mayoría de los fármacos evaluados para las diferentes dianas propuestas, aunque cumplen su función en la proteína destino, no producen ninguna mejoría neurológica y, además, producen múltiples efectos secundarios no deseados que inclinan la balanza hacia un efecto más perjudicial que beneficioso. Por otro lado, la falta de traslacionalidad entre los modelos animales, en los que se basan la mayoría de los estudios, y los cerebros de pacientes de Alzheimer dificultan la proposición de dianas terapéuticas exitosas [18, 19]. De igual forma, este desconocimiento sobre la etiología de la patología (al menos en el Alzheimer esporádico) conlleva a la falta de marcadores biológicos en estadios preclínicos y prodrómicos de la EA determinables *in vivo*, lo que da lugar a un inicio probablemente tardío de los tratamientos ensayados [20].

En este trabajo de revisión, analizamos las principales estrategias terapéuticas abordadas en los últimos años, principalmente basadas en las patologías amiloide y neurofibrilar. Además, debido al fracaso terapéutico obtenido hasta la fecha en la EA, a pesar del elevado número de fármacos ensayados, destacamos el papel de la respuesta glial y neuroinflamatoria como posible diana terapéutica, en la que aún queda mucho por explorar.

2. Estrategias terapéuticas basadas en la patología amiloide

Durante las dos últimas décadas, la mayoría de las estrategias terapéuticas abordadas para el tratamiento de la EA se han centrado en la patología amiloide [21]. Las placas amiloides son una de las principales y más características lesiones microscópicas del cerebro de pacientes de Alzheimer (Figura 1 B). Se forman a partir de agregados proteicos insolubles y extracelulares localizados en el parénquima cerebral y en la pared de los vasos sanguíneos, cuyo componente principal es el péptido A β [9, 22].

Este péptido deriva del procesamiento proteolítico de la proteína precursora del péptido β -amiloide (APP) (Figura 3 A). APP puede ser procesado por la ruta no amiloidogénica, por las α - y γ -secretasas, con la consecuente ausencia de producción de A β . Sin embargo, en la vía amiloidogénica, APP es procesado por la β -secretasa o

BACE-1 y, posteriormente, por la γ - secretasa, produciendo principalmente fragmentos de $A\beta$ de 40 aminoácidos ($A\beta_{40}$) [23].

Las proteínas con actividad proteasa PS1 o PS2, donde han sido identificadas más de 300 mutaciones asociadas con la variante familiar de la EA, forman parte del centro activo del complejo γ -secretasa [24]. En individuos sanos, el procesamiento de APP genera principalmente péptidos $A\beta_{40}$ (o de menor tamaño, $A\beta_{36-38}$). Sin embargo, en pacientes de EA, aumenta la relación $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ [25], siendo $A\beta_{42}$ el componente mayoritario y más tóxico de las placas, debido a su mayor capacidad agregante [1, 9]. El péptido $A\beta$, además de aparecer en forma de placas, puede permanecer como monómero o agregarse en forma de fibrillas, protofibrillas y oligómeros solubles extracelulares [23, 26].

Aunque aún quedan por dilucidar múltiples aspectos importantes acerca de esta acumulación defectuosa, parece que es consecuencia de un desequilibrio entre los mecanismos de produc-

ción, degradación y/o aclaramiento de las distintas isoformas de $A\beta$ [27].

En base a las mutaciones encontradas en pacientes con Alzheimer familiar, se propuso la llamada “Hipótesis de la Cascada Amiloide”, para explicar la etiología de esta demencia (Figura 3 B). Esta hipótesis (la más aceptada en la actualidad) propone que la acumulación del péptido $A\beta$ es el agente causante (o desencadenante) de la patología de Alzheimer y que, como consecuencia de su deposición, se producen los ovillos neurofibrilares, la pérdida sináptica, la muerte neuronal, la neuroinflamación y, como consecuencia clínica, la demencia típica de la EA [28]. Desde que esta hipótesis fue propuesta en 1992, ha ido sufriendo modificaciones, como la hipótesis de los oligómeros de $A\beta$, que plantea que son las especies solubles de $A\beta$, y no las placas, las principales responsables de la neurodegeneración, puesto que correlacionan mejor con los síntomas de la EA y su severidad [29, 30]. Como se menciona, entre las principales razones para apoyar esta hipótesis, podemos destacar que

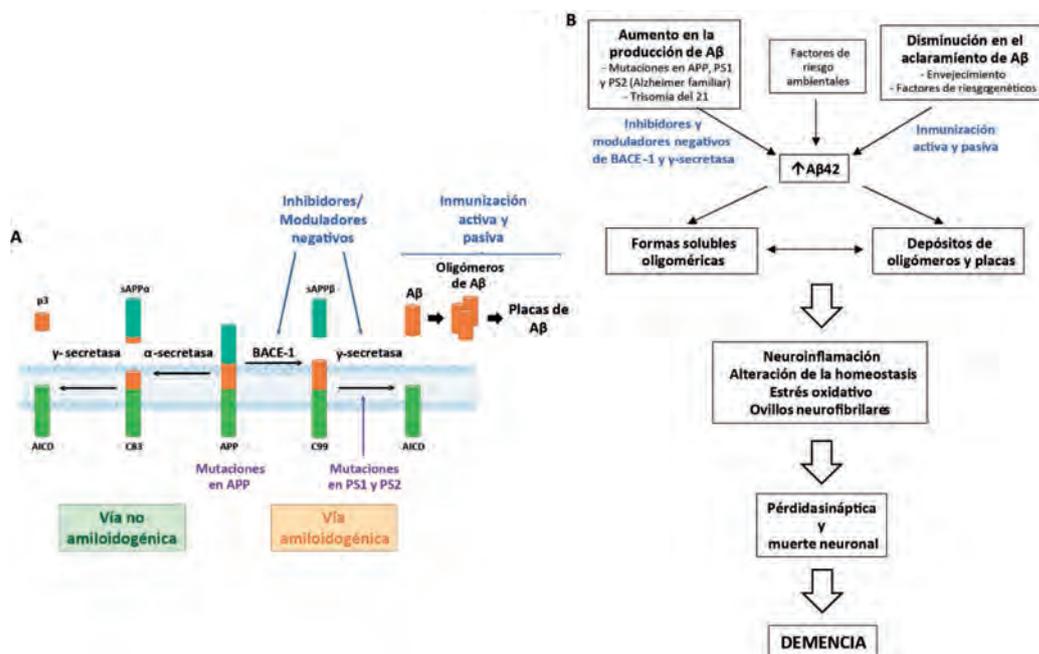


Figura 3. La patología amiloide en la EA. (A) Procesamiento de la Proteína Precursora Amiloide (APP) mediante las rutas amiloidogénica y no amiloidogénica. En la vía amiloidogénica, el procesamiento del APP se lleva a cabo por la acción de BACE-1 y γ - secretasa, generándose los fragmentos sAPP β , AICD y el péptido $A\beta$. Este último se acumula en el medio extracelular, se agrega y forma las placas seniles características de la EA. (B) Hipótesis de la cascada amiloide. Según esta hipótesis, en la EA se produce un aumento de $A\beta_{42}$, que da lugar a un acumulo de formas oligoméricas solubles y depósitos y placas de $A\beta$. En consecuencia, se produce una cascada de eventos patológicos que acaban desencadenando la pérdida sináptica y muerte neuronal que causan la demencia de Alzheimer. En azul, se indican las dianas de las principales estrategias terapéuticas ensayadas en la EA.

todas las mutaciones conocidas, causantes del Alzheimer familiar (en los genes que codifican para APP, PS1 y PS2) están relacionadas con la producción y procesamiento del péptido A β , aumentando la producción de A β 42 con respecto a A β 40 [31]. Además, un elevado número de personas con síndrome de Down (presentan trisomía del cromosoma 21, donde se localiza el gen para APP) padecen síntomas de EA de forma temprana (30-40 años de edad). En tercer lugar, los modelos animales transgénicos con las mutaciones humanas de EA familiar de APP y PS1 presentan placas amiloides, pérdida sináptica y algunos síntomas, como problemas de memoria, de la EA. Por otra parte, se ha demostrado que la deposición de A β en el cerebro puede ocurrir décadas antes de que aparezcan los síntomas clínicos [32].

Por todos estos motivos, la hipótesis de la cascada amiloide ha sido ampliamente aceptada durante años por gran parte de la comunidad científica. En consecuencia, la mayoría de las estrategias terapéuticas han estado dirigidas hacia la reducción de la producción, agregación y hacia un aumento en el aclaramiento de A β [12]. Teniendo en cuenta la ruta amiloidogénica del APP, la reducción en la producción de A β se ha abordado, originalmente, desarrollando inhibidores o moduladores negativos de las dos principales enzimas involucradas en la ruta amiloidogénica (Figura 3). Por tanto, las dos dianas terapéuticas elegidas para el desarrollo de nuevos fármacos contra la EA han sido BACE-1 y la γ -secretasa. Sin embargo, los ensayos clínicos realizados hasta el momento con inhibidores/moduladores de estas enzimas, a pesar de inhibir eficientemente sus actividades enzimáticas, no han desvelado una adecuada relación riesgo-beneficio. Hasta la fecha, no se ha descrito ninguna mejora neurológica de los pacientes de EA tratados con estos inhibidores en ningún ensayo clínico. Por el contrario, sí se han descrito diversas, en algunos casos graves, reacciones adversas [23, 33, 34]. Una de las múltiples razones que explicarían este fracaso farmacológico es la diversidad de sustratos distintos de ambas, BACE-1 y γ -secretasa, actividades enzimáticas. De manera que la inhibición no específica de dichas actividades afecta a multitud de procesos celulares esenciales en muchos órganos y sistemas, no sólo en el SNC.

Para mejorar la especificidad en los tratamientos destinados a disminuir la acumulación de

A β se han realizado numerosos ensayos clínicos de inmunización activa y pasiva con diferentes anticuerpos monoclonales o inmunoglobulinas contra A β [34]. Esta estrategia ha predominado en los últimos 15 años, aunque hasta la fecha, ninguno ha mostrado adecuada seguridad y/o eficacia [12]. Es interesante destacar que, aunque la mayoría de estas estrategias han sido efectivas en la disminución de la acumulación de A β , ninguna ha aportado beneficios aparentes a nivel cognitivo a las dosis ensayadas [35]. Por ello, en los últimos años la mayoría de los estudios se está centrando en estadios preclínicos, prodrómicos o leves [33, 10]. Por tanto y a pesar de este aparente fracaso, en la actualidad hay múltiples anticuerpos monoclonales en fase III, como aducanumab, gantenerumab y BAN2401 para estadios prodrómicos o leves de EA. Otros, como crenezumab, gantenerumab, y solanezumab, se están empleando en fases preclínicas o poblaciones de riesgo [10, 12].

Por otra parte, este importante fracaso terapéutico contribuye a los múltiples argumentos contra la hipótesis de la cascada amiloide, que está siendo revisada en la actualidad. Entre estos argumentos cabría destacar, en primer lugar, el patrón en la aparición de los depósitos extracelulares de A β , que sigue una distribución anatómica en el cerebro de los pacientes contraria (en cierto grado) a la patología Tau [36]. De hecho, existe una alta correlación neuroanatómica entre el desarrollo de la neurodegeneración con la progresión de la deposición de Tau y no con A β [1]. Por tanto, parece que, en contra de lo defendido en la hipótesis de la cascada amiloide, en la EA las placas no son el principal agente causal de las alteraciones sinápticas, la neurodegeneración y la respuesta inflamatoria [29, 35, 30]. De hecho, existen depósitos de A β insolubles en el parénquima cerebral y en la pared de los vasos sanguíneos cerebrales de personas sanas con edad avanzada [37]. Otro aspecto a considerar es que, a pesar de la importancia de A β en la EA familiar, el 97-99% de los casos son esporádicos y, aunque presentan los mismos rasgos neuropatológicos y síntomas, podrían existir importantes diferencias en su etiología y evolución o proceso patológico. Por otra parte, en los modelos transgénicos para APP y PS1 no se producen ovillos neurofibrilares, no reproduciendo los rasgos patológicos de la EA en su totalidad, a pesar de presentar acúmulo de A β [38].

En resumen, existen múltiples factores que cuestionan la validez de la hipótesis de la cascada amiloide, sugiriendo que la acumulación de A β puede ser una consecuencia, y no la causa (al menos única), de la EA, lo cual explicaría la falta de éxito en las múltiples estrategias abordadas en esta área.

3. Estrategias terapéuticas basadas en la patología Tau

Otro de los sellos distintivos de la EA es la formación de los ovillos neurofibrilares, conformados por agregados de la proteína Tau. Esta proteína se encarga de la estabilización de la estructura y la dinámica de los microtúbulos neuronales, por lo que es fundamental para el transporte axonal. Además, participa en la regulación de la actividad neuronal, en la neurogénesis, y en la regulación de la insulina cerebral [39]. Estas funciones están controladas por su estado de fosforilación, el cual se ve alterado en la Enfermedad de Alzheimer. Durante la progresión de la enfermedad, Tau se hiperfosforila, se disocia de los microtúbulos y se agrega dando lugar a distintas formas de Tau soluble hiperfosforilado y a los agregados insolubles (ovillos) (Figura 1 B), que se acumulan en el soma de las neuronas y en los procesos neuríticos, produciendo en cierta medida la disfunción y muerte neuronal. De esta forma, la mayoría de los tratamientos encaminados a minimizar la patología Tau en los enfermos de Alzheimer están dirigidos a las proteínas implicadas en el estado de fosforilación y agregación de Tau [40].

Aunque actualmente no existen fármacos en ensayos clínicos en fase III dirigidos hacia este mecanismo de acción, 17 fármacos se encuentran en fase I, II o II/III [14]. Dada la implicación de la quinasa glucógeno sintasa kinasa 3 (GSK3 β) en la fosforilación de Tau, se han desarrollado diferentes inhibidores contra esta diana, siendo el más estudiado el cloruro de litio [41, 42]. Por otro lado, el inhibidor de GSK3 β ANAVEX 2-73 ha presentado mejoras en la realización de tareas cotidianas en pacientes con deterioro cognitivo leve [43]. Por su parte, otras moléculas que disminuyen la agregación de Tau también están siendo evaluadas en ensayos en fase II, como LUCIDITY o Nilotinib [44]. Además, al igual que en la terapia dirigida contra A β , existen algunos proyectos de inmunización activa o pasiva contra Tau [45].

4. La neuroinflamación como diana terapéutica

Durante años, en la EA, se ha considerado al sistema inmune como un observador pasivo de la cascada patogénica, que simplemente respondía al daño infligido por los agregados proteicos. De hecho, la mayoría de las estrategias terapéuticas desarrolladas hasta ahora han sido dirigidas hacia la disfunción neuronal. Sin embargo, estudios recientes han realzado la importancia de otros tipos celulares en las enfermedades neurodegenerativas, que también pueden verse afectados por la progresión de la patología. De hecho, la glía se corresponde con el 80% de las células del sistema nervioso central. Recientemente, novedosas investigaciones en modelos y pacientes de EA, combinadas con “estudios masivos de secuenciación génica” han asignado a la respuesta inmune un papel mucho más activo (Figura 2), y han permitido acuñar el término de “componente celular” en la patogénesis de la EA, que hace referencia a las complejas interacciones entre neuronas, glía y vasculatura [46, 47]. Por tanto, frente a la hipótesis amiloide lineal, que no correlaciona con las observaciones clínicas, la relevancia de las interacciones entre los distintos tipos celulares como mediadores de la progresión de la patología está adquiriendo cada vez más fuerza. En esta revisión, nos centramos en las principales células gliales que median la neuroinflamación: la microglía y los astrocitos.

Microglia en la EA.

Las células microgliales vigilan constantemente su entorno para asegurar la homeostasis cerebral. Frente a un estímulo dañino, modifican su estado transcripcional, metabólico y morfológico hacia un fenotipo activo que elimina el agente perjudicial y restaura la lesión tisular [48]. Clásicamente, en similitud a lo que ocurre con la respuesta de macrófagos, se ha asumido que la activación microglial frente a los daños típicos de la patología de Alzheimer genera una respuesta pro-inflamatoria y neurotóxica. Sin embargo, el panorama parece ser mucho más complejo y, ante las alteraciones continuadas que se producen en la EA, el rol de la microglía no se conoce con exactitud (Figura 4) [49].

En cualquier caso, los estudios GWAS han identificado numerosos polimorfismos en genes involucrados en la respuesta microglial, asociados a la forma esporádica de la EA, como ApoE, TREM2, TYROBP o CD33 [50 - 52], que refuerzan la importancia de la población microglial en el inicio y progresión de la patología.

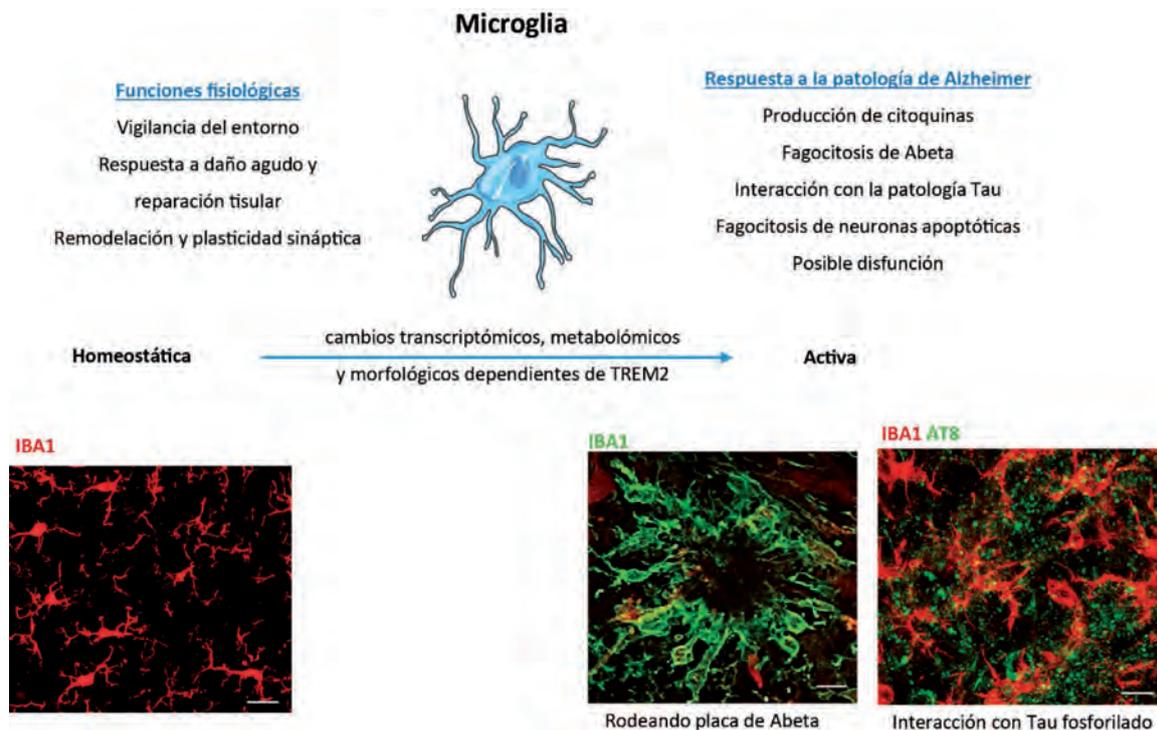


Figura 4. Principales alteraciones de la microglía en la EA. En condiciones fisiológicas, la microglía realiza diversas funciones para contribuir a la homeostasis cerebral. En la EA, interacciona con las patologías A β y Tau y puede sufrir disfunción. Las imágenes han sido realizadas en modelos murinos no-transgénicos (microglía homeostática) y modelos murinos de EA (microglía activa); APP751SL/+ y Tau MAPT.pP301S/+; IBA1 = marcador microglial; AT8=marcador de Tau fosforilado. Barras de escala: 10 μ m.

La activación microglial asociada a procesos neurodegenerativos ha sido recientemente caracterizada gracias a estudios transcriptómicos en modelos animales. Se ha definido que, en la EA, entre otros procesos neurodegenerativos, la microglía adquiere un fenotipo asociado a enfermedad, conocido como DAM (del inglés, *disease-associated microglia*) [53, 54]. Esta activación microglial, dependiente del receptor TREM2 [55, 56], es fundamental para la contención de las placas amiloides [57] y la fagocitosis de A β oligomérico [58]. Sin embargo, su interacción con la patología Tau, que es la que mejor correlaciona con el déficit cognitivo, es un tema de debate. Mientras algunos estudios muestran que la microglía favorece la propagación de depósitos de Tau [59], otras evidencias sugieren que la progresión de la patología Tau es independiente de la respuesta microglial [60]. Por tanto, el papel de la microglía DAM en la progresión de la EA es un tema controvertido y variará a lo largo de la enfermedad, siendo influenciado por el grado de desarrollo de las patologías A β y Tau. Por ello, en las diferentes investigaciones realizadas, se propone tanto impulsar su actividad [54, 61], como recuperar la microglía homeostática [55, 62].

Sin embargo, los novedosos avances metodológicos que han permitido caracterizar el perfil genético de la microglía humana en la EA, HAM (del inglés, *human Alzheimer's microglia*) [63], ilustran que la firma genética HAM comparte la mitad de su perfil de expresión con la microglía obtenida de individuos controles, manifestando cambios asociados a un envejecimiento fisiológico, mientras que apenas comparte el perfil de expresión de la firma DAM. Estas diferencias podrían deberse a que, en los modelos murinos con patología amiloide y en algunos modelos con patología Tau tiene lugar una exacerbada activación microglial [64, 65], mientras que en los pacientes de Alzheimer podría no producirse un fenotipo microglial activo y resolutivo [63, 66].

De hecho, la activación microglial en muestras de hipocampo humanas postmortem parece ser limitada, restringida principalmente a los alrededores de los depósitos amiloides; y la mayoría de células microgliales parecen presentar un fenotipo disfuncional o incluso degenerativo [67].

Esta incapacidad para desarrollar sus funciones podría ser consecuencia de mutaciones en genes esenciales para su supervivencia y activación

(como Trem2) [68], de falta de disponibilidad de oxígeno por alteraciones vasculares (remitido a publicación), de la toxicidad de las especies solubles de Tau [65, 67, 69] o de repetidos estados de activación. De esta forma, cabe la posibilidad de que las células microgliales sean “víctimas” de la patología y pierdan su funcionalidad.

Así pues, la investigación en el campo se ve nuevamente retardada por las diferencias existentes entre el fenotipo microglial observado en modelos murinos transgénicos frente a los registros en muestras humanas post mortem, que presentan numerosas comorbilidades [18]. Además de la historia clínica de cada paciente, deben tenerse en cuenta las diferencias entre las distintas regiones cerebrales, aún dentro del mismo individuo. En regiones donde predomina la patología amiloide, como la corteza cerebral, la microglía podría presentar un fenotipo y función diferente a regiones donde predomina la patología Tau, como el hipocampo [66, 70]. Del mismo modo, la respuesta microglial también podría variar en función de la disponibilidad de nutrientes y oxígeno de cada región cerebral (remitido a publicación). Todo ello determinará si el papel microglial es neuroprotector o neurotóxico.

En resumen, la heterogénea respuesta microglial dependerá de la región cerebral considerada,

de la progresión de las patologías A β y Tau, y de las enfermedades coetáneas que presente el paciente. Esto dificulta la propuesta de dianas terapéuticas concretas, pero a su vez subraya la importancia de continuar con las investigaciones en torno a la implicación de la microglía en la EA para así proponer terapias eficaces y personalizadas.

Astrocitos en la EA

Los astrocitos o astrogliá constituyen entre el 19 - 40% de las células gliales del SNC humano [71], donde son mediadores importantes de la respuesta neuroinflamatoria. Los astrocitos desarrollan múltiples y variadas funciones indispensables para el correcto mantenimiento y la homeostasis del SNC [72 - 74]. En condiciones fisiológicas, los astrocitos proporcionan soporte metabólico y estructural a las neuronas, captando el exceso de glutamato extracelular, proporcionando lactato como fuente de energía y regulando las sinapsis [75, 72]. Forman parte de la unidad neurovascular de la barrera hematoencefálica, y participan en la respuesta inmune en el SNC (Figura 5) [73, 75].

Sin embargo, conforme la EA progresa, también pueden producirse alteraciones patológicas en los astrocitos (Figura 5). En los pacientes de EA

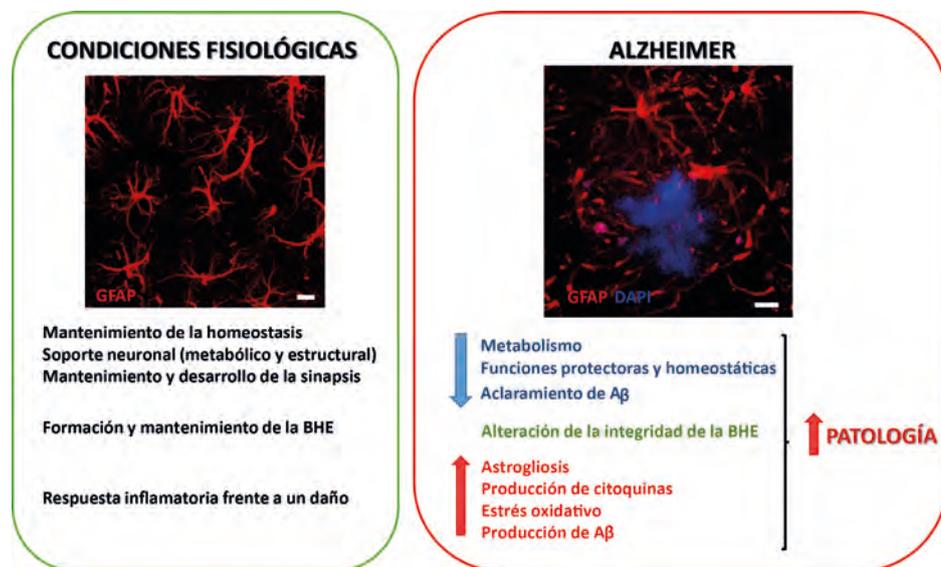


Figura 5. Principales alteraciones de los astrocitos en la EA. Los astrocitos presentan importantes funciones para el correcto funcionamiento del SNC. Sin embargo, en la EA parece producirse una disfunción metabólica, con la consecuente pérdida de funciones protectoras y homeostáticas, así como una importante reactividad astrogliá y alteración de la barrera hematoencefálica (BHE). Todo ello, podría contribuir a la patología de Alzheimer. Las imágenes muestran astrocitos (GFAP) y placas de A β (DAPI) de ratones no transgénicos, para ilustrar los astrocitos en condiciones fisiológicas, y de modelos de Alzheimer APP751SL/+, donde observamos astrocitos reactivos rodeando a una placa amiloide, de forma similar a lo que ocurre en pacientes de EA. Barras de escala: 10 μ m.

se produce una reactividad astrocitaria generalizada [76, 77]. Se ha propuesto que, en fases iniciales de la enfermedad, los astrocitos reactivos podrían intervenir en procesos de aclaramiento y degradación de A β , aunque, con la progresión de la patología, estos mecanismos pueden alterarse, probablemente debido a una disfunción de los astrocitos, lo que implicaría una exacerbación de la patología [75, 78]. Los astrocitos reactivos pueden producir citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno, que, junto a la microglía, participan en la respuesta neuroinflamatoria típica de la EA [75, 79].

Recientemente se ha postulado que la progresión de la EA se relaciona, desde estadios muy tempranos, con deficiencias metabólicas en el SNC [80 - 82], en las que probablemente los astrocitos activos desempeñen un papel fundamental [81, 83]. De hecho, se ha observado que el A β afecta al metabolismo de los astrocitos [84] y a través de ellos a las funciones cognitivas [81]. Además, la disfunción metabólica también puede contribuir a la generación de A β por parte de los propios astrocitos [83]. La atrofia y/o disfunción astrocitaria implica la reducción del soporte homeostático astrogial, con una regulación anormal de calcio y glutamato, lo que tiene graves consecuencias en la supervivencia neuronal y en la actividad funcional de las sinapsis [75, 82, 84].

Por otro lado, el cambio morfológico asociado a la activación y/o disfunción astrogial afecta a los pies de los astrocitos que forman parte de la unidad neurovascular, provocando déficits vasculares desde estadios tempranos de la EA [74, 82, 85].

En definitiva, aunque, al igual que en la microglía, sigue habiendo controversia sobre el rol de los astrocitos en la EA, parece que, en los inicios de la patología, los astrocitos poseen un papel neuroprotector. Sin embargo, con la progresión de la enfermedad, puede producirse una pérdida de sus funciones normales y/o a una ganancia de función tóxica, contribuyendo a la patología [74, 83]. Dilucidar el papel de estas células, con funciones tan importantes y variadas, resulta esencial para proponer nuevos abordajes terapéuticos, que pudiesen contribuir, al menos en parte, a frenar o paliar el avance de la EA.

Estrategias terapéuticas basadas en la neuroinflamación

El uso de las células gliales como posibles dianas terapéuticas se ha centrado principalmente

en tratar de frenar los efectos neurotóxicos producidos en la EA. Varios estudios observacionales han demostrado que el uso prolongado de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) puede retrasar el comienzo de la EA y reducir su progresión [79, 86 - 88]. En este sentido, los inhibidores de TNF α , como infliximab, adalimumab o golimumab están siendo valorados como terapias potenciales para la EA. Sin embargo, la baja penetración de estos fármacos a través de la barrera hematoencefálica compromete su eficacia en la EA. Otras líneas de investigación se centran en el estudio de moléculas antioxidantes, debido al aumento de estrés oxidativo producido en la EA. Actualmente, se encuentra en ensayo clínico el extracto de Ginkgo Biloba (fase II-III), que además de su poder antioxidante, mejora el flujo sanguíneo y la función cerebral [12, 14].

A pesar de los prometedores resultados de agentes antiinflamatorios y antioxidantes en investigaciones *in vitro* y con modelos de la EA, hasta el momento ha habido controversias entre los estudios observacionales y los ensayos clínicos [88, 89]. Entre las múltiples explicaciones posibles (diseño erróneo de los ensayos, intervenciones tardías, etc.) debemos incluir un conocimiento incompleto sobre el papel de las células gliales en los mecanismos fisiopatológicos de la EA. Mientras que los ensayos anteriores han asumido un rol pro-inflamatorio de la microglía y los astrocitos en la patología, nuevas evidencias cuestionan ese papel neurotóxico, descrito principalmente en modelos animales, apuntando a que en pacientes con EA, su contribución perjudicial podría deberse más bien a una falta de función protectora. Por ello, en los últimos años también se están desarrollando estrategias terapéuticas para revertir alteraciones patológicas producidas en las células gliales y recuperar su función fisiológica. En este sentido, puesto que múltiples variantes de riesgo de la EA en TREM2 producen una disminución de la activación microglial y función fagocítica, actualmente se encuentran en fase I anticuerpos monoclonales activadores de TREM2 [33].

Sin embargo, dada la gran heterogeneidad observada en la respuesta microglial, los astrocitos podrían ser preferentemente una potencial diana terapéutica. La astroglia presenta múltiples funciones esenciales para el correcto funcionamiento del SNC y en la EA participa en un amplio rango de cambios patológicos. Por tanto, una vez conocida con exactitud su función, podrían constituir una estrategia prometedora. Ac-

tualmente se investigan aproximaciones para el mantenimiento de la producción de factores neurotróficos, neurotransmisión glutamatergica y mantenimiento de la homeostasis del SNC [90]. En enero de 2020, se completó con buenos resultados la fase I del THN201 (combinación de donepezilo y mefloquina), que modula la función astrocítica y mejora la señal a acetilcolina.

Otra aproximación que está cobrando importancia en los últimos años es el estudio de la relación entre la respuesta inmune periférica y la neuroinflamación [91, 92]. De hecho, en noviembre de 2019, el Oligomanoato de sodio (GV-971) ha recibido una aprobación condicional en el tratamiento de la EA de leve a moderada en China. Aunque se desconoce su mecanismo de acción, parece que reacondiciona a la microbiota intestinal, lo cual podría limitar la contribución de la inmunidad periférica alterada en la patogénesis de la EA [93].

Por tanto, dilucidar el papel que desempeñan las células gliales y la neuroinflamación en la patología de Alzheimer resulta esencial para poder desarrollar estrategias terapéuticas eficientes que reduzcan los posibles efectos neurotóxicos y/o compensen su disfunción.

5. Conclusiones

En los últimos años, en la EA, las estrategias terapéuticas se han basado principalmente en las patologías amiloide y Tau, pero hasta la fecha no se ha aprobado ningún fármaco modificador de la enfermedad debido a la falta de eficacia y/o a la presencia de reacciones adversas graves. Por otro lado, la falta de traslacionalidad entre los modelos animales y los cerebros de pacientes de Alzheimer dificultan la proposición de dianas terapéuticas exitosas [18, 19]. Además, este desconocimiento sobre la progresión de la patología conlleva a la falta de marcadores biológicos en estadios preclínicos y prodrómicos, lo que da lugar a un inicio probablemente tardío de los tratamientos ensayados [20], ya que la acumulación de A β y Tau comienza décadas antes del inicio de los síntomas.

Como consecuencia de este fracaso terapéutico, es fundamental centrar el foco en dianas alternativas a las patologías de A β y Tau. Aunque también se han propuesto estrategias dirigidas a la neuroprotección y potenciación

de la función neuronal [14], en la mayoría de los pacientes la pérdida neuronal podría ser muy elevada cuando se diagnostica la enfermedad, siendo la recuperación neuronal y sináptica un reto demasiado desafiante. Por tanto, gracias a que diversas evidencias científicas han puesto a la microglía y a los astrocitos en el punto de mira, actualmente numerosas investigaciones van encaminadas hacia la comprensión de la participación de las células gliales en el inicio y el desarrollo de la patología de Alzheimer. Por consiguiente, las estrategias dirigidas a la actividad glial podrían suponer una opción más prometedora para frenar la EA. Especialmente, el rescate de la pérdida de función de soporte neuronal por parte de los astrocitos podría ser una diana exitosa.

Sin embargo, al ser la EA una patología con multitud de alteraciones coetáneas, que a su vez se retroalimentan entre sí [94 - 96], el tratamiento dirigido a uno de los signos probablemente no sea suficiente para enlentecer su progresión. La actuación simultánea sobre varias dianas podría ser esencial para frenar la patología, si bien esto dificulta enormemente la realización y evaluación de los ensayos clínicos. Por todo ello, es fundamental invertir y aunar esfuerzos para profundizar en los mecanismos patológicos del Alzheimer de manera que el éxito terapéutico se visualice en un futuro cercano.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), los fondos FEDER de la Unión Europea, mediante las ayudas PI15/00957 y PI18/01556 (JV), CIBERNED (CB06/05/0094 a JV); CMC y CRM han recibido financiación de las becas FPU del Ministerio español de Universidades. Este artículo se distribuye bajo los términos de *Creative Commons Attribution 4.0 International License* (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, proporcionando el crédito al autor original o fuente, el link a la licencia de *Creative Commons* (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) y la indicación de si se han realizado cambios. Las ilustraciones bajo esta licencia se muestran en la figura 1A y 4.

Contribución de los autores

CMC y CRM contribuyeron en igual medida.

Conflicto de interés

Sin conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

1. Hane FT, Robinson M, Lee BY, Bai O, Leonenko Z, Albert MS. Recent progress in Alzheimer's Disease research, part 3: diagnosis and treatment. *J Alzheimers Dis.* 2017;57(3):645-65.
2. Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin.* 1907;64 Band, Verlag von Georg Reimer.
3. Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol.* 2013;12(2):207-16.
4. Calero M, Gómez-Ramos A, Calero O, Soriano E, Ávila J, Medina M. Additional mechanisms conferring genetic susceptibility to Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:138.
5. Robinson M, Lee BY, Hanes FT. Recent progress in Alzheimer's Disease research, part 2: genetics and epidemiology. *J Alzheimers Dis.* 2017;61(1):459.
6. Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, Strooper B de, Frisoni GB, Salloway S, et al. Alzheimer's disease. *The Lancet.* 2016;388(10043):505-17.
7. Kunkle BW, Grenier-Boley B, Sims R, Bis JC, Damotte V, Naj AC, et al. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. *Nat Genet.* 2019;51(3):414-30.
8. Sancesario GM, Bernardini S. Alzheimer's disease in the omics era. *Clin Biochem.* 2018;59:9-16.
9. Kumar A, Tsao JW. Alzheimer Disease. [Updated 2020 April 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499922/>
10. Atri A. The Alzheimer's disease clinical spectrum: diagnosis and management. *Med Clin North Am.* 2019;103(2):263-93.
11. Kishita N, Backhouse T, Mioshi E. Nonpharmacological interventions to improve depression, anxiety, and quality of life (QoL) in people with dementia: an overview of systematic reviews. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2020;33(1):28-41.
12. Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG. Current and future treatments in Alzheimer Disease: an update. *J Cent Nerv Syst Dis.* 2020;12:1179573520907397.
13. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's Disease. *Brain.* 2018;141(7):1917-33.
14. Cummings J, Lee G, Ritter A, Sabbagh M, Zhong K. Alzheimer's disease drug development pipeline. *Alzheimers Dement (N Y).* 2019;5:272-93.
15. McShane R, Westby MJ, Roberts E, Minakaran N, Schneider L, Farrimond LE, et al. Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;3(3):CD003154.
16. Blanco-Silvente L, Capellà D, Garre-Olmo J, Vilalta-Franch J, Castells X. Predictors of discontinuation, efficacy, and safety of memantine treatment for Alzheimer's disease: meta-analysis and meta-regression of 18 randomized clinical trials involving 5004 patients. *BMC Geriatr.* 2018;18(1):168.
17. Tricco AC, Ashoor HM, Soobiah C, Rios P, Veroniki AA, Hamid JS, et al. Comparative effectiveness and safety of cognitive enhancers for treating Alzheimer's Disease: systematic review and network metaanalysis. *J Am Geriatr Soc.* 2018;66(1):170-8.
18. Gutiérrez A, Vitorica J. Toward a new concept of Alzheimer's Disease models: a perspective from neuroinflammation. *J Alzheimers Dis.* 2018;64(s1):S329-38.
19. Drummond E, Wisniewski T. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* 2017;133(2):155-75.

20. Gauthier S, Albert M, Fox N, Goedert M, Kivipelto M, Mestre-Ferrándiz J, et al. Why has therapy development for dementia failed in the last two decades? *Alzheimers Dement*. 2016;12(1):60-4.
21. Folch J, Ettcheto M, Petrov D, Abad S, Pedrós I, Marin M, et al. Review of the advances in treatment for Alzheimer disease: strategies for combating β -amyloid protein. Una revisión de los avances en la terapéutica de la enfermedad de Alzheimer: estrategia frente a la proteína β -amiloide. *Neurología*. 2018;33(1):47-58.
22. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(12):4245-9.
23. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin*. 2017;38(9):1205-1235.
24. Wolfe MS. Structure and function of the γ -secretase complex. *Biochemistry*. 2019;58(27):2953-2966.
25. Hillen H. The beta amyloid dysfunction (BAD) hypothesis for Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*. 2019;13:1154.
26. Choi ML, Gandhi S. Crucial role of protein oligomerization in the pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *FEBS J*. 2018;285(19):3631-44.
27. Baranello RJ, Bharani KL, Padmaraju V, Chopra N, Lahiri DK, Greig NH, et al. Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2015;12(1):32-46.
28. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992;256(5054):184-5.
29. Cline EN, Bicca MA, Viola KL, Klein WL. The amyloid- β oligomer hypothesis: beginning of the third decade. *J Alzheimers Dis*. 2018;64(s1):S567-S610.
30. Ricciarelli R, Fedele E. The amyloid cascade hypothesis in Alzheimer's Disease: it's time to change our mind. *Curr Neuropharmacol*. 2017;15(6):926-35.
31. Rosenberg RN, Lambracht-Washington D, Yu G, Xia W. Genomics of Alzheimer Disease: a review. *JAMA Neurol*. 2016;73(7):867-74.
32. Gao YL, Wang N, Sun FR, Cao XP, Zhang W, Yu JT. Tau in neurodegenerative disease. *Ann Transl Med*. 2018;6(10):175.
33. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: an update on pathobiology and treatment strategies. *Cell*. 2019;179(2):312-39.
34. Briggs R, Kennelly SP, O'Neill D. Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clin Med (Lond)*. 2016;16(3):247-53.
35. Makin S. The amyloid hypothesis on trial. *Nature*. 2018;559(7715):S4-S7.
36. Jucker M, Walker LC. Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Ann Neurol*. 2011;70(4):532-40.
37. Rodríguez KM, Kennedy KM, Devous MD Sr, Rieck JR, Hebrank AC, Diaz-Arrastia R, et al. β -Amyloid burden in healthy aging: regional distribution and cognitive consequences. *Neurology*. 2012;78(6):387-95.
38. Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltze L, et al. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep*. 2006;7(9):940-946.
39. Gao YL, Wang N, Sun FR, Cao XP, Zhang W, Yu JT. Tau in neurodegenerative disease. *Ann Transl Med*. 2018;6(10):175.
40. Lee HE, Lim D, Lee JY, Lim SM, Pae AN. Recent tau-targeted clinical strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Future Med Chem*. 2019;11(15):1845-8.

41. Hampel H, Lista S, Mango D, Nisticò R, Perry G, Avila J, et al. Lithium as a treatment for Alzheimer's Disease: the systems pharmacology perspective. *J Alzheimers Dis.* 2019;69(3):615-29.
42. Trujillo-Estrada L, Jiménez S, De Castro V, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-González I, et al. In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol Commun* 2013;1(73):1-16.
43. Parmentier F, Etchet A, Missling CU, Williams C, Afshar M. Exploring gut microbiota as a source of potential biomarkers: initial results from the ANAVEX[®]2-73 Alzheimer's Disease clinical study [O4-02-04]. AAIC; 2019. <http://www.arianapharma.com/wpcontent/uploads/2019/07/Anavex-Microbiota-Presentation-AAIC-July-2019-FINAL-1.pdf>.
44. Medina M. An overview on the clinical development of Tau-based therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4):1-16.
45. Gauthier S, Aisen PS, Cummings J, Detke MJ, Longo FM, Raman R, et al. Non-amyloid approaches to disease modification for Alzheimer's Disease: an EU/US CTAD task force report. *J Prev Alzheimers Dis.* 2020;1-6. doi: 10.14283/jpad.2020.18.
46. De Strooper B, Karran E. The cellular phase of Alzheimer's Disease. *Cell.* 2016;164(4):603-15.
47. Prokop S, Lee VMY, Trojanowski JQ. Neuroimmune interactions in Alzheimer's disease-New frontier with old challenges? *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2019;168:183-201.
48. Butovsky O, Weiner HL. Microglial signatures and their role in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2018;19(10):622-35.
49. Süß P, Schlachetzki JCM. Microglia in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.* 2020;17(1):29-43.
50. Dansokho C, Heneka MT. Neuroinflammatory responses in Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 2018;125(5):771-9.
51. Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2013;45(12):1452-8.
52. Sims R, van der Lee SJ, Naj AC, Bellenguez C, Badarinarayan N, Jakobsdottir J, et al. Rare coding variants in PLCG2, ABI3, and TREM2 implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2017;49(9):1373-84.
53. Friedman BA, Srinivasan K, Ayalon G, Meilandt WJ, Lin H, Huntley MA, et al. Diverse brain myeloid expression profiles reveal distinct microglial activation states and aspects of Alzheimer's Disease not evident in mouse models. *Cell Rep.* 2018;22(3):832-47.
54. Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, et al. A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's Disease. *Cell.* 2017;169(7):1276-1290. e17.
55. Krasemann S, Madore C, Cialic R, Baufeld C, Calcagno N, El Fatimy R, et al. The TREM2-APOE pathway drives the transcriptional phenotype of dysfunctional microglia in neurodegenerative diseases. *Immunity.* 2017;47(3):566-581.e9.
56. Ulland TK, Song WM, Huang SC-C, Ulrich JD, Sergushichev A, Beatty WL, et al. TREM2 maintains microglial metabolic fitness in Alzheimer's Disease. *Cell.* 2017;170(4):649-663.e13.
57. Condello C, Yuan P, Schain A, Grutzendler J. Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A β 42 hotspots around plaques. *Nat Commun.* 2015;6:6176.
58. Mandrekar S, Jiang Q, Lee CYD, Koenigsnecht-Talboo J, Holtzman DM, Landreth GE. Microglia mediate the clearance of soluble Abeta through fluid phase macropinocytosis. *J Neurosci.* 2009;29(13):4252-62.
59. Hopp SC, Lin Y, Oakley D, Roe AD, DeVos SL, Hanlon D, et al. The role of microglia in processing and spreading of bioactive tau seeds in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 2018;15(269):1-15.

60. Zhu K, Pieber M, Han J, Blomgren K, Zhang XM, Harris RA, et al. Absence of microglia or presence of peripherally-derived macrophages does not affect tau pathology in young or old hTau mice. *Glia*. 2020;68(7):1466-78.
61. Wang Y, Ulland TK, Ulrich JD, Song W, Tzaferis JA, Hole JT, et al. TREM2- mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *J Exp Med*. 2016;213(5):667-75.
62. Leyns CEG, Ulrich JD, Finn MB, Stewart FR, Koscal LJ, Remolina Serrano J, et al. TREM2 deficiency attenuates neuroinflammation and protects against neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(43):11524-9.
63. Srinivasan K, Friedman BA, Etxeberria A, Huntley MA, Brug MP van der, Foreman O, et al. Alzheimer's patient brain myeloid cells exhibit enhanced aging and unique transcriptional activation. *bioRxiv*. 2019;610345.
64. Jiménez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-González I, Torres M, Sánchez-Varo R, et al. Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci*. 2008;28(45):11650-11661.
65. Romero-Molina C, Navarro V, Sánchez-Varo R, et al. Distinct microglial responses in two transgenic murine models of TAU pathology. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:421:1-12.
66. Navarro V, Sánchez-Mejías E, Jiménez S, Muñoz-Castro C, Sánchez-Varo R, Dávila JC, et al. Microglia in Alzheimer's disease: activated, dysfunctional or degenerative. *Front Aging Neurosci*. 2018;10:140:1-8.
67. Sánchez-Mejías E, Navarro V, Jiménez S, Sánchez-Mico M, Sánchez-Varo R, Núñez-Díaz C, et al. Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration. *Acta Neuropathol*. 2016;132(6):897-916.
68. Carmona S, Zahs K, Wu E, Dakin K, Bras J, Guerreiro R. The role of TREM2 in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol*. 2018;17(8):721-30.
69. Streit WJ, Braak H, Xue QS, Bechmann I. Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2009;118(4):475-85.
70. Boza-Serrano A, Ruiz R, Sánchez-Varo R, García-Revilla J, Yang Y, Jiménez-Ferrer, et al. Galectin-3, a novel endogenous TREM2 ligand, detrimentally regulates inflammatory response in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2019;138(2):251-73.
71. von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: a review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol*. 2016;524(18):3865–95.
72. Vasile F, Dossi E, Rouach N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct*. 2017;222(5):2017–29.
73. Liddelow SA, Barres BA. Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential. *Immunity*. 2017;46(6):957–67.
74. Pérez-Nievas BG, Serrano-Pozo A. Deciphering the astrocyte reaction in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2018;10:114.
75. Li K, Li J, Zheng J, Qin S. Reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Aging Dis*. 2019;10(3):664-75.
76. Chun H, Lee CJ. Reactive astrocytes in Alzheimer's Disease: a double-edged sword. *Neurosci Res*. 2018;126:44-52.
77. Serrano-Pozo A, Muzikansky A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Betensky RA, Frosch MP, et al. Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in Alzheimer disease. *J Neuro-pathol Exp Neurol*. 2013;72(6):462-71.
78. Cai Z, Wan CQ, Liu Z. Astrocyte and Alzheimer's Disease. *J Neurol*. 2017;264(10):2068-74.

79. Ahmad MH, Fatima M, Mondal AC. Influence of microglia and astrocyte activation in the neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease: Rational insights for the therapeutic approaches. *J Clin Neurosci*. 2019;59:6-11.
80. Gordon BA, Blazey TM, Su Y, Amrita HR, Aylin D, Flores S, et al. Spatial patterns of neuroimaging biomarker change in individuals from families with autosomal dominant Alzheimer's disease: a longitudinal study. *Lancet Neurol*. 2018;17(3):241-50.
81. Le Douce J, Maugard M, Veran J, Matos M, Jégo P, Vigneron PA, et al. Impairment of glycolysis-derived l-serine production in astrocytes contributes to cognitive deficits in Alzheimer's Disease. *Cell Metab*. 2020;31(3):503-17.
82. Verkhratsky A, Zorec R, Rodríguez JJ, Parpura V. Pathobiology of neurodegeneration: the role for astroglia. *Opera Med Physiol*. 2016;1:13-22.
83. Zulfiqar S, Garg P, Nieweg K. Contribution of astrocytes to metabolic dysfunction in the Alzheimer's disease brain. *Biol Chem*. 2019;400(9):1113-27.
84. Rodríguez-Arellano JJ, Parpura V, Zorec R, Verkhratsky A. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2016;323:170-82.
85. Liu CY, Yang Y, Ju WN, Wang X, Zhang HL. Emerging roles of astrocytes in neuro-vascular unit and the tripartite synapse with emphasis on reactive gliosis in the context of Alzheimer's Disease. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:193.
86. Zhang C, Wang Y, Wang D, Zhang J, Zhang F. NSAID Exposure and risk of Alzheimer's Disease: an updated meta-analysis from cohort studies. *Front Aging Neurosci*. 2018;10:83.
87. McGeer PL, Rogers J, McGeer EG. Inflammation, antiinflammatory agents, and Alzheimer's disease: the last 22 years. *J Alzheimers Dis*. 2016;54:853-57.
88. Wang J, Tan L, Wang HF, Tan CC, Meng XF, Wang C, et al. Anti-inflammatory drugs and risk of Alzheimer's disease: an updated systematic review and meta-analysis. *J Alzheimers Dis*. 2015;44(2):385-96.
89. Jaturapatporn D, Isaac MG, McCleery J, Tabet N. Aspirin, steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;(2):CD006378.
90. Toledano-Díaz A, Álvarez MI, Toledano A. Glial alterations in aging and Alzheimer's Disease: a novel basis to understand, prevent and treat the degenerative process. *OBM Geriatrics*. 2020;4 (2):34. doi:10.21926/obm.geriatr.2002117.
91. Tejera D, Mercan D, Sánchez-Caro JM, Hanan M, Greenberg D, Soreg H, et al. Systemic inflammation impairs microglial A β clearance through NLRP3 inflammasome. *EMBO J*. 2019;38(17):e101064.
92. Ide M, Harris M, Stevens A, Sussams R, Hopkins V, Culliford D, et al. Periodontitis and cognitive decline in Alzheimer's Disease. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151081.
93. Syed YY. Sodium oligomannate: first approval. *Drugs*. 2020;80(4):441-4.
94. Chen W, Abud EA, Yeung ST, Lakatos A, Nassi T, Wang J, et al. Increased tauopathy drives microglia-mediated clearance of beta-amyloid. *Acta Neuropathol Commun*. 2016;4(1):63.
95. Penke B, Szűcs M, Bogár F. Oligomerization and conformational change turn monomeric β -amyloid and Tau proteins toxic: their role in Alzheimer's pathogenesis. *Molecules*. 2020;25(7):1659.
96. Shin WS, Di J, Murray KA, Sun C, Li B, Bitan G, et al. Different amyloid- β self-Assemblies have distinct effects on intracellular Tau aggregation. *Front Mol Neurosci*. 2019;12:268:1-8.

Este trabajo debe ser citado como:

Muñoz-Castro C, Romero-Molina C, Vitorica J. Redirigiendo las estrategias terapéuticas en la Enfermedad de Alzheimer. *Rev Esp Cien Farm*. 2020;1(1):18-33.



Revisión

Actualización de conocimientos en la enfermedad celíaca y otras patologías relacionadas con el gluten

Update of knowledge in celiac disease and other gluten-related pathologies

Moreno ML*, Sousa C

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. Sevilla. España

*Correspondencia: lmoreno@us.es

Recibido: 12.06.20; aceptado: 24.06.20

Resumen: Las patologías relacionadas con el gluten afectan de media al 1-7% de la población global y no sólo producen daño a nivel del aparato digestivo, sino que afectan a otros órganos y sistemas, y están asociadas a procesos inflamatorios. Las proteínas del gluten son las responsables de la cohesividad, viscosidad y elasticidad de la masa del trigo, la cebada, el centeno, la avena, y sus derivados, y tienen propiedades antigénicas que pueden desencadenar reacciones adversas en individuos susceptibles. El objetivo de esta revisión consiste en la actualización de los principales aspectos de epidemiología, fisiopatología, diagnóstico y tratamiento de las patologías más importantes relacionadas con el gluten como son la enfermedad celíaca (EC), la sensibilidad al gluten no celíaca (SGNC) y la alergia al trigo (AT). A pesar de que las formas de presentación clínica y su relación con la ingesta pueden ser similares, sus mecanismos patogénicos, forma de diagnóstico y tratamiento, pero difieren en los síntomas clínica y en la repuesta inmune que generan. Por tanto, es de crucial importancia reconocer y saber interpretar los síntomas, pruebas serológicas e histológicas para el correcto diagnóstico. El seguimiento de una dieta con exclusión del gluten es común en todas, si bien en el caso de pacientes con EC debe ser estricto, en los pacientes con SGNC se recomienda pero la falta de adherencia sólo condicionará recaídas sintomáticas. En la AT el tratamiento se basa en la retirada no solo del gluten, sino del trigo en general.

Abstract: Gluten-related pathologies affect 1-7% of the global population and not only cause damage at the level of the digestive system, but also affect other organs and systems associated with inflammatory processes. Gluten proteins are responsible for the cohesiveness, viscosity and elasticity of the dough of wheat, barley, rye, oats, and their derivatives. They have antigenic properties that can trigger adverse reactions in susceptible patients. The objective of this review is to update the main aspects of epidemiology, pathophysiology, diagnosis and treatment of the most important gluten-related pathologies such as celiac disease (CD), non-celiac gluten sensitivity (SGNC) and the wheat allergy (WA). Despite the clinical presentation is diverse and their relationship with intake may be similar, their pathogenic mechanisms, clinical symptoms, diagnostic form, treatment and the immune response they generate differ. Therefore, it is of crucial importance to recognize and know how to interpret the symptoms, serological and histological tests for the correct diagnosis. The follow-up of a gluten excluding diet is common in all pathologies; however, in CD patients must be strict and in SGNC patients is recommended, but the lack of adherence will only condition symptomatic relapses. In WA, treatment is based on the removal not only of gluten, but of wheat in general.

Palabras clave: Reacción adversa a alimentos, enfermedad celíaca, alergia al trigo, sensibilidad al gluten no celíaca. **Keywords:** Food adverse reaction, celiac disease, wheat allergy, non-celiac gluten sensitivity.

1. Introducción

La mayor carga antigénica a la que se ve sometido el sistema inmunitario en nuestra vida procede de los alimentos ingeridos que se estiman en unas 100 toneladas [1]. La respuesta normal del sistema inmunitario ante los alimentos es tolerarlos, por lo que un elevado porcentaje de la población puede consumir cualquier tipo de alimento que esté en adecuadas condiciones higiénico-sanitarias sin sufrir ningún tipo de efecto adverso para la salud. Sin embargo, en una parte de la población pueden generarse respuestas clínicamente anormales que pueden atribuirse a la ingestión, contacto o inhalación de un alimento, de sus derivados o de algún aditivo que contengan [2, 3]. Es lo que se conoce como reacciones adversas a los alimentos (RAA). Se estima que aproximadamente el 20% de la población general presenta a lo largo de su vida alguna de sus formas clínicas y se estima que su prevalencia en adultos supera el 30% [4].

La Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica clasificó las reacciones adversas según los mecanismos patogénicos y en ella se incluyen las intolerancias y alergias alimentarias. Sin embargo, ambos términos a menudo se confunden por lo que conviene precisar sus diferencias.

Alergia alimentaria

La alergia alimentaria es una reacción exagerada del organismo ante un alimento (alérgeno) mediada por mecanismos inmunológicos tipo IgE ó por células. En las alergias alimentarias o también llamadas reacciones de hipersensibilidad mediadas por IgE hay una primera fase llamada “fase de sensibilización”, en la que no se suele observar ninguna sintomatología clínica. En esta fase los alérgenos o antígenos (determinadas proteínas o glicoproteínas de alimentos) estimulan la producción de IgE (anticuerpos) por los linfocitos B. Las moléculas de IgE se unen a la superficie de mastocitos y basófilos lo que genera una sensibilización de los mismos frente al alérgeno lo que provoca la producción de IgE. En exposiciones posteriores al alérgeno, se da la unión antígeno-anticuerpo y se desencadena una reacción alérgica inmediata (liberación de histamina y sustancias proinflamatorias) [5].

Intolerancia alimentaria

La intolerancia alimentaria se puede definir como una condición en la que se producen efectos adversos, no mediados por IgE, tras ingerir un alimento en concreto o un ingrediente culinario. No interviene la respuesta inmunitaria, siendo ésta la diferencia más importante con las alergias alimentarias [6].

Una diferencia entre la intolerancia y la alergia alimentaria es que en el caso de la primera la reacción es menor y la persona no es consciente de que se ha producido puesto que no se manifiestan los síntomas de una manera rápida. Estos pueden aparecer más lentamente y por eso no se asocian a algo ingerido varias horas antes o a un alimento ingerido de manera habitual. Por dicha razón, la intolerancia alimentaria es conocida, también, como “alergia escondida” [6].

2. Métodos

La búsqueda se realizó en las bases de datos PubMed, MEDLINE y SCOPUS. Las palabras clave utilizadas fueron: “enfermedad celiaca”, “alergia al trigo”, “sensibilidad al gluten no celiaca” y “reacción adversa a los alimentos”. Los criterios de selección o filtros utilizados fueron: review, free full text, 10 years, clinical trial.

3. Resultados y discusión

Aunque las RAA han acompañado al ser humano desde épocas remotas, hoy día son un problema creciente en la población, destacando las relacionadas con el gluten, que afectan al 1-7% de la población global y no sólo producen daño a nivel del aparato digestivo, sino que afectan a otros órganos y sistemas, y están asociadas a procesos inflamatorios [7, 8].

Como se muestra en la Figura 1 entre las patologías más importantes relacionadas con el gluten se encuentran la enfermedad celiaca (EC), la alergia al trigo y la sensibilidad al gluten no celiaca, entre otras, que se clasifican según la respuesta inmune generada [7]. Si bien sus formas de presentación clínica y su relación con la ingesta pueden ser similares, sus mecanismos patogénicos, forma de diagnóstico y tratamiento difieren.

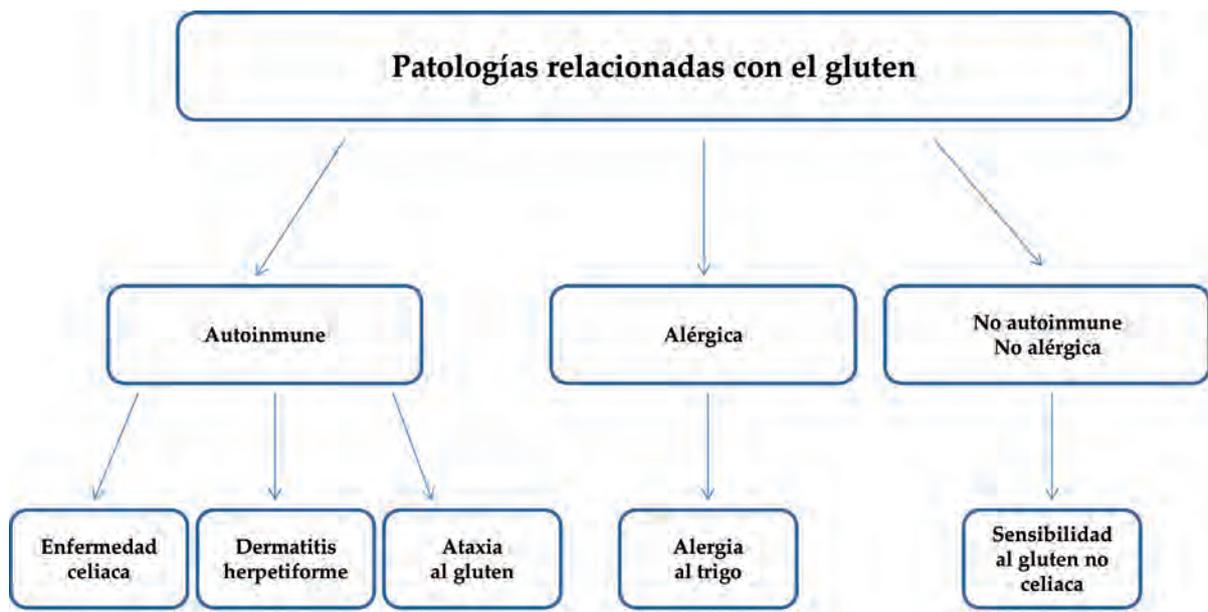


Figura 1. Patologías asociadas al gluten (adaptada de Rosell y col., 2014).

3.1. Enfermedad celiaca

Definición

La EC fue la primera patología en la que se estableció relación causal con las proteínas del gluten. Esta enfermedad se define como una enteropatía inflamatoria crónica del intestino delgado mediada inmunológicamente y causada por la ingesta de gluten en la dieta, en individuos genéticamente predispuestos. Se manifiesta por lesiones en el epitelio y en la lámina propia del intestino delgado, tales como atrofia de las vellosidades, hiperplasia de las criptas e infiltración leucocitaria, tras la ingestión de estas proteínas que se encuentra en cereales como el trigo, la cebada, el centeno, la avena y, sus derivados [7, 9].

Patogenia

El modelo patogénico más ampliamente aceptado para esta enfermedad incluye alteraciones en la digestión y el transporte transepitelial del gluten. La respuesta inmune inapropiada a las proteínas del gluten observadas en pacientes celíacos, incluyen tanto la inmunidad innata como la adaptativa. Por tanto, el gluten tiene un efecto dual en la mucosa del intestino delgado. Las proteínas del gluten poseen un alto contenido en prolina lo que les otorga resistencia ante la acción de proteasas gastrointestinales, por lo que no pueden ser totalmente digeridas y

permanecen como péptidos en el tracto digestivo sin sufrir una proteólisis total, a diferencia de la mayoría de proteínas de la dieta. Estos péptidos con un alto contenido en prolina y glutamina se acumulan en el lumen intestinal y acceden a la lámina propia bien por vía paracelular debido a una permeabilidad aumentada, o bien por vía transcelular mediante endocitosis. En cualquier caso, una vez en la lámina propia, estos péptidos derivados del gluten inducen una respuesta inmune innata que tiene lugar cuando algunos de los péptidos del gluten, como el 19-mer, incrementan de manera muy rápida la expresión de interleucina 15 (IL-15), iniciándose fenómenos de citotoxicidad y debilitamiento de las uniones tight-junctions. La respuesta adaptativa se ve facilitada por el aumento de la permeabilidad intestinal que permite el paso de péptidos inmunogénicos como el 33-mer hasta la lámina propia, donde son desaminados por la enzima transglutaminasa tisular. Esto inicia una cascada de reacciones que degeneran en hiperplasia de las criptas y aplanamiento de las vellosidades [10, 11].

Epidemiología

La EC tiene una distribución global a nivel mundial, existiendo una prevalencia relativamente homogénea en las personas de ancestría caucasoide [11]. La prevalencia mundial de la EC fluctúa alrededor del 0,5-1% de la población [12, 13, 14]. La heterogeneidad de

los datos entre los distintos países y continentes puede ser debido a las diferencias en el consumo de gluten y/o un acceso limitado a herramientas diagnósticas. Otra posible explicación es la variabilidad en el conocimiento y la experiencia de los médicos que realizan el diagnóstico de la EC debido a la existencia de múltiples formas de presentación clínica [11]. Normalmente el diagnóstico se basa en la combinación del historial clínico, el análisis genético para determinar el haplotipo de riesgo HLA DQ2/DQ8 (aunque existen más de 40 genes no HLA asociados con la EC) y el desarrollo de pruebas serológicas para detectar la presencia de anticuerpos específicos de la EC [15]. Sin embargo, la prueba de oro es el análisis histológico de la biopsia del intestino delgado.

Se ha descrito un aumento de frecuencia en los últimos años, llegando a duplicarse su prevalencia en los últimos 20 años. Para explicar este fenómeno se han propuesto factores ambientales, como el aumento de consumo de trigo e infecciones al inicio de la vida, si bien la evidencia aún no es concluyente.

Cuadro clínico

Originalmente la EC era considerada como un trastorno exclusivamente pediátrico caracterizado por la presencia de diarrea crónica junto con malabsorción y esteatorrea. Posteriormente se puso de manifiesto que la EC puede afectar también a los adultos a cualquier edad. En los últimos 20 años se ha descrito tanto en niños como adultos un descenso de las formas de presentación “clásicas” como diarrea y un incremento en las formas de presentación “no clásicas” de la enfermedad. En la actualidad, la EC se caracteriza por ser una patología con manifestaciones tanto digestivas como extradigestivas (orales, cutáneas, neurológicas, articulares, hepáticas, endocrinas, ginecológicas y psiquiátricas, entre otras). También es frecuente que se relacione con otras patologías autoinmunes y que aparezcan complicaciones graves como adenocarcinomas intestinales [16, 17, 18]. Las principales modalidades de presentación de la EC de acuerdo con las definiciones de la reunión de Consenso de Oslo son las siguientes: EC asintomática, EC clásica, EC no clásica, EC subclínica, EC sintomática y EC potencial [9].

En niños la presentación clínica se ve afectada por la edad, siendo los menores de 3 años los que frecuentemente presentan diarrea, distensión abdominal y retraso en el desarrollo mientras que los niños mayores y adolescentes presentan otros síntomas gastrointestinales como dolor abdominal y estreñimiento así como síntomas extraintestinales. En los adultos las principales formas de presentación son la diarrea así como síntomas gastrointestinales no específicos que pueden confundirse con la dispepsia funcional, el síndrome de intestino irritable o la diarrea funcional [19].

Diagnóstico

La primera vez que se establecieron unos criterios estrictos para el diagnóstico de la EC en población pediátrica fue en 1969, durante la reunión anual de la ESPGHAN (European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition). La aplicación de estos criterios de forma generalizada por los gastroenterólogos pediátricos, la aparición de parámetros biológicos y serológicos, anticuerpos anti-gliadina (AAG) y anti-endomisio (AAE), propiciaron que dichos criterios fueran revisados con posterioridad en 1990 y en 2012.

Concretamente, en enero de 2012 se redactaron las “ESPGHAN guidelines for the diagnosis of Coeliac Disease”, en las que aparece una nueva definición de la enfermedad, a la luz de los nuevos conocimientos científicos y aplicando criterios de medicina basada en la evidencia: la EC es una alteración sistémica de carácter autoinmune desencadenada por el consumo de gluten en individuos con predisposición genética (principalmente HLA), caracterizada por una combinación variable de: manifestaciones clínicas gluten-dependientes, anticuerpos específicos de EC, haplotipo HLA DQ2 y/o DQ8 y enteropatía. Por primera vez se considera la enteropatía como un elemento más del diagnóstico, pero no un criterio indispensable [20].

Tratamiento

El único tratamiento existente a día de hoy para la EC consiste en el seguimiento de una dieta estricta sin gluten (DSG) durante toda la vida del paciente [21]. En la mayoría de los celíacos, el cumplimiento estricto de una DSG conduce,

en pocos meses, a la recuperación rápida y completa de la arquitectura normal y la función de la mucosa del intestino delgado, así como a la remisión de los síntomas y la normalización de las pruebas serológicas [22]. Sin embargo, este tipo de dieta no es tarea sencilla debido a la ubicuidad del gluten en los alimentos, a la desinformación educativa, a las variaciones en el etiquetado de los alimentos y a la posible contaminación cruzada de éstos.

Las terapias en desarrollo para la EC se incluyen en 5 grupos: eliminación de la toxicidad del gluten, terapias lumbales, terapias de fortalecimiento de la barrera intestinal, terapias dirigidas a la reacción inflamatoria y terapias experimentales [23].

La eliminación de la toxicidad del gluten consiste en alterar las proteínas de los alimentos antes de su comercialización. Entre ellas se puede citar el uso de herramientas de ingeniería genética dirigida a la mejora vegetal eliminando las gliadinas y las gluteninas del trigo o la digestión de péptidos inmunogénicos mediante peptidasas [23, 24].

Las terapias lumbales van dirigidas a neutralizar el gluten en la luz del intestino delgado. Podemos citar en primer lugar la terapia de digestión enzimática oral que busca inactivar los péptidos de gluten en el tracto gastrointestinal. Las enzimas que han sido más ampliamente estudiadas son las prolil endopeptidasas que no se hallan presentes en humanos. Actualmente están en fase 2 de ensayo clínico 2 al menos enzimas o combinaciones de enzimas conocidas como ALV-003 y STAN1 [25, 26, 27]. En segundo lugar, los probióticos poseen una variedad de efectos inmunomoduladores y fortalecedores de la barrera [28, 29]. Otros estudios sugieren el uso de bacterias procedentes del tracto gastrointestinal humano [30]. Por último, los aglutinantes del gluten como el polímero BL-7010 ha demostrado tener efectos preclínicos beneficiosos *in vitro* e *in vivo* [31].

Las terapias de fortalecimiento de la barrera disminuyen el paso de péptidos de gluten o de otros antígenos dañinos hacia la lámina propia. El acetato de larazotide o AT-001 está siendo desarrollado como modulador ya que promueve la reestructuración de la actina y previene el desmontaje de las uniones estrechas [32, 33].

Las terapias dirigidas a la inmunidad se basan en contrarrestar la reacción inflamatoria. En esta categoría se incluyen los bloqueadores de la transglutaminasa, bloqueadores del HLA, modulación de células T y otros mediadores inflamatorios y por último la vacunación que sería la única estrategia curativa si resultara eficaz.

Las terapias experimentales comprenden compuestos o estrategias biológicas que se encuentran en fase de estudio. Hasta la fecha no han sido aprobadas para uso clínico y se hallan en fase de desarrollo.

3.2. Alergia al trigo

Definición

La alergia al trigo (AT) es una reacción de hipersensibilidad a las proteínas del trigo (no solo al gluten) mediada por un mecanismo inmune, implicando la activación de los mastocitos. Es una respuesta rápida a la ingesta de trigo cada vez que se ingiere. La respuesta inmune puede ser IgE mediada o no-IgE mediada, o una combinación de ambas, en la cual la liberación de mediadores químicos como histamina juega un papel fundamental [34].

Los síntomas comunes de la AT pueden manifestarse al cabo de minutos u horas posteriores a la ingestión de los alimentos que lo contengan. Se caracteriza por la presencia de síntomas cutáneos, digestivos y/o respiratorios. Los síntomas de la piel incluyen reacciones como urticaria, inflamación alrededor de la boca y eczemas. Entre los síntomas digestivos se encuentran las diarreas, vómitos, náuseas, indigestión y dolores estomacales y abdominales [34]. La AT se confunde a menudo con la EC, ya que los síntomas son similares, especialmente en el tracto gastrointestinal.

Patogenia

Como en todas las alergias, la sensibilización antigénica ocurre desde el nacimiento y la fisiopatológica radica en reacciones cruzadas entre alérgenos, basófilos y mastocitos mediadas por IgE. La patogenia se basa en la pérdida de la tolerancia inmunológica ante antígenos de la dieta, es decir, la supresión antígeno-específica de las respuestas inmunes celulares o humorales. También se ha propuesto que la sensibilización

alérgica provoque una falta de maduración de la arquitectura epitelial y con ello un aumento de la permeabilidad de la barrera mucosa intestinal/epidermis. El antígeno, una vez que atraviesa la mucosa es presentado por células dendríticas que provocan una respuesta Th2 caracterizada por la producción de IL-4, IL-5, e IL-13 desde las células TCD4+. Esta respuesta conlleva a la producción de IgE por los linfocitos B, que al unirse a sus receptores en la superficie de los mastocitos de la piel, tracto gastrointestinal, respiratorio y cardiovascular, los prepara para reaccionar ante una re-exposición al alérgeno [35].

Se han identificado unos 40 alérgenos en el trigo, entre ellos la omega-5 gliadina, la gamma gliadina, inhibidores de la tripsina y la amilasa (ATI), la tiorredoxina o la proteína transportadora de lípidos. Las gliadinas omega, especialmente la mega-5 gliadina estable al calor, suelen ser las responsables de la anafilaxia inducida por el ejercicio físico dependiente del trigo (del inglés WDEIA o wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis) en los adultos. También parece ser el principal alérgeno de la anafilaxia inducida por el trigo y mediada por la IgE en los niños. Por el contrario, en los niños que padecen dermatitis atópica, con o sin asma, son más importantes otras fracciones de las gliadinas y las albuminas o globulinas [36, 37].

Epidemiología

La prevalencia de la AT varía según la edad y la región [38]. Durante la primera infancia (0-3 años) se ven afectados normalmente por la AT clásica que vuelve a desaparecer posteriormente durante la infancia. Por el contrario, los adultos más bien padecen una AT permanente o una anafilaxia inducida por el ejercicio físico dependiente del trigo. En la mayoría de los países, la alergia a la leche de vaca y la alergia al huevo representan las dos alergias individuales más comunes, pero al AT ocupa el tercero. En Europa, se ha informado una prevalencia de AT del 1% en diferentes estudios, siendo la población del norte de Europa la que presenta más a menudo AT en comparación con la del sur de Europa. Probablemente, el motivo sea que la dieta que se toma es distinta entre zonas. Sin embargo, otros estudios ponen de manifiesto un incremento en la prevalencia que oscila entre un 2% y 3,6% [34, 39-41].

Diagnóstico

Para realizar un diagnóstico de AT en primer lugar deben identificarse las manifestaciones mediante un cuestionario de sintomatología y molestias. A continuación, se realiza la determinación específica de anticuerpos IgE en sangre (RAST) y por último se realiza las pruebas cutáneas (prick test) o pruebas de provocación con el alérgeno [42]. En lo referente al diagnóstico mediante pruebas IgE específicas, todas las estrategias diagnósticas han mostrado tener una baja predictibilidad y especificidad por el uso de extractos de trigo de pureza insuficiente o con falta de inclusión de todos los alérgenos principales en dichos extractos [34]. Por el contrario, la prueba de activación de basófilos se considera una técnica diagnóstica *in vitro* confiable aunque no se utiliza ampliamente en la práctica clínica diaria. La introducción de la técnica de microarrays aunque incluye un gran panel de alérgenos purificados y representa un gran avance, no se usa en la práctica clínica diaria ya que es una metodología tediosa, lenta y poco rentable [38, 43].

Tratamiento

El tratamiento de la AT consiste en la completa eliminación de los productos que contienen trigo. En los niños que han presentado una reacción anafiláctica, la eliminación es posible que sea de por vida, mientras que en un 75% los que predomina la manifestación gastrointestinal consiguen tolerancia durante la adolescencia [44]. En ocasiones para el tratamiento de la AT se incluyen fármacos como la epinefrina para reacciones alérgicas severas (anafilaxia), anti-histamínicos y corticoides.

3.3. Sensibilidad al gluten no celiaca

Definición

La sensibilidad al gluten no celiaca (SGNC) es un trastorno emergente y crónico, descrita por primera vez en la década de 1980 e incluida a partir del 2010 en las patologías relacionadas con el gluten. En una enfermedad que se caracteriza por la presencia de síntomas intestinales y extraintestinales, que ocurren típicamente al poco tiempo de la ingesta de gluten y desaparecen rápidamente con su retirada en personas en los que se ha descartado la EC y la AT [7, 45, 46].

Patogenia

La fisiopatología de la SGNC aún no se conoce totalmente aunque varios estudios parecen indicar un papel importante de la inmunidad innata intestinal [47, 48, 49]. Se han descrito alteraciones en la permeabilidad intestinal y producción de interleucinas y otras citosinas. Actualmente se piensa que el gluten no es el único componente del trigo responsable de esta patología. Es posible que además los FODMAP (oligosacáridos, disacáridos, monosacáridos y polioles), presentes en el trigo y otros cereales tóxicos para las personas que sufren las patologías relacionadas con el gluten, puedan ser responsables de algunos de los síntomas de las personas que sufren la SGNC aunque no explican los síntomas extra-digestivos. También se especula con la posibilidad de que los inhibidores de la tripsina-amilasa, la lecitina y las exotoxinas sean responsables del desarrollo de los síntomas posteriores a la ingesta del gluten [50].

Epidemiología

Se desconoce la prevalencia general de la SGNC en la población general debido principalmente a la carencia de marcadores diagnósticos y que muchos pacientes se autodiagnostican e inician una dieta sin gluten sin consejo. Los trabajos disponibles indican que es de 5 a 10 veces más frecuente que la EC [45] y se han indicado prevalencias de SGNC estimada de entre un 0,6-6% [51] e incluso en un 13% de la población [52].

Diagnóstico

El diagnóstico se basa en la definición de consenso de Oslo que requiere: 1) una reacción sintomática al gluten/trigo, 2) la resolución de los síntomas después de la exclusión de alimentos que contienen gluten/trigo y 3) la reaparición de los síntomas con la reintroducción de productos con gluten/trigo. El diagnóstico definitivo de SGNC es desafiante ya que todavía está cuestionado el desencadenante exacto de la enfermedad y no hay pruebas o biomarcadores específicos para su diagnóstico y se realiza una vez excluida la EC o la AT [46].

Se han utilizado otras pruebas para apoyar el diagnóstico de la SGNC como las biopsias duodenales que muestran una longitud vellositaria normal, con o sin aumento de

linfocitos intraepiteliales y menos probable aumento de eosinófilos [53, 54]. Los anticuerpos antigliadina se encuentran en aproximadamente el 50% de los pacientes con sospecha de SGNC; sin embargo, estos no son específicos y pueden estar presentes en muchas otras afecciones gastrointestinales [48].

Tratamiento

El tratamiento de la SGNC es idéntico al de la EC una DSG de forma estricta durante toda la vida aunque los mecanismos patogénicos y las alteraciones inmunológicas de ambas enfermedades son diferentes. Sin embargo, la eficacia de una DSG para la SGNC es controvertida dado que se ha postulado recientemente otros componentes del trigo contribuyentes de la aparición de los síntomas. Además de dietas restrictivas, se ha propuesto que podrían ser beneficiosas terapias adicionales como probiótico o enzimas derivadas de bacterias; sin embargo, la evidencia al respecto es escasa [56].

4. Conclusiones

En la actualidad, la elevada prevalencia y efectos nocivos para la salud de las patologías relacionadas con el gluten representan un reto diagnóstico terapéutico importante ya que incluyen enfermedades que pueden tener complicaciones como la EC, hasta situaciones puramente sintomáticas como la SGNC.

Aunque las patologías relacionadas con el gluten tienen un espectro similar de síntomas clínicos que pueden confundirse fácilmente, existen diferencias entre ellas y la correcta interpretación de las pruebas diagnósticas y el adecuado conocimiento de la clínica conducen al abordaje apropiado. La EC pertenece a las enfermedades autoinmunes, la AT es un trastorno alérgico, y la SGNC no representa enfermedades autoinmunológicas ni alérgicas. La SGNC es un diagnóstico de exclusión de la EC y de la AT debido a la ausencia de marcadores diagnósticos específicos.

Todas las enfermedades mencionadas requieren como parte del tratamiento una dieta con exclusión del gluten. Sin embargo, mientras que en los pacientes con EC deben someterse a estricta DSG, los pacientes con SGNC, si

bien se recomienda este tipo de dieta, la falta de adherencia sólo condicionará recaídas sintomáticas. En el caso de los pacientes con AT la exclusión no es del contenido de gluten en los cereales sino del trigo en exclusividad.

Contribuciones de los autores: Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

“Conceptualización, MLM; escritura-preparación del borrador, MLM y CS; escritura: revisión y edición, MLM y CS; adquisición de fondos, CS.

Financiación: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2017-83700-R).

Conflicto de interés: Los autores no declaran ningún conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

1. Gimeno E. Alergias alimentarias. *Offarm*. 2004;23:88-94.
2. Chivato T. ¿Qué es la alergia? ¿Qué estudia la alergología? En: Zubeldia JM, Baeza ML, Júregui I, Senent CJ (editores). Libro de las enfermedades alérgicas 2012 y del Tratado de Alergología 2007. Fundación BBVA y SEAIC. 2012.
3. Kleine-Tebbe J, Waßmann-Otto A, Mönnikes H. Food Allergy and Intolerance: Distinction, Definitions and Delimitation. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2016;59(6):705-22.
4. Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, Roberts G, Muraro A, Sheikh A. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2014;69(8):992-1007.
5. Yu W, Freeland DMH, Nadeau KC. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(12):751-65.
6. Ruiz JG, Palma S, Pelegrina B, López B, Bermejo LM, Gómez-Candela C. A global vision of adverse reactions to foods: food allergy and foodintolerance. *Nutr Hosp*. 2018;35:102-8.
7. Fasano A, Sapone A, Zevallos V, Schuppan D. Nonceliac gluten sensitivity. *Gastroenterology*. 2015;148(6):1195-204.
8. Valenti S, Corica D, Ricciardi L, Romano C. Gluten-related disorders: certainties, questions and doubts. *Ann Med*. 2017;49(7):569-81.
9. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Kelly CP, Leonard JN, Lundin KE, Murray JA, Sanders DS, Walker MM, Zingone F, Ciacci C. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*. 2013; 62: 43-52.
10. Arranz E, Montalvillo E. Aspectos inmunológicos de la enfermedad celíaca. *Salud i Ciencia*. 2014; 20(7):738-46.
11. Escudero-Hernández C, Garrote JA, Arranz E. Patogenia de la enfermedad celíaca. En: Arranz E, Fernández-Bañares F, Rosell CM, Rodrigo L, Peña AS, editores. Avances en el Conocimiento de las Patologías Relacionadas con el gluten y evolución de los alimentos sin gluten. Sociedad Española de Enfermedad Celíaca. *Omnia Science*. 2018. p. 143-70.
12. Catassi C, Gatti S, Lionetti E. World Perspective and Celiac Disease Epidemiology. *Dig Dis*. 2015;33(2):141-6.
13. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PHR, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Rostami K, Sanders DS, Schumann M, Ullrich R, Villalta D, Volta U, Catassi C, Fasano A. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med*. 2012;10:13.
14. Singh P, Arora A, Strand TA, Leffler DA, Catassi C, Green PH, Kelly CP, Ahuja V, Makharia GK. Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2018;16(6):823-836.e2.
15. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Lelegman M, Mäki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer KP; ESPGHAN Working Group

- on Coeliac Disease Diagnosis; ESPGHAN Gastroenterology Committee; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54:136-60.
16. Jericho H, Sansotta N, Guandalini S. Extraintestinal Manifestations of Celiac Disease: Effectiveness of the Gluten-Free Diet. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017;65:75-9.
 17. Jericho H, Guandalini S. Extra-Intestinal Manifestation of Celiac Disease in Children. *Nutrients.* 2018;10(6):755.
 18. Sansotta N, Amirikian K, Guandalini S, Jericho H. Celiac Disease Symptom Resolution: Effectiveness of the Gluten-free Diet. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018;66:48-52.
 19. Mearín ML, Montoro-Huguet M, Polanco I, Ribes-Köninckx C, Sanolara S. Manifestaciones clínicas de la enfermedad celiaca y criterios diagnósticos: diferencias entre niños, adolescentes y adultos. En: Arranz E, Fernández-Bañares F, Rosell CM, Rodrigo L, Peña AS, editores. *Avances en el Conocimiento de las Patologías Relacionadas con el gluten y evolución de los alimentos sin gluten.* Sociedad Española de Enfermedad Celiaca. Omnia Science. 2018; p. 259-304.
 20. Ruíz B, de Toro MT. Diagnóstico y seguimiento de la enfermedad celiaca. En: Sánchez D, Rodríguez-Herrera A, Moreno ML, editores. *Actualizaciones en el diagnóstico y manejo de la Enfermedad Celiaca.* Instituto de Especialidades Digestivas. 2018; p. 26-35.
 21. Ludvigsson JF. Commentary: coeliac disease, mortality and malignancy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012; 35:839-40.
 22. Green PH, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet.* 2003; 362:383-91.
 23. Vaquero L, Rodríguez-Martín L, León F, Jorquera F, Vivas S. New coeliac disease treatments and their complications. *Gastroenterol Hepatol.* 2018;41(3):191-204.
 24. McCarville JL, Caminero A, Verdu, EF. Terapias adyuvantes y opciones sin gluten en la enfermedad celiaca. En: Arranz E, Fernández-Bañares F, Rosell CM, Rodrigo L, Peña AS, editores. *Avances en el Conocimiento de las Patologías Relacionadas con el gluten y evolución de los alimentos sin gluten.* Sociedad Española de Enfermedad Celiaca. Omnia Science. 2018; p. 199-228.
 25. Krishnareddy S, Stier K, Recanati M, Lebwohl B, Green PH. Commercially available glutenases: a potential hazard in coeliac disease. *Therap Adv Gastroenterol.* 2017;10(6):473-81.
 26. Cavaletti L, Taravella A, Carrano L, Careni G, Sigurtà A, Solinas N, Caro S, Stasio LD, Picascia S, Laezza M, Troncone R, Gianfrani C, Mamone G. E40, a novel microbial protease efficiently detoxifying gluten proteins, for the dietary management of gluten intolerance. *Sci Rep.* 2019;9(1):13147.
 27. Moreno ML, Arévalo-Rodríguez M, Durán EM, Martínez Reyes JC, Sousa C. A new microbial gluten-degrading prolyl endopeptidase: Potential application in celiac disease to reduce gluten immunogenic peptides. *PLoS One.* 2019;14(6):e0218346.
 28. Cristofori F, Indrio F, Miniello VL, de Angelis M, Francavilla R. Probiotics in Celiac Disease. *Nutrients.* 2018;10(12):1824.
 29. Serena G, Fasano A. Use of Probiotics to Prevent Celiac Disease and IBD in Pediatrics. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1125:69-81.
 30. Gutiérrez S, Pérez-Andrés J, Martínez-Blanco H, Ferrero MA, Vaquero L, Vivas S, Casqueiro J, Rodríguez-Aparicio LB. The human digestive tract has proteases capable of gluten hydrolysis. *Mol Metab.* 2017;6(7):693-702.
 31. Pinier M, Fuhrmann G, Galipeau HJ, Rivard N, Murray JA, David C, Drasarova H, Tuckova L, Leroux JC, Verdu EF. The copolymer P(HEMA-coSS) binds gluten and reduces immune response in gluten-sensitized mice and human tissues. *Gastroenterology.* 2012;142(2):316-25 e1-12.
 32. Leffler DA, Kelly CP, Green PH, Fedorak RN, DiMarino A, Perrow W, Rasmussen H, Wang C, Bercik P, Bachir NM, Murray JA. Larazotide acetate for persistent symptoms of celiac disease despite a gluten-free diet: a randomized controlled trial. *Gastroenterology.* 2015;148(7):1311-9.e6.

33. Khaleghi S, Ju JM, Lamba A, Murray JA. The potential utility of tight junction regulation in celiac disease: focus on larazotide acetate. *Therap Adv Gastroenterol*. 2016;9(1):37-49.
34. Armentia A, Arranz E, Garrote JA, Santos J. El trigo como alérgeno: asma del panadero, alergia alimentaria y al trigo. En: Arranz E, Fernández-Bañares F, Rosell CM, Rodrigo L, Peña AS, editores. *Avances en el Conocimiento de las Patologías Relacionadas con el gluten y evolución de los alimentos sin gluten*. Sociedad Española de Enfermedad Celíaca. Omnia Science. 2018; p. 415-40.
35. Jiménez AI, Martínez RM, Quiles MJ, Majid JA, González IMJ. Celiac disease and new diseases related to gluten. *Nutr Hosp*. 2016;33:345.
36. Gordins P, McLean-Tooke A, Spickett GP. The Role of Omega-5 Gliadin-Specific IgE Test in Diagnosing Exercise-Induced Wheat Allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;155:93-94.
37. Pasha I, Saeed F, Sultan MT, Batool R, Aziz M, Ahmed W. Wheat Allergy and Intolerance; Recent Updates and Perspectives. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016;56(1):13-24.
38. Mäkelä MJ, Eriksson C, Kotaniemi-Syrjänen A, Palosuo K, Marsh J, Borres M, Kuitunen M, Pelkonen AS. Wheat allergy in children—new tools for diagnostics. *Clin Exp Allergy*. 2014;44:1420-30.
39. Zuidmeer L, Goldhahn K, Rona RJ, Gislason D, Madsen C, Summers C, Sodergren E, Dahlstrom J, Lindner T, Sigurdardottir ST, McBride D, Keil T. The prevalence of plant food allergies: A systematic review. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:1210-8.
40. Fleischer DM, Perry TT, Atkins D, Wood RA, Burks AW, Jones SM, Henning AK, Stablein D, Sampson HA, Sicherer SH. Allergic reactions to foods in preschool-aged children in a prospective observational food allergy study. *Pediatrics*. 2012;130:e25-e32.
41. Longo G, Ber I, Burks AW, Krauss B, Barbi E. IgE-mediated food allergy in children. *Lancet*. 2013;382:1656-64.
42. Jiménez AI, Martínez RM, Quiles MJ, Majid JA, González MJ. Enfermedad celíaca y nuevas patologías relacionadas con el gluten. *Nutr Hosp*. 2016;33:44-8.
43. Elli L, Branchi F, Tomba C, Villalta D, Norsa L, Ferretti F, Roncoroni L, Bardella MT. Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. *World J Gastroenterol*. 2015;21(23):7110-9.
44. Ros I. Patología relacionada con el gluten. Actualización en *Helicobacter pylori*. En: AEPap (ed.). *Curso de Actualización Pediatría 2017*. Madrid: Lúa Ediciones 3.0. 2017. p. 67-77.
45. Molina-Infante J, Santolaria S, Fernández-Bañares F. Sensibilidad al gluten no celiaca. En: Arranz E, Fernández-Bañares F, Rosell CM, Rodrigo L, Peña AS, editores. *Avances en el Conocimiento de las Patologías Relacionadas con el gluten y evolución de los alimentos sin gluten*. Sociedad Española de Enfermedad Celíaca. 2018. p. 395-414.
46. Pinto MI, Verdú EF. Controversias y desafíos en la sensibilidad al gluten/trigo no celiaca. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2019;49(2):166-82.
47. Sapone A, Lammers KM, Casolaro V, Cammarota M, Giuliano MT, de Rosa M, et al. Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Med*. 2011;9:23.
48. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PHR, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Rostami K, Sanders DS, Schumann M, Ullrich R, Villalta D, Volta U, Catassi C, Fasano A. Spectrum of gluten related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med*. 2012;10:13.
49. Volta U, Tovoli F, Cicola R, Parisi C, Fabbri A, Piscaglia M, Fiorini E, Caio G. Serological tests in gluten sensitivity (nonceliac gluten intolerance). *J Clin Gastroenterol*. 2012;46:680-5.
50. Cobos-Quevedo OJ, Hernández-Hernández GA, Remes-Troche JM. Trastornos relacionados con el gluten: panorama actual. *Med Int Méx*. 2017;33(4):487-502.

51. Aziz I, Lewis NR, Hadjivassiliou M, Winfield SN, Rugg N, Kelsall A, Newrick L, Sanders DS. A UK study assessing the population prevalence of self-reported gluten sensitivity and referral characteristics to secondary care. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2014;26(1):33-9.
52. Molina-Infante J, Santolaria S, Sanders DS, Fernández-Bañares F. Systematic review: noncoeliac gluten sensitivity. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;41(9):807-20.
53. Marsh M, Villanacci V, Srivastava A. Histology of gluten related disorders. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2015;8:171-7.
54. Talley NJ, Walker MM. Celiac Disease and Nonceliac Gluten or Wheat Sensitivity: The risks and benefits of diagnosis. *JAMA Intern Med*. 2017;177:615-6.
55. Sapone A, Lammers KM, Mazzarella G, Mikhailenko I, Carteni M, Casolaro V, Fasano A. Differential mucosal IL-17 expression in two gliadin-induced disorders: gluten sensitivity and the autoimmune enteropathy celiac disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;152:75-80.
56. Ido H, Matsubara H, Kuroda M, Takahashi A, Kojima Y, Koikeda S, Sasaki M. Combination of gluten-digesting enzymes improved symptoms of non-celiac gluten sensitivity: a randomized single-blind, placebo-controlled crossover study. *Clin Transl Gastroenterol*. 2018;9:181

Este trabajo debe ser citado como:

Moreno ML, Sousa C. Actualización de conocimientos en la enfermedad celíaca y otras patologías relacionadas con el gluten. *Rev Esp Cien Farm*. 2020;1(1):34-44.



Revisión

Gotas para la presbicia: ¿mito o realidad?

Presbyopia eyedrops: myth or reality

Romero L^{1*}, Ortega N²

¹Titular de Oficina de Farmacia. Castilblanco de los Arroyos. Sevilla. España

²Departamento de Psicología. Universidad Loyola. Sevilla. España

*Correspondencia: mlourdesromero@redfarma.org

Recibido: 12.05.20; aceptado: 18.06.20

Resumen: La presbicia o vista cansada es el resultado del deterioro del proceso de acomodación del ojo ante la visión próxima y esta acomodación es llevada a cabo por el músculo ciliar (MC) y por la contracción del iris. Hasta ahora los métodos conocidos para el tratamiento de la presbicia comprenden el uso de lentes convencionales, lentes de contacto, y en ciertos casos cirugía. Recientemente se ha descrito el uso de gotas que estimulan esta acomodación mediante formulaciones de uno o varios fármacos parasimpaticomiméticos con un antiinflamatorio, consiguiendo una estimulación del MC y una miosis, lo que aumenta la agudeza visual (AV) considerablemente en visión próxima y en muchos casos en visión de lejos (VL). Sin embargo, se necesitan más estudios sobre la efectividad y la seguridad a medio y largo plazo del tratamiento con gotas para la presbicia ya que actualmente no contamos con datos suficientes para evaluar su eficacia a largo plazo.

Abstract: The presbyopia or tired sight results of the movement in the accommodation process of the eye in the near vision which accommodation is carried out by the ciliary muscle (MC) and by the iris contraction. To date, the well-known methods for the presbyopia treatment imply the use of specific lenses, contact lenses, and surgery in certain cases. The use of drops stimulating the accommodation has been described through formulations of one or more parasymphomimetic drugs with an anti-inflammatory activity, achieving a stimulation of the MC and a miosis, which increases visual acuity (VA) results in near vision and in many cases in far vision (VL). However, more studies are needed on the evaluation and safety of the drops. Currently we do not have the necessary data to evaluate its long-term efficacy.

Palabras clave: Presbicia, vista cansada, miosis, Benozzi, EV06, Fovtears, Vejarano. **Keywords:** Presbyopia, eyestrain, miosis, Benozzi, EV06, Fovtears, Vejarano.

1. Introducción

A partir de los 40 es común sufrir un problema conocido como vista cansada. Esto se refleja en nuestra capacidad de enfoque en trabajos de visión próxima como la lectura, manejo del móvil, costura, cocinar... La vista cansada o presbicia es el resultado del deterioro del proceso de acomodación que el ojo ha de realizar en

visión próxima. La acomodación en humanos es llevada a cabo por el músculo ciliar (MC) y por la contracción del iris. Ambos están inervados por el sistema parasimpático. Cuando el cerebro percibe un objeto próximo y lo ve borroso manda señales para que el MC abombe el cristalino (aumentando su potencia) y se contraiga el iris consiguiendo focalizar en la retina. Hasta hoy

en día los métodos conocidos para la corrección de este problema van desde el uso de lentes convencionales, lentes de contacto, y en ciertos casos cirugía. Pero existe un método actualmente poco conocido en Europa, que está basado en el uso de gotas que estimulan esta acomodación y que eluden, por lo tanto, el paso de los años. En 1999, el Dr. Jorge Benozzi comenzó a investigar sobre otra alternativa que no fuera el uso de gafas para tratar la presbicia. Sus resultados fueron muy llamativos, ya que sus gotas no sólo conseguían eliminar el efecto de la vista cansada, sino que también parecían detener su progreso. Sin embargo, su trabajo es poco riguroso ya que apenas hay publicados estudios independientes que lo avalen [1]. Actualmente existen varias formulaciones que prometen los mismos resultados combinando en la mayoría de ellas uno o varios fármacos parasimpaticomiméticos con un antiinflamatorio, consiguiendo una estimulación del músculo ciliar y una miosis, lo que aumenta la agudeza visual (AV) considerablemente en visión próxima y en muchos casos en visión de lejos (VL) [2].

El objetivo de este trabajo es doble, por una parte se realiza una exhaustiva revisión bibliográfica de las publicaciones científicas existentes sobre el método de corrección de la presbicia por medio de la instilación periódica de gotas, y por otra parte se analiza críticamente cuál es la evidencia real existente sobre este método, qué limitaciones tienen los estudios analizados, qué metodología deberían seguir para ser correctos, y cuáles son las próximas líneas de investigación que han de seguirse en este campo en el futuro.

El título seleccionado “Gotas para la presbicia: ¿Mito o realidad?” viene determinado por la escasez de ensayos clínicos que se encuentran al respecto, que permitan avalar científicamente la seguridad, eficacia y conveniencia de este método respecto a los métodos previamente utilizados.

Debido a que no es un método aprobado en Europa, la mayoría de las fuentes provienen de otros países (especialmente Argentina y EEUU) aunque cabe destacar la existencia de un estudio avalado por el Instituto Carlos III de España [3].

Para entender un poco el mecanismo de acción de estas gotas, es necesario repasar los procesos fisiológicos y anatómicos que se dan lugar

en la acomodación. El cristalino es una lente biconvexa y transparente que se encuentra en el interior del ojo suspendido por unas estructuras, entre las que se encuentra el músculo ciliar (MC). La acomodación es el mecanismo por el cual el cristalino, bajo la acción del MC, se abomba aumentando su potencia para poder enfocar en la retina los objetos próximos. La contracción del MC permite variar la forma del cristalino porque es una estructura elástica y flexible. En el acto acomodativo participan la convergencia de los ejes oculares y la variación del tamaño de la pupila. Estas funciones de acomodación, convergencia y miosis forman la triada sincinética llamada “triada proximal”, “triada de acomodación”, “reflejo proximal”, “reflejo de cercanía” o “reacción al punto próximo”. El resultado es la formación de una imagen nítida en retina.

Debido al envejecimiento el MC pierde su capacidad de contracción y el cristalino pierde su elasticidad y flexibilidad, disminuyéndose la capacidad de acomodación. Se trata, por tanto, de un proceso fisiológico relacionado con la edad y no de un proceso patológico.

La presbicia es una condición asociada a la edad y se manifiesta en todas las personas antes o después. Afecta por igual a miopes e hipermetropes, dando la cara antes en éstos últimos. También la presentan las personas que nunca han usado gafas. La pérdida de acomodación se inicia en la juventud y hacia los 40-45 años ha disminuido lo suficiente como para provocar síntomas. La presbicia aumenta con el tiempo y es necesario modificar la prescripción óptica con los años [4].

La corrección de la presbicia hoy en día puede ser óptica o quirúrgica. La corrección óptica es la más común y va desde lentes monofocales, bifocales o progresivas, o lentes de contacto multifocales. La corrección quirúrgica está avanzando mucho. Los métodos más usados hoy en día son los basados en la ablación selectiva de la córnea para generar unas zonas de visión próxima y otras de visión de lejos (PresbyLASIK). Aunque se están potenciando últimamente métodos quirúrgicos más reversibles, que consisten en la inserción de implantes corneales.

Los diferentes tipos de implantes intracorneales tienen distinto fundamento:

- KAMRA (Acufocus): efecto estenopeico.
- In-Vue (Biovision): inducción aberración esfera negativa.
- PresbyLens (Revision Optics): inducción aberración esfera negativa.
- Flexivue (Presbia): inducción aberración esfera positiva.

Nos detendremos brevemente para resaltar el implante KAMRA ya que su mecanismo de acción es muy parecido al de las gotas para la presbicia, objeto de estudio de este trabajo de fin de máster. Se trata de un anillo delgado y opaco perforado con 8400 micro-agujeros para facilitar el transporte de nutrientes, que se implanta mediante un pequeño flap. Básicamente genera un agujero estenopeico que aumenta la profundidad de foco, incrementando y mejorando la visión cercana y manteniendo buena visión lejana. Se implanta en el ojo no dominante con lo que se genera una monovisión parcial. Los resultados visuales son buenos y estables [5].

2. Materiales y métodos

Hay un hecho irrefutable y es que con una pupila miótica la profundidad de foco aumenta y somos capaces de enfocar el objeto en un solo punto de la retina. Es precisamente en este fenómeno en el que se basan muchas de las gotas que se someten a evaluación en este trabajo. Los resultados de los ensayos publicados parecen justificar este mecanismo de acción, pero ¿es esto suficiente para resolver el proceso fisiológico de la vista cansada? ¿Podría este proceso afectar a la visión en otras distancias o con distintos grados de luminosidad? Y, sobre todo, ¿resulta seguro para un uso continuado en humanos?

Es necesario también señalar que un tamaño reducido de pupila también tiene sus efectos adversos ya que, en condiciones nocturnas, la cantidad de luz que entra en el ojo es mucho menor por lo que se pierde sensibilidad al contraste especialmente en la visión de lejos. Algunos tratamientos proponen la terapia en un solo ojo para evitar este aspecto, pero en este caso se sacrifica la estereopsis (visión en tres dimensiones que es posible gracias al procesamiento las distintas imágenes que crea

cada ojo) y por lo tanto la calidad visual también se ve comprometida.

En la Tabla 1 se recogen las formulaciones más conocidas de gotas para la presbicia desarrolladas hasta fecha de hoy, así como sus mecanismos de acción [6].

Tabla 1. Denominación, composición y mecanismo de acción de las “gotas para la presbicia”.

NOMBRE DE LA PREPARACIÓN	COMPOSICIÓN	MECANISMO DE ACCIÓN
GOTAS DEL DR. BENOZZI	Pilocarpina 1%	Miosis
	Diclofenaco 0,1%	Contracción MC
		Reduce inflamación
GOTAS DEL DR. ABDELKADER	Carbacol 3%	Miosis
	Brimonidina 0,2%	
FOV TEARS (DESPUÉS PRESBV)	Pilocarpina 0,247%	Miosis
	Feniletrina 0,78%	Contracción MC
	Polietilenglicol 0,09%	Relajación del MC
	Nefanac 0,023%	Lubricación
	Ferinamina 0,034%	Reduce inflamación y los efectos parasimpaticomiméticos adversos
	Nafazolina 0,003%	
PRESBIDROPS	Fármaco parasimpaticomimético	Miosis
		Reduce inflamación
	AINE	
PRESBYPLUS	2 fármacos parasimpaticomiméticos	Miosis
		Contracción MC
	Fármaco parasimpaticolítico	Reduce los efectos parasimpaticomiméticos adversos
PRESBYEYEDROPS	Parasimpaticomimético (desconocido)	Miosis
		Reduce inflamación

Pasaremos a revisar en profundidad las diferentes formulaciones de los compuestos referenciados en la Tabla 1, haciendo especial énfasis en los principios activos que poseen y en su efecto en diferentes aspectos de la visión.

- El primer hallazgo al respecto lo hizo el Dr. Benozzi a comienzos del siglo XXI, cuando tratando a sus pacientes para otras patologías con una combinación de fármacos (pilocarpina al 1% y diclofenaco al 0,1%) descubrió que la capacidad de visión de cerca se veía enormemente mejorada en individuos ya présbitas. La Pilocarpina consigue contraer el MC y el Iris, pero este efecto a largo plazo produce inflamación. Para contrarrestar dicho efecto adverso, se añade el Diclofenaco, potente antiinflamatorio no esteroideo (AINE), que reduce tanto la inflamación como el

espasmo del MC. La combinación de estos dos principios activos hace que se recupere la visión de cerca sin comprometer la de lejos. La primera evidencia a este respecto fue encontrada en el estudio publicado por Benozzi y colaboradores (2012), donde se estudiaban los efectos en una muestra de 100 pacientes, a lo largo de 5 años [7].

- Abdelkader y su equipo estudiaron los efectos de una formulación que combina carbacol, potente parasimpaticomimético, con brimonidina, usado para el tratamiento del glaucoma. El resultado de la combinación de ambos, es una potente miosis mantenida. Se logró una mejoría estadísticamente significativa en la medida de la agudeza visual cercana en todos los sujetos que recibieron la combinación de carbacol 3% y brimonidina al 0,2% en la misma fórmula, en comparación con aquellos que recibieron formas separadas de sólo carbacol, o brimonidina sola [8].
- El Dr. Vejarano y sus colaboradores diseñaron las conocidas como FOV Tears. Es de las formulaciones más completas como se puede observar en la Tabla 1, y además del efecto miótico conseguido con preparados anteriores, logra alcanzar una pseudoacomodación y un tamaño variable de pupila. Esto mejoraría sensiblemente los efectos adversos mencionados en condiciones de baja luminosidad (pérdida de contraste). La pilocarpina estimula el MC y provoca miosis, la fenilefrina, nefanac y la ferinamina previenen un excesivo efecto miótico, un espasmo del MC, y la hiperemia causada por la pilocarpina. La nafazolina aumenta el efecto relajante de la pupila, y el Polietilenglicol ayuda a la tolerancia de la gota previniendo el escozor que los otros componentes pueden inducir. En un estudio realizado en mayo del 2016 [3] se observó la mejoría en la AV de cerca en 14 pacientes sin que la de lejos se viera comprometida. El diámetro de la pupila se veía moderadamente afectado lo que permitía una pseudoacomodación de manera que su diámetro se reducía con la luz o aumentaba en ausencia de ella.
- El fármaco comercializado con el nombre de PresbiDrops tiene una formulación parecida a las gotas del Dr. Benozzi y, por lo tanto, el mismo mecanismo de acción. En un estudio con 81 pacientes [9] se relacionó la disminución

del diámetro pupilar de 1 mm con el aumento de 0.9 D en la potencia de la VC.

- La combinación PrebyPlus aún a un parasimpaticolítico con dos parasimpaticomiméticos de manera que se suman miosis y acomodación. En un estudio en el que se siguió la evolución de un grupo de pacientes durante un año se observó que la agudeza visual de cerca (AVC) se veía mejorada en el 90% de los casos (en el test e Jager pasaban de J4 a J1) sin registrarse efectos adversos. Si bien no hemos encontrado publicaciones sobre este estudio por lo que no quedan demostrados estos resultados [10].
- Presbyeyedrops es otra formulación basada en la combinación de un parasimpaticomimético y un AINE. En un estudio piloto con 15 pacientes [11], los autores aseguran una mejoría tanto en la AVC (de 0,54 a 0,8) como en la AVL (de 0,8 a 1,0).
- Por su parte, el medicamento PRX-100, contiene tropicamida que es un agente antimuscarínico y midriático, y aceclidina que es un agonista muscarínico menos potente que la pilocarpina y el carbacol. Con la aceclidina conseguimos el efecto miótico y con la tropicamida el midriático con un efecto mínimo en la acomodación. Estas gotas actúan de forma muy rápida (15 minutos después de su instilación), y su efecto dura cinco horas con el único inconveniente de la pérdida de contraste debido a la menor entrada de luz en la pupila contraída [12].
- AGN-190584 (cuya composición está protegida) y AGN-199201 (oximetazolina) combinados. Parece ser que este segundo componente, con efecto midriático, reduce los efectos de hiperemia del primero y/o disminuye su absorción por lo que el efecto se prolonga. En un estudio con 65 pacientes [13], se observó una mejoría de la agudeza visual de cerca de al menos 2 líneas con el ojo no dominante.
- Liquidvision se compone de aceclidina, un potente miótico que también es un gran estimulador de la acomodación; y de tropicamida, un ciclopléjico que reduce la acomodación. La combinación de ambos fármacos hace posible la visión de cerca y la visión de lejos [14].

- Por último y como método más novedoso, encontramos las gotas EV06, cuyo mecanismo de acción es totalmente diferente al resto de fármacos analizados. En este caso el objetivo terapéutico es ablandar el cristalino de manera que recupere parte de su elasticidad y, por lo tanto, vuelva a ser capaz de acomodar. Un estudio de 90 días de tratamiento realizado en una muestra de 75 pacientes [15] reflejaba un aumento de la AVC de 1 a 4 líneas en los pacientes. El estudio también asegura que estos efectos se prolongaban en los 10 meses posteriores al tratamiento (sin necesidad de instilar más gotas) aunque posteriormente decaían.

Como podemos observar, las líneas de investigación siguen actualmente abiertas, y no debemos aceptar este método como uno más en la corrección de la presbicia hasta que no esté científica y metodológicamente establecidas tanto la seguridad en su uso como su eficacia respecto a diversas alternativas terapéuticas y quirúrgicas. Hemos podido constatar que se requieren más ensayos clínicos con estos fármacos, ya que, aunque su mecanismo parece funcionar (corrige la vista cansada sin uso de otros medios), hay que demostrar su seguridad, especialmente en lo que afecta a otras distancias de trabajo (visión media y lejana); y en el uso del tratamiento a largo plazo. Así lo recoge un último estudio del equipo del Dr. Vejarano y colaboradores [16], donde concluye que son necesarios estudios a largo plazo para evaluar su eficacia, para averiguar si existe tolerancia a los fármacos, y si el paciente está satisfecho con este método.

Por otro lado, los laboratorios Novartis se encuentran inmersos en el proceso de comercializar URN844 (desarrollo de EV06), previsto para el año 2021. Los ensayos clínicos se encuentran en Fase I-II [17]. El hecho de que el mecanismo de acción de estas gotas vaya a la causa del problema (pérdida de elasticidad del cristalino), hace muy interesante esta línea de investigación y desarrollo. Muy recientemente se ha publicado un nuevo ensayo con 120 pacientes presbítabas [18], observándose mejoras tanto en la agudeza visual de lejos como en la de cerca.

3. Resultados

Tras indagar en profundidad sobre este método correctivo se plantean varias hipótesis de partida, por una parte, la hipótesis de si el tratamiento es efectivo, como tentativamente parece serlo a raíz de las exiguas publicaciones científicas encontradas. Y por otra, si realmente este tratamiento es seguro a largo plazo. Son necesarios más estudios rigurosos y metodológicamente bien contruidos para dar respuesta a esta pregunta. Actualmente todos los estudios que abordan esta temática se encuentran recogidos en este trabajo. Podríamos sugerir que los resultados son prometedores, pero esta técnica se encuentra aún en estadios muy iniciales.

También sería interesante realizar un estudio económico del tratamiento, y ver si puede convertirse en una alternativa terapéutica accesible a la población en general, o por el contrario sólo podría ser sufragada por pacientes que tengan un estatus socioeconómico alto, y una renta que le permita costear dicho tratamiento. Para ser específicos, el centro médico de la Dra. Benozzi cobra en la actualidad 1500\$ por la primera consulta, lo que hace difícil a priori que este método se pueda implantar en todo tipo de familias.

También sería conveniente realizar un análisis de cómo se podría implementar este método en establecimientos ópticos, sin ver mermadas de forma significativa sus ventas ya que, debido al alto coste de implementación, es posible que esta modalidad terapéutica quede excluida para la mayor parte de la población diana de este fármaco. Además, hay que señalar que la legislación de nuestro país (España), no permite vender en los Centros Ópticos colirios con principios activos con acción medicamentosa. Esto derivaría la veta a las Oficinas de Farmacia siempre bajo prescripción médica. Lo que nos lleva a una segunda cuestión, ¿podría estar sufragado por el Sistema Nacional de Salud?

También hay que recordar que todas las formulaciones sometidas a revisión se basan en estimular la acomodación del cristalino, por lo que los pacientes operados de cataratas no pueden beneficiarse de este tratamiento, porque ya no poseen cristalino. Esto deja a un gran grupo de población sin posibilidad de beneficiarse de las gotas para la presbicia.

4. Discusión

Además del tratamiento para la presbicia, algunas gotas como la EV06 (en la actualidad URN844), creen que pueden desacelerar o incluso revertir el proceso de esclerosis nuclear del cristalino (o catarata nuclear), debido a que esta patología se desarrolla mediante los mismos procesos químicos que se dan en la presbicia. EV06 apunta a la causa subyacente del aumento de la rigidez del cristalino relacionada con la edad, los enlaces de disulfuro que se forman entre las proteínas cristalinas dentro de las fibras de las células del cristalino. Es un profármaco que es capaz de penetrar la córnea. Dentro del ojo, EV06 se descompone en ácido lipoico y colina, dos sustancias de origen natural. En el interior del cristalino, el ácido lipoico se reduce al agente activo, el ácido dihidrolipoico, un potente antioxidante que rompe los enlaces disulfuro. Según el Dr. Lindstrom (al mando de los ensayos con EV06), el reto ahora es conseguir mantener el fármaco suficientemente en el ojo para que actúe eficazmente en el núcleo del cristalino [19]. Esto supondría un gran avance médico, aunque se hacen de nuevo imprescindibles rigurosos estudios para avalar esta hipótesis.

5. Conclusiones

Se necesitan más estudios sobre la efectividad y la seguridad a medio y largo plazo del tratamiento con gotas para la presbicia. Actualmente no contamos con datos suficientes para evaluar su eficacia a largo plazo. Por la documentación revisada, estamos ante una línea de investigación

novedosa, que continuará en desarrollo dado los resultados óptimos en los primeros ensayos; pero es necesario ser prudentes, ya que el método se basa en la instilación de fármacos y estos pueden presentar efectos adversos en el tiempo. También es necesario que estos estudios sean avalados por investigadores externos independientes que puedan corroborar los resultados.

La revisión de las formulaciones existentes es complicada debido a los escasos estudios publicados. Existen numerosos comunicados que podríamos tildar de sensacionalistas debido al novedoso sistema para resolver los síntomas provocados por la presbicia, pero que no responden rigurosamente a un método científico de investigación. También el coste de investigación se ve reflejado en estudios económicos de viabilidad por parte de los laboratorios fabricantes, que calculan que para que estos fármacos sean rentables, el coste anual de tratamiento debe ser de al menos 1000 \$ [17].

Contribuciones de los autores: Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Financiación: Este trabajo no está financiado.

Conflicto de intereses: Los autores no declaran ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos: A la Dra. Nerea Ortega Castro por su exhaustiva y exquisita tutela durante la redacción del trabajo. Al Real Colegio Oficial de Farmacéuticos de Sevilla por su interés en la materia y en especial a Fernando Cansino Calvo, Vocal de Óptica y Acústica. A mi esposo y 4 hijos por su incalculable paciencia dejándome investigar durante los fines de semana.

Referencias bibliográficas

1. Benozzi G, Facal S, Gualtieri A, Leiro J, Orman B, Pérez C. Ocular Surface Evaluation in Patients Treated with Pharmacological Treatment for Presbyopia. *Int J Ophthalmic Pathol.* 2018;7:2-7.
2. Renna A, Alió JL, Vejarano LF. Pharmacological treatments of presbyopia: a review of modern perspectives *Eye Vis (Lond).* 2017;4:3.
3. Renna A, Vejarano LF, De la Cruz E, Alió JL. Pharmacological Treatment of Presbyopia by Novel Binocularly Instilled Eye Drops: A Pilot Study. *Ophthalmol Ther.* 2016;5(1):63-73.
4. Gómez MJ. Presbicia o vista cansada. Sociedad Oftalmológica de la Comunidad de Valencia. Sitio web: <http://www.socv.org/presbicia-o-vista-cansada/>. 2014.
5. Piñero D. Nuevas Técnicas Corneales para la Corrección de la Presbicia. School of Advanced Education, Research and Accreditation (SAERA). 2018.
6. Çalis F, Turgut B. Update on Presbyopia-correcting Drops. *Eur Ophth.* 2017;2:99-102.

7. Benozzi J, Benozzi G, Orman B. Presbyopia: A New Potential Pharmacological Treatment. Medical hypothesis, discovery & innovation ophthalmology journal. 2012;1:3-5.
8. Abdelkader A, Kaufman HE. Clinical outcomes of combined versus separate carbachol and brimonidine drops in correcting presbyopia. Eye and Vision (London, England). 2016;3:31.
9. Guttman C. Simple solution for presbyopia. Modern Medicine Network. Sitio web: <https://www.ophthalmologytimes.com/modern-medicine-feature-articles/simple-solution-presbyopia>. 2015.
10. Donofrio Angelucci, D. (2016). Presbyopia Eye Drop Targets Miosis and Accommodation. Refractive Surgery Outlook. Sitio web: <https://www.isrs.org/resources/february-2016>
11. Matovic K, Patel S, Salamun F. Pharmacological correction of presbyopia. Poster presented at the XXXI congress of the ESCRS. 2013.
12. Steven J. PRX-100: A Pharmacologic Approach to Presbyopia. Millennial Eye. Sitio web: <https://millenniaeye.com/articles/2014-nov-dec/prx-100-a-pharmacologic-approach-to-presbyopia/>. 2014.
13. Allergan. Safety and Efficacy of AGN-199201 and AGN-190584 in Patients with Presbyopia, Clinicaltrials.gov. Sitio web: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02197806>. 2015.
14. Lipner M. A unique drop. Eye World. Sitio web: <https://www.eyeworld.org/article-a-unique-drop>. 2014.
15. Larkin H. Presbyopia eye drops. Anti-crosslinking drug may restore natural accommodation. Eurotimes. Sitio web: <https://www.eurotimes.org/presbyopia-eyedrops-lindstrom/>. 2017.
16. Alió JL, Vargas V, Vejarano F. Near Vision Improvement with the Use on a New Topical Compound for Presbyopia Correction: A Prospective, Consecutive Interventional Non- Comparative Clinical. Ophthalmol Ther. 2018;8:31-39.
17. Chou B. Presbyopia Eye Drops are in Sight. Review Education Group. Sitio web: <https://www.reviewsce.com/ce/presbyopia-eye-drops-are-inde>. 2018.
18. Laboratorios Novartis. A Study of Safety and Efficacy of UNR844 Chloride (UNR844-Cl) Eye Drops in Subjects with Presbyopia. Clinical Trials (U.S. National Library of Medicine). Sitio web: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03809611>. 2019.
19. Hilman L. New compound shows promise in reversing, preventing cataracts in eye drop form. EyeWorld. Sitio web: <https://www.eyeworld.org/article-new-compound-shows-promise-in-reversing---preventing-cataracts-in-eye-drop-form>. 2016.

Este trabajo debe ser citado como:

Romero L, Ortega N. Gotas para la presbicia: ¿mito o realidad? Rev Esp Cien Farm. 2020;1(1):45-51.



Revisión

Un nuevo método de impresión 3D de medicamentos

A novel 3D printing method of medicines

Real JP, Palma SD*

Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA), CONICET y Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria. Córdoba. Argentina

*Correspondencia: sdpalma@unc.edu.ar

Recibido: 12.07.20; aceptado: 18.07.20

Resumen: Objetivo: Describir MESO-PP (Melting solidification printing process) como un nuevo proceso para obtener formas farmacéuticas sólidas (FFS) orales impresas, evitando el uso de solventes y altas temperaturas, especialmente diseñado para su uso en los puntos de atención al paciente. Métodos: Ricobendazol (RBZ), un fármaco cuya disolución en el ambiente ácido del estómago es un paso crucial para su absorción, fue escogido como fármaco modelo. Se diseñaron dispositivos flotantes, de diferentes formas y tamaños, y se formularon 3 diferentes tintas, todas cargadas al 25% con RBZ y utilizando excipientes reconocidos como seguros. Gelucire 43/01 y 50/13 fueron utilizados para las tintas liberación modificada y polietilenglicol y propilenglicol para la tinta de liberación inmediata. Para cada una de las tintas formuladas se realizó una caracterización por calorimetría de barrido diferencial (DSC), difracción de rayos X (DRX), espectroscopía infrarroja (IR), microscopía electrónica de barrido (SEM) con detector de rayos X (EDS). Los dispositivos gastro-flotantes impresos en 3D fueron estudiados en términos de propiedades mecánicas (friabilidad-dureza), uniformidad de peso-contenido, capacidad de flotación y comportamiento de liberación. Resultados: Todas las formas flotantes diseñadas pudieron ser impresas con las tintas formuladas a una temperatura inferior a 50 °C. La técnica mostró una precisión de un 98% en la obtención de formas impresas de diferente tamaño. Los espectros IR, los perfiles de DRX y la microscopía SEM con EDS permitieron observar que el fármaco se mantiene suspendido en las tintas y que se distribuye en forma homogénea. Los estudios de disolución permitieron observar la capacidad de flotación y caracterizar la velocidad de liberación del activo en función de la tinta utilizada. Conclusión: Este método es capaz de obtener FFS orales de diferente tamaño, geometría y velocidad de liberación, siendo una excelente alternativa para individualizar el tratamiento farmacológico.

Abstract: Objective: To describe MESO-PP (Melting solidification printing process) a process capable of obtaining printed oral solid dosage forms (OSDF) avoiding the use of solvents and high temperatures. This method is specially designed for use at patient care points. Methods: Ricobendazole (RBZ), a drug whose dissolution in the acidic environment of the stomach is a crucial step in its absorption, was chosen as the model drug. Floating devices of different shapes and sizes were designed and 3 different inks were formulated, all 25% loaded with RBZ and using recognized safe excipients. Gelucire 43/01 and 50/13 were used for the modified release inks and Polyethylene glycol and propylene glycol for the immediate release ink. For each of the formulated inks, a characterization was performed by differential scanning calorimetry (DSC), X-ray diffractometry (DRX), Infrared Spectroscopy (IR), Scanning electron microscopy (SEM) with X-ray detector (EDS). 3D-printed gastro-floating devices were studied in terms of mechanical properties (friability-hardness), weight-content uniformity, buoyancy, and release behavior. Results: All the designed floating forms could be printed with the inks formulated at

a temperature below 50 ° C. The technique showed an accuracy of 98% in obtaining printed forms of different sizes. IR spectra, XRD profiles and SEM Microscopy with EDS revealed that the drug remains suspended in the inks and that it is distributed homogeneously. The dissolution studies allowed us to observe the buoyancy capacity and characterize the release rate of the active as a function of the ink used. Conclusion: This method is capable of obtaining OSDF of different size, geometry and release rate, being an excellent alternative to customize pharmacological treatment.

Palabras clave: Impresión 3D, Gastroflotantes, Liberación modificada, tratamiento personalizado, formulación farmacéutica. **Keywords:** 3D printing, gastro-floating, sustained release, Precision Medicine, Drug Compounding.

1. Introducción

La manufactura aditiva, más comúnmente conocida como impresión 3D (I3D) se ha convertido en una herramienta prometedora en numerosos campos de la producción. La I3D permite crear objetos sólidos a partir de modelos digitales prediseñados, añadiendo el material capa por capa hasta lograr la forma alojada en un archivo digital. Con solo modificar el archivo, es posible crear estructuras geométricas diferenciadas en tamaño y forma, usando exactamente la misma impresora [1].

La introducción de la I3D como proceso farmacéutico tiene el potencial de generar un cambio de paradigma, sobre todo en el campo de las formas farmacéuticas sólidas (FFS). La fabricación convencional es eficiente para la producción a gran escala, logrando grandes lotes de una misma FFS (igual geometría, tamaño y dosis) en un corto proceso de tiempo. Sin embargo, estos métodos resultan inflexibles a modificaciones en la dosis u otras personalizaciones terapéuticas sin cambios dramáticos en la configuración del equipamiento [2, 3].

La I3D, simplifica el proceso de elaboración tradicional permitiendo variar los tamaños y las geometrías de las formas farmacéuticas pudiéndose incluso combinar materiales de diferente naturaleza. Las impresoras 3D son a su vez equipos portátiles, económicos y simples de operar, ya que funcionan mediante un proceso con elevada automatización y precisión. Estas características permitirían que las mismas puedan ser instaladas en los puntos de atención al paciente (farmacias u hospitales), descentralizando el proceso de producción. Si bien no pueden igualar la velocidad (producen 60 veces más lento) ni los costos de los métodos

de producción a gran escala, la flexibilidad de las impresoras 3D permitiría la fabricación a demanda, es decir, individualizar los medicamentos según las necesidades de cada paciente [4]. Además, las capacidades de las impresoras 3D (flexibles, automáticas, precisas) permitiría obtener medicamentos que no son alcanzables con los métodos que se utilizan actualmente para la elaboración personalizada en farmacias: liberación modificada, FFS multicomponente (*polypill*) y sistema gastro-retentivos [5 - 7].

Cabe destacar que se han desarrollado y patentado diversos métodos o procesos de impresión 3D para la producción de medicamentos. Si bien el fundamento de la impresión 3D es el mismo, cada uno de estos métodos utiliza una impresora 3D completamente diferente y presenta diferentes desventajas que conspiran con el uso en sistemas farmacéuticos.

- Deposición de gota sobre polvo (DoP). En esta técnica un líquido aglutinante se deposita sobre una fina capa de polvo [8]. La posible contaminación cruzada, el tamaño de las impresoras utilizadas y los procedimientos previos (control de flujo, selección/preparación del aglutinante) y posteriores (secado) a la impresión, conspirarían con el uso en lugares como una farmacia oficina u hospitalaria.
- Estereolitografía (SLA) [9]. Esta técnica utiliza polímeros fotopolimerizables, los cuales no son considerados materiales GRAS. Se requiere procesos de lavado que aseguren la eliminación completa de la película fotocurable e investigaciones adicionales respecto a su seguridad.
- Sinterización láser selectiva (SLS) [10]. Esta técnica utiliza materiales (en polvo) que

requieren altas temperaturas y láseres de alta energía para ser sinterizados. Muchos principios activos pueden ser degradados o sufrir cambios polimórficos durante el proceso. Esta técnica presenta también la desventaja de requerir un procesamiento posterior a la impresión para dar un acabado a las piezas y retirar el polvo restante.

- Modelado por deposición fundida (FDM) [11]. Este método se basa en la fusión de un filamento polimérico termoplástico que contiene el fármaco producido previamente a través de extrusión de fusión en caliente. Teniendo en cuenta que esta técnica requiere altas temperaturas durante la producción y la extrusión del filamento, la misma no es adecuada para medicamentos termosensibles. La producción previa del sistema cargado con el fármaco es una limitante para la rápida incorporación de la tecnología en la producción a baja escala.

- La impresión por microjeringa asistida por presión (PAM) utiliza una formulación semisólida, que debe tener la propiedad de formar un objeto 3D. Para alcanzar la viscosidad adecuada en la formulación se utilizan solventes que requieren un prolongado proceso de secado inmediatamente posterior a la impresión (24 a 48 h) prolongando considerablemente el tiempo total del proceso [12, 13]. A su vez, la elección de los solventes adquiere complejidad porque el agua requiere mayor tiempo de secado e induce problemas de estabilidad (química y microbiana) mientras que el uso de solventes orgánicos, si bien facilita el secado, requerirá una determinación de residuos de acuerdo con los compendios farmacéuticos [14].

Teniendo en cuenta estas desventajas que limitan el uso de los procesos precedentes en sistemas farmacéuticos, en nuestro laboratorio se ha desarrollado un nuevo método de impresión, al cual hemos denominado y registrado como MESO-PP [15] por sus siglas en inglés (*Melting solidification printing process*).

2. Materiales y Métodos

2.1. Descripción detallada del proceso patentado

MESO-PP es un método simple, flexible, económico, adaptable a pequeños lotes de fabricación de medicamentos, que permite ser

adaptados a grupos especiales de pacientes o geometrías especiales.

El procedimiento utiliza materiales que presenten una temperatura de fusión en un rango entre 40 y 60 °C. Estas tintas se mezclan en estado sólido con el o los principios activos (fármacos) para dar lugar a un producto sólido premezclado (PSM) el cual puede utilizarse en el momento o bien ser almacenado en forma estable.

Al momento de la impresión, la mezcla sólida en su conjunto es calentada, a una temperatura superior al punto de fusión de la tinta, con una agitación continua. Como resultado del calentamiento, la tinta se funde y el principio activo se incorpora en forma suspendida o disuelta.

Posteriormente, la tinta con el fármaco cargado es extruida y depositada en forma controlada en una superficie de impresión (que puede estar refrigerada) siguiendo el patrón diseñado en el ordenador para dar una imagen tridimensional a partir del agregado de material capa a capa.

2.2. Pruebas de concepto

En materia de excipientes, se han utilizado materiales considerados por las autoridades sanitarias como GRAS (reconocidos como generalmente seguros) [16], clasificados en dos categorías:

- Excipiente para liberación modificada de fármacos: en esta categoría han sido utilizados los Gelucires, familia de vehículos grasos los cuales son denominados según su punto de fusión y balance hidrófilo-lipofílico (LHB acrónimo en inglés). Para las pruebas de concepto se han utilizado dos Gelucires: 43/01 y 50/13.

- Excipientes para liberación inmediata: en esta categoría se ha utilizado la familia de los Polietilenglicoles. Para las pruebas de concepto se ha utilizado PEG 1500. Con el fin de mejorar la reología del PEG fundido se agregaron ciertos porcentajes de propilenglicol (menores al 2.5%).

Las diferentes tintas fueron cargadas al 25% con ricobendazol (RBZ). Este fármaco, utilizado como modelo, presenta una biodisponibilidad errática como consecuencia de una baja solubilidad acuosa dependiente del pH [17]. Su disolución en el ambiente ácido del estómago es un paso crucial antes de su absorción en la

primera parte del duodeno [18]. Por esta razón, se decidió utilizar como prueba de concepto diferentes formas flotantes, algo que, si bien solo es válido en tintas de liberación controlada, también nos posibilitaba evaluar la capacidad del método en relación a la producción de una red tridimensional interna específica. Todos los diseños obtenidos en forma STL (formato de archivo informático de diseño asistido por computadora) fueron traducidos a archivos g-code (lenguaje de impresión estándar utilizado por las impresoras 3D) con una densidad de relleno del 40%. Los filamentos de las capas pares se dispusieron en un ángulo de 45 ° con respecto a los filamentos de las capas irregulares, lo que dio como resultado una estructura porosa que permite la flotabilidad del impreso.

Para cada una de las tintas formuladas se realizó una caracterización por calorimetría de barrido diferencial (DSC), difracción de rayos X (DRX), espectroscopía infrarroja (IR), microscopía electrónica de barrido (SEM) con detector de rayos X (EDS).

Los dispositivos gastro-flotantes impresos en 3D fueron estudiados en términos de propiedades

mecánicas (friabilidad-dureza), uniformidad de peso-contenido, capacidad de flotación y comportamiento de liberación.

3. Resultados y discusión

El proceso de impresión MESO-PP (Figura 1) presenta múltiples ventajas respecto a los otros métodos de impresión 3D entre ellos los descritos anteriormente. A saber:

- No utiliza agua ni otro solvente con la consiguiente mejora en términos de estabilidad de los fármacos y costos relacionados al proceso de secado.
- Permite obtener medicamentos sólidos sin necesidad del uso de altas temperaturas con la consiguiente mejora en la estabilidad (permite utilizar la técnica en fármacos termosensibles) y en costos por la disminución de la aplicación de calor.
- Utiliza materiales seguros, extensamente empleados en tecnología farmacéutica (por ejemplo, polímeros y lípidos) con la ventaja regulatoria que esto trae aparejado.

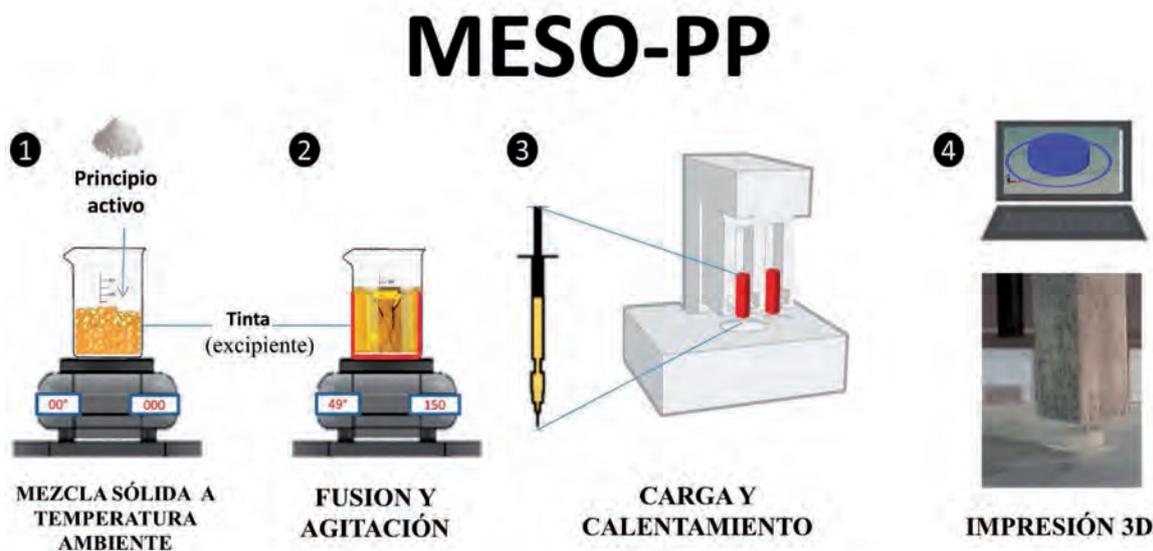


Figura 1. MESO-PP: *Melting Solidification Printing Process*. 1) El ingrediente farmacéutico activo (API) y los excipientes que componen la tinta se mezclan a temperatura ambiente en estado sólido. 2) La mezcla sólida se calienta a una temperatura superior al punto de fusión del excipiente de tinta principal mientras se agita continuamente. 3) La mezcla resultante se carga en la jeringa para uso inmediato o para solidificar hasta su uso. La jeringa se coloca dentro de un tubo de aleación calentado eléctricamente para que la mezcla se estabilice a una temperatura de impresión óptima. 4) La torre vertical de la impresora se mueve de derecha a izquierda y un pistón presiona el émbolo de la jeringa para que la mezcla se deposite gradualmente en un estado semisólido para finalmente solidificarse a temperatura ambiente. La impresión se realizará capa por capa hasta que se complete la imagen tridimensional previamente diseñada.

- No precisa operaciones o procesos previos (como la fabricación de filamentos o tintas) con la consiguiente ventaja de versatilidad y potencial uso en fabricación de medicamentos a escala reducida (farmacias u hospitales).
- Es un método versátil que permite la incorporación del o los activos en el momento previo a la impresión, pudiendo efectuarse en una sola etapa.
- Las impresoras utilizadas para este método son

equipos portátiles, económicos y relativamente simples de operar, lo que las hace elegibles para su implementación en farmacias y puntos de atención al paciente (Figura 1).

En las pruebas de concepto de esta técnica, 3 tintas diferentes pudieron ser formuladas e impresas en una temperatura inferiores a 50 °C utilizando el método MESO-PP, pudiéndose incluso realizar un escalado del tamaño del comprimido impreso con una precisión del 98% (Figura 2).

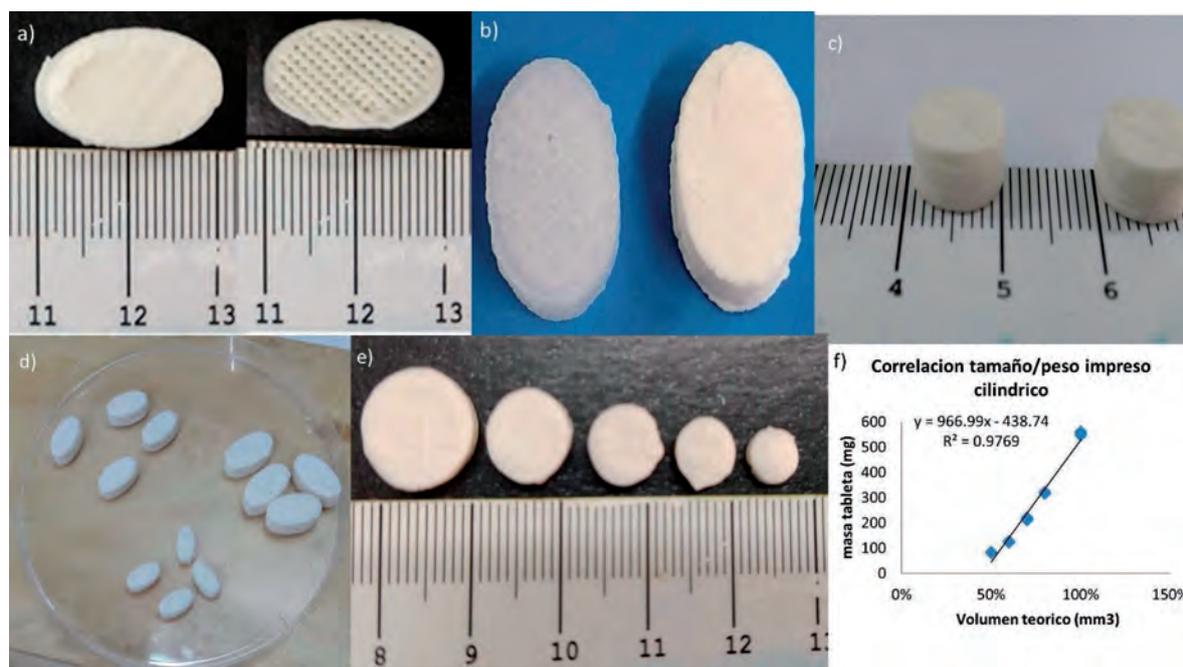


Figura 2. Serie de fotografías de una serie de impresos logrados por el método MESO-PP. a) impresos oblongos enteros y con un corte transversal obtenidas con Gelucire 43/01. b) Impresos oblongos obtenidos con Tinta rápida (PEG y propilenglicol). La estructura interna de los impresos puede verse en la transparencia que brinda el PEG cuando se imprime sin fármaco (izquierda). c), d) y e) impresos obtenidos en diferentes formas y tamaños. f) Correlación entre el peso y el volumen teórico de los impresos cilíndricos obtenidos con Gelucire.

Los espectros IR y los perfiles de DRX de las tintas fueron completamente superponibles con los correspondientes a las materias primas y los escaneos por DSC de las tintas cargadas con fármaco siguieron el mismo comportamiento que el excipiente solo. Estos resultados indican que el fármaco (RBZ) no interacciona con la matriz, sino que se mantiene suspendido en la misma.

La microscopía electrónica de barrido (SEM) permitió observar claramente el ordenamiento de los filamentos que construyen la estructura 3D, mientras que el análisis complementario con sonda EDS reveló la distribución homogénea del fármaco a lo largo de los comprimidos impresos (Figura 3).

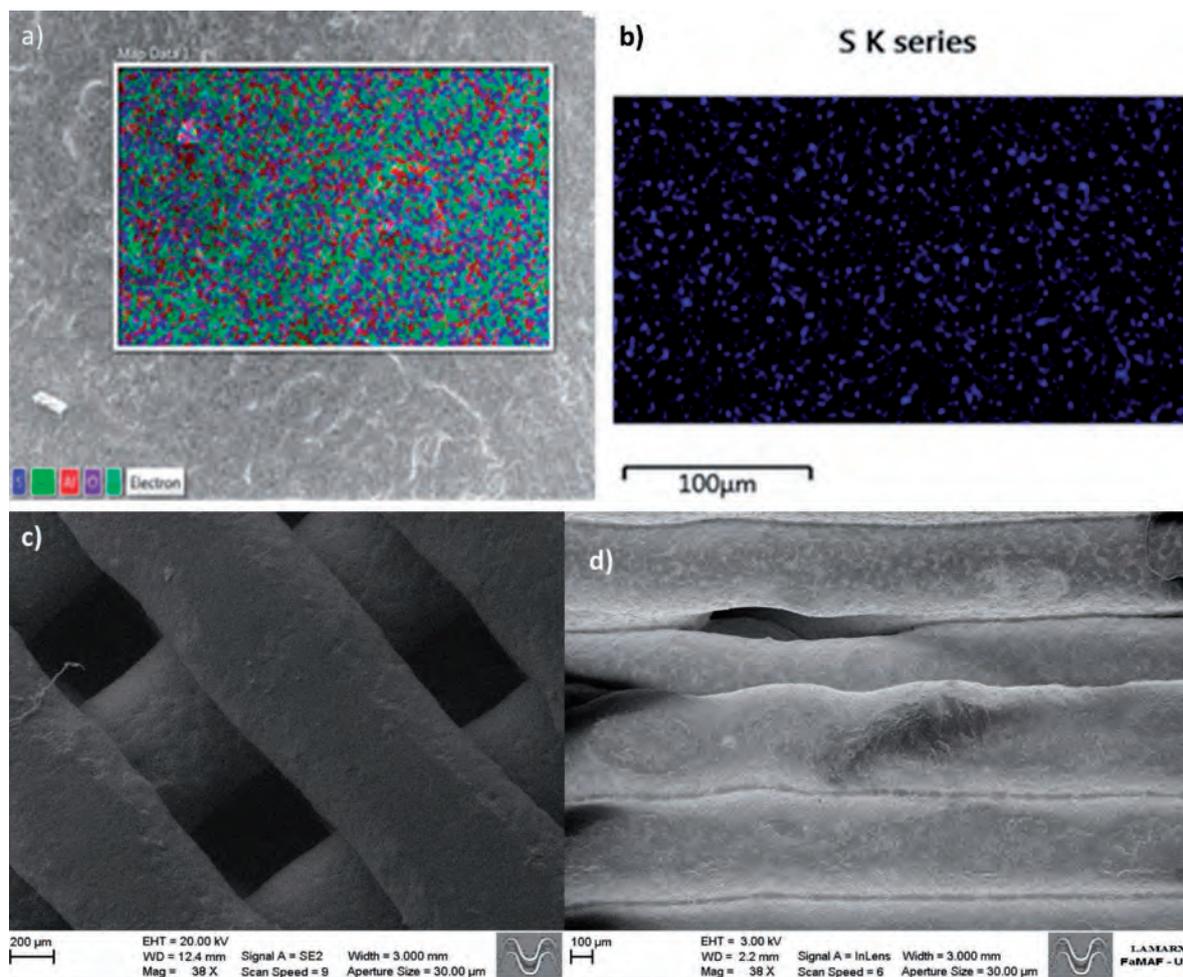


Figura 3. a) Mapeo de rayos X de EDS que muestra la distribución electrónica de carbono, oxígeno y azufre en la superficie de un comprimido impreso con PEG. Los colores verde, violeta y azul representan carbono y azufre, respectivamente. b) Mapeo de rayos X de EDS que muestra la distribución electrónica solo del azufre (elemento presente únicamente en el fármaco). c y d) Imágenes SEM de un corte transversal (c) y vista lateral (d) de un comprimido impreso con Gelucire.

Cuando se analizaron los escaneos DSC de diferentes muestras, fue posible observar que no hubo cambios significativos tanto en los termogramas generales como en los picos endotérmicos. Las tintas siguieron el mismo comportamiento que el excipiente principal sin transiciones vítreas o cambios debido a la presencia de RBZ.

Las formas farmacéuticas impresas cumplieron

las especificaciones de compendios relativas a friabilidad, dureza, uniformidad de peso y contenido [19].

Los estudios de disolución realizados permitieron observar la capacidad de flotación in vitro de los impresos (tiempo de flotación de 6 h para Gelucire 50/13 y mayor a 24 h para Gelucire 43/01) y caracterizar la velocidad de liberación del activo en función de la tinta utilizada (Figura 4).

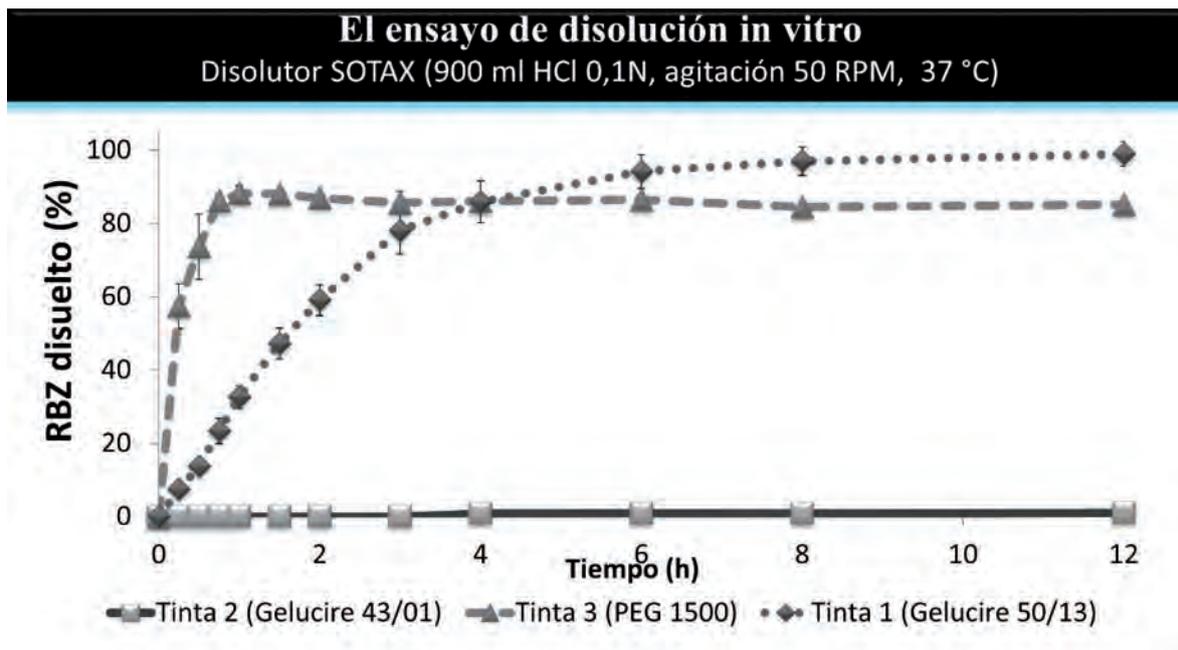


Figura 4. Test de disolución de diferentes tintas de ricobendazol al 25% en un medio de HCl 0,1N, Paleta, 50 rpm, 37°C, 900 mL.

En los impresos obtenidos con tintas de Gelucire 50/13, el modelo de Korsmeyer-Peppas [20] mostró que la erosión o disolución de la matriz fue el mecanismo predominante de liberación del fármaco, pudiendo a su vez esta matriz que a aumentar la solubilidad aparente del RBZ en el medio. La liberación del fármaco desde la tinta de Gelucire 43/01 fue prácticamente nula ($1.5 \pm 0.5\%$ a las 24 h).

4. Conclusiones

MESO-PP es un método de impresión 3D a

baja temperatura, sin solventes y de un solo paso. Este método, capaz de utilizar tintas de diferentes velocidades de liberación y con capacidad de obtener diferentes geometrías, puede considerarse una excelente alternativa para individualizar el tratamiento farmacológico a partir de formas farmacéuticas sólidas orales.

Agradecimientos

Se agradece el soporte técnico de la empresa Life SI, Argentina, que permitió la adaptación de la tecnología descrita en este artículo.

Referencias bibliográficas

1. Marson N, Diaz-Nocera A, Real JP, Palma SD. Las impresoras 3D y el diseño de medicamentos. Bitácora Digital, revista electrónica de la Facultad de Ciencias Químicas -UNC. 2016;3(7).
2. Goole J, Amighi K. 3D printing in pharmaceuticals: a new tool for designing customized drug delivery systems. Int J Pharm. 2016;499(1-2):376-94.
3. Real JP, Barberis E, Camacho N, Palma SD. Modified-release 3D printed tablets: challenges and opportunities based on geometry and materials. 3D Printing in Medicine. 2018;2(3):93-5.
4. Norman J, Madurawe RD, Moore CMV, Khan MA, Khairuzzaman A. A new chapter in pharmaceutical manufacturing: 3D-printed drug products. Adv Drug Deliv. 2017;108:39-50.
5. Korte C, Quodbach J. 3D-printed network structures as controlled-release drug delivery systems: dose adjustment, API release analysis and prediction. AAPS PharmSciTech. 2018;19(8):3333-42.
6. Pereira BC, Isreb A, Forbes RT, Dores F, Habashy R, Petit JB, Alhnan MA, Oga EF. Temporary plasticiser: a

- novel solution to fabricate 3D printed patient-centred cardiovascular 'Polypill' architectures. *Eur J Pharm Biopharm.* 2019;135:94-103.
7. Fu J, Yin H, Yu X, Xie C, Jiang H, Jin Y, Sheng F. Combination of 3D printing technologies and compressed tablets for preparation of riboflavin floating tablet-in-device (TiD) systems. *Int J Pharm.* 2018;549:370-9.
 8. Infanger S, Haemmerli A, Iliev S, Baier A, Stoyanov E, Quodbach J. Powder bed 3D-printing of highly loaded drug delivery devices with hydroxypropyl cellulose as solid binder. *Int J Pharm.* 2019;555:198-206.
 9. Healy AV, Fuenmayor E, Doran P, Geever LM, Higginbotham CL, Lyons JG. Additive manufacturing of personalized pharmaceutical dosage forms via stereolithography. *Pharmaceutics.* 2019;11(12):645.
 10. Fina F, Goyanes A, Gaisford S, Basit AW. Selective laser sintering (SLS) 3D printing of medicines. *Int J Pharm.* 2017;529(1-2):285-93.
 11. Goyanes A, Buanz AB, Basit AW, Gaisford S. Fused-filament 3D printing (3DP) for fabrication of tablets. *Int J Pharm.* 2014;476(1-2):88-92.
 12. Khaled SA, Burley JC, Alexander MR, Yang J, Roberts CJ. 3D printing of tablets containing multiple drugs with defined release profiles. *Int J Pharm.* 2015;494(2):643-50.
 13. Khaled SA, Burley JC, Alexander MR, Roberts CJ. Desktop 3D printing of controlled release pharmaceutical bilayer tablets. *Int J Pharm.* 2014;461(1-2):105-11.
 14. E.P. Commission, Residual Solvents, European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare (EDQM), Strasbourg, France, 2016.
 15. Real JP, Barberis ME, Palma SD, 2020. Proceso de impresión 3D de medicamentos a baja temperatura, presión y sin uso de solventes-(MESO-PP). Solicitud INPI - ACTA 20200101256 - 04/05/2020.
 16. Food and Drug Administration (FDA). Generally Recognized as Safe (GRAS). <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras> (consultado 11.04.20).
 17. Wu Z, Razzak M, Tucker IG, Medlicott NJ. Physicochemical characterization of ricobendazole: I. Solubility, lipophilicity, and ionization characteristics. *J Pharm Sci.* 2005;94:983-93.
 18. Paredes AJ, Camacho NM, Schofs L, Dib A, Zarazaga MP, Litterio N, Allemandi DA, Sánchez-Bruni S, Lanusse C, Palma SD. Ricobendazole nanocrystals obtained by media milling and spray drying: pharmacokinetic comparison with the micronized form of the drug. *Int J Pharm.* 2020;585:119501.
 19. United States Pharmacopeial Convention. The Official Compendia of Standards. USP-30 NF-25. U.S. Pharmacopeia & National Formulary. The Standard of Quality. United States. 2007.
 20. Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA. Mechanisms of potassium chloride release from compressed, hydrophilic, polymeric matrices: effect of entrapped air. *J Pharm Sci.* 1983;72(10):1189-91.

Este trabajo debe ser citado como:

Real JP, Palma SD. Un nuevo método de impresión 3D de medicamentos. *Rev Esp Cien Farm.* 2020;1(1):52-59.



Revisión

Pandemia COVID-19: Análisis Clínicos, Laboratorios Clínicos, Medicina de Laboratorio

Pandemic COVID-19: Clinical Analysis, Clinical Laboratories, Laboratory Medicine

Gómez Canga-Argüelles C

Academia de Farmacia de Castilla y León. Valladolid. España.

Correspondencia: carlosgomez@redfarma.org

Recibido: 13.06.20; aceptado: 24.06.20

Resumen: El laboratorio clínico está siendo una pieza fundamental en la actual pandemia COVID 19, interviniendo tanto en el diagnóstico de la infección, detectando el virus SARS-CoV-2 por técnicas moleculares y serológicas (RT PCR, anticuerpos IgM, IgG), como en la realización de las pruebas necesarias para el correcto seguimiento, pronóstico, y colaboración en las decisiones terapéuticas. Asimismo, se han elaborado protocolos de actuación para futuras epidemias o pandemias. Se ha incluido una breve introducción histórica de la especialidad de Análisis Clínicos que dé visibilidad a su carácter multidisciplinar.

Abstract: In the actual pandemic COVID19 the clinical laboratory is acting as a cornerstone, taking part at the disease diagnose procedure, in the SARS-CoV-2 detection procedure using molecular and serological techniques (RT PCR, IgM antibodies, IgG), as well as all necessary texts for the right tracing, diagnose and also collaborate making the right therapeutic decisions. Likewise, some action protocols are being created to face up future epidemics or pandemics. A short introduction of the clinical analysis specialty history is being explained to give visibility of the multidisciplinary nature of this medical specialty.

Palabras clave: Pandemia COVID-19, SARS-CoV-2, laboratorio clínico, fisiopatología, pruebas bioquímicas, hematológicas e inmunológicas. **Keywords:** COVID-19 Pandemic, SARS-CoV-2, clinical laboratory, pathophysiology, biochemical, hematological and immunological test.

La especialidad de Análisis Clínicos se inicia científicamente a finales del siglo XIX: el método experimental se incorporó a la investigación y al pensamiento médicos a través de la fisiología, aprovechando la oportunidad que para el desarrollo de la ciencia médica significó la utilización de los grandes hospitales públicos. El francés François Magendie, el británico Marshall May, el suizo Moritz Schiff y el alemán Johannes Müller fueron los pioneros en esta ciencia y marcaron la transición desde

la fisiología especulativa a otra experimental y analítica.

La fisiología experimental del francés Claude Bernard, recogida en su libro "Introducción al estudio de la Medicina Experimental", tuvo gran repercusión en Europa y también en España. Constituyó el principal referente de la aplicación del desarrollo de los avances en las ciencias del laboratorio, y su obra fue el estandarte del movimiento positivista renovador de la medicina

española. Los libros de texto universitarios de fisiología de Juan Magaz, José Moreno Fernández, Juan Aguilar y Lara, y otros, se referían a la revolución metodológica impulsada por Bernard a favor de la experimentación.

El impacto de la obra de Claude Bernard desbordó los límites estrictos de la fisiología convirtiendo el hospital en el lugar esencial para la investigación médica. Los laboratorios comenzaron a transformar la fisiología y la patología y a dejar su huella también en la formación médica. Quienes se dedicaban a la química orgánica, a la microscopía, a la fisiología y a otras disciplinas relacionadas con la medicina en el siglo XIX, se percibieron que mientras el hospital era el lugar adecuado para realizar observaciones, en el laboratorio se efectuaba una experimentación controlada y sistemática de éstas, y que debían estudiarse de forma objetiva por diferentes métodos y técnicas con el fin de generar nuevos conocimientos

Durante el siglo XX, con el importante crecimiento experimentado por el conocimiento científico, surgieron numerosas nuevas disciplinas en el campo de la medicina, entre las que destacamos la Química Biológica o Bioquímica, la histología, anatomía patológica, genética, embriología, microbiología... que se engloban dentro del área de conocimiento que llamamos biomedicina.

La biomedicina aplica todos los principios de las ciencias mencionadas en la práctica clínica, mediante el estudio e investigación de los procesos fisiopatológicos, abordando tanto las interacciones moleculares como el funcionamiento dinámico del organismo. Todo ello nos ha permitido perfeccionar el diagnóstico precoz de enfermedades con nuevos biomarcadores de los procesos fisiopatológicos, así como descubrir nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos innovadores.

Podemos constatar que en las últimas décadas del siglo XX y principios del XXI, se toman muchas medidas diagnósticas y terapéuticas basadas en la tecnología biomédica o biotecnología. Estamos asistiendo a un cambio en el concepto de la enfermedad, y en las posibilidades de conocer los detalles de su etiopatología, que nos ha permitido tomar decisiones médicas impensables hace unos años.

En España, se establecieron dos núcleos de vanguardia, localizados en Madrid y Barcelona. Ambas universidades fueron el alma mater de científicos de primera línea, que serían, en definitiva, el punto de partida de los grupos de investigación que, desde principios del siglo XX, elevaron el rango de la investigación fisiológica en España.

El despliegue institucional de la fisiología catalana giró en torno a August Pi i Sunyer y sus discípulos Jesús María Bellido Golferichs y Rosendo Carrasco Formiguera, todos ellos protagonistas de una etapa de investigación experimental sin precedentes y maestros de una generación de grandes fisiólogos.

En Madrid, el gran peso de esta labor recayó sobre todo en la Junta para Ampliación de Estudios e Investigaciones Científicas (JAE), fundada en 1907. Presidida por Ramón y Cajal, fue un instrumento central de las políticas regeneracionistas. Bajo la misma inspiración que la JAE se creó en 1910 la Residencia de Estudiantes, dirigida desde su fundación por Alberto Jiménez Fraud.

Pero debemos evocar que, anteriormente, en 1903, el farmacéutico y profesor de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, José Rodríguez Carracido había publicado el libro "Tratado de Química Biológica", pionero de los estudios de bioquímica en España.

A partir de 1912 se inició la creación de pequeños laboratorios para la enseñanza práctica universitaria y para la iniciación a la investigación. Estaban ubicados en los sótanos de la Residencia de Estudiantes. A continuación, se fundó el Laboratorio de Serología y Bacteriología, cuyo director fue Paulino Suárez.

En la memoria publicada por la JAE en 1919, sobre los trabajos e investigaciones realizados durante el curso 1918-1919, se resalta que los trabajos de química se asociaban y complementaban a las prácticas de laboratorio de la Facultad de Farmacia. Se realizaban bajo la dirección de los profesores farmacéuticos José Rodríguez Carracido y Antonio Madinaveitia. Eran trabajos de química biológica dedicados a estudios de farmacodinamia. Asimismo, también se impartían cursos breves de análisis

clínicos de orina, sangre, heces y otros productos biológicos.

En este breve recuerdo histórico de la aportación del laboratorio a la medicina, hemos de destacar la importancia de los descubrimientos en microbiología, parasitología, inmunología y nutrición, y su repercusión en la mejora del diagnóstico biológico y del tratamiento terapéutico de las enfermedades. La ciencia y la práctica médicas basadas en la investigación experimental constituyen la denominada "medicina de laboratorio". Al ser una actividad multidisciplinar, la especialidad fue denominada "Análisis Clínicos", y ha sido el origen histórico de otras especialidades relacionadas con el laboratorio como: Bioquímica Clínica, Hematología, Inmunología, Microbiología y Parasitología, y de otras áreas como la Genética.

He tenido el honor de pertenecer a la Comisión Nacional de Análisis Clínicos del Ministerio de Sanidad, primero como vocal, después como secretario, y finalmente como presidente. En la última Guía de Formación de los Residentes en la que participé en el año 2004, definíamos la especialidad de Análisis Clínicos como la especialidad que, desde el profundo conocimiento de la fisiopatología humana y de los métodos de análisis de muestras biológicas de origen humano, tiene como misión generar información de utilidad para la clínica en los siguientes aspectos:

- a) Distinguir los estados de salud y de enfermedad.
- b) Ayudar al correcto diagnóstico de las enfermedades.
- c) Contribuir al establecimiento del pronóstico de las mismas.
- d) Facilitar el seguimiento clínico.
- e) Asegurar la eficacia del tratamiento aplicado.

Por ello, el Especialista en Análisis Clínicos se integra como un componente fundamental en el equipo multidisciplinar, que junto al resto de especialistas clínicos, participa en el proceso de decisión clínica, que afecta a las tareas de prevención de la enfermedad, promoción de la salud y el cuidado del paciente. Por otro lado, no se entendería que los profesionales

del laboratorio clínico permaneciesen aislados de las grandes líneas de investigación, cuando son ellos los que en muchas ocasiones realizan las determinaciones donde se objetivan los resultados de las mismas.

Hemos querido realizar esta introducción para dar visibilidad al papel que ha llevado a cabo el laboratorio clínico en la actual pandemia COVID-19.

La crisis sanitaria y social derivada de la pandemia COVID-19 ha requerido afrontar una serie de relevantes retos. Avanzar en el conocimiento de un virus desconocido hasta ahora, aplicar los mejores procedimientos para su diagnóstico por el laboratorio y por la clínica, tratar y prevenir la infección, constituyen los principales desafíos científicos de la actualidad.

Mucho se ha escrito y difundido por las redes sociales sobre la ingente y heroica labor de todos los sanitarios, desde el médico asistencial hasta todo el personal auxiliar. Particularmente he echado de menos que no se mencione también a los farmacéuticos, al personal de las farmacias, y a los veterinarios, sobre todo a nivel estatal, no así a nivel autonómico, donde sí se ha reconocido esta actividad sanitaria de primera línea. Ahí están nuestros compañeros que han entregado su vida y/o se han contagiado con la enfermedad en el ejercicio cotidiano de su actividad asistencial SANITARIA.

En el periodo de confinamiento han sido frecuentemente mencionados y popularizados los test de la PCR y las llamadas técnicas rápidas de detección de anticuerpos, así como su significación diagnóstica, cómo y cuándo se debían efectuar, y la falta de reactivos para realizarlos, reemplazando a otras noticias habituales, incluso en los programas radiofónicos audiovisuales deportivos. Sin embargo, con esta popularización se han originado equívocos y dudas entre el público que han contribuido, en ocasiones, a incrementar el desasosiego y la incertidumbre que produce la situación actual. En mi condición de profesional del laboratorio clínico quiero contribuir con algunas reflexiones sobre el papel que aportan las ciencias del laboratorio y los profesionales que trabajamos en ellas.

Los servicios centrales de los hospitales (Radiología, Laboratorios clínicos, Farmacia

Hospitalaria) son departamentos a los que se le da poca visibilidad pero que prestan un servicio sanitario imprescindible para la asistencia médica clínica.

El laboratorio clínico ha sido utilizado por las autoridades sanitarias como centro esencial para la lucha contra la enfermedad COVID-19, dado que una de las principales recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha sido realizar un adecuado cribado de la población para detectar el alcance real de la infección.

No es el motivo de este artículo explicar la metodología de la realización de la PCR y de los test de anticuerpos. Desde el diagnóstico de la infección mediante la detección del virus en muestras de vías respiratorias hasta las pruebas necesarias para el correcto seguimiento, pronóstico y colaboración en la toma de decisiones terapéuticas o el conocimiento del estado de inmunización de los pacientes, el laboratorio clínico está siendo una pieza clave en el complicado puzzle de esta nueva situación. Si habitualmente muchas de las decisiones clínicas están basadas en la información procedente del laboratorio clínico, este hecho se ha incrementado en la situación actual de los pacientes con COVID 19.

Pero es que, además de las pruebas diagnósticas de la PCR y serología de anticuerpos, los profesionales del laboratorio han tenido que adaptar sus instalaciones a las nuevas demandas y circunstancias para contribuir y facilitar el seguimiento clínico y asegurar la eficacia del tratamiento terapéutico aplicado.

Ante el dramatismo de ver cómo los pacientes se deterioraban ante sus ojos, los médicos solicitaban pruebas diagnósticas de todo tipo que diesen respuesta o explicaran la fisiopatología del enfermo; necesitaban datos analíticos y/o radiológicos que les ayudara para tomar decisiones terapéuticas. La incertidumbre, falta de seguridad, de confianza ha generado inquietud en la actuación médica. Han tenido que asumir y probar cualquier terapia que pudiera ser efectiva, aunque no estuviera debidamente contrastada su eficacia.

Los laboratorios de urgencia, para dar respuesta a estas inquietudes han tenido que adaptar

sus instalaciones para efectuar las pruebas bioquímicas, inmunológicas y hematológicas alteradas en estos pacientes. Sirvan como ejemplo las alteraciones analíticas más solicitadas referidas en el informe de la Vocalía Nacional de Análisis Clínicos del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.

- Gasometrías, como en todas las neumonías. Estado ácido base arterial: los pacientes infectados pueden desarrollar de manera súbita insuficiencia respiratoria aguda, por lo que es importante tener presente las alteraciones en la gasometría arterial para poder realizar un correcto diagnóstico y tratamiento.

El score SOFA o *Sequential Organ Failure Assesment*, es utilizado frecuentemente en las unidades de cuidados críticos y se calcula en base a parámetros analíticos y clínicos.

- Linfopenia: Un recuento linfocitario bajo ($<0.4 \times 10^9/L$) se asoció de una manera importante al desarrollo de neumonía grave. (n° neutrófilos/ n° linfocitos $>3,13$).

- Neutrofilia: El 87% de los pacientes con una cifra de neutrófilos por encima de $7 \times 10^9/L$ desarrollaron un peor curso clínico.

- Leucocitosis: El 96% de los pacientes con recuento leucocitario superior a $10 \times 10^9/L$ presentaron un cuadro severo

- Dímero D: El 81% de los pacientes con niveles de dímero D superiores a 1 mg/L presentaron un cuadro grave de neumonía, valores de mal pronóstico en el momento del ingreso. También se asoció a la aparición de complicaciones trombóticas.

- Proteína C reactiva: Mayores niveles de proteína C reactiva (>150 mg/L) se relacionan con desarrollo de neumonía severa.

- Lactato deshidrogenasa (LDH): El 100% de los pacientes con neumonía grave presentaron niveles por encima de 720 U/L.

- Ferritina: Niveles elevados de ferritina (> 2000 ng/mL) se relacionaron con el desarrollo de síndrome hemofagocítico (SHF).

- Procalcitonina (PCT): La procalcitonina es un marcador de utilidad para vigilar la aparición de sobreinfección bacteriana. Niveles

superiores a 0,5 µg/L corresponden a un riesgo 5 veces mayor de infección severa.

- Troponina T: Durante la hospitalización los pacientes con niveles elevados de TnT tuvieron más frecuencia de arritmias malignas que los que presentaban niveles de TnT normales.
- Interleucina -6: Niveles elevados de IL-6 (>80 pg/mL), se asocian al desarrollo de SHF y a fallo respiratorio severo.
- Péptidos natriuréticos (BNP, NT-prBNP): La elevación de péptidos natriuréticos son un factor de riesgo de muerte independiente en pacientes con COVID-19.
- Alanina amino transferasa (ALT): El aumento de la actividad de la ALT se relacionó con peor evolución, especialmente con niveles superiores a 40 U/L.

Como venimos refiriendo en este artículo, los laboratorios de Análisis Clínicos han dado respuesta a la investigación de las alteraciones fisiopatológicas de los trastornos orgánicos producidos por la pandemia COVID 19, referidas principalmente a las interacciones del virus SARS-CoV-2 con el sistema renina-angiotensina-aldosterona, con el sistema inmunitario, así como con la coagulación y el sistema microvascular.

Los profesionales del laboratorio clínico han vivido con preocupación y responsabilidad esta pandemia, teniendo que adaptar sus instalaciones para la correcta organización de la demanda asistencial sanitaria. Como manifiestan los Dres. Buño (Hospital de la Paz, Madrid) y Álvaro González (Clínica Universitaria de Navarra), en la nota de prensa de la Sociedad Española de Química Clínica del 24/04/2020, han tenido que afrontar los retos demandados por la pandemia COVID-19, han debido aprender a interpretar los resultados de ciertas magnitudes en un nuevo contexto clínico como las pruebas de coagulación, con especial mención al D-dímeros, o a elaborar perfiles que ayuden a estratificar a los pacientes explorando biomarcadores de función hepática, lesión miocárdica, inflamación o infección, entre otras.

Conclusiones

Como conclusión, debemos destacar que los laboratorios clínicos de urgencia y centrales han sabido responder con gran celeridad a los desafíos que ha impuesto la pandemia actual, pero también han aprendido que deben estar preparados para una nueva epidemia o pandemia. Para ello, han elaborado unas recomendaciones que sirvan de referencia a estas posibles situaciones.

- Revisar los protocolos de seguridad con el adecuado uso de los equipos de protección individual y adaptarlos a las circunstancias del laboratorio, con objeto de preservar la seguridad de los profesionales que trabajan en los laboratorios clínicos, con especial atención a los técnicos de laboratorio.
- Adecuar la organización de los servicios al cambio de actividad. Por un lado, una parte importante de la actividad habitual desapareció por la baja demanda de las necesidades médicas que no fueran COVID-19, mientras que por otro lado apareció una creciente demanda para atender a los pacientes de COVID-19. Ello ha obligado a reajustar circuitos, protocolos y plantillas.
- Compaginar esta reorganización con la ayuda profesional y logística a otras ubicaciones del hospital para múltiples tareas, entre las que destaca la organización del laboratorio clínico de los hospitales de campaña.
- Poner en marcha nuevas pruebas como la detección por PCR del virus en muestras respiratorias, medición de citocinas, como la IL-6, o readaptar las carteras de servicios en los laboratorios de urgencias para medir magnitudes que ofrezcan valor en la toma de decisiones clínicas en los pacientes con COVID-19.
- Formación en la correcta interpretación de resultados. Sigue habiendo una auténtica explosión de publicaciones donde es importante seleccionar las más relevantes.

Referencias bibliográficas

Los análisis en el laboratorio clínico, pieza clave para luchar contra la pandemia de COVID-19. Nota de prensa de la Sociedad Española de Química Clínica SEQCML. 14.04.2020

Los laboratorios clínicos españoles afrontan una rápida transformación para enfrentarse al COVID-19. Nota de prensa SEQCML. 24.04.2020

Diagnóstico por el laboratorio del virus SARS-CoV-2. Farmacéuticos, Consejo General de Colegios Farmacéuticos, Vocalía Nacional de Farmacéuticos de Análisis Clínicos. Autores: Marta García Colías (1,2), Diego García Martínez de Artola (3), José Antonio Carbajal de Lara (3,4), Miriam Albert Hernández (3). Informe Mayo, 2020. Especialistas en Análisis Clínicos (1), Bioquímica Clínica (2), Microbiología y Parasitología (3) F. Hospitalaria (4).

Gómez Canga-Argüelles C. El laboratorio y la medicina: de los síntomas a los signos. Discurso de ingreso en la Real Academia de Farmacia de Cataluña. Barcelona, 22 de marzo de 2015.

El rol de las pruebas de laboratorio en la COVID-19, Blog Economía y Salud. Pere Ibern, Ricard Meneu, Carlos Campillo Artero, Ildefonso Hernández, Salvador Peiró, Vicente Ortún 14 abril, 2020

Buño Soto A. El profesional de la Medicina de Laboratorio ante la pandemia por COVID-19. <https://doi.org/10.1515/almed-2020-0032>

ORDEN SCO/3369/2006, de 9 de octubre, por la que se aprueba y publica el programa formativo de la especialidad de Análisis Clínicos. BOE núm. 262 Jueves 2 noviembre 2006, 38117

Este trabajo debe ser citado como:

Gómez C. *Pandemia COVID-19: Análisis Clínicos, Laboratorios Clínicos, Medicina de Laboratorio*. Rev Esp Cien Farm. 2020;1(1):60-65.



Artículo original

Nueva alternativa a la cirugía en la queratopatía neurotrófica. Formulación de liposomas deformables de extracto de membrana amniótica

New alternative to surgery in neurotrophic keratopathy. Formulation of amniotic membrane extract-loaded deformable liposomes

Rodríguez-Ochoa JL, Arroyo-García CM, Rabasco AM, González-Rodríguez ML*

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Sevilla. Sevilla. España

*Correspondencia: malugoro@us.es

Recibido: 01.07.20; aceptado: 08.07.20

Resumen: El objetivo del presente trabajo de investigación fue desarrollar nuevas formulaciones de liposomas deformables de extracto de membrana amniótica (EMA), menos agresivas que un trasplante de placenta para el tratamiento de la queratopatía neurotrófica. Para ello, en primer lugar, se puso a punto el método de extracción de las proteínas totales, seguido de la cuantificación de proteínas utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA). Las formulaciones de liposomas se elaboraron mediante la técnica TLE (Thin Layer Evaporation). Para obtener la composición deseada de las vesículas, se realizó un estudio de cribado usando el diseño experimental con una matriz de Taguchi L9, de cuyos experimentos se evaluaron el tamaño, índice de polidispersión (PDI), carga superficial y eficacia de encapsulación (EE). Tras establecer las condiciones de extracción de las proteínas, los resultados del estudio de cribado mostraron que todos los factores evaluados afectaron a las características fisicoquímicas. La etapa de optimización permitió seleccionar como composición para los estudios posteriores: desoxicolato sódico (NaDC) como agente deformable, estearilamina como agente de carga en una cantidad de 0.06 mmol y una dilución al 75% del EMA. Este estudio ofrece nuevas posibilidades para mejorar el tratamiento de la queratopatía neurotrófica (QN) mediante el uso de formulaciones no invasivas.

Abstract: The objective of the present research work was to develop a new formulation of amniotic membrane extract (EMA)-loaded deformable liposomes. This pharmacological alternative supposes a less aggressive technology than a placental transplant for the treatment of neurotrophic keratopathy. Firstly, the total protein extraction method was developed, followed by protein quantification using the bicinchoninic acid (BCA) method. Liposome formulations were made using the TLE (Thin Layer Evaporation) technique. To obtain the desired composition of the vesicles, a screening study was realized using the design of experiments and a Taguchi L9 matrix, whose experiments evaluated the size, polydispersity index (PDI), surface charge and encapsulation efficiency (EE). After selecting the suitable conditions for protein extraction, the results of the screening study showed that all the factors evaluated affected the physicochemical characteristics of vesicles. The optimization stage allowed to select as composition for subsequent studies: sodium deoxycholate (NaDC) as a deformable agent, stearylamine as positively-charged agent in an amount of 0.06 mmol and a 75% dilution of the EMA. This study offers new possibilities to improve the treatment of neurotrophic keratopathy through the use of non-invasive formulations.

Palabras clave: queratopatía neurotrófica, liposoma, membrana amniótica, transfersoma. **Keywords:** neurotrophic keratopathy, liposome, amniotic membrane, transfersomet.

1. Introducción

La queratopatía neurotrófica es una enfermedad degenerativa de la córnea que se caracteriza por una hipoestesia corneal producida por un deterioro parcial o total de inervación del trigémino. Esta reducción en la sensibilidad corneal, junto a una regeneración epitelial reducida constituyen los sellos distintivos de esta enfermedad y son responsables de la consiguiente degradación del epitelio corneal, que afecta la integridad de la película lagrimal, el epitelio y el estroma [1]. Aunque no existen datos oficiales de su prevalencia, se estima que esta patología afecta a menos de 5 de cada 10.000 personas [2], por lo que es considerada como una enfermedad rara.

Hasta el momento, no existe un tratamiento efectivo para esta enfermedad. Esto supone que la progresiva degeneración con la que cursa puede desembocar en una ceguera permanente para el paciente. Los objetivos actuales de la terapéutica se centran en evitar la progresión del daño ocular, intentando mantener tanto la estructura como la transparencia de la córnea. Es fundamental, por lo tanto, que se instaure un tratamiento de forma precoz, ya que una vez que se ha producido el daño, la regeneración corneal estaría muy comprometida. Dicho tratamiento varía en función del estadio de la enfermedad, de forma que, en el primer estadio, el objetivo consiste en prevenir la ruptura epitelial y mejorar la calidad epitelial mediante lágrimas artificiales, parches oclusivos y con profilaxis de otras patologías que comprometan la integridad de la superficie ocular. En el estadio 2 se promueve la curación del defecto corneal con antibióticos tópicos, suero autólogo o suero de cordón umbilical. En el último estadio se encuentran los pacientes que no han respondido a los anteriores tratamientos, teniendo que recurrir a técnicas de cirugía como tarsorrafia flap conjuntival o trasplante de membrana amniótica.

La membrana amniótica se compone de una matriz avascular con propiedades antiangiogénicas y antiinflamatorias, considerándose eficaz en la regeneración del epitelio corneal. Es utilizada en oftalmología

para el tratamiento de diversas afecciones, tales como úlceras corneales, glaucoma, quemaduras, leucomas, etc., ya que actúa inhibiendo la neovascularización y la fibrosis [3]. Además, se ha recogido en la literatura que al utilizarla como sustrato para el cultivo de células epiteliales, forman una estructura tridimensional que se asemeja mucho al tejido epitelial de la córnea [4].

Los tratamientos actuales con trasplante de membrana amniótica consisten en la aplicación de un fragmento de ésta sobre la superficie ocular, el cual suele fijarse a los tejidos mediante finas suturas, pudiéndose aplicar como recubrimiento o como injerto. En caso de existir defecto epitelial únicamente, sin afectar al estroma, la membrana amniótica se utiliza recubriendo toda la superficie, de manera que los factores de crecimiento que contiene hacen que las células del epitelio se empiecen a regenerar por su parte interna. Sin embargo, en los casos en que exista una lesión más profunda, con pérdida de estroma, la membrana se injerta en la región carente del mismo. En este caso, las células crecen hasta sustituir dicha membrana, que se va reabsorbiendo progresivamente. Este proceso es más lento y la membrana amniótica provoca cierta opacidad, como se aprecia en la Figura 1, que puede limitar la visión de manera transitoria.



Figura 1. Tratamiento de úlcera corneal con injerto de membrana amniótica.

Para evitar los problemas y limitaciones que suponen los trasplantes con membrana amniótica, tanto en lo referente a la intervención

al paciente como en los efectos indeseables que producen en ellos, se han desarrollado estudios en los que se emplean extractos de dicha membrana, habiéndose ampliado su campo de aplicación de la vía tópica sobre piel [5] a la vía oftálmica, los cuales son incorporados en la correspondiente forma de administración para su aplicación en mucosa ocular [6].

Los liposomas han recibido una especial consideración como sistemas transportadores de compuestos terapéuticamente activos en la vía oftálmica, debido a sus características únicas, tales como la capacidad para incorporar fármacos hidrófilos e hidrófobos, biocompatibilidad, baja toxicidad, no activación del sistema inmune y dirigir la liberación de compuestos bioactivos al sitio de acción [7]. Son estructuras vesiculares esféricas compuestas de una bicapa lipídica, uni o multilamelar, que rodea compartimentos internos acuosos.

Sus propiedades de composición y estructura los hacen adecuados para el transporte de proteínas [8]. Recientemente, se han aplicado al tratamiento de diversas patologías, como el cáncer de vejiga [9], cicatrices hipertróficas con papaiña [10], infecciones vaginales por el virus del papiloma humano con interferón alfa-2b [11], o para la disolución de los trombos mediante administración del activador tisular del plasminógeno recombinante [12].

Entre los liposomas, los denominados liposomas ultradeformables o transfersomas, gracias a la combinación de los fosfolípidos con compuestos activadores del borde en su composición, presentan una bicapa que es capaz de moldearse a temperatura ambiente. Esto les permite atravesar las membranas biológicas sin llegar a romperse, evitando la liberación espontánea de su contenido [13]. Dichos activadores del borde que confieren esta actividad tan interesante son, por lo general, compuestos de naturaleza tensioactiva. Por tanto, uno de los factores a tener en cuenta a la hora de trabajar con activadores del borde es que, superada una determinada concentración, conocida como concentración micelar crítica (CMC), no sólo se agregan al resto de lípidos formando parte de la estructura de la bicapa, sino que empiezan a constituir por sí mismos distintos tipos de vesículas, conocidas como micelas mixtas (MMs), como demostró Schubert (2003) en sus estudios [14].

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente descritos en cuanto a la dificultad e invasividad del injerto de membrana amniótica y las ventajas que ofrecen los liposomas como sistemas de administración de fármacos por vía oftálmica, el objetivo general del presente trabajo de investigación fue desarrollar una formulación de liposomas deformables de extracto de placenta (EMA), para su posterior uso en el tratamiento de la queratopatía neurotrófica.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

Fosfatidilcolina (FC), bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB), colato sódico (NaC), colesterol (CH), desoxicolato sódico (NaDC), polvo de placenta, taurocolato sódico (NaTC), ácido Bicinconínico, estándar de ovoalbúmina y polvo liofilizado de gonadotropina coriónica humana se adquirieron de Sigma-Aldrich (España). Estearilamina (EA) se obtuvo de Fluka-Biochemika (Suiza). Hepes (ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetasulfónico), hidrógeno fosfato de sodio, dihidrógeno fosfato de sodio, acetona, cloroformo, metanol y acetonitrilo fueron proporcionados por Panreac Química (España), siendo los solventes acetona y cloroformo de calidad analítica y el acetonitrilo y el metanol de grado HPLC.

2.2. Cuantificación de las proteínas del extracto de placenta

La cuantificación de las proteínas existentes en el extracto de placenta se llevó a cabo mediante dos métodos: el método del ácido bicinconínico (BCA) para proteínas totales, y por HPLC para la gonadotropina coriónica humana (hCG), proteína presente en el extracto de placenta. Para conocer qué porcentaje representaba la hCG (p/p) en el extracto, se cuantificó una muestra por triplicado por ambos métodos.

El fundamento del método BCA consiste en la reacción entre las proteínas presentes en la muestra, con iones Cu^{2+} en un medio básico. Esta reacción da lugar a iones Cu^{+} los cuales, al reaccionar con el BCA dan lugar a un complejo coloreado púrpura cuyo máximo de absorbancia se encuentra a 562 nm. Este pico de absorbancia

permitió determinar la concentración de proteínas mediante espectrofotometría UV-visible. Para el procedimiento de cuantificación, se añadieron 100 µL de muestra y 2 mL de reactivo previamente preparado (1:50 sulfato de cobre + 49:50 ácido bicinónico). Las muestras se incubaron a 37 °C y en agitación durante 30 minutos (Ret Basic IKA®-WERKE). Posteriormente, se midió su absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Agilent® 8453).

Para cuantificar hCG por HPLC, se siguió el método descrito por Pithadia et al. (2015) con ciertas modificaciones [15]. El análisis por HPLC fue llevado a cabo utilizando un equipo Hitachi Elite LaChrom. Se utilizó una columna Zorbax SB-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5 µm). El flujo se fijó en 1 mL/min y el volumen de inyección en 20 µL. La fase móvil estaba constituida por una solución de tampón fosfato sódico (pH 7.0, 0.05 mM) y acetonitrilo, en proporción 87.5:12.5 % v/v. Para la correcta detección, se requirió un tratamiento previo de la hCG. Para ello, se tomaron 350 µL de muestra a los cuales se adicionaron 700 µL de acetona. Las muestras se agitaron en vórtex (Atom® Atomixer) durante 10 min y se centrifugaron a 4000 rpm/4 °C/10 min (Eppendorf Centrifuge 5804 R). Una vez centrifugadas, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la hCG en 200 µL de tampón Hepes 7.4. Tras ser filtradas las muestras utilizando filtros de acetato de celulosa (Pierce® Spin Cups) adaptados en eppendorf y centrifugadas en las mismas condiciones, estas fueron trasvasadas a un vial de HPLC con inserto incorporado para su posterior cuantificación.

2.3. Extracción de las proteínas del polvo de placenta

Para efectuar el proceso de extracción de las proteínas del polvo de placenta, se utilizó un homogeneizador ultrasónico (Ultrasonic Processor UP100H) usando como buffer de homogenizado Hepes pH 7.4, isotónico con NaCl 150 mM.

Se realizó por triplicado la extracción de 40 mg de polvo de placenta en 2 mL de Hepes, aplicando el homogeneizador durante dos tiempos distintos (30 s y 60 s) con el fin de comprobar el efecto del tiempo sobre la eficacia de la extracción. Posteriormente, la muestra se centrifugó en dos

condiciones distintas: 3000 rpm/4°C/10 minutos y 8000 rpm/4°C/10 minutos para comprobar qué condiciones permitían la extracción más favorable. Las muestras resultantes fueron cuantificadas en proteínas totales por el método BCA.

Una vez seleccionadas las condiciones más favorables de extracción aplicando el test estadístico t-student, se estandarizó el método y los sobrenadantes se fueron almacenando en un único matraz con el fin de utilizar en todos los ensayos un extracto con la misma concentración de proteínas.

2.4. Elaboración de los liposomas

Para elaborar los liposomas se empleó la técnica de evaporación en capa fina o Bangham (TLE, *Thin Layer Evaporation*), ampliamente utilizada por González-Rodríguez et al. (2016), con el fin de obtener una elevada eficacia de encapsulación de EMA, así como buenas características físicas de las vesículas [16]. El método requiere la formación inicial de una película fina de los lípidos, la cual es posteriormente hidratada en condiciones de agitación y calentamiento a 58 °C (temperatura superior a la temperatura de transición de fases de la FC).

2.5. Estudios de caracterización

2.5.1. Análisis dimensional

Para evaluar el tamaño de las vesículas se recurrió a la espectroscopía de correlación fotónica. El equipo utilizado fue un Zetasizer Nano ZS (Malvern Zetasizer), el cual calculó el radio hidrodinámico (RH) de las partículas, así como el índice de polidispersión (PDI). Este último parámetro informa sobre la homogeneidad o heterogeneidad en tamaño de la población analizada, adquiriendo este ensayo especial relevancia a la hora de definir la presencia de MMs por exceso de activador de borde. Las medidas fueron realizadas por triplicado y se aplicó una dilución 1:20 v/v.

2.5.2. Carga superficial: potencial zeta

El potencial zeta (ζ) es una medida de la carga que rodea a las partículas en suspensión. En nuestro estudio, dotar a la superficie de los liposomas de una carga positiva permitiría mejorar la penetración y tiempo de permanencia

en la córnea, al contar esta con una carga superficial negativa [17, 18]. Además, se evitan los fenómenos de agregación durante el almacenamiento. El equipo utilizado fue el mismo que para la determinación de tamaños, así como la preparación de las muestras.

2.5.3. Eficacia de encapsulación

Este parámetro refleja la cantidad en porcentaje de la proteína que se ha internalizado en las vesículas. Esta se determinó de forma indirecta, cuantificando la cantidad de proteínas existente en el medio y teniendo en cuenta la cantidad de proteína añadida.

Para determinar la fracción no encapsulada, las muestras se sometieron a centrifugación en condiciones de 8000 rpm/4°C/60 min.

Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se cuantificó mediante el método del BCA.

Por diferencia con el total de proteínas adicionado, que era conocido por la cuantificación del extracto y por el volumen añadido en cada lote, se determinó la fracción encapsulada y se representó en forma de porcentaje frente al total añadido.

2.5.4. Índice de deformabilidad

Uno de los parámetros más relevantes a la hora de caracterizar liposomas es el índice de deformabilidad. Para la determinación de este factor, se hizo pasar la formulación optimizada de liposomas por una serie de poros de diámetro conocido con el fin de observar la capacidad de estos de recuperar su forma y tamaño una vez atravesados, evitando romperse y liberar el fármaco. Se utilizó como control la misma formulación pero en ausencia del activador del borde.

Para ello, se extruyeron las vesículas a través de un filtro de membrana de policarbonato de 800 nm en un extrusor (LIPEX® Thermobarrel Extruder) bajo flujo de nitrógeno [16]. El ID se calculó determinando el flujo (J) de la muestra a través del filtro y la relación del tamaño vesicular obtenido y el tamaño del poro. El flujo se determinó haciendo pasar la formulación, previamente tratada con el filtro de 800 nm, por uno de 100 nm (rp) aplicando una presión de 290 psi durante 10 minutos, y midiendo el radio hidrodinámico por DLS (rv). El ensayo se realizó

por duplicado.

El ID se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$ID = J \times (rv/rp)^2$$

2.5.5. Morfología

La caracterización morfológica superficial de la formulación optimizada de liposomas fue evaluada mediante un Microscopio Electrónico de Barrido de Alta Resolución (FEGSEM HITACHI S-5200), el cual posee un detector de electrones el cual permite la observación de la superficie de la muestra. La muestra fue previamente tratada diluyendo 500 µL de ésta en 2,5 mL de tampón Hepes. Posteriormente, se depositó en un soporte de silicio y se dejó secar al aire durante una noche. Al día siguiente fueron recubiertas con platino mediante *sputtering*, con el fin de transformarlas en superficies conductoras.

2.6. Estabilidad de las proteínas en las condiciones de trabajo

Debido a la labilidad que presentan las proteínas cuando son sometidas a determinadas condiciones de stress, antes de proceder a desarrollar los ensayos de formulación, se realizó un estudio para evaluar la estabilidad de las proteínas en las condiciones más agresivas que forman parte de la elaboración y caracterización de los liposomas. Los ensayos incluyeron la estabilidad frente al tiempo, la temperatura y la centrifugación.

2.6.1. Tiempo

Teniendo como referencia el tiempo de estudio de estabilidad de los liposomas se forma rutinaria, se cuantificó una vez por semana durante un mes la concentración de proteínas de las cuatro extracciones realizadas para el estudio de extracción detalladas en un apartado anterior, utilizando el método BCA.

2.6.2. Temperatura

Para estudiar la estabilidad frente a la temperatura, el método de cuantificación con BCA no es válido, ya que tanto la estructura macromolecular de la proteína como cuatro aminoácidos específicos (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) son los responsables de la formación de color en muestras de proteínas cuando son ensayadas con este método. Esto

implica que, aunque las proteínas se encuentren desnaturalizadas, el BCA seguirá reaccionando con estos aminoácidos formando el complejo coloreado.

Por ello, se llevó a cabo la técnica descrita por Cueto et al. (2003) para la determinación de temperatura de desnaturalización de proteínas, mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC Setaram 131) [19].

2.6.3. Centrifugación

Para evaluar si las proteínas permanecían estables a las condiciones de centrifugación necesarias para hacer precipitar los liposomas y poder así cuantificar el sobrenadante en la determinación de la eficacia de encapsulación, se realizó una extracción, la cual se separó en dos alícuotas. Una de ellas se cuantificó inmediatamente por el método BCA y la otra se sometió a centrifugación (8000 rpm/4°C/60 min) y se cuantificó. Posteriormente, se compararon los datos obtenidos.

2.7. Diseño y optimización de la formulación de transfersomas

2.7.1. Determinación de la CMC del ácido cólico

La obtención de transfersomas requiere la adición a la mezcla lipídica de un activador del borde. En el presente estudio se utilizaron las siguientes sales biliares: colato Na (NaC) desoxicolato Na (NaDC) y taurocolato Na (NaTC).

Para determinar la cantidad máxima de sal biliar que pudiese incorporarse sin que se superase la CMC, se llevó a cabo un primer estudio con el NaC para determinar su CMC y, a partir de ahí, establecer las concentraciones adecuadas para su formulación en liposomas.

Para ello, se prepararon 5 lotes de liposomas con composiciones fijas de FC (0.11 mmol) y CH (0.027 mmol) y concentraciones crecientes (3, 6, 12, 25 y 73.3 mM) de ácido cólico. Posteriormente, se caracterizaron en cuanto a tamaño, PDI y carga superficial, y se midió la transmitancia por espectrofotometría UV-visible con el fin de establecer la concentración a la cual comienzan a formarse las micelas. Previamente se hizo un barrido para determinar la longitud de onda de máxima transmitancia.

2.7.2. Aplicación del diseño experimental a la etapa de cribado

El objetivo de esta etapa fue determinar la composición de los transfersomas que satisficiera los criterios de calidad en términos de tamaños, PDI, carga superficial y eficacia de encapsulación del EMA. Para ello, se aplicó la herramienta estadística del diseño experimental, la cual permite acercarnos a la composición óptima de la formulación, cribando entre todos los factores analizados, aquellos que influyeron significativamente en las respuestas evaluadas. El estudio se llevó a cabo utilizando el software DOEpack 2000.

Para ello, se fijaron cuatro factores con tres niveles cada uno (Tabla 1). Para el estudio se seleccionó una matriz L9 de Taguchi, generando de esta forma 9 experimentos, cuyas composiciones se recogen en la Tabla 2.

Tabla 1. Factores y niveles del estudio.

Factor	Niveles		
	-1	0	+1
Activador del borde (Tipo AB)	NaC	NaDC	NaTC
Agente de carga (Tipo AC)	Ninguno	EA	DDAB
Cantidad de agente de carga (Q, mmol)	0.02	0.04	0.06
Concentración de extracto ([E], mg/mL)	0.125	0.187	0.25

Tabla 2. Experimentos correspondientes a la matriz experimental Taguchi L9. TC: taurocolato sódico. C: colato sódico. DC: desoxicolato sódico. EA: estearilamina. DDAB: didodecildimetilamonio.

	Tipo AB	Tipo AC	Q (mmol)	[E] (mg/mL)
1	TC	Sin	0.02	0.125
2	TC	EA	0.04	0.187
3	TC	DDAB	0.06	0.25
4	C	Sin	0.04	0.25
5	C	EA	0.06	0.125
6	C	DDAB	0.02	0.187
7	DC	Sin	0.06	0.187
8	DC	EA	0.02	0.25
9	DC	DDAB	0.04	0.125

Los experimentos se realizaron por duplicado y las formulaciones se caracterizaron en tamaño, PDI, potencial ζ y eficacia de encapsulación.

La evaluación de los efectos producidos por la modificación de las variables se realizó mediante el análisis de las medias (ANOM), el cual analiza si las medias de los tratamientos difieren de la media general.

2.7.3. Optimización de la formulación

Una vez evaluados los resultados obtenidos en la etapa de cribado, se seleccionaron cuatro combinaciones para seleccionar de entre ellas la composición óptima, siendo los factores críticos: activador de borde (NaC o NaDC) y cantidad de agente de carga (0.04 o 0.06 mmol). Los factores de agente de carga utilizado y concentración del EMA se fijaron en la etapa de cribado. Estas cuatro combinaciones se elaboraron por duplicado y se caracterizaron.

Los objetivos que se plantearon en esta etapa de optimización fue seleccionar la formulación con tamaño próximo a 800 nm, un PDI mínimo, un potencial ζ máximo positivo y una eficacia de encapsulación máxima.

3. Resultados y discusión

3.1. Extracción y estudio de estabilidad de las proteínas del polvo de placenta

Antes de proceder a la formulación de los liposomas, se realizó un estudio básico a las muestras del extracto con el fin de evaluar la influencia de distintos factores relacionados con el proceso de extracción de las proteínas totales a partir del polvo de placenta comercial y que han sido detallados en el apartado de Metodología. Estas muestras se evaluaron en cuanto a proteínas totales durante un periodo de un mes con el fin de determinar si las condiciones de extracción condicionan el mantenimiento de las concentraciones. En la Figura 2 se puede apreciar cómo el aumento del tiempo de centrifugación afectó considerablemente a la concentración de proteínas extraídas, disminuyéndola. Esto podría deberse a que este proceso induce la precipitación de las proteínas, reduciendo así la cantidad solubilizada recuperada [20]. El tiempo de sonicación parece afectar en menor medida a la cantidad extraída.

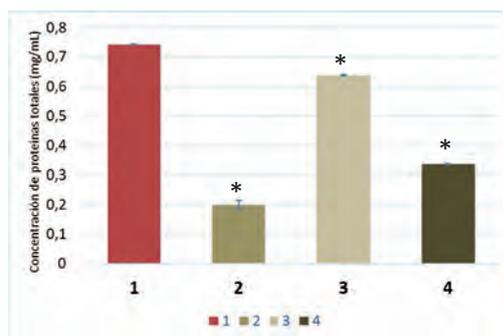


Figura 2. Condiciones de extracción de las muestras de EMA. **1:** 30 s de sonicación y centrifugación 3000 rpm/4°C/10 min. **2:** 30 s de sonicación y centrifugación 8000 rpm/4°C/10 min. **3:** 60 s de sonicación y centrifugación 3000 rpm/4°C/10 min. **4:** 60 s de sonicación y centrifugación 8000 rpm/4°C/10 min. Los valores medios fueron estadísticamente diferentes comparados con el experimento 1 (* P<0.0001).

A la vista de los resultados obtenidos, las condiciones de extracción se fijaron 30 segundos de sonicación seguidos de centrifugación a 3000 rpm/4°C/ 10 min.

A continuación, se llevó a cabo un estudio de recuperación de las proteínas totales de las muestras, las cuales fueron sometidas a las condiciones propias del proceso de elaboración de liposomas, tanto de temperatura (en la obtención de los liposomas) como de tiempo de centrifugación (para la determinación de la eficacia de encapsulación de las proteínas en las muestras). Los resultados obtenidos sobre el efecto de la temperatura se muestran a partir de los termogramas correspondientes a las muestras de extracto de placenta control (A) y tras ser sometida a 80°C durante 30 min (B), como se recoge en la figura 3.

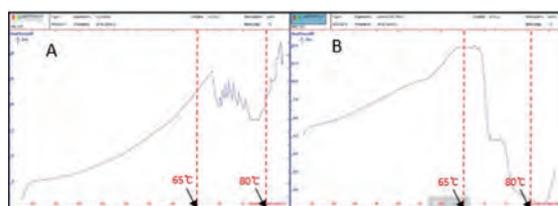


Figura 3. Termogramas obtenidos por DSC de la muestra del polvo de placenta. (A) Sin someterla a ningún tipo de tratamiento. (B) Sometida a baño maría a 80 °C durante 30 minutos.

En la figura 3A se pueden observar varios picos en el rango de temperaturas entre 70 y 75°C

aproximadamente, que pueden identificarse con los picos típicos de la desnaturalización de las proteínas [19]. Sin embargo, en la figura 3B no aparecen estos picos al encontrarse las proteínas ya desnaturalizadas.

Dado que en el proceso de elaboración de los liposomas por TLE la temperatura máxima que se requiere es de 58°C [16], el método sería adecuado para trabajar con proteínas.

3.2. Determinación de la concentración micelar crítica (CMC) del ácido cólico

Este estudio se planteó con idea de determinar la cantidad de activador del borde (sal biliar) a usar en la elaboración de los liposomas, tal que se asegurara su incorporación en la bicapa y se evitara la formación de micelas.

Para ello, se llevó a cabo la determinación de la transmitancia de las muestras con diferente concentración, en el espectrofotómetro,

estableciéndose el máximo en 657 nm. A partir de ahí, se determinó el porcentaje de transmitancia de cada uno de los lotes a esa longitud de onda. Los resultados obtenidos mostraron un incremento del valor de transmitancia a medida que aumentó la cantidad del colato (Figura 4). Ello puede deberse a la formación de micelas que, al tener un menor tamaño que los liposomas, interfieren menos en el paso de la luz [21].

Asimismo, cuando se evaluaron los tamaños de las muestras coloidales por espectroscopía de correlación fotónica, se pudo observar cómo a concentraciones mayores de 6 mM (correspondiente a L2), deja de obtenerse una única población (Fig. 4A), detectándose al menos dos poblaciones distintas en los lotes elaborados con una concentración de NaC de 12 mM o mayor, como se recoge en la Figura 4B. Ello se debe a que al superarse la CMC aparecen las MMs, las cuales poseen tamaños muy dispersos [14].

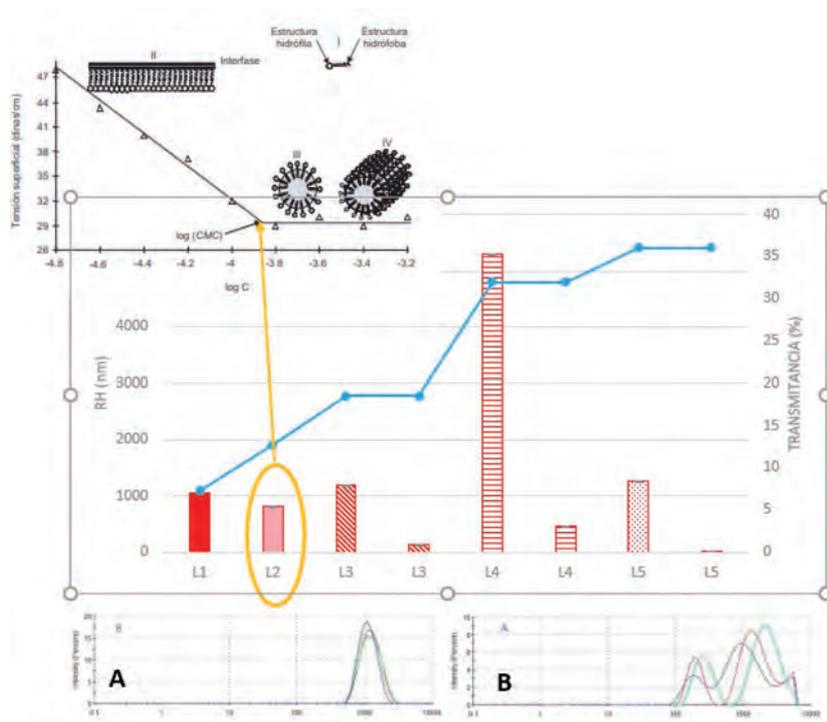


Figura 4. Representación de los radios hidrodinámicos (RH, nm) de los lotes ensayados y valores de transmitancia (%) obtenidos. En la parte superior se esquematiza la organización de las moléculas de activador del borde alrededor de la concentración micelar crítica (CMC): por debajo de la CMC, monómeros; Por encima de la CMC, el activador del borde se encuentra formando micelas. A) Diagrama DLS ilustrativo de lotes con una concentración inferior a 6 mM. B) Diagrama DLS ilustrativo de lotes con una concentración superior a 6 mM.

A la vista de los resultados obtenidos, se fijó en 6 mM la concentración de activador del borde, la cual formará parte de la composición de los distintos lotes de liposomas. Esta concentración permitía la incorporación de la sal biliar en la bicapa sin formación de MMs.

3.3. Influencia de los factores variables en la formulación

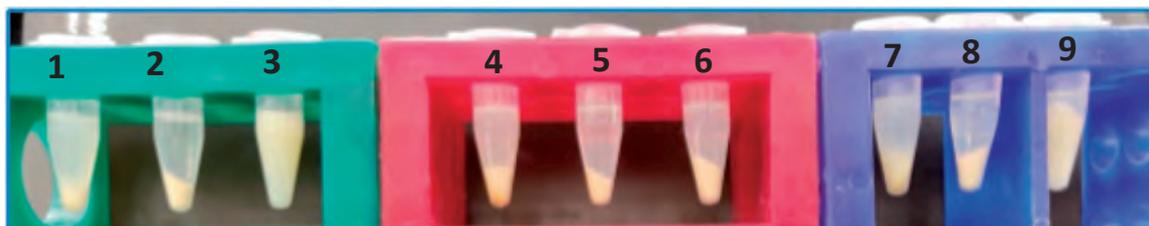
Una vez seleccionada la cantidad de sal biliar a incorporar en la formulación, se continuó el trabajo evaluando la influencia que determinados factores de formulación podrían afectar a las características de los sistemas coloidales obtenidos.

Como se muestra en la sección de metodología, se seleccionaron cuatro factores a tres niveles (Tabla 1), cuya matriz experimental correspondió a una L9 Taguchi (Tabla 2). Los resultados de caracterización de las formulaciones elaboradas se recogen en la Tabla 3.

La caracterización de todos los lotes fue posible, a excepción de los experimentos 3 y 9, como se muestra en la parte inferior de la tabla, los cuales presentaron problemas de poseer numerosas poblaciones de tamaño, desestabilización de las muestras y dificultad en el proceso de centrifugación [22].

Tabla 3. Características de los lotes ensayados en el *screening*.

	RH (nm)	PDI	ζ (mV)	EE (%)
1	634.9 ± 136.8	0.384 ± 0.0016	- 9.66 ± 0.91	41.48 ± 10.97
2	1415.0 ± 50.9	0.220 ± 0.0026	+ 26.50 ± 0	68.78 ± 5.74
3	578.6 ± 2.3	0.536 ± 0.016	+ 24.05 ± 1.34	- -
4	908.7 ± 22.7	0.229 ± 0.069	- 9.03 ± 0.64	58.60 ± 5.78
5	1156.8 ± 447.2	0.355 ± 0.187	+ 28.05 ± 1.34	27.11 ± 13.23
6	1332.5 ± 89.8	0.206 ± 0.001	+ 13.05 ± 1.34	64.06 ± 8.47
7	1067.0 ± 8.5	0.152 ± 0.057	- 8.61 ± 0.96	58.68 ± 4.29
8	1992.0 ± 647.5	0.050 ± 0.018	+ 12.47 ± 6.70	81.86 ± 2.60
9	564.85 ± 137.8	0.580 ± 0.073	+ 12.00 ± 3.12	- -



Con el fin de analizar la influencia de los factores de formulación sobre las respuestas de caracterización evaluadas, se aplicó el Diseño de Experimentos y se utilizaron los gráficos ANOM y el análisis de la varianza. Para ello, se establecieron los límites de confianza, superior (UDL) e inferior (LDL), los cuales determinarán la influencia significativa de cada factor en la respuesta evaluada.

3.3.1. Influencia en el potencial ζ

Los valores de carga superficial de los liposomas en las diferentes formulaciones oscilaron entre -9.66 y +28.05 mV.

Con el fin de visualizar gráficamente el efecto de los factores sobre esta respuesta, a título de ejemplo se exponen dos gráficos ANOM, uno con efecto significativo y otro sin él (Figura 5A y 5B, respectivamente). Para el resto de variables, el procedimiento sería similar.

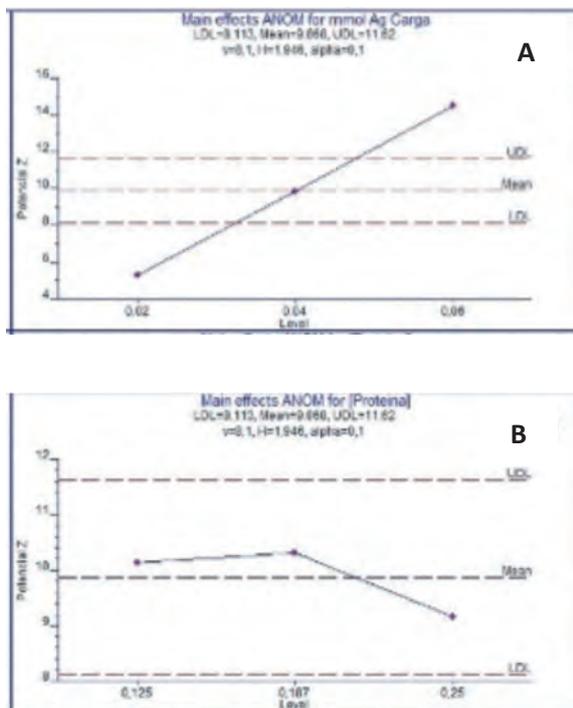


Figura 5. Gráficas ANOM del potencial zeta respecto a: A) cantidad del agente de carga y B) concentración de proteínas totales.

Se obtuvo la existencia de diferencia significativa entre la ausencia de agente portador de carga positiva a las vesículas y la presencia de estos compuestos ($p < 0.001$; $F 28.8$ (-1 v +1) y $F 202.8$ (-1,+1 v 0), siendo la EA el lípido que aportó mayores valores de potencial. Asimismo, se aprecia con claridad en la figura 5A una relación lineal entre la cantidad de agente de carga añadida y el potencial ζ , como también observaron Carrión et al. (1997) [23].

Con respecto a la concentración de proteínas, no existieron diferencias significativas entre los niveles ensayados (Figura 5B).

3.3.2. Influencia sobre el tamaño y la polidispersión

Las formulaciones desarrolladas tuvieron tamaños que oscilaron entre 565 y 1992 nm, aproximadamente, con PDI comprendidos entre 0.05 y 0.58. Estos valores tan dispersos se justificaron por la presencia simultánea en algunos lotes de liposomas y micelas.

Los factores que contribuyeron de forma significativa en el tamaño fueron el activador del borde, obteniendo vesículas de menor tamaño al usar NaTC. En cambio, no se observaron

diferencias significativas entre NaC y NaDC. Este resultado puede deberse a la formación de MMs de NaTC, como se pudo comprobar al obtener valores de PDI muy elevados, en concordancia con otros estudios [14].

Por otra parte, el agente de carga que influyó de forma más significativa en el tamaño fue EA, obteniéndose con ésta el mayor tamaño ($p < 0.001$, $F 24.63$ (-1,+1 v 0). La rigidez de esta molécula en comparación con la naturaleza tensioactiva DDAB puede contribuir a la obtención de vesículas de mayor tamaño al interponerse en la bicapa [13].

La cantidad de agente de carga y la concentración de proteínas no influyeron significativamente en los valores de tamaño obtenidos, si bien respecto a la concentración de proteínas, el nivel intermedio (0.187 mg/mL) fue el que proporcionó un menor PDI de forma significativa.

3.3.3. Influencia sobre la eficacia de encapsulación

Los valores obtenidos en los experimentos ensayados oscilaron entre 27.11 y 81.86 % de proteína.

La EA mostró ser el agente de carga más indicado al presentar mayores valores de encapsulación ($p < 0.001$, $F 36.48$ (-1 v +1); $F 27.67$ (-1,+1 v 0). Sin embargo, el resultado más revelador fue la obtención de una relación lineal inversa entre la cantidad de agente de carga y la eficacia de encapsulación obtenida ($p < 0.001$, $F 54.88$ (-1 v +1)). Por otro lado, se observó que NaTC proporcionó el menor valor de fármaco encapsulado de forma significativa y que no existieron diferencias entre NaC y NaDC. Finalmente, el nivel intermedio de concentración de proteínas fue el que presentó un mayor valor de este parámetro ($p < 0.001$, $F 33.78$ (-1 v +1) y $F 51.68$ (-1,+1 v 0)).

3.4. Optimización de la formulación

Los resultados del cribado permitieron fijar algunos factores de formulación: EA como agente de carga superficial, ya que este lípido permitió obtener los mejores resultados en PDI, potencial ζ y eficacia de encapsulación; asimismo, la concentración de proteínas se fijó en 0.187 mg/mL. Sin embargo, fueron necesarios ensayos adicionales para dilucidar el comportamiento de las formulaciones en función del activador

del borde y la concentración del agente de carga. Se descartaron NaTC y la cantidad de agente de carga 0.02 mmol en base a los resultados del apartado anterior.

En esta etapa, se realizó una batería de cuatro experimentos con las distintas combinaciones de NaC y NaDC, a 0.04 y 0.06 mmol de EA.

Los resultados de caracterización obtenidos (Tabla 4) mostraron la presencia de MMs en las formulaciones A y B, haciéndose patente este hecho por la distribución de tamaños y los valores de PDI elevados, motivo por el cual estos lotes fueron descartados. Se fijó, por tanto, NaDC como activador del borde.

Tabla 4. Características de los lotes elaborados en la etapa de optimización. A: NaC y 0.04 mmol. B: NaC y 0.06 mmol. C: NaDC y 0.04 mmol. D: NaDC y 0.06 mmol.

	RH (nm)	PDI	ζ (mV)	EE (%)
A	596.9± 108.8	0.468± 0.187	+ 25.06± 3.37	76.64± 2.47
B	598.2± 58.8	0.357± 0.147	+ 28.50± 3.75	59.67± 29.58
C	879.5± 169.7	0.268± 0.086	+ 21.50± 3.56	76.83± 22.24
D	813.9± 52.1	0.093± 0.033	+ 26.95± 2.90	75.44± 7.23

Como quedó patente en el estudio ANOM, al aumentar la cantidad de agente de carga, el potencial ζ obtenido aumenta de forma lineal, como ya afirmaron Villasmil-Sánchez et al. (2010) [24]. Esto, junto a que los resultados de encapsulación en ambos lotes fueron similares, hicieron que la cantidad añadida en los lotes definitivos fuese el nivel más alto, 0.06 mmol.

Por tanto, la composición definitiva de la formulación se fijó como sigue. Los componentes de la bicapa fueron: FC (0.11 mmol), CH (0.027 mmol), NaDC (0.018 mmol) y EA (0.06 mmol). La fase acuosa de los liposomas estuvo compuesta del EMA (0.187 mg/mL) disuelta en tampón Hepes pH 7.4.

En las microfotografías tomadas mediante FEGSEM (Figura 6) se pudo apreciar la morfología de los sistemas lipídicos obtenidos, confirmando su naturaleza vesicular. Además, la elasticidad conferida por el activador del borde les permite atravesar diámetros de poro mucho menores que sus propios radios. A nivel

biológico, esto se traduciría en su capacidad para atravesar las membranas biológicas reduciendo el riesgo de romperse, liberando el fármaco encapsulado durante el proceso de penetración [25]. El valor de ID obtenido para la formulación optimizada fue de 4.38 ± 0.4 , mientras que la formulación control sin NaDC presentó un valor de 1.98 ± 0.1 , lo que demuestra la elevada flexibilidad de las vesículas obtenidas.

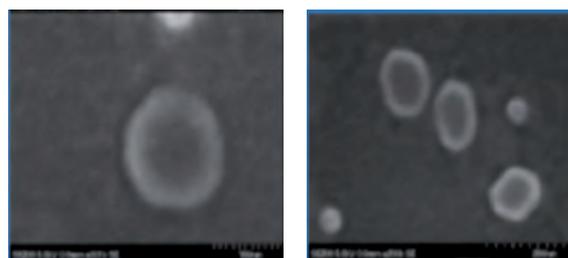


Figura 6. Microfotografías obtenidas por FEGSEM de la formulación optimizada.

4. Conclusiones

La determinación de las condiciones óptimas de trabajo para el extracto de polvo de placenta aseguró que las condiciones de elaboración de los liposomas no afectasen a su integridad.

Mediante la aplicación del diseño experimental, se pudo alcanzar una composición óptima para la formulación de liposomas deformables, con unas características fisicoquímicas apropiadas para una futura administración oftálmica. No obstante, estos estudios han de complementarse con otros relacionados con el comportamiento biofarmacéutico del fármaco en las formulaciones.

Agradecimientos

Al Ministerio de Educación y Formación Profesional del Gobierno de España, por la concesión de una Beca de Colaboración a JLRO.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

1. Dua HS, Said DG, Messmer EM, Rolando M, Benítez-del-Castillo JM, Hossain PN, Shortt AJ, Geerling G, Nubile M, Figueiredo FC, Rauz S, Mastropasqua L, Rama P, Baudouin C. Neurotrophic Keratopathy. *Prog Retin Eye Res* 2018;66: 107–31.
2. Babayán-Sosa A, Baca-Lozada O. Epiteliopatía corneal por alteración sensitiva: queratitis neurotrófica corneal. *Rev Mex Oftalmol* 2018;92(3):117–22.
3. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 2001;20(4):408–13.
4. Endo K, Nakamura T, Kawasaki S, Kinoshita S. Human amniotic membrane, like corneal epithelial basement membrane, manifests the A5 chain of type IV collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(6):1771.
5. Choi YK, Din FU, Kim DW, Kim YI, Kim JO, Ku SK, Ra JC, Huh JW, Lee JI, Sohn DH, Yong CS, Choi HG. Amniotic membrane extract-loaded double-layered wound dressing: evaluation of gel properties and wound healing. *Drug Dev Ind Pharm* 2014;40(7):852–9.
6. Liang L, Li W, Ling S, Qiu W, Li C, Liu Z. Amniotic membrane extraction solution for ocular chemical burns. *Clin Exp Ophthalmol*. 2009;37(9):855–63.
7. González-Rodríguez ML, Rabasco AM. Charged liposomes as carriers to enhance the permeation through the skin. *Expert Opin Drug Deliv* 2011;8(7):857–71.
8. Laouini A, Charcosset C, Fessi H, Holdicha RG, Vladisavljevića GT. Preparation of liposomes: a novel application of microengineered membranes—from laboratory scale to large scale. *Coll Surf B: Biointerfaces* 2013;112: 272–8.
9. Vila-Caballer M, Codolo G, Munari F, Malfanti A, Fassan M, Ruggie M, Balasso A, de Bernard M, Salmaso S. A pH-sensitive stearyl-PEG-poly(methacryloyl sulfadimethoxine)-decorated liposome system for protein delivery: an application for bladder cancer treatment. *J Control Release* 2016;238:31–42.
10. Chen YY, Lu YH, Ma CH, Tao WW, Zhu JJ, Zhang X. A novel elastic liposome for skin delivery of papain and its application on hypertrophic scar. *Biomed Pharmacother* 2017;87:82–91.
11. Jøraholmen MW, Basnet P, Acharya G, Škalko-Basnet N. PEGylated liposomes for topical vaginal therapy improve delivery of interferon alpha. *Eur J Pharm Biopharm* 2017;113:132–9.
12. Hsu HL, Chen JP. Preparation of thermosensitive magnetic liposome encapsulated recombinant tissue plasminogen activator for targeted thrombolysis. *J Magn Magn Mater* 2017;188–94.
13. Arroyo CM. Evaluación de nanosistemas lipídicos para coadministración de maleato de timolol y acetazolamida: nueva propuesta en el tratamiento del glaucoma [Tesis Doctoral]. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2018.
14. Schubert R. Liposome preparation by detergent removal. *Method Enzymol* 2003;367:46–70.
15. Pithadia AB, Prajapati DM, Jha LL, Tandel F, Patel N. Bioanalytical method development and validation of HCG (Human Chorionic Gonadotropin). *Int J Pharm Pharm Sci* 2015;7(7):390–6.
16. González-Rodríguez ML, Arroyo CM, Cózar-Bernal MJ, González-R PL, León JM, Calle M, Canca D, Rabasco AM. Deformability properties of timolol-loaded transfersomes based on the extrusion mechanism. Statistical optimization of the process. *Drug Dev Ind Pharm* 2016;42(10):1683–94.
17. Law SL, Huang KJ, Chiang CH. Acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery. Corneal penetration and absorption. *J Control Release* 2000;63(1–2):135–40.
18. Rabinovich-Guilatt L, Couvreur P, Lambert G, Goldstein D, Benita S, Dubernet C. Extensive surface studies help to analyse zeta potential data: the case of cationic emulsions. *Chem Phys Lipids* 2004;131:1–13.
19. Cueto M, Dorta MJ, Munguía O, Llabrés M. New approach to stability assessment of protein solution formulations by Differential Scanning Calorimetry. *Int J Pharm* 2003;252:159–166.

20. Krishnamurthy R, Lumpkin JA, Sridhar R. Inactivation of lysozyme by sonication under conditions relevant to microencapsulation. *Int J Pharm* 2000;205(1-2):23-34.
21. Svarc FE, Ranocchia RP, Arnejo N. 2012. La química de la perfluorodecalina: potenciales usos en química cosmética. <https://www.researchgate.net/publication/274072852> (June 12, 2019).
22. Liu X, Sun J, Xu X, Alsaedi A. Adsorption and desorption of UV(VI) on different-size graphene oxide. *Chem Engin J* 2019;360:941–50.
23. Carrión EJ, de La Maza A, Parra JL. The influence of ionic strength and lipid bilayer charge on the stability of liposomes. *J Colloid Interface Sci* 1994;164(1):78-87
24. Villasmil-Sánchez S, Drhimeur W, Salas SC, Rabasco AM, González-Rodríguez ML. Positively and negatively charged liposomes as carriers for transdermal delivery of sumatriptan: in vitro characterization. *Drug Dev Ind Pharm* 2010;36(6):666–75.
25. Chen H, Pan H, Li P, Wang H, Wang X, Pan W, Yuan Y. The potential use of novel chitosan-coated deformable liposomes in an ocular drug delivery system. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 2016;143:455–62.

Este trabajo debe ser citado como:

Rodríguez-Ochoa JL, Arroyo-García CM, Rabasco AM, González-Rodríguez ML. Nueva alternativa a la cirugía en la queratopatía neurotrófica. Formulación de liposomas deformables de extracto de membrana amniótica. *Rev Esp Cien Farm.* 2020;1(1):66-78.



Artículo original

Escorbuto o la enfermedad de los nautas. Aportación de los navegantes españoles a su conocimiento y tratamiento

Scurvy or the disease of the navigators. Contribution of spanish navigators to their knowledge and treatment

Herrera J

Fundación Farmacéutica Avenzoar. Sevilla. España
Correspondencia: jherreracarranzat@yahoo.es

Recibido: 24.06.20; aceptado: 04.07.20

Resumen: En el presente trabajo se analiza el papel jugado por algunos navegantes españoles en el conocimiento y, especialmente, el tratamiento del escorbuto en las largas rutas transoceánicas. Tratamientos siempre con frutas cítricas, naranjas y limones. Se comenta el caso especial del capitán Sebastián Vizcaíno, mediante la administración de una frutilla (xocohuitzles) en la isla de Mactán. También los importantes navegantes Antonio de Ulloa, en las conversaciones con sus tres hijos, y el insigne médico cirujano Pedro M^a González, en la expedición de Alejandro Malaspina. La primera expedición de muy largo recorrido libre de escorbuto. Por último, el médico renacentista sevillano Agustín Farfán, el primero en preparar y recomendar tempranamente un medicamento elaborado con naranjas y limones, en 1592.

Abstract: This paper discusses the role played by some spanish navigators in knowledge and, especially, treatment against scurvy on long transoceanic routes. Treatments always with citrus fruits, oranges and lemons. The spatial case of captain Sebastián Vizcaíno is discussed, administering a small fruit (xocohuitzles) on the island of Mactan. Also the important navigators Antonio de Ulloa, in the conversations with his three sons, and the distinguished surgeon Pedro M^a González on the expedition of Alejandro Malaspina. The first expedition of very long-haul navigation free of scurvy. Finally, the sevilian renaissance physician Agustín Farfán, the first to prepare and recommend early a drug made with oranges and lemons, in 1592.

Palabras clave: escorbuto, navegantes españoles, tratamiento. **Keywords:** Scurvy, spanish navigators, treatment.

El escorbuto recibió distintos nombres, todos ellos muy indicativos de la severidad de su padecimiento, por parte de los navegantes, españoles y portugueses, de la Era de los Descubrimientos Geográficos y siglos posteriores: el terrible mal, la peste de los mares, la peste de las naos, el mal de Loanda (para los portugueses), etc. Sin embargo, el escorbuto no fue privativo de los nautas embarcados durante largas, o muy largas,

travesías, también a lo largo de la Historia los hombres de los ejércitos, las poblaciones sitiadas por el enemigo, las migraciones que parecían no tener fin, etc., fueron sometidos a los azotes de algo parecido a un mal desatado por los dioses enfurecidos. Empero, hay que reconocer que los navegantes lo sufrieron con inusitado rigor y virulencia. Al menos, así nos lo contaron en nuestra etapa escolar y la investigación histórica lo confirma.

Siento la oportunidad, o conveniencia, de escribir sobre esta materia en el tiempo actual en el que se conmemora el V Centenario de la Primera Vuelta al Mundo (1519 - 1522), aquella gesta protagonizada por dos hombres (sin olvidar los intrépidos tripulantes) que gravitan en lo más alto de la Historia Universal: Fernando de Magallanes y Juan Sebastián Elcano. El primero portugués al servicio de la corona española y el segundo quien capitaneó la efeméride de la Primera Vuelta al Mundo. Empero, en justicia, como digo: acompañados, desde la partida de la orilla del Guadalquivir (puerto de Mulas), por más de 200 intrépidos héroes, muchos anónimos. Bien entendido, que la Vuelta al Mundo fue una consecuencia de la expedición ideada por Magallanes a las Islas de la Especias.

Y el escorbuto se hizo presente durante las largas travesías oceánicas, cobrándose muchas vidas. El testimonio de Antonio Pigafetta, sobresaliente que acompañaba a Magallanes en la nave Trinidad, la capitana, en la primera parte de tan excepcional gesta marítima, así lo acredita: "Pero por encima de todas las penalidades, esta era la peor: que les crecía a algunos las encías sobre los dientes -así los superiores como los inferiores de la boca-, hasta que de ningún modo les era posible comer: que morían de esta enfermedad". Tomado de la Crónica del primer viaje alrededor del mundo que escribió. Pigaffetta fue uno de los 18 superviviente que llegaron a Sevilla con el cargamento de clavo, a bordo de la nao Victoria.

Otro testimonio de la misma época (Era de los Descubrimientos Geográficos) lo ofrece Andrés de Urdaneta (famoso por la acertada propuesta del tornaviaje de Filipinas a Acapulco o Ruta de Urdaneta), con ocasión de la expedición de Fray García Jofré de Loaysa (se descubrió el Cabo de Hornos, "el acabamiento de tierras"), en la que, por cierto, murió Juan Sebastián Elcano de escorbuto: "Toda esta gente que falleció (unos 30 desde la salida al océano) murió de creerse las encías en tanta cantidad que no podían comer ninguna cosa y más de un dolor de pechos con esto; yo vi sacar a un hombre tanto grosor de carne en las encías como un dedo, y otro día tenerlas crecidas como si no hubiera sacado nada".

Con relación a esta efeméride marítima, ordenada por Carlos I, que se llevó a cabo entre 1525 y 1536, el hispanista Stanley G. Payne (365

momentos claves de la Historia de España, Espasa, 2016), describe la dramática situación a bordo: "Con la llegada del verano, el escorbuto comenzó a hacer mella en los tripulantes hasta que sus efectos se volvieron devastadores, (...)". Y prosigue el hispanista refiriéndose a Toribio Alonso de Zalazar, elegido nuevo capitán general, tras la muerte de Loaysa: "..., pues al poco de tomar el mando ya mostraba signos de padecer el escorbuto. En algún punto del océano entre las Marianas y las Molucas, dos semanas después del descubrimiento (atolón de Bokak), el joven capitán murió", cuando contaba unos treinta años de edad.

Un navegante español, extremeño u onubense, capitán Sebastián Vizcaíno, con ocasión de una expedición exploratoria por la costa oeste de California (1602), al mando de tres naves, describió por vez primera detalladamente la enfermedad y su primer tratamiento efectivo, al contraer el escorbuto parte de la tripulación y recobrar la salud en nueve días, cuando desembarcaron en la isla de Mazatlán. He aquí su testimonio escrito: "... cobraron todos salud y fuerzas y se levantaron de las camas, de suerte que cuando salieron las naos del puerto ya podían acudir a marear las velas y a gobernar el navío y hacer sus guardias como antes. (...), no hubo medicinas, ni drogas de botica, ni recetas, ni medicamentos de médicos y si algún remedio hubo, fue el refresco de las comidas frescas y comer de una frutilla que se halló en estas islas y los naturales de allí llaman xocohuitzles" (parecida a una manzana pequeña y oblonga).



Figura 1. Capitán Sebastián Vizcaíno. Explorador de la costa de California (1602).

Brillante página española que contribuyó, sin duda, al conocimiento de esta temida enfermedad de los navegantes y su tratamiento. El secreto contenido en la frutilla: vitamina C (ácido ascórbico). Aquellos intrépidos marinos desconocían las propiedades antiescorbúticas de la 'milagrosa' vitaminas y tardaría aún largo tiempo hasta su aplicación médica con base científica.

En la Era de los Descubrimientos, y tomando como base las provisiones alimenticias embarcadas en la Armada de la Especiería al mando de Fernando de Magallanes, según los documentos custodiados en el Archivo General de Indias de Sevilla, se ofrece el siguiente listado de productos:

Bizcocho, vino, aceite, vinagre, pescado seco, bastina seca, tocinos añejos, habas, garbanzos, lentejas, harina, ajos, quesos, miel, almendras, anchoas, sardinas blanca, pasas, ciruelas pasas, higos, azúcar, carne de membrillo, alcaparras, mostaza, arroz y sal. También algunos animales de carne: aves, vacas, puercos. Y agua que debían renovar en los sucesivos desembarcos, siempre que las condiciones geográficas fueran favorables (ríos, arroyos, embalses).

Tres cuestiones merecen comentarios: 1) se comprueba en el listado que no hay muchos productos de origen vegetal y, además, los pocos embarcados (ciruelas, higos), con posible contenido de vitamina C, muy difíciles de conservar durante la travesía; 2) interesante, para algunos historiadores, es la presencia de carne de membrillo (fuente muy dudosa de vitamina C), aunque ésta privativa para los mandos de las naos (capitanes, maestros, pilotos); y 3) en numerosas ocasiones los alimentos tenían que se racionados (también el agua), por orden de la máxima autoridad de la expedición, Magallanes. Bajo estas condiciones el escorbuto se convirtió en el padecimiento más sufrido por los navegantes y el que más muerte causó.

Desde finales del siglo XIX se sospechaba que el escorbuto era una enfermedad carencial causada por la falta de algún componente nutricional, que poco tiempo después, se identificaría como la vitamina C (ácido ascórbico), aunque el recorrido fue, como se aprecia, muy largo, demasiado largo, hasta alcanzar la feliz conclusión científica. En efecto, es generalmente aceptado que el médico

(cirujano) escocés, James Lind, (Edimburgo, 1716), enrolado temporalmente en la Armada británica (Royal Navy), inició el camino para la curación definitiva del escorbuto. Destinado entre 1746 y 1747 en el buque *Salisbury*, tuvo que hacer frente a la virulencia del escorbuto en parte de los tripulantes. Concretamente trató a 12 enfermos: "... todos tenían las encías podridas, manchas en la piel, lasitud y debilidad de las rodillas,...". Fue claro el diagnóstico de escorbuto.

Tomó la decisión de hacer una distribución de 6 parejas y a cada una de ellas suministró diariamente un suplemento alimenticio diferente para comprobar sus efectos: 1) Un cuarto de galón de sidra tres veces al día; 2) Dos cucharadas de vinagre tres veces al día; 3) Media pinta de agua de mar; 4) 25 gotas de elixir de vitriolo tres veces al día; 5) Semilla de nuez moscada tres veces al día y una mezcla de ajo, semilla de mostaza, bálsamo del Perú y resina de mirra; y 6) Dos naranjas y un limón al día. Resultado: la pareja de enfermos de escorbuto que había recibido el suplemente de los cítricos experimento una valorable mejoría.

Lind se retiró de la marina en 1748, ejerció la medicina y realizó una tesis acerca de las enfermedades venéreas, aunque también tuvo tiempo para escribir su obra *Tratado sobre la naturaleza, las causas y la curación del escorbuto*, publicada en 1753. Murió en 1794. El diseño de su estudio antiescorbútico está considerado como una aproximación al primer ensayo clínico de la Historia de la Medicina. No obstante, el Almirantazgo británico no ordenó el abastecimiento de sus buques con naranjas y limones hasta 1795, un año después de su fallecimiento.

Y ahora es de justicia relatar resumidamente los antecedentes en el conocimiento y tratamiento del escorbuto por parte de navegantes y sanitarios españoles. Ya se ha expuesto el caso memorable del capitán Sebastián Vizcaíno, con ocasión de su expedición por las costas de California en 1602. Ahora, en primer lugar, analicemos el empeño del Almirante sevillano Antonio de Ulloa (1716-1795), descubridor del platino y mucho más, coetáneo del escocés James Lind. de California en 1602. Ahora, en primer lugar, analicemos el empeño del Almirante sevillano Antonio de

Ulloa (1716-1795), descubridor del platino y mucho más, coetáneo del escocés James Lind.

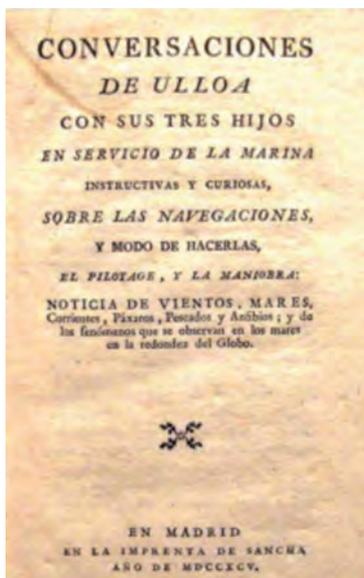


Figura 2. Documento *Conversación de Ulloa con sus tres hijos en servicio de la marina* (título abreviado).

Se conserva un abultado texto, titulado *Conversaciones de Ulloa con sus tres hijos en servicio de la marina* (título corto), en el que hace referencia extensa al escorbuto y su incidencia entre los navegantes que le acompañaron en sus travesías oceánicas. Pues bien, durante el segundo viaje (1758) que realizó a América el Almirante ilustrado hispalense, a bordo del buque *San Rafael*, recomienda, con pleno convencimiento, la administración de zumo de limón puro como preventivo antiescorbútico. Así queda recogido en las *Conversaciones*:

“Parece que el uso del agrio de limón y el aguardiente, en las cantidades que se han dicho, debían ser repugnantes al tomarlos, y producir efectos nocivos á la salud (...); pero no es así: el limón bebido como si fuese agua por los escorbúuticos, les es tan grato al paladar, que no quedan satisfechos con la porción de una ración, ó la quarta parte de un quartillo que les daba; (...); y en que continuando esto todo el tiempo que duró la navegación, no solo no se debilitaron sus estómagos, sino es que los mantuvieron robustos hasta llegar á puerto”.

Por tanto, tal como sostiene, y con razón, el profesor Orozco Acuaviva: “... es la primera vez que en la literatura se encuentra el uso de limón

puro como terapéutica específica del escorbuto”. Recordemos que la Royal Navy no lo hizo hasta 1795.

Caso especial es la expedición capitaneada por Alejandro Malaspina (1789-1794), una proeza de intento de circunnavegación con fines científicos (historia natural, cartografía, astronomía, hidrología, medicina, etc.), políticos, económicos y sociales, auspiciada por el rey ilustrado Carlos III, algo posterior a las misiones marítimas del Salisbry y los tratamientos antiescorbúuticos del médico-cirujano escocés James Lind.

Destinado en una de las corbetas (*Atrevida* y *Descubierta*) de Malaspina viajó el médico-cirujano, de la Real Armada, nacido en Osuna (Sevilla), Pedro María González Gutiérrez (1760-1839), autor de un notable y afamado tratado de medicina e higiene naval, editado en Madrid (1805), titulado *Tratado de las enfermedades de la gente de la mar* (título corto). Contó con la colaboración de Francisco Flores Moreno, ambos formados en el prestigiado Real Colegio de Cirugía de Cádiz. No es el lugar de hacer una disección, ni siquiera abreviada, del libro aludido, pero sí mencionar que el capítulo séptimo está dedicado a analizar las causas remotas del escorbuto, su descripción médica y su tratamiento que, el cirujano Pedro María González, lo fundamenta (¡y acierta!) en la ingestión de frutas, entre ellas naranjas y limones, y verduras, en la dieta habitual de oficiales y tripulación.



Figura 3. *Tratado de las enfermedades de la gente de mar* (título abreviado) de Pedro María González. Imprenta Real de Madrid, 1805.

Tres hechos, relacionados con el tratamiento del escorbuto, son determinantes en la extraordinaria y singular aportación de Pedro M^a González:

- 1.- Como oficial médico responsable de la expedición ordenó el embarque de “abundante acopio de zumo de naranjas y limón” (cítricos muy ricos en vitamina C).
- 2.- Dejó escrito en su libro: “Y añadimos de nuestra propia experiencia haber curado el escorbuto en las islas Marianas con solo el uso de las verdolagas” (rica en vitamina C).
- 3.- Al finalizar su amplísimo y brillante estudio sobre el ‘mal de los navegantes’, firma la siguiente conclusión: “Por último, el escorbuto es una enfermedad que jamás se cura radicalmente durante la navegación, y su exterminio está reservado para los ayres de tierra, o más bien para el uso de los vegetales recientes” presencia de vitamina C).

González recomendó diversas dietas antiescorbúticas durante las larguísimas travesías oceánicas, aunque únicamente se transcribe una de ellas, que puede resultar incluso curiosa, pero cuya fórmula es básicamente antiescorbútica: “Tampoco debe olvidarse el gazpacho (negrita del autor), composición nacional muy apropiada para el escorbuto y a la que el pueblo español vive acostumbrado”.

Como afirmó en 1935 Gregorio Marañón (conferencia pronunciada en el Museo Naval de Madrid), refiriéndose al escorbuto: “..., aquellos marineros moribundos, (...), se ponían teatralmente buenos, sin más que tomar frutas frescas, o, como dice González, verdolagas (cualquier verdura). Este gran médico recuerda con orgullo que la primera descripción exacta de la enfermedad, (...), la describió un español, no médico, el capitán Sebastián Vizcaíno, que en 1602 hizo un viaje de exploración a la costa oeste de California”.

La ambiciosa expedición de Malaspina está considerada como la primera que no tuvo bajas por escorbuto, gracias a la visión, conocimiento y buen hacer del ursonense Pedro María González, oficial médico responsable. Y conviene recordarlo. Y conviene saberlo.

Para concluir este sucinto análisis del temible

mal (y sufrimiento) de los marineros durante siglos, desde la perspectiva de la aportación de algunos navegantes españoles, volvamos la vista de nuevo a la Era de los Descubrimientos Geográficos (siglo XVI) y, concretamente, a un médico sevillano: Pedro García Farfán, más conocido por Fray Agustín Farfán, nombre tomado tras abrazar, al enviudar, la orden de los agustinos. Nació en la ciudad hispalense en torno a 1532, estudió medicina en las universidades de Alcalá y Sevilla. Ejerció la medicina en su ciudad natal y Nueva España, a donde se trasladó con su familia en 1557. Murió en México en 1604.

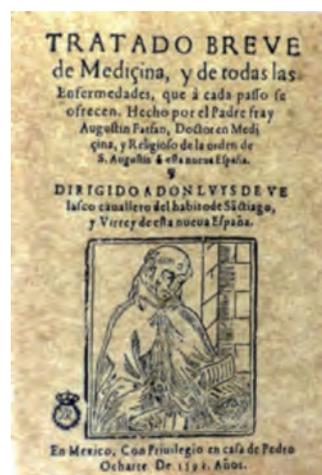


Figura 4. *Tratado breve de Medicina, y todas las enfermedades* (título abreviado) de Agustín Farfán. Editado en México (Nueva España), en 1592.

Lo más destacado de su obra es la autoría del *Tratado breve de anathomia y chirurgia, y de algunas enfermedades que mas comunmente suelen haver en esta Nueva España*, editada en México (1579), como una primera versión. No obstante, es más conocida la segunda versión de la misma (1592): *Tratado breve de medicina, y de todas las enfermedades* (título corto), bastante más elaborada. Con todo, nuestro interés se focaliza en el asunto médico y farmacológico del escorbuto y, a este respecto, Juan Esteva de Sagrera manifiesta en un artículo (2006): “El uso sistemático de cítricos por la marina británica tuvo varios antecesores renacentistas, aunque se trataba de observaciones esporádicas. En 1569, Sebastián Vizcaíno, explorador del Pacífico, al tocar tierra en México, ordenó que proporcionaran a sus hombres alimentos frescos, entre ellos papayas,

plátanos, naranjas, limones, calabacín y bayas. A los 10 días su tripulación, diezmada por el escorbuto, se había restablecido. En 1592, Agustín Farfán, fraile boticario, recomendaba el empleo de un medicamento con medio limón y media naranja amarga, con un poco de alumbre quemado”.

Comprobamos que hace referencia a Vizcaíno, citado más arriba, y al fraile sevillano Farfán, médico, no boticario, aunque sí fue ‘visitador de boticas’. También es cierto que en aquella época renacentista los médicos conocían y

entendían de elaboración de preparados, como el citado a base de limones y naranjas. Magnífico precedente en la historia de la lucha contra el escorbuto de los navegantes.

Por todo lo brevemente expuesto, entiendo que debemos considerar al fraile sevillano, Agustín Farfán, un auténtico pionero de la recomendación y utilización de preparados farmacéuticos contra el escorbuto, en cuya composición entraban los cítricos y algo más (alumbre) para su elaboración.

Referencias bibliográficas

Blanco JM. Pedro María González Gutiérrez. Vida y obra de un médico-cirujano de la Real Armada. Discurso de Recepción como Académico de número. Real Academia de Medicina y Cirugía de Cádiz, 2007.

Comellas JL. La primera vuelta al mundo. Madrid: Rialp; 2012.

Esteva J. La farmacia, comercio y ciencia. Monardes y Hernández como ejemplo. *Offarm*. 2006;23(11):69.

González PM. Tratado de las enfermedades de la gente de mar, en que se exponen sus causas, y los medios de precaverlas. Madrid: Imprenta Real; 1805.

Lind J. Treatise of the Scurvy. Edimburgo: Editorial A. Kincaid y A. Donaldson; 1753.

Payne SG. 365 momentos claves de la historia de España. Madrid: Espasa; 2016.

Pigafetta A. La primera vuelta al mundo. Madrid: Alianza Editorial; 2019.

Ulloa A. Conversaciones de Ulloa con sus tres hijos en servicio de la marina instructivas y curiosas, sobre las navegaciones, y modo de hacerlas, el pilotage, y la maniobra. Madrid: Imprenta de Sancha, 1795.

Este trabajo debe ser citado como:

Herrera J. Escorbuto o la enfermedad de los nautas. Aportación de los navegantes españoles a su conocimiento y tratamiento. *Rev Esp Cien Farm*. 2020;1(1):79-84.



Artículo original

Información aerobiológica desde la farmacia comunitaria. La red aerobiológica de la región de Murcia

Aerobiological information from the community pharmacy. The aerobiological network in región of Murcia

Moreno-Grau S^{1,2*}, Elvira-Rendueles, B¹, García-Moreno SI³, Tovar I^{4,2}, Sierra S³, Moreno JM¹

¹Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. Universidad Politécnica de Cartagena. Murcia. España

²Academia de Farmacia Santa María de España de la Región de Murcia. Murcia. España

³Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España

⁴Colegio Oficial de Farmacéuticos de la Región de Murcia. Murcia. España

*Correspondencia: stella.moreno@upct.es

Recibido: 04.07.20; aceptado: 18.07.20

Resumen: Objetivos: Con este trabajo queremos asentar los fundamentos que permitan establecer sinergias entre las redes aerobiológicas y la farmacia comunitaria, permitiendo que la información aerobiológica redunde en beneficio de la calidad de vida del paciente polínico, mediante los servicios farmacéuticos profesionales. Métodos: Se describe el método de muestreo aerobiológico y de identificación y recuento de los palinomorfos presentes en el bioaerosol. Se ha realizado una revisión bibliográfica en la web of Science y en MedPlus con los descriptores alergia, aerobiología, farmacia comunitaria, atención farmacéutica y analizado el contenido de las publicaciones recuperadas. Resultados: Se presentan las integrales anuales del polen (IAP) para los tipos polínicos mayoritarios de los puntos de muestreo de Cartagena, Murcia y Lorca (REAREMUR) y las medias semanales de los tipos polínicos *Artemisia* en las tres ciudades, *Amaranthaceae* en Cartagena y Murcia y *Casuarina* en Murcia. Se ha revisado la bibliografía recuperada con los descriptores definidos encontrando prácticamente inexistentes los trabajos en los que se utilice la información aerobiológica dentro de los servicios de la farmacia comunitaria. Conclusiones: La evitación de la exposición al alérgeno es la medida preventiva más eficaz para el enfermo polínico, que demanda el acceso a la información aerobiológica que le permita emprender las acciones que mejoren su calidad de vida. La Farmacia comunitaria debe tomar la iniciativa e incluir en su práctica el conocimiento y difusión de la información aerobiológica, obtenida, como en el caso de la Región de Murcia, con la colaboración del conjunto de la profesión representada por el Colegio.

Abstract: Objectives: This work aims to ground future synergies between the aerobiological networks and the community pharmacy, by providing aerobiological information that will benefit the quality of life of pollen-allergic patients, through professional pharmaceutical services. Methods: This work describes the method of aerobiological sampling and the identification and counting of palinomorphs present in the bioaerosol. A bibliographic review was carried out on the Web of Science and in MedPlus with the descriptors allergy, aerobiology, community pharmacy, pharmaceutical care, together with the study of some recovered publications. Results: This work shows the annual integrals of pollen (IAP) for the major pollen types of the sampling points of Cartagena, Murcia and Lorca (REAREMUR). It also depicts the weekly averages of *Artemisia* in the three cities, *Amaranthaceae* in Cartagena and Murcia and *Casuarina* in Murcia. It reviews the bibliography recovered under the defined descriptors,

finding that seldom has the aerobiological information been used within the community pharmacy services. Conclusions: The avoidance of allergen exposure is the most effective preventive measure for the allergic patient. Thereby, patients need access to aerobiological information so that they can take actions to improve their quality of life. The Community Pharmacy must take the initiative and include in its practice the knowledge and dissemination of aerobiological information obtained, as in the case of the Region of Murcia, with the collaboration of the entire profession represented by the College.

Palabras clave: Aerobiología, polinosis, farmacia comunitaria. **Keywords:** Aerobiology, pollinosis, community pharmacy

1. Introducción

La aerobiología es una disciplina científica que, en la amplitud del término, se dedica al estudio de las partículas bióticas presentes en el aerosol atmosférico, las sustancias que pueden emitir los organismos vivos a la atmósfera y los efectos que los agentes atmosféricos puedan tener sobre ellos [1]. Cuantitativamente, el mayor número de grupos de investigación que trabajan en aerobiología en nuestro país centran su estudio en la caracterización del contenido en granos de polen y esporas en el aerosol atmosférico.

Estas partículas de origen natural producen sobre los individuos sensibles una enfermedad alérgica, denominada polinosis, que es una reacción de hipersensibilidad tipo I, mediada por IgE que desarrollan las personas atópicas. Esta patología cursa principalmente con rinitis, conjuntivitis, o las dos a la vez (rinoconjuntivitis) y puede dar lugar a la aparición de asma alérgico [2].

La alergia no se puede curar, pero hay tres abordajes terapéuticos principales: el primero y de gran importancia, es la evitación de la exposición; el segundo, reducir la sintomatología con medicamentos; y el tercero, la inmunoterapia específica [3]. Es aquí donde consideramos fundamental la involucración de la farmacia comunitaria debido a que está en la primera línea de la labor asistencial, por su proximidad, disponibilidad y confianza conseguida día a día en el trato con el paciente.

El farmacéutico recibe consultas de pacientes que presentan síntomas que pueden o no tener diagnosticada la alergia al polen. Ambas situaciones requieren la derivación al médico, en el caso de los pacientes diagnosticados, para evaluar la eficacia y cumplimiento del tratamiento y en el caso de pacientes no diagnosticados

para su valoración. La primera actuación del farmacéutico es dar a conocer las medidas higiénico-sanitarias adecuadas que permitan un mayor control ambiental del entorno del paciente, y por tanto reducir la exposición a los alérgenos causantes: evitar salir a la calle en las horas con mayor carga alérgica, disponer de filtros adecuados de aire acondicionado, tender la ropa en el interior para evitar que se adhiera polen, mantener una adecuada higiene de los utensilios personales y del mobiliario de la casa, evitar las tapicerías, alfombras o moquetas [4].

Frecuentemente, se confunden sus síntomas con los de un resfriado común o gripe, y por este motivo el paciente se dirige a la farmacia, incluso antes de acudir al médico. La presencia de episodios con estornudos muy intensos es altamente sugerente de una rinitis alérgica, así como una rinorrea acuosa e intensa que no llega a producir obstrucción. Entre los elementos diferenciales más claros para la rinitis alérgica está la presencia de un picor nasal muy intenso y conjuntivitis, mientras que en las formas infecciosas es frecuente la existencia de malestar general y cefalea [5].

Una vez establecido el cuadro de rinitis alérgica, y no existiendo ningún factor que haga recomendable la remisión del paciente al médico, niños menores de dos años con síntomas de rinitis alérgica, ancianos afectados por patologías sistémicas, embarazadas, madres lactantes, pacientes con cardiopatías o broncopatías, pacientes que refieran disnea, sibilancias, opresión en el tórax dolor de cabeza o de oídos, secreción nasal u ocular de tipo purulento fiebre o tos persistentes [6], el farmacéutico empleará el servicio profesional farmacéutico de indicación farmacéutica que consiste en aconsejar medicamentos que no requieran prescripción médica para tratar esos

síntomas y permitir al paciente desarrollar una vida normal.

El tratamiento farmacológico se basa en la utilización de agentes vasoactivos, capaces de reducir la rinorrea (descongestivos adrenérgicos), así como fármacos activos para prevenir o controlar la respuesta alérgica del paciente (antihistamínicos, corticosteroides, antialérgicos e inmunoterapia) [7].

Esta es una enfermedad que frecuentemente es debilitante, produciendo un impacto importante en la calidad de vida, y que tiene como consecuencia la pérdida de un importante número de horas bien, en edades tempranas, de formación personal o, en adultos, de trabajo, lo que acarrea grandes costes económicos, al margen de los ligados a su diagnóstico y tratamiento. La Asociación Europea de Alergia e Inmunología Clínica estima que el asma y la rinitis alérgica son responsables de la pérdida anual de más de 100 millones de días de trabajo y asistencia a los centros docentes, con unos costes indirectos evitables en la UE que oscilan entre los 55 mil millones y 151 mil millones de euros anuales, con un ahorro estimado si se realiza un buen tratamiento de 142 mil millones de euros/año [8].

En cuanto a su prevalencia en España, según el informe Alergológica 2015 [9], en el 79,3% de los pacientes con rinitis y conjuntivitis su origen es alérgico. Con unos porcentajes de alergia del 70,8% a granos de polen cifra que muestra un importante aumento con respecto a la edición de alergológica de 2005, y que oscila entre el 96,3% de la Comunidad de Castilla La Mancha y el 16% de las Islas Canarias (situándose la Región de Murcia en un 74,5%) y el 7,6% a hongos. Se puede destacar que el 42,2% de los enfermos con rinitis y conjuntivitis presentan sensibilización únicamente a granos de polen, mientras que solo a hongos tan solo el 0,9%. En relación con el asma, el 82,2% es asma alérgica, con un 65,6% de pruebas cutáneas positivas a extractos de granos de polen y un 10,1% a hongos. El tipo polínico que causa una mayor sensibilización en nuestro país es el de gramíneas, seguido del de *Olea*, especies de *Cupressus*, *Platanus* y *Salsola*.

La vigilancia de redes aerobiológicas genera una información imprescindible para evitar la exposición al alérgeno, en el diagnóstico etiológico correcto y, por tanto, para incrementar

la eficacia de la tercera de las estrategias de abordaje de la enfermedad, la inmunoterapia. La inmunoterapia específica subcutánea está indicada en cuadros graves de rinitis alérgica, que cursa con síntomas muy intensos o asociados a otros síntomas respiratorios (disnea, sibilancias), y siempre que las pruebas alérgicas demuestran que existe sensibilidad a un alérgeno y la exposición al alérgeno es inevitable. En niños se acepta el inicio de la inmunoterapia a partir de los cinco años [7].

La alta variabilidad espacial y temporal en los niveles de palinormos en el bioaerosol lleva asociada la necesidad de realizar un seguimiento en diversas localizaciones y mantener operativa la actividad a lo largo de los años, para generar una información útil y eficaz para lo fines perseguidos.

Las redes de vigilancia aerobiológica determinan de modo cualitativo, tipos polínicos y fúngicos diferenciados, y cuantitativo, concentración volumétrica de cada uno de ellos, como media diaria a lo largo del año. Esta información es suministrada por diversas vías tanto a los especialistas en alergia e inmunología clínica como a la sociedad en general, con el fin de que puedan llegar hasta el enfermo alérgico. En muchas Comunidades Autónomas existen redes aerobiológicas, la mayor parte de ellas fruto del esfuerzo de grupos de investigación. Las Comunidades Autónomas de Madrid y el País Vasco disponen de redes financiadas por sus propios Gobiernos autonómicos, dotadas de personal propio. En las de las Comunidades Autónomas de Galicia, Castilla y León y Castilla-La Mancha los grupos de investigación tienen convenios con los Gobiernos Autonómicos que financian por periodos de tiempo programados los estudios aerobiológicos. Que los autores conozcamos, el Colegio de Farmacéuticos de Zaragoza financia los estudios aerobiológicos en esa ciudad, y el Colegio de Farmacéuticos de la Región de Murcia viene colaborando con el grupo de investigación Aerobiología y Toxicología Ambiental de la Universidad Politécnica de Cartagena y desde el año 2008, con la creación de la Red Aerobiológica de la Región de Murcia (REAREMUR) da en su página web la información aerobiológica de los puntos de muestreo ubicados en Cartagena, Murcia y Lorca, además de financiar el traslado

de los captadores desde los laboratorios sitos en Cartagena hasta los Hospitales Reina Sofía de Murcia y Rafael Méndez de Lorca, y viceversa, en los que personal de los Servicios de Alergia e Inmunología Clínica se encargan de la toma de muestras en esas dos ciudades. En el año 2019 se ha suscrito un Convenio de Colaboración con el Ayuntamiento de Murcia para los estudios aerobiológicos en esa ciudad.

El objetivo de este trabajo es promover las bases que permitan avanzar en el establecimiento de sinergias entre las redes aerobiológicas y la farmacia comunitaria, optimizando la información que producimos para la mejora de la calidad de vida del paciente alérgico, utilizando para ello una herramienta tan importante como es la atención farmacéutica, que desde nuestro punto de vista no está siendo aprovechada en la medida de lo posible para esta finalidad. Como paso previo a nuestra propuesta, vamos a describir la información que suministramos en REAREMUR y cómo se produce, información esencial para conseguir la adhesión de la farmacia comunitaria a este proyecto.

2. Materiales y Métodos

2.1. Muestreo aerobiológico

Los muestreos en REAREMUR se realizan con un captador tipo Hirst, modelo VPPS 2000 Lanzoni s.r.l., Italia. Un equipo volumétrico de impacto activo en el que una bomba de aspiración calibrada a un flujo de 0,1667 L/s (10 L/min), atraviesa la boca de entrada del captador (una rendija de 14 x 2 mm). El aire es obligado a desviarse de su trayectoria, y se encuentra en su camino con el cabezal de muestreo, por lo que las partículas que superan el punto de corte del equipo no son capaces de adaptarse al cambio en la dirección del flujo del aire y chocan con el cabezal, en el que se encuentra una cinta de polipropileno recubierta con una silicona adhesiva, por lo que las partículas quedan adheridas. El cabezal dispone de un mecanismo de relojería que permite su movimiento a una velocidad de 2 mm/h (48 mm/día), teniendo capacidad para recoger la muestra de modo consecutivo durante 7 días. En el cambio de cabezal es necesario comprobar el flujo de entrada, y, caso necesario, proceder a su ajuste. El conjunto está montado sobre una pieza móvil, orientable mediante una veleta, por lo que la boca

de muestreo siempre se encuentra a favor del viento. Las características del muestreador han sido recogidas en la norma EN 16868: 2019[10].

El cabezal es retirado al finalizar el periodo de muestreo y sustituido por un nuevo cabezal. Para los cambios de cabezal, se dispone de recipientes específicos que permiten mantener su integridad antes y después del muestreo.

2.2. Preparación de la muestra para el análisis

La manipulación del cabezal de muestreo se realiza en una campana de flujo laminar Telstar AV-100. La cinta es retirada del cabezal y colocada sobre una regleta de corte, provista de marcas horarias, que permite dividir la cinta en segmentos de 48 mm correspondientes a cada día de muestreo. Los segmentos diarios son montados sobre portaobjetos con glicerogelatina y cubiertos con cubreobjetos y glicerogelatina fuchsinada. Tras un periodo de reposo suficiente para que los palinomorfos absorban la tinción, las muestras son analizadas al microscopio óptico, leyendo la longitud completa de cuatro transectos horizontales, a unos aumentos que permitan la lectura de una superficie igual o mayor del 10% del total de la superficie de muestreo diario. Disponemos de dos microscopios un Olympus BH-2 y un Zeiss Axioskop 2 Plus, provistos de óptica Plan Acromática. Los recuentos los realizamos con objetivo 50x inmersión y ocular 10x, utilizando el objetivo de 100x para una mejor identificación. En ambos equipos la lectura de cuatro transectos horizontales permite cubrir la superficie especificada.

2.3. Identificación de los tipos polínicos y fúngicos

La correcta identificación de los distintos palinomorfos requiere de personal especializado, bien formado en las características morfológicas de los diferentes taxones polínicos y fúngicos y en el manejo de las claves de identificación y material gráfico. Además, se dispone de una palinoteca de referencia en la que los granos de polen de plantas debidamente clasificadas por expertos botánicos se preparan en las condiciones del muestreo aerobiológico.

Las características morfológicas más importantes son número y tipo de aperturas, ornamentación, tamaño, unidades, forma, etc.

Los recuentos se centran en la caracterización de los tipos polínicos y fúngicos (por acuerdo en el seno de la Red Española de Aerobiología [11] se centran en los tipos *Alternaria*, *Cladosporium cladosporioides* y *Cladosporium herbarum*), y su cuantificación. Una vez se dispone del recuento, se aplica el algoritmo desarrollado para cada microscopio y se calcula la concentración de cada palinomorfo en granos/m³, la suma de todos los tipos polínicos en un día la denominamos polen total. Para la difusión se elaboran dos tipos de información, una en la que se utiliza una escala o umbrales de información, mejor adaptada para el público en general, y los datos cuantitativos obtenidos, información que se suministra a los profesionales sanitarios. La base de datos aerobiológica es fundida con una base de datos meteorológica obtenida de la AEMET para cada punto de muestreo, para las investigaciones propias del grupo de trabajo.

2.4. La Red Aerobiológica de la Región de Murcia

Aunque nuestro objetivo es poder disponer de un captador en cada una de las IX áreas de salud de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, disponemos de tres puntos de muestreo situados en las ciudades de Cartagena, Murcia y Lorca. Los estudios aerobiológicos en Cartagena se iniciaron a finales de la década de los años 80 del pasado siglo como consecuencia de los brotes de asma epidémico que se padecieron en la ciudad en los años 1987 y 1988. En el año 1993 con la creación de la Red Española de Aerobiología se instaló el captador Lanzoni que hemos descrito, por lo que se dispone de datos de esta ciudad desde el 21 de marzo de ese año hasta la actualidad. El 17 de junio de 2009 se iniciaron los muestreos en la ciudad de Murcia y el 19 de febrero de 2010 los muestreos en Lorca.

En cuanto a las características de las tres ciudades:

Cartagena

Es la capital de la Comarca natural denominada Campo de Cartagena, con alrededor de 400000 habitantes en una superficie de unos 1850 km². El Municipio de Cartagena tiene una extensión de 558,3 km² (Ayuntamiento de Cartagena 2013) y una población de 215 418 habitantes en 2019 (Ayuntamiento de Cartagena 2020). La ciudad, a

orillas del mediterráneo, se encuentra situada al nivel del mar.

Lorca

Capital de la Comarca del Alto Guadalentín, con una población de unos 142 000 habitantes y una superficie de 2071,8 km². El Municipio de Lorca tiene una superficie de 1675,3 km², el segundo municipio en extensión de España, y una población de 94 404 habitantes en 2019, está situada a 353 masl (Ayuntamiento de Lorca 2020).

Murcia

Es la capital de la Región de Murcia y de su área metropolitana, con una superficie de 1183,4 km² y una población de unos 625000 habitantes. El Municipio de Murcia tiene una superficie de 886 km² y una población de 463258 en 2019, situada a 43 masl.

Las tres ciudades conforman prácticamente los vértices de un triángulo isósceles, con una distancia entre Lorca y Cartagena de 61,1 km y de Lorca a Murcia de 61,8 km; la distancia entre Cartagena y Murcia es de 42,2 km. La ciudad más situada al oeste es Lorca, Murcia la que se sitúa más al norte y Cartagena más al sur y al este.

Los datos aeropalínológicos diarios obtenidos en las tres ciudades son suministrados semanalmente al Colegio Oficial de Farmacéuticos de la Región de Murcia, en un formato pensado para el enfermo alérgico, fácilmente interpretable (<https://nuevaweb.cofrm.com/aerobiologia/>). A los servicios de alergia e inmunología clínica de los Hospitales Universitarios de Santa Lucía (Cartagena), Reina Sofía (Murcia) y Rafael Méndez (Lorca) y a las Asociación AlergoMurcia. Los datos de Cartagena y Murcia son suministrados al Comité de Aerobiología de la Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica que los publica en su web (<https://www.polenes.com/>). Los datos de Cartagena se aportan a la base de datos de la Red Española de Aerobiología, rama técnica de la Asociación Española de Aerobiología, que tiene su Centro Coordinador en la Universidad de Córdoba, y que a su vez vuelca esta información en la Red Europea de Aeroalérgenos, con sede en Viena (<https://ean.polleninfo.eu/Ean/> y <https://www.polleninfo.org/>).

2.5. Atención farmacéutica

Se ha realizado una revisión bibliográfica en la web of Science y en MedPlus con los descriptores alergia, aerobiología, farmacia comunitaria, atención farmacéutica y analizado el contenido de las publicaciones recuperadas.

3. Resultados y discusión

3.1. Rasgos aerobiológicos principales de las ciudades de Cartagena, Murcia y Lorca

Se han identificado un total de 63 tipos polínicos en la Región de Murcia (en Cartagena 52 y en Murcia y Lorca 59) y hasta 88 tipos

fúngicos diferentes. La media del polen total anual acumulado (Integral anual del polen, IAP) en el periodo 2010-2019 es para Cartagena de 16332 granos/m³, de 25459 granos/m³ para Murcia y de 23343 granos/m³ para Lorca.

Consideramos que en la Región de Murcia 17 tipos polínicos son mayoritarios por superar la media de los valores anuales acumulados (IAP) el valor de 100 granos/m³ en alguna de las tres ciudades. La figura 1 recoge el valor medio del IAP en el periodo 2010-2019 para estos tipos polínicos mayoritarios, en la figura 1a se muestran los diez tipos polínicos que superan en alguna de las tres ciudades una media del IAP de 1000 granos/m³, la figura 1b los siete que no alcanzan ese valor.

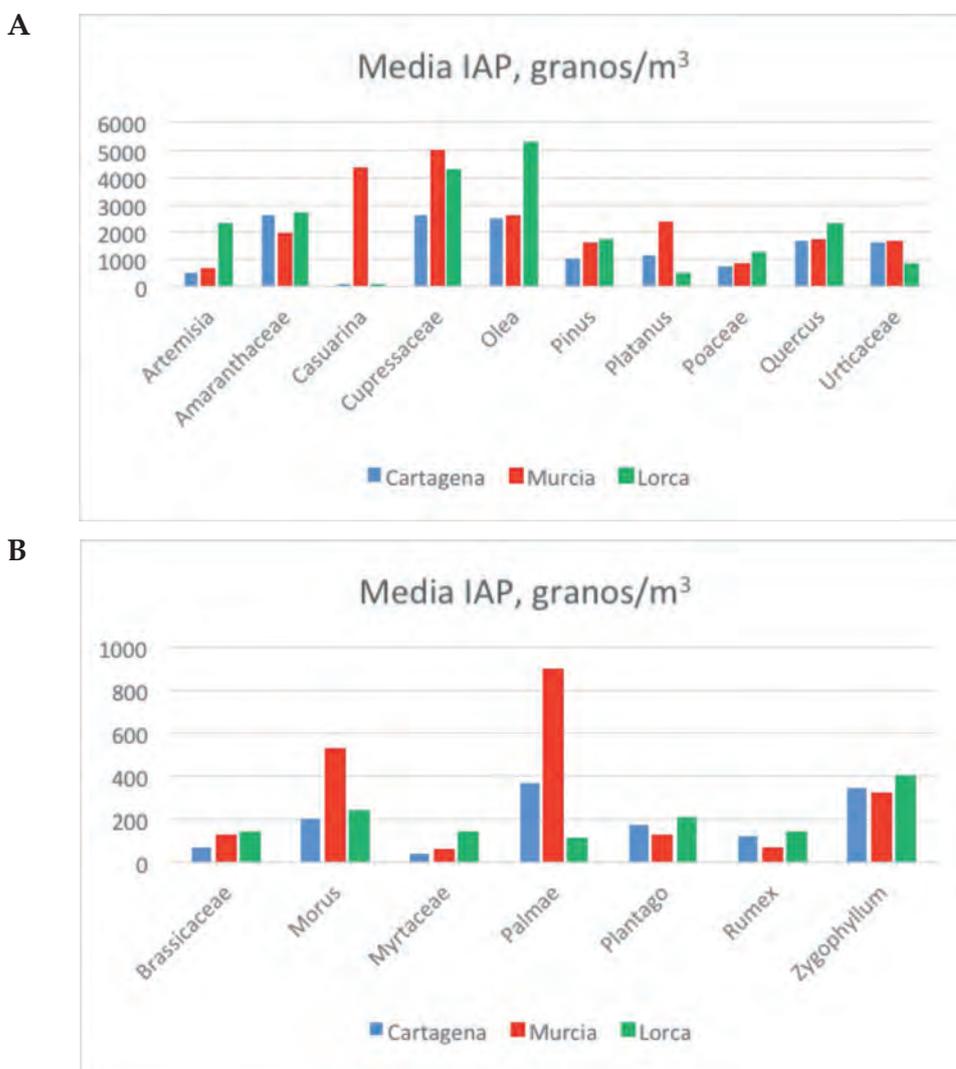


Figura 1. Media del periodo 2010-2019 del índice polínico anual de los tipos polínicos mayoritarios en la Región de Murcia. A) Tipos polínicos con media del IAP > 1000 granos/m³ en una de las tres ciudades; B) Tipos polínicos con media del IAP < 1000 granos/m³ en una de las tres ciudades

En la tabla 1 se recogen los valores mínimos y máximos del IAP para cada uno de los tipos polínicos y el polen total, junto con el o los años en los que se ha alcanzado ese valor.

Tabla 1. Valores mínimos y máximos de la integral anual del polen (IAP) para los tipos polínicos mayoritarios en Cartagena, Murcia y Lorca, y los años en los que se han producido.

Cartagena				
Tipo polínico	IAPmín granos/m ³	Año IAPmin	IAPmax granos/m ³	Año IAPmax
Amaranthaceae	1558	2018	3719	2010
<i>Artemisia</i>	261	2013	778	2018
Brassicaceae	22	2010	190	2019
<i>Casuarina</i>	35	2011	183	2019
Cupressaceae	1291	2016	4456	2011
<i>Morus</i>	50	2010	450	2018
Myrtaceae	--	2011	73	2019
<i>Olea</i>	999	2014	3853	2010
<i>Quercus</i>	784	2011	2477	2012
Palmae	210	2014	495	2011
<i>Pinus</i>	379	2017/2019	1706	2010
<i>Plantago</i>	70	2014	384	2010
<i>Platanus</i>	443	2017/2019	2747	2018
Poaceae	404	2014	1492	2013
Urticaceae	924	2016	2425	2011
<i>Rumex</i>	34	2014	173	2010
<i>Zygophyllum</i>	169	2014	496	2017/2019
Total	10140	2014	19302	2010
Murcia				
Tipo polínico	IAPmín granos/m ³	Año IAPmin	IAPmax granos/m ³	Año IAPmax
Amaranthaceae	978	2013	3038	2019
<i>Artemisia</i>	265	2013	1344	2019
Brassicaceae	51	2016	316	2019
<i>Casuarina</i>	2239	2016	7548	2019
Cupressaceae	2287	2016	9694	2011
<i>Morus</i>	145	2014	977	2019
Myrtaceae	27	2018	92	2011
<i>Olea</i>	1410	2016	4623	2019
<i>Quercus</i>	526	2013	3743	2019
Palmae	635	2010	1510	2019
<i>Pinus</i>	590	2013	3592	2010
<i>Plantago</i>	57	2016	244	2010
<i>Platanus</i>	823	2014	3558	2019
Poaceae	646	2016	1218	2019
<i>Rumex</i>	14	2014	103	2010
Urticaceae	1047	2014	2597	2011
<i>Zygophyllum</i>	127	2013	447	2019
Total	14795	2016	39768	2019

Lorca				
Tipo polínico	IAPmín granos/m ³	Año IAPmin	IAPmax granos/m ³	Año IAPmax
Amaranthaceae	742	2016	4374	2019
<i>Artemisia</i>	491	2015	5762	2011
Brassicaceae	48	2016	262	2019
<i>Casuarina</i>	20	2010	98	2019
Cupressaceae	1475	2016	9450	2011
<i>Morus</i>	64	2016	703	2019
Myrtaceae	32	2016	276	2019
<i>Olea</i>	953	2016	8669	2010
<i>Quercus</i>	339	2016	5467	2019
Palmae	47	2016	187	2019
<i>Pinus</i>	634	2017	3721	2011
<i>Plantago</i>	32	2016	383	2010
Poaceae	252	2016	2321	2013
<i>Rumex</i>	27	2016	188	2010
Urticaeae	347	2016	1533	2011
<i>Platanus</i>	93	2013	1123	2019
<i>Zygophyllum</i>	85	2016	709	2019
Total	6975	2016	37998	2011

Estos tipos polínicos suponen en Cartagena el 95,9% del polen total (rango 95,1% en 2019 al 96,9% en 2010); el 96,9% en Murcia (rango 96,2% en 2012 al 97,4% en 2013) y el 96,1% en Lorca (rango 94,3% en 2018 al 97,0% el 2010).

La figura 2 muestra para las ciudades de Cartagena, Lorca y Murcia la media semanal del

periodo 2010 a 2019 del tipo polínico *Artemisia*. La figura 3 para la ciudad de Cartagena y este periodo la media semanal del tipo polínico *Amaranthaceae* y del polen total. La figura 4 muestra para la ciudad de Murcia, para este periodo, la media semanal del tipo polínico *Casuarina* y la del polen total.

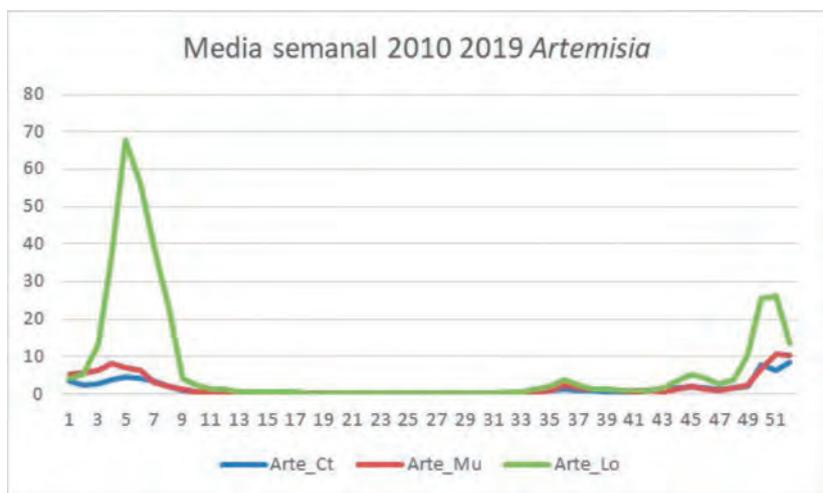


Figura 2. Media semanal del tipo polínico *Artemisia*, granos/m³, en el periodo 2010-2019 en Cartagena, Murcia y Lorca.

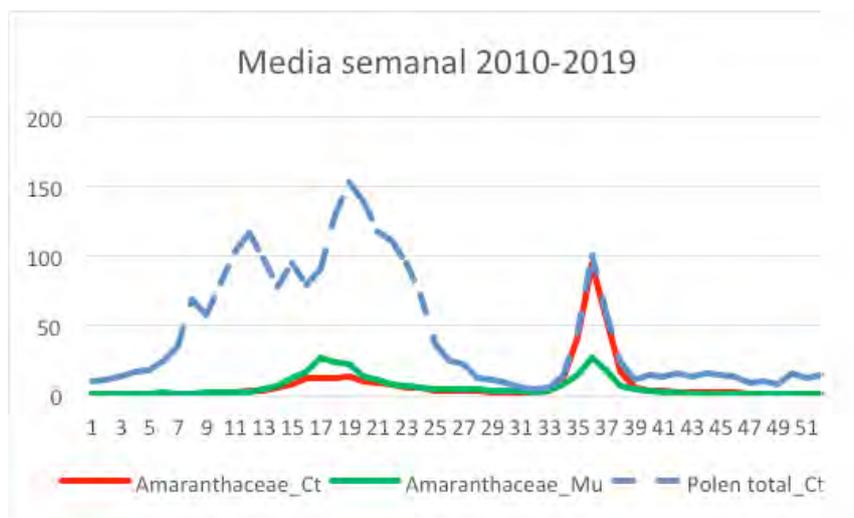


Figura 3. Media semanal en el periodo 2010-2019 del tipo polínico Amaranthaceae en Cartagena y Murcia y del polen total en Cartagena, granos/m³.

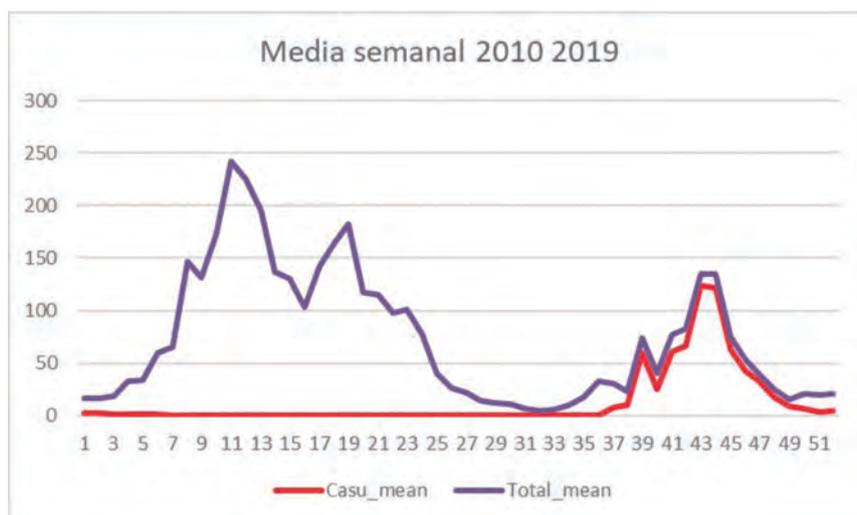


Figura 4. Media semanal en el periodo 2010-2019 del tipo polínico *Casuarina* y del polen total, granos/m³, en Murcia.

3.2. Aerobiología y atención farmacéutica

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica en “web of science” y en “MedPlus” (1 de julio de 2020), con las palabras clave “pharmaceutical

care” y “community pharmacy” combinados con “allergy”; “aerobiology” o “pollen”, el número de documentos recuperados se recogen en la tabla 2.

Tabla 2. Documentos recuperados en la web of science con las palabras clave “pharmaceutical care” y “community pharmacy” más “allergy” o “aerobiology” o “pollen”.

Palabras clave	“and”							
			allergy		aerobiology		pollen	
	WOS	PUBMED	WOS	PUBMED	WOS	PUBMED	WOS	PUBMED
pharmaceutical care	55994	198880	2243	3134	2	2	48	39
community pharmacy	15501	30586	428	718	0	0	3	12

4. Discusión

A pesar de la proximidad de las tres ciudades, los resultados mostrados ponen en evidencia la gran variabilidad espacial y temporal de los datos. La ciudad de Cartagena presenta la menor riqueza en tipos polínicos, así como las menores concentraciones totales. En Murcia y Lorca coinciden el número de tipos polínicos identificados, siendo la media del polen total en el periodo considerado mayor en Murcia que en Lorca. De modo arbitrario consideramos que los tipos polínicos mayoritarios en la Región de Murcia son aquellos que superan el IPA de 100 granos/m³ en alguna de las tres ciudades [12], así resultan 17 tipos polínicos, para todos ellos se han descrito capacidad sensibilizante o de producir reacciones cruzadas. De ellos, 10 alcanzan en alguna de las ciudades IAP > 1000 granos/m³ (Figura 1a), y 7 no alcanzan este valor (Figura 1b). La variabilidad tanto espacial como temporal queda claramente reflejada en los valores medios (Figura 1), máximos y mínimos (Tabla 1) de los IAP. Además, el perfil aerobiológico es diferente en cada una de las ciudades. Así (Figura 1a) *Artemisia*, tipo polínico muy alergénico, es más abundante en Lorca que en Murcia o Cartagena; el tipo polínico *Amaranthaceae*, también muy alergénico, el segundo causante de polinosis en la Región de Murcia, abunda más en Cartagena y Lorca que en Murcia; *Casuarina*, planta ornamental abundante en Murcia, referida como alergénica en algunos estudios, se presenta intensamente en la ciudad de Murcia, mientras que es prácticamente testimonial en Cartagena y Lorca; *Olea*, el tipo polínico que presenta una mayor prevalencia entre los enfermos polínicos en la Región de Murcia, es más abundante en Lorca, presentando los valores más bajos en Cartagena; *Pinus* tiene un grano de polen que por su tamaño es considerado poco alergénico, sin embargo ha sido referenciado como agente causal de polinosis en algunos estudios [13]. Las mayores concentraciones se encuentran en Lorca y Murcia; *Platanus*, el polen del plátano de sombra, planta ornamental muy utilizada en jardines y alamedas, es más abundante en Murcia y la ciudad con valores medios menores de IAP es Lorca; el tipo polínico *Poaceae*, el tipo polínico más alergénico en el conjunto de nuestro país, se encuentra en mayores concentraciones en Lorca, que en Murcia y Cartagena; algo similar ocurre con el polen de

Quercus, este tipo polínico presenta una menor capacidad de sensibilización, pero no se puede descartar su implicación en algunos casos de polinosis, en cuanto a las *Urticaceae*, Cartagena y Murcia presentan concentraciones mayores que la ciudad de Lorca.

Las mayores concentraciones medias para el tipo polínico *Brassicaceae* (Figura 1b), se han alcanzado en Lorca, seguido de Murcia y Cartagena, también alergénico [14]; para *Morus* es Murcia la que presenta los mayores valores, y Cartagena los menores; el tipo polínico *Myrtaceae* es más abundante en Lorca, la ciudad con menores concentraciones es Cartagena; en Murcia abunda el polen de *Palmae* (*Arecaceae*), las palmeras, utilizadas como ornamentales, siendo Lorca la ciudad en la que están peor representadas; *Plantago* es más abundante en Lorca, y las menores concentraciones medias se encuentran en Murcia; *Rumex* alcanza valores medios en el periodo estudiado similares en Cartagena y Lorca, mayores que en Murcia; finalmente, *Zygophyllum* es más abundante en Lorca, seguido de Cartagena y Murcia, este tipo polínico fue definido como alergénico por nuestro grupo de trabajo, que lo identificó por primera vez en el bioaerosol atmosférico [15].

Si se analiza el comportamiento a lo largo del año, también tenemos diferencias muy destacables entre los puntos de muestreo, hemos recogido tres ejemplos que puedan ilustrar la importancia del conocimiento por parte del farmacéutico de la aerobiología local en relación con su actividad asistencial. El primero, *Artemisia* (Figura 2), se puede observar que la media semanal del periodo estudiado presenta cuatro picos. Esta planta tiene una floración “estío autumnal tardía”. Sin embargo, en la Región de Murcia tiene un pico claramente invernal, esto es debido a la presencia de un endemismo la *Artemisia barrelieri* [16], estando presente en las tres ciudades, aunque es en Lorca en donde alcanza los registros más altos. Ante sintomatología compatible con polinosis a principios de año, en la Región de Murcia hay que pensar no solo en la presencia de *Cupressaceae*, sino también en la de *Artemisia* y derivar al médico.

El segundo caso que describimos es el de las *Amaranthaceae* (Figura 3), que en nuestra Región presentan dos picos diferenciados, uno

en primavera y el otro en verano-otoño. Hay que destacar la importancia de este segundo pico en la ciudad de Cartagena, más intenso que el primero, con otro hecho importante, que es prácticamente el único tipo polínico presente en ese momento. El paciente alérgico con prueba cutánea positiva a este tipo polínico, que no presente síntomas en verano-otoño en nuestra Región, con una alta probabilidad está manifestando una reacción cruzada [17]. Informar al paciente de esta segunda floración permitirá que adopte las medidas adecuadas, contribuyendo a su mejor calidad de vida.

Casuarina es abundante en la ciudad de Murcia (Figura 4), su floración ocurre en otoño, al finalizar la floración de las Amaranthaceae, en ese momento en el bioaerosol de la ciudad es también prácticamente el único tipo polínico presente. Otro factor que tener en consideración ante manifestaciones alérgicas compatibles con polinosis en esta época del año en la ciudad de Murcia.

Teniendo en cuenta que entre los cinco problemas de salud por los que más se realizan consultas en las farmacias se encuentran las alergias (17,3%), ocupando el tercer lugar tras los resfriados y las erosiones cutáneas [18], parece de especial interés difundir los datos aerobiológicos entre el colectivo de los profesionales de la farmacia comunitaria, diseñando en colaboración con el Centro de Información del Medicamento del COFRM un sistema de información que permita orientar a los enfermos. Derivando hacia la atención médica o dando recomendaciones sobre la evitación del alérgeno, medidas preventivas tendentes a evitar la aparición de los síntomas y mejorando así su calidad de vida.

En la bibliografía recuperada (Tabla 2) la mayor parte de los trabajos se centran en la posible reacción alérgica a los medicamentos, sin entrar en el papel que los servicios profesionales farmacéuticos puedan aportar en la mejora de la calidad de vida del paciente polínico. Aspecto que desde nuestro punto de vista es muy importante. Que los pacientes dispongan de información sobre el contenido polínico en cada momento es útil para conseguir este objetivo y en esta labor de divulgación debe encontrarse la farmacia comunitaria. Los enfermos alérgicos se preguntan por qué es tan accesible la información meteorológica y no ocurre lo

mismo con la información aerobiológica [19]. Quizás éste sea el principal problema de los afectados por la alergia al polen: la ausencia de información completa y oportuna, así podemos leer [19] *“Con una mayor y más correcta información podríamos adelantar nuestra visita al especialista, seríamos menos vulnerables a la presión ambiental y podríamos adoptar con mayor éxito medidas preventivas”* demanda de los enfermos que debe ser, en nuestra opinión, recogida por la farmacia comunitaria e incorporada en la práctica profesional diaria.

En el contexto actual de la pandemia ocasionada por el SARS-CoV-2 aun es más relevante el papel de la oficina de farmacia a la hora de diferenciar los síntomas de estas dos patologías.

5. Conclusiones

La evitación del alérgeno es la mejor medida preventiva en la minimización de la sintomatología alérgica, el conocimiento de la aerobiología local permite poner en marcha medidas preventivas o paliativas tendentes a la mejora de la calidad de vida de los pacientes polínicos. En la farmacia comunitaria los pilares fundamentales son la promoción de la salud, la prevención de la enfermedad y el uso racional de medicamentos, tres aspectos esenciales que pueden cubrirse con una correcta educación sanitaria de los pacientes con polinosis, puesto que desde ésta se podría informar de las condiciones aerobiológicas del momento y la forma de actuar más adecuada para cada paciente en función de los alérgenos de tal forma que se promueva la salud previniendo la aparición de la sintomatología de la enfermedad y evitando así un excesivo tratamiento del paciente. Identificando situaciones relacionadas con enfermedad alérgica que puedan ser desconocidas por el enfermo al producirse en periodos de tiempo no usuales en otras localizaciones, derivando al médico, mejorando el diagnóstico de la enfermedad.

Consideramos que la Farmacia comunitaria debe tomar la iniciativa e incorporar entre sus actuaciones un servicio profesional estandarizado relacionado con la información de la red aerobiológica que permita un control de su patología y mejore su calidad de vida.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a Paula García López, Técnico de Apoyo de la Universidad Politécnica de Cartagena por su ayuda y colaboración. Al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades por la financiación del contrato PTA2017-13571-I y del

Proyecto RTI2018-096392-B-C21. Al Ayuntamiento de Murcia por el Convenio de Colaboración para estudios aerobiológicos en esa ciudad. A los servicios de Alergia e Inmunología Clínica de los Hospitales Reina Sofía de Murcia y Rafael Méndez de Lorca por su colaboración en el estudio.

Referencias bibliográficas

1. Edmonds RL. *Aerobiology: the ecological systems approach*. Stroudsburg, New York: Dowden, Hutchinson & Ross; distributed world wide by Academic Press; 1979. 386 p.
2. Moreno-Grau S. *De alérgenos aerovagantes: La Red Aerobiológica de la Región de Murcia (REAREMUR)*. Academia de Ciencias Veterinarias de la Región de Murcia; 2015.
3. Bastl K, Bastl M, Bergmann KC, Berger U. How to do a clinical trial? Recommendations from the aerobiological point of view. *World Allergy Organ J*. 2019;12(4):100020.
4. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. *Campaña Sanitaria sobre Alergia «Más que un estornudo»* [Internet]. 2012. Disponible en: <https://www.portalfarma.com/Profesionales/campanaspf/Paginas/indice.aspx>
5. Rinitis alérgica. *Panorama Actual del Medicamento*. 2013;37:309-16.
6. Baos V, Faus MJ. *Protocolos de indicación farmacéutica y criterios de derivación al médico en síntomas menores*. Madrid: Fundación Abbott; 2010.
7. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. *Portalfarma* [Internet]. [consultado: 10 de julio de 2020]. Disponible en: <https://botplusweb.portalfarma.com/botplus.asp>
8. European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI). *Advocacy Manifesto. Tackling the Allergy Crisis in Europe- Concerted Policy Action Needed* [Internet]. 2016 [citado 15 de mayo de 2018]. Disponible en: http://www.eaaci.org/images/media/EAACI_Manifesto_brochure_Interactive.pdf
9. SEAIC. *Alergológica 2015* [Internet]. 2017 [citado 22 de mayo de 2018]. Disponible en: <http://www.seaic.org/profesionales/alergologica-2015>
10. Norma UNE 16868: *Ambient air. Sampling and analysis of airborne pollen grains and fungal spores for networks related to allergy-Volumetric Hirst Method*. European Standard; 2019.
11. Galán C, Cariñanos P, Alcázar P, Domínguez E. *Management and Quality Manual*. Córdoba: Servicio de Publicaciones, Universidad de Córdoba; 2007.
12. Elvira-Rendueles B, Moreno JM, Costa I, Bañón D, Martínez-García MJ, Moreno-Grau S. *Pollen calendars of Cartagena, Lorca, and Murcia (Region of Murcia), southeastern Iberian Peninsula: 2010–2017*. *Aerobiologia* [Internet]. 30 de marzo de 2019 [citado 9 de abril de 2019]; Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10453-019-09578-y>
13. Senna G, Roncarolo D, Dama A, Mistrello G. Anaphylaxis to pine nuts and immunological cross-reactivity with pine pollen proteins. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2000;10(1):44-6.
14. Singh A, Shahi S, Katiyar RK, Gaur S, Jain V. Hypersensitivity to pollen of four different species of Brassica: a clinico-immunologic evaluation in patients of respiratory allergy in India. *Asia Pac Allergy*. 2014;4(4):197.
15. Belchí-Hernández J, Moreno-Grau S, Bayo J, Rendueles BE, Moreno J, Angosto JM, et al. Pollinosis related to *Zygophyllum fabago* in a Mediterranean area. *Aerobiología* 2001;17(3):241-6.
16. Vallès-Xirau J. Aportación al conocimiento citotaxonómico de ocho táxones ibéricos del género «*Artemisia*» L. («*Asteraceae*, *Anthemideae*»). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 1987;44:79-96.

17. Elvira-Rendueles B, Zapata JJ, Miralles JC, Moreno JM, García-Sánchez A, Negral L et al. Aerobiological importance and allergic sensitization to Amaranthaceae under arid climate conditions. *Sci Total Environ.* 2017;583:478-86.
18. Salar L, Prats R, Eyaralar T, Espejo J. Programa 'I-VALOR': la indicación farmacéutica protocolizada, consensuada y registrada en la farmacia comunitaria. *Farmacéuticos Comunitarios.* 2017;9:5-12.
19. López Bachero, M. La visión del paciente: Polinosis, la visita impertinente. En: *Pólenes alergénicos y polinosis en la Región de Murcia.* Murcia: AllergoMurcia; 2013.

Este trabajo debe ser citado como:

Moreno-Grau S, Elvira-Rendueles B, García-Moreno SI, Tovar I, Sierra S, Moreno JM. Información aerobiológica desde la farmacia comunitaria. La red aerobiológica de la región de Murcia. *Rev Esp Cien Farm.* 2020;1(1):85-97.



Artículo original

Conocer el pasado es predecir el futuro: a propósito de la covid-19

Knowing the past is predicting the future: about the covid-19

Ramos A^{1*}, Venegas C², Moreno E¹

¹Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Sevilla. Sevilla. España

²Colegio Oficial de Farmacéuticos de Badajoz. Badajoz. España

*Correspondencia: antonioramos@us.es

Recibido: 04.07.20; aceptado: 09.07.20

Resumen: En fecha de 12 de abril de 2020 se firmó el manifiesto “Conocer el pasado es predecir el futuro”, en el que se reivindicaba el papel de la historia de las enfermedades en escenarios como el de la covid-19 y los que están por venir, planteando la obligatoriedad de estas enseñanzas en todos los programas docentes de Ciencias de la Salud y transmitiéndose así al Ministro de Universidades. Abordando las tres pandemias que han resultado más letales: peste, viruela y gripe, tratamos de poner en valor la importancia de esta plataforma de asesoramiento recién constituida a fecha de edición de este artículo, y que tiene la finalidad de ser útil a la sociedad en esta nueva pandemia de covid-19. El tiempo, como siempre, nos dirá si los valores que aporta son tomados en consideración o no.

Abstract: On April 12, 2020, the manifesto “Knowing the past is signed predict the future”, in which the role of the history of diseases was claimed in scenarios such as that of covid-19 and those that are to come. We propose that these teachings should be compulsory in Health Sciences teaching programs and we have transmitted it to the minister of universities. Addressing the three pandemics that have been most lethal: plague, smallpox and influenza, we try to highlight the importance of this newly formed advisory platform as of the date of publication of this article, and which is intended to be useful to society in this new pandemic covid-19. Time, as always, will tell us whether the values it contributes are taken into consideration or not.

Palabras clave: historia; enfermedades; plataforma de asesoramiento, pandemias. **Keywords:** history; diseases; advice platform, pandemics.

Decía Miguel de Cervantes Saavedra que “la historia, émula del tiempo, depósito de las acciones, testigo de lo pasado, ejemplo y aviso de lo presente y advertencia del porvenir”.

1. Introducción

En fecha de 12 de abril de 2020 se firmó el manifiesto “Conocer el pasado es predecir el futuro”, en el que se reivindicaba, en palabras de uno de sus principales propulsores Anton Erkoreka

junto con Joan March, el papel de la historia de las enfermedades en escenarios como el de la covid-19 y los que están por venir, planteando la obligatoriedad de estas enseñanzas en todos los programas docentes de Ciencias de la Salud y transmitiéndose así al Ministro de Universidades.

Es un momento clave, continua Anton Erkoreka, tanto para prestigiar como para aprovechar los conocimientos acerca de la Historia de las Enfermedades a las que nos dedicamos desde hace años.

Este manifiesto, del cual somos componentes los tres firmantes de este artículo, puede pasar desapercibido y no ser tenido en cuenta. De ahí que, en estas líneas, tratamos de poner en valor la importancia de esta plataforma recién constituida a fecha de edición de este artículo.

2. Método

Primeramente, la heurística; entendida como la búsqueda de fuentes documentales. Tras lo cual, aunando las fuentes primarias con una bibliografía secundaria, proporcionamos la contextualización.

El análisis y la reflexión posterior nos lleva a la confección del discurso narrativo y conclusiones.

3. Resultados y discusión

Si en la toma de decisiones por parte de los políticos se tuvieran en cuenta la visión de los Historiadores de la Ciencia, se podrían obtener perfiles de comportamiento de las pandemias útiles a la sociedad. En caso contrario, este será el documento que demuestre que se obviaron las aportaciones que la historia nos enseña.

El manifiesto, que es firmado por las personas y sociedades descritas al final de esta carta, literalmente, expresa:

CONOCER EL PASADO ES PREDECIR EL FUTURO

Los historiadores e historiadoras de Ciencias de la Salud abajo firmantes nos constituimos:

En plataforma de asesoramiento permanente a las autoridades administrativas y sanitarias.

En un momento tan delicado para la salud de la humanidad, hemos notado en las declaraciones de las autoridades de todos los niveles e incluso en las de algunos expertos en epidemiología, una falta de conocimiento de lo que han sido las pandemias a lo largo de la historia, incluso de las del siglo XX.

Convencidos, como estamos, de que conocer en profundidad el pasado, sumado a los conocimientos adquiridos en las circunstancias actuales, nos han de ayudar a analizar mejor el presente y prepararnos para no repetir en el futuro los errores recientes.

PROPONEMOS

Establecer en cada estado de la Unión Europea, un grupo de investigación permanente sobre el origen, desarrollo, finalización y consecuencias de lo que han sido las epidemias y las pandemias a lo largo de la historia.

Integrar en todos los equipos de epidemiología del Estado y de las Comunidades Autónomas, historiadores de las ciencias de la salud especializados en estudios sobre historia de las enfermedades y demografía histórica.

Introducir un capítulo de epidemiología histórica en la asignatura de historia de la medicina en los planes de estudio de todas las Facultades de Medicina y Ciencias de la Salud.

Para canalizar la reivindicación proponemos la creación de una página web/blog oficial de la plataforma y la creación de un Comité de Enlace que comience a reivindicar ante las instituciones académicas y de gobierno estas tres propuestas iniciales y que mantenga, de forma dinámica, la relación entre todos los historiadores e historiadoras de las Ciencias de la Salud, así como las entidades y grupos de trabajo que nos sumamos a esta plataforma:

Palma y Bilbao, 12 de abril de 2020.

Firmantes:

Joan March. Doctor en Farmacia. Coordinador del Grupo de Investigación de Historia de la Salud de la Universidad de las Islas Baleares. **Anton Erkoreka.** Doctor en Medicina. Director del Museo Vasco de Historia de la Medicina y la Ciencia (UPV/EHU). **José Luis Peset.** Doctor en medicina. Profesor de Investigación del Instituto de Investigaciones Científicas. Jubilado. **Rafael Sanz.** Doctor en Medicina. Profesor asociado de Historia de la Medicina de la Universidad Europea de Madrid

Berta Paz. Profesora. Doctora e Fisioterapia. Titular de Historia de la Fisioterapia de la Universitat de les Illes Balears. **Josep Bernabeu.** Doctor en Medicina. Catedrático de Historia de la Ciencia de la Universitat d' Alacant. **Miquel Marín.** Doctor en Historia. Director de la Fundación Endesa. **Antoni Contreras.** Licenciado en Medicina. Especialista en historia de las enfermedades. **Jaume Marti Martorell.** Licenciado en

Medicina. Doctorando en Historia de la Medicina. **Josep Lluís Barona**. Doctor en Medicina. Catedrático de Historia de la Ciencia de la Universitat de Valencia. **Joan Maria Pujadas-Mora**. Doctora de Historia. Investigadora del Centre d'Estudis Demogràfics de Catalunya. **Pere Salas**. Licenciado en Historia. Profesor asociado de Historia Contemporánea de la Universitat de les Illes Balears. **Miquel Roca**. Doctor en Medicina. Decano de la Facultad de Medicina de las Islas Baleares

Isabel Moll. Doctora en Historia. Catedrática emérita de Historia Contemporánea de la Universitat de les Illes Balears. **Manel Herrera**. Licenciado en Medicina. Doctor en Historia Contemporánea. **Joaquim Boronat**. Licenciado en Medicina. Doctor en Historia de la Medicina. **Agustín Ceba**. Licenciado en Física. Doctorando en Historia de la Física. **Jaume Mercant**. Licenciado en Medicina. Doctor en Historia de la Medicina. **Josu Hernando**. Doctor en Historia. Profesor Facultad de Medicina (UPV/EHU). **José Ramón Gurpegui**. Doctor en Medicina. Profesor Facultad de Medicina (UPV/EHU). **Aitor Anduaga**. Doctor en Física y en Historia. Ikerbasque. Investigador del Museo Vasco de Historia de la Medicina (UPV/EHU). **Aritz Ipiña**. Doctor en Historia. Profesor Facultad de Medicina (UPV/EHU). **Begoña Madarieta**. Historiadora. Museo Vasco de Historia de la Medicina (UPV/EHU). **Kepa Lizarraga**. Doctor en Medicina. Investigador del Museo Vasco de Historia de la Medicina (UPV/EHU). **Ricardo Franco**. Doctor en Medicina. Presidente de la Academia de Medicina de Bilbao. **Enrique Aramburu**. Doctor en Farmacia. Director del Museo Farmacia Aramburu. **Javier Garaizar**. Doctor en Medicina. Profesor de la Facultad de Farmacia (UPV/EHU). **Oscar Martínez Azumendi**. Doctor en Medicina. Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. **Francisco Luis Dehesa**. Doctor en Veterinaria. Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. **Iñaki Markez**. Doctor en Medicina. Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. **Luis Pacheco**. Doctor en Medicina. Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. **Antoni Payeras**. Doctor en Medicina. Profesor asociado en Introducción e Historia de la Medicina de la Universitat de les Illes Balears. **Adrián Hugo Aguinalde**. Especialista en Salud Pública. Ministerio

de Sanidad. **Gloria Gallego**. Doctora en Humanidades y Ciencias Sociales. Profesora colaboradora de Historia de la Enfermería de la Universitat de les Illes Balears.

Josep Batllo. Doctor en Física. Investigador de l'Institut Cartogràfic i Geològic de Catalunya. **Isabel Porras**. Doctora en Medicina. Catedrática acreditada de Historia de la Medicina de la Universidad de Castilla la Mancha. **Antonio Ramos Carrillo**. Director del Museo de Historia de la Farmacia. Profesor de Historia de la Farmacia. Universidad de Sevilla. **Francisco González Lara**. Profesor de Historia de la Farmacia. Universidad de Sevilla. **Esteban Moreno Toral**. Profesor Historia de la Farmacia. Universidad de Sevilla. **Cecilio J. Venegas Fito**. Presidente del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Badajoz.

Entidades y Sociedades firmantes:

Grup d'Investigació d'Història de la Salut - Universitat de les Illes Balears. Medikuntza eta Zientzia Historiaren Euskal Museoa / Museo Vasco de Historia de la Medicina y de la Ciencia (UPV/EHU). Museo de Historia de la Farmacia de Sevilla. Academia de Ciencias Médicas de Bilbao.

Asociación Vasca de Historia de la Veterinaria. Sociedad de Docentes Universitarios de Historia de la Farmacia de España.

En fecha de 2 de mayo de 2020, Joan March y Anton Erkoreka enviaron a Manuel Castells Oliván, Ministro de Universidades, una carta en la que se le hacían llegar, en nombre de los firmantes del documento, nuestras reivindicaciones como investigadores y docentes de diversas disciplinas que venimos trabajando en el ámbito del estudio del desarrollo de las enfermedades a lo largo de la historia. En la carta se expresa que:

Las reivindicaciones las hacemos partiendo de la premisa que nuestros conocimientos adquiridos por la atenta observación de cómo han tenido lugar las grandes epidemias desde la antigüedad hasta nuestros días pueden ser útiles para mejorar la forma de afrontar la actual pandemia, covid-19, pero también y especialmente, las que se irán produciendo en el futuro.

Consecuentemente y conscientes de la organización competencial del Estado y que por lo tanto la atención efectiva a nuestras peticiones deberá ser llevada a cabo por muy diversas estancias y organismos del conjunto del Estado hemos querido hacerlas llegar a Vd. en primera instancia, al ser la persona que al encontrarse en la cúpula de la organización Académica tiene una visión privilegiada de cómo funcionan las cosas en su conjunto.

Sí está bajo su jurisdicción, los contenidos de la asignatura de Historia de la Medicina en el Grado de Medicina y de otras Ciencias de la Salud que deberían de contemplar siempre un capítulo de "historia de las enfermedades". El contenido de este capítulo puede dar a todos los futuros médicos y profesionales sanitarios conocimientos de cómo se originan las enfermedades infecciosas, como se expanden y de los sistemas que se han empleado históricamente para acabar con ellas.

Por este motivo, y para darle más razones por las cuales deberían ser tenidas en cuenta nuestras peticiones, le solicitamos que una delegación de los firmantes del documento reivindicativo pueda reunirse con Vd. en la fecha que considere oportuna.

Quedamos pues a su entera disposición para cualquier aclaración a lo expuesto y a la espera de poder hacerlo cuando su disponibilidad y las circunstancias excepcionales que estamos viviendo lo permitan.

Esta carta recibió la consecuente respuesta, algo tenue pero entendible, por parte del Ministro de Universidades Manuel Castells, en la que propiciaba su colaboración a través de una entrevista, si bien advirtiendo que los planes de estudio los cambian las universidades a través de un proceso de modificación que, si fuere sustancial, ha de tener la evaluación positiva de la agencia de calidad correspondiente, por lo que era competencia de las mismas universidades y de las agencias de evaluación autonómicas y/o estatal que del Ministerio directamente.

Durante las epidemias y como hemos podido comprobar en los días que se escriben estas líneas, junio de 2020, la preocupación por la salud se vuelve prioritaria, al tiempo, en todos los miembros de una comunidad, de una nación o de todo el mundo. Esa extraordinaria alarma ante la muerte produce no sólo cataclismos

sociales, económicos y políticos, sino también el afloramiento de toda la falta de madurez personal, convertida ahora en colectiva: el resquebrajamiento de las estructuras sociales, religiosas o morales, prejuiciadas o no; el retorno a situaciones menos evolucionadas del desarrollo sentimental e intelectual y un extremo desorden, olvidado tan pronto desaparecen.

Existe un elemento común durante el desarrollo de las pandemias en la historia de la humanidad: la preocupación social por la salud y, sobre todo, el miedo a la muerte. Ello además conlleva aparejadas situaciones de crisis demográficas, económicas y sociales. Cuando la enfermedad epidémica se extiende a muchos países hablamos técnicamente de pandemia.

En tiempos pretéritos las pandemias duraban más tiempo que en los tiempos contemporáneos debido a que las comunicaciones no permitían viajes tan rápidos como en la actualidad. Con ello, ahora la propagación es muy veloz pero, por fortuna, la duración de la pandemia disminuye. El estado de crisis y de alarma, en especial por la letalidad, provocaban un gran pánico social. Hasta el punto que se abandonaban las zonas de aglomeraciones, en especial grandes ciudades, para vivir en el campo [1].

Todo ello es debido a que las pandemias pueden matar más que las guerras. Ha ocurrido durante siglos y es debido a que la enfermedad que aparece en un entorno geográfico se nutre de la ausencia de inmunidad adquirida de la población. Se estima que solo en el siglo XVI murieron 70 millones de indígenas americanos al contraer enfermedades portadas por los conquistadores europeos. Los diferentes patógenos (virus, bacterias, hongos, protozoos, helmintos, ...) generan una amplia gama de enfermedades de diverso pronóstico. Además, no será hasta la segunda mitad del siglo XIX cuando comienzan a descubrirse los agentes patógenos que provocaban estas enfermedades mortales, entre otros con las aportaciones de científicos como Koch o Pasteur. Descubierta la etiología era más fácil luchar contra la enfermedad. La Medicina y la Farmacia aunaron esfuerzos y los tratamientos pasaron de ser paliativos a tener eficacia terapéutica [2]. Pero no ha sido fácil, ni siquiera recientemente. Sirva de ejemplo que de la pandemia de gripe de 1918-19, la más catastrófica de la humanidad en la que se estima que murieron entre 50 y 100 millones

de personas (unos 60 millones son las fuentes más fiables), no se supo del origen vírico hasta 1931, once años después, pues se creía que era un bacilo, y de hecho no se aisló el virus hasta dos años más tarde, y no hubo una vacuna hasta la década de 1940. Si a eso le añadimos que aún no existían los antibióticos, los resultados de mortalidad en esta pandemia triplicaron al de fallecidos de la Primera Guerra Mundial, que fueron hechos casi coetáneos [3].

Pero las cifras son siempre relativas ya que es necesario comparar los fallecidos en cada pandemia con la población de ese momento. Cada enfermedad ha dominado las grandes edades de la humanidad. Así en la Edad Antigua y en la Edad Media son muchas las pandemias que se han producido, pero es la de peste la más mortífera de todas, aunque también hay descritas de viruela o lepra.

En la Edad Moderna (finales del siglo XV a finales del XVIII) sigue siendo la peste protagonista, pero comparte este papel con la viruela, en especial durante el siglo de las luces, y en menor medida con las fiebres tercianas o palúdicas.

En la Edad Contemporánea (siglo XIX a la actualidad) destacan la fiebre amarilla, la tuberculosis, y de manera muy especial el cólera durante el XIX (en España hubo cuatro brotes entre 1833 y 1885), la gripe durante el XX, y la de la covid-19 en el XXI.

Vamos a abordar las tres que han resultado más letales: peste, viruela y gripe.

PESTE NEGRA

La peste es una enfermedad producida por la bacteria *Yersinia pestis*. Tiene dos variedades: la bubónica producida por la picadura de pulgas infectadas con la bacteria procedente de roedores; y la neumónica transmitida por vía respiratoria. Se han descrito varias pandemias, entre ellas la llamada Peste Antonina desde el año 165 de nuestra era hasta el 180, estimándose que mató a 5 millones de personas; o la llamada Plaga de Justiniano, del 541 al 561, en varios brotes, que provocó unos 30 millones de muertes.

Pero la más mortífera fue la llamada Peste Negra, entre el 1347 y el 1353. Se calculan en unos 50-75 millones las personas fallecidas en el Mundo, de ellas unos 25 millones en Europa lo que suponía casi la mitad de su población. Proveniente de Asia, llegó a Europa por las rutas comerciales

afectando primero a puertos italianos para extenderse rápidamente por el continente. Los grandes estragos los provocaba especialmente en ciudades portuarias o muy comerciales y populosas [4].

Hubo en la Edad Moderna casos más localizados. Destacamos como principales los de la peste de Sevilla (1649), Londres (1665), Marsella (1720), o Viena (1769).

VIRUELA

El virus *Variola virus* es el responsable de esta enfermedad, que erradicada del planeta desde 1977, hizo estragos en la humanidad durante siglos, siendo especialmente dramática en América desde la conquista y en Europa en el siglo XVIII. Desde entonces ha sido mitigada gracias a la vacunación descubierta por Jenner en 1796, lo que permitió reducir de manera importante el número de contagiados. Otro hecho reseñable fue la expedición del médico alicantino Balmis realizada en 1803. Una de las secuelas más importantes en los que superan la enfermedad es la ceguera que se da en un 30% de los casos [5].

GRIFE ESPAÑOLA

No hay duda que la pandemia de gripe de 1918-1919 constituye, en términos de fallecimientos, el mayor impacto demográfico que ha sufrido la humanidad por su distribución mundial y sobre todo por la rapidez con que se produjo.

Las causas de tan alta mortalidad han sido discutidas a lo largo de los años, no existiendo ninguna explicación convincente. Se han esgrimido hipótesis tales como las condiciones higiénico-sanitarias producidas por la guerra, pero la mortalidad fue similar en zonas que no estuvieron comprometidas en ella. Otra teoría aboga por la cooperación entre la infección viral y una sobreinfección bacteriana. Una tercera habla de una respuesta inmune masiva, ante la presencia de antígenos nuevos. En fin, podemos concluir que situaciones similares a la segunda y tercera hipótesis se han producido en otras epidemias, sin las consecuencias fatales de la gripe del año 18.

La pandemia de 1918-19 promovió numerosas investigaciones [6]. Muchas de ellas se centraron en el posible factor etiológico del *H. influenzae*, pero los estudios más importantes fueron los anatomopatológicos de Winternitz

y cols. [7] y los del Departamento Médico de las Fuerzas Armadas, en que describieron que la característica clave desde el punto de vista patológico fue una extensa hialinización y necrosis de todas las superficies endoteliales, desde la tráquea hasta el parénquima pulmonar [8].

En cuanto a la etiología del proceso, la observación más certera fue la de S. Koen, un veterinario, responsable del control del cólera porcino en Iowa. En el otoño de 1918 y la primavera de 1919 realizó unas observaciones de gran trascendencia al describir la íntima relación entre la enfermedad en los cerdos y en el hombre, escribiendo:

“La similitud de la epidemia entre las personas y los cerdos es tan grande, las descripciones tan frecuentes, que un brote en la familia va seguido de otro entre los cerdos y viceversa, mostrando una coincidencia tal que sugiere una estrecha relación entre los dos procesos”.

Un avance importante, que demuestra siempre la necesidad de un equipo multidisciplinar fue conseguido por Richard Shope, también veterinario del Instituto Rockefeller de Investigación Médica, al demostrar que la gripe del cerdo estaba producida por un virus, actuando en sinergia con *Haemophilus influenzae*. En 1930 fue capaz de transmitir la enfermedad de cerdo a cerdo a través de exudados filtrados, procedentes de cerdos que padecían la enfermedad.

El virus de la gripe española, o de 1918, es el AH1N1. Está considerado el abuelo de los virus de la gripe y se replicaba 50 veces más rápido que los virus actuales de la gripe. De forma injusta se denominó gripe española porque España, al ser un país neutral en la primera Guerra Mundial, no ocultó, a diferencia de la censura militar de los contendientes en la guerra, la información sobre la pandemia dando detalles de su contagio, evolución y muertes y pareció por ello que había numerosos casos a diferencia de otros países [9].

En realidad, la epidemia de gripe de 1918 aparece en un pequeño condado (Haskell) del estado norteamericano de Kansas donde un médico constató un brote muy virulento de gripe. El médico que refirió estos síntomas fue Loring Miner el 30 de marzo de 1918 y solicitó consejo y ayuda al servicio de salud (*U.S. Public Health*

Service), que no le ayudó de ninguna forma, y solo se limitó a publicar en el boletín, días después, la existencia de 18 casos de gripe severa con tres muertes [10]. Puede que la gripe existiera meses antes, como de hecho se publica ahora con la covid-19. El problema de base en todo esto es la burocracia y lo que tardan las administraciones públicas en reaccionar de modo acertado ante un caso de grave riesgo para la salud social [11]. A partir de estos datos se constata que marines norteamericanos la introducen en el verano de 1918 en el puerto francés de Brest, y de ahí se extendió por todo el planeta [12]. El momento más dramático se produjo a finales de octubre-principios de noviembre de 1918 [13], con otro rebrote en febrero de 1919 (figura 1). Ese segundo rebrote a los 4 meses es el que postulan autoridades sanitarias y algunos medios de comunicación para pensar que la covid-19 tendrá un rebrote en los meses próximos. No obstante, la clave está en la gravedad y capacidad de mutación del virus, la prevención generalizada, y los tratamientos adecuados antes de conseguir la vacuna efectiva. Los medios actuales, un siglo después, deben ser más efectivos si se atiende el problema con prontitud y se asume estrictamente en el contexto sanitario.

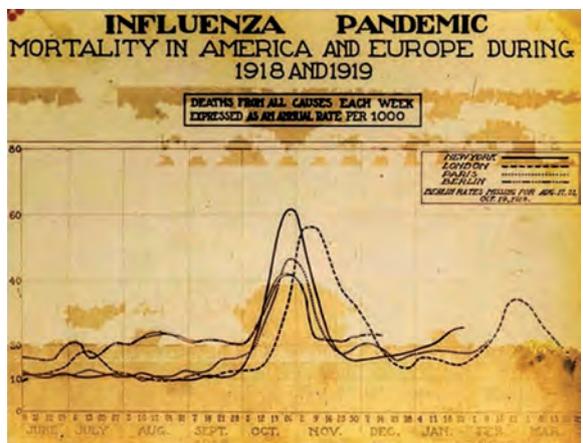


Figura 1. Muertes de gripe (1918-19).

Las siguientes pandemias de gripe del siglo XX fueron comparativamente más veniales. La de 1957 o gripe asiática (producida por el virus AH2N2), la gripe de 1968 de Hong-Kong (AH3N2) y ya en el XXI la de 2009 (AH3N2).

A mayor abundamiento sobre cuestiones locales de la gripe española, es recomendable consultar la obra de Anton Erkoreka *La pandemia de gripe española en el País Vasco (1918-1919)* [14].

4. Conclusiones

Podemos decir que, con respecto a casos anteriores, hemos avanzado enormemente en un siglo. Hemos sido capaces de detectar, describir y secuenciar el genoma del virus, que consiste en un coronavirus de ARN con 30000 pares de bases perfectamente conocidas hoy día; y anticipar (aunque no todo lo eficiente que hubiera sido deseable) la primera onda epidémica mediante mecanismos observacionales y predictivos muy certeros. Al ser el genoma del virus [15] perfectamente conocido, a la vez que se desataba su propagación, se ha conseguido minimizar en la mayoría de los países, de un modo notable, el impacto y coste en vidas, aún con el riesgo evidente de paralizar la economía y desencadenar una profunda crisis social y política. Algunos estudios han publicado que haber tomado medidas 10 días antes hubiera reducido hasta la mitad las consecuencias de contagio y muerte. Y es que, a veces, cuestiones políticas y/o económicas tienen más peso que el interés sanitario. Pero también es fácil decir qué hubiera sido lo correcto sabiendo certeramente las consecuencias.

La Farmacia tiene un papel esencial y clave en las pandemias. Estos procesos afloran cada cierto tiempo, y ponen en el tablero la viabilidad de la existencia humana y nuestras interrelaciones como especie y como individuos sociales. Los descubrimientos farmacéuticos de los últimos siglos, entre ellos los antibióticos, juegan un papel importante en los tratamientos, en especial por las patologías concomitantes.

Pero, debemos tener la seguridad de que los avances terapéuticos, tanto profilácticos como terapéuticos y vacunales, van en la dirección correcta. Un tratamiento inadecuado o lesivo, así como una vacuna nociva pueden resultar muy perjudiciales, de ahí el papel de los ensayos clínicos y el retraso en conseguirlos. Por ello, debemos andar con pies de plomo y dar seguridad para ser eslabón científico vital en ésta y para las próximas e inevitables pandemias.

La profesora Ana Carrasco Conde, describe que ciencia y humanidades han de trabajar conjuntamente, las humanidades le proporcionan la medida necesaria para que no pierda perspectiva. Todo cambio importante requiere un tiempo y las medidas que pongamos en marcha ahora generarán los modos de las sociedades del futuro [16].

En esencia pues, buscar datos en los tiempos pretéritos ayudan a construir el presente y predecir el futuro. Se ha creado la plataforma de asesoramiento "*Conocer el pasado es predecir el futuro*" que da origen a este artículo con la finalidad de ser útil a la sociedad. El tiempo, como siempre, nos dirá si los valores que aporta son tomados en consideración o no.

Contribuciones de los autores: Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Financiación: Este trabajo no está financiado.

Conflicto de intereses: Los autores declaran la ausencia de conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

1. Pérez V, Reher DS, Sanz A. La conquista de la salud. Madrid: Marcial Pons; 2015.
2. Macip S. Las grandes epidemias modernas. La lucha de la humanidad contra los enemigos invisibles. Barcelona: Ediciones Destino; 2020.
3. Echeverri B. La pandemia de 1918-1919. Madrid: Centro de Investigaciones Sociológicas (CIS); 1993.
4. Ledermann DW. El hombre y sus epidemias a través de la historia. Revista chilena de infectología, 2003, 20 (Supl. notashist), 13-7. [Consultado el 23 de junio de 2020]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v20snotashist/art03.pdf>
5. Balaguer E, Ballester R. Asociación Española de Pediatría, ed. En el nombre de los niños. Real Expedición Filantrópica de la Vacuna 1803-1806 (capítulo 4: «Viruela y vacuna en España y en los territorios coloniales de ultramar antes de la llegada de la expedición»). Madrid. 2003. p. 86. [Consultado el 27 de junio de 2020]. Disponible en: <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/4.pdf>
6. Thomson D, Thomson R. Annals of the Pickett-Thomson Research Laboratory, vols. 9 and 10, Influenza. Baltimore. Williams and Wilkens. 1934.

7. Winternitz MC. The pathology influenza. New Haven. Yale University Press. 1920.
8. Spink W. Infection Diseases. Prevention and treatment the Nineteenth and Twentieth Centuries. Dawson. University of Minnesota. 1978.
9. Eiros JM, Bachiller MR, Pérez A. La gripe de 1918: Centenario de una crisis sanitaria devastadora. Gráficas Montseny; 2018.
10. Echeverri B. En el centenario de la gripe española: un estado de la cuestión. Revista de Demografía Histórica, XXXVI, I, 2018: 17-42.
11. Augusto dos Santos R. O Carnaval, a peste e a 'espanhola'. Hist. cienc. saude-Manguinhos vol.13 no.1: 129-58. Rio de Janeiro Jan./Mar. 2006.
12. Eiros JM. La pandemia de gripe de 1918: reflexiones en su centenario. Discurso pronunciado por el Ilmo. Sr. Dr. D. José María Eiros Bouza, en el acto de su toma de posesión como Académico de número de la Academia de Ciencias Veterinarias de Castilla y León. 2019.
13. Spinney L. El jinete pálido: 1918: La epidemia que cambió el mundo (Tiempo de Historia). Barcelona: Crítica; 2018.
14. Erkoreka A. La pandemia de gripe española en el País Vasco (1918-1919). Bilbao: Museo Vasco de Historia de la Medicina y de la Ciencia. 2006.
15. Jiménez L. ABC Galicia 22/05/2020.
16. Carrasco, A. Algo más que ciencia: la importancia de las Humanidades en la pandemia. Lm. [Consultado el 23 de junio de 2020]. Disponible en: <https://www.lamarea.com/2020/04/01/algo-mas-que-ciencia-la-importancia-de-las-humanidades-en-la-pandemia/>

Este trabajo debe ser citado como:

Ramos A, Venegas C, Moreno E. Conocer el pasado es predecir el futuro: a propósito de la covid-19. Rev Esp Cien Farm. 2020;1(1):98-105.

