Introducción

JUAN MANUEL REOL TEJADA
Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia

Los genes expresan proteínas destinadas a realizar muy numerosas funciones soporte de nuestra actividad vital. Si se me permite la metáfora, los académicos son los genes que a través de revisiones o discusiones, «expresan» puntos de vista, en publicaciones destinadas a sugerir reflexiones o proporcionar nuevos enfoques a la realidad científica circundante, insuflando, pues, vitalidad al eterno debate de la Ciencia, soporte del progreso humano. Esa función académica es, además, una exigencia de nuestra obligación de mantener vivo el diálogo entre la ciencia y la sociedad.

La Real Academia Nacional de Farmacia presenta a la comunidad investigadora, al mundo del medicamento, al sanitario y a los profesionales, un trabajo independiente de grandísimo interés científico, económico y social. «Nuevos avances en Medicamentos» es un texto que recoge los últimos progresos en determinados aspectos de la terapéutica farmacológica y los somete a una visión objetiva y crítica que descubre luces y sombras.

Cuando la Real Academia Nacional de Farmacia acepta el riesgo de comparecer públicamente con una obra de estas características añade a su «legitimidad de origen», la «legitimidad de ejercicio». Pone a prueba, con obras, su prestigio y su compromiso con la ciencia y la sociedad.

Creo que la Academia acierta de pleno con esta publicación. Difícilmente otra materia puede ser más específica de nuestra Corporación. Las Ciencias Farmacéuticas, sobre el fundamento de las básicas, estudian las cuestiones relativas al medicamento —farmacología—, en gran parte desde el enfoque de la Biología y la Química —química farmacéutica—. Di-

cho de otro modo desde la búsqueda del perfil estructural a la respuesta clínica terapéutica.

El texto que el lector tiene ante sus ojos tiene dos coordinadores especialistas en esas disciplinas la profesora Carmen Avendaño, Química Farmacéutica, y el profesor Tamargo, Farmacología. Ambos Académicos de Número de esta Academia.

El libro aparece en un momento de transición entre las expectativas y las realidades. Se trata de recorrer ese camino que el desciframiento del genoma ha abierto y que solemos cuantificar diciendo que vamos a pasar de las 500 a las 5000 nuevas dianas terapéuticas. Transición entre la medicina de los síntomas y de los primeros conceptos etiológicos, a los niveles moleculares y genéticos de estos. Transición en la comprensión de los polimorfismos que garantizan el éxito o vaticinan el fracaso. Transición en el logro de los objetivos, que se adivinan tras la inhibición de la transducción de señales que desencadenan la proliferación celular.

Los nuevos caminos pueden ir por la vía de la terapia génica, pero, también, por la de los inhibidores, o los mecanismos competitivos estructurales, que bloquean los procesos bioquímicos en niveles moleculares.

La Profesora Avendaño, que ya nos ha dado magníficos textos sobre estas materias en publicaciones académicas, ha escrito una introducción antológica. Hace un recorrido por el mundo de la innovación farmacéutica y nos deslumbra al describir los progresos actuales que utilizan unas veces el instrumento de la química combinatoria, otras la bioinformática, otras los sistemas robóticos de cribado de alto rendimiento, la nanotecnología, las tecnologías «in sílico», o la terapia fotodinámica, para conseguir fármacos citotóxicos.

El Profesor Tamargo, especialista a nivel internacional en canales iónicos, escribe junto a Eva Delpón un capítulo excepcionalmente lúcido de amplísimo contenido y rigurosa sistemática en referencia concreta a la terapia cardiovascular.

Los Profesores Domínguez-Gil, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia y Martín Suárez nos ilustran sobre los últimos avances en tecnología farmacéutica desde las proteínas recombinantes a los nuevos procesos de administración de medicamentos, nanopartículas, microencapsulación, de tanta importancia en la modificación de la secuencia de liberación del medicamento.

No podía faltar un capítulo dedicado a los fármacos derivados o basados en productos naturales de origen microbiano, escrito por Fernando Peláez que dirige el Centro de Investigaciones de MSD en España, que tiene en su haber logros importantísimos y entre ellos un antifúngico de última y novedosa generación.

Como es preceptivo hay un capítulo dedicado a la farmacogenética, farmacogenómica y proteómica, que con profundidad de conocimiento y ejemplos de alto valor explicativo y didáctico escribe el Prof. Ortega Mata que es el paradigma de un Académico, lo es de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, de insaciable curiosidad científica y profundas convicciones y principios.

El Prof. José Luis García, del Centro de Investigaciones Biológicas, nos pone al corriente de los avances en ingeniería genética y biotecnología. Toda la tecnología del DNA recombinante, los anticuerpos monocionales y los fármacos alumbrados desde esta técnica: factores de coagulación, inmunomoduladores... son revisados desde criterios actuales.

El capítulo de la inflamación está a cargo de los Profesores Espinós, Buenadicha y Calvo. No puedo por menos de emocionarme cuando me refiero al Profesor Espinós. Brillantísimo Académico de Número de Medicina y Farmacia, entregó este trabajo unos minutos antes de sufrir el accidente automovilístico que le puso en inminente trance de muerte. El profesor Espinós lucha con admirable éxito contra las secuelas neurológicas contando con una familia cuya fe hace cotidianamente el milagro de la esperanza. El trabajo es un exhaustivo repaso y puesta al día de la terapia antiinflamatoria desde las bases genéticas y moleculares del proceso.

El Profesor Díaz Rubio, oncólogo clínico de singular trayectoria, describe la historia y consecuencias del descubrimiento del imatinib, el primer verdadero inhibidor del proceso de proliferación celular por el bloqueo de la tirosin quinasa patológica en la LMC, así como los últimos avances de fármacos antiangiogénicos y otros antitumorales.

El texto recoge también una revisión del Profesor Cortijo sobre el tratamiento de las enfermedades pulmonares, gran conocedor del tema, incluye los anticuerpos monocionales para el asma y la EPOC.

Un capítulo sobre avances en psicofarmacología de los Profesores Cuenca, Alonso y López Muñoz, pioneros en este difícil campo, analiza las consecuencias clínicas del bloqueo receptorial por antipsicóticos y antidepresivos.

La Profesora Avendaño, en su introducción, nos acerca al problema del coste y financiación de la innovación farmacéutica. En EEUU desde 1980 al 2002 el gasto total en I+D de la Industria Farmacéutica ha pasado de 2000 millones de dólares a 32000 millones. El coste medio —gasto total en I+D dividido por el número total de medicamentos autorizados— ha pasado en tiempo equivalente de 250 a 500 y por último a 800 millones de dólares. El gasto en I+D+i de los laboratorios que ocupan los primeros lugares es similar a todo el gasto público español en investigación.

Todo esto nos sitúa ante un escenario financiero que solo se puede soportar desde un mercado global. El retorno del capital exige ventas milmillonarias. El primer mundo representa el 85% de toda la producción y el consumo.

Sin embargo eso no puede hacemos olvidar que solo el 1% de los medicamentos autorizados en el último cuarto de siglo se destinó al tratamiento de la malaria; que sólo el 10% de la financiación se dedica a la investigación de fármacos para el tratamiento de las patologías que suponen el 90% de la mortalidad mundial y que el 77% de la diferencia de muertes, entre el 20% de los países más ricos y el 20% de los más pobres, se debe a enfermedades transmisibles casi privativas de los países en vías de desarrollo.

Estudiar las causas de esta situación y los esfuerzos para modificarla, supondría un buen examen para nuestra conciencia occidental. La Real Academia Nacional de Farmacia en octubre acometerá ese trabajo. Pero eso es ya otra historia.

La innovación farmacéutica

CARMEN AVENDAÑO

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica.
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense, Madrid

1. CONSIDERACIONES ACERCA DE LOS PROBLEMAS Y SOLUCIONES QUE AFECTAN A LA INNOVACIÓN FARMACÉUTICA

A partir de 1850, la ciencia ha sido el motor del progreso de la técnica, y la tecnología el apoyo de **la innovación**. Ésta ha dejado de ser un fenómeno marginal en la economía moderna para ser esencial en la dinámica industrial y en el desarrollo de cualquier nación. Hay que resaltar que, en una economía de mercado, la innovación es un fenómeno básicamente empresarial aunque otros agentes fundamentalmente estatales puedan facilitarla o, incluso, catalizarla.

Muchas industrias farmacéuticas parecen atravesar momentos difíciles tras varios años de grandes beneficios. El factor principal que está implicado en este proceso es la competencia de los **genéricos** promovida por los gobiernos para controlar los precios tras la caducidad de los derechos que protegen las patentes. Pero también es preocupante la **falta de nuevos fármacos** que sean realmente **relevantes**, es decir, que supongan avances importantes en el tratamiento de las enfermedades.

Estas circunstancias se yuxtaponen a la **descorazonadora realidad de los números**, ya que suele admitirse que sólo la mitad de los proyectos de I+D que se inician en una empresa farmacéutica acaban con la selección de algún candidato a fármaco, sólo un 20% de estos candidatos se desarrollan, y sólo un 10% de este 20% se comercializan, lo que da

como resultado que sólo un 1% de las ideas alcanza el éxito, con el agravante de que el desarrollo de muchos compuestos se frena en las últimas fases de la investigación. Según el informe anual correspondiente al 2003 de la patronal farmacéutica estadounidense (PhRMA) la relación de éxitos/candidatos es aún menor: de cada 5000 nuevas moléculas seleccionadas 250 alcanzan los estudios preclínicos de las que sólo 5 pasan a ensayos clínicos y una se aprueba por la FDA.

Resulta evidente que **la innovación farmacéutica tiene problemas de productividad**. Por ejemplo, la inversión anual en I+D de la Industria Farmaceutica americana pasó de 2.000 millones de dólares en 1980 a 32.000 en el año 2002, mientras que el número de nuevos fármacos registrados cada año en este periodo permaneció constante. ¿Cuáles son las causas de este estado de cosas? En gran medida se debe a que las **reglamentaciones** para aprobar un nuevo producto son **cada vez más estrictas**, a que las **enfermedades** a las que se dirige la innovación son **más difíciles de tratar**, a que la **innovación biológica** ha sido impactante pero **se necesita trasvasar** esta ingente cantidad de conocimiento para diseñar nuevas entidades con actividad terapéutica y, también, a la necesidad de **prestar más atención a la innovación química** [1-3].

La industria farmacéutica se basaba hasta los años 80 en el **«modelo aspirina»**, desarrollando productos baratos y de gran consumo para el tratamiento sintomático de diversas patologías, mientras que los fármacos surgidos de un largo proceso de investigación y con una carga innovadora notable eran escasos. Por el contrario, las grandes compañías necesitan invertir actualmente ingentes cantidades de dinero en el desarrollo de fármacos innovadores que permitan el tratamiento de enfermedades crónicas, siendo el riesgo mucho mayor. Ahora bien, si no se asume este riesgo, la empresa puede ser absorbida o perecer.

Este cambio de estrategia se produce de forma no programada cuando el antiguo modelo deja de ser productivo, como ocurrió con las primitivas aproximaciones a los fármacos antitumorales, o cuando se aprecian los beneficios económicos que pueden alcanzarse con un fármaco verdaderamente innovador, como fue la **ciclosporina A**. Los analistas económicos han atribuido a esta molécula, un potente inmunosupresor descubierto en 1972 como consecuencia de un programa de cribado que buscaba compuestos antimicrobianos, el enorme crecimiento experimentado

en los años noventa por la compañía suiza **Sandoz** (que después sería parte de **Novartis**). Este fármaco apareció en un momento clave para generalizar el transplante de órganos en todo el mundo.

Algo semejante sucedió con SK&F con el lazamiento en 1987 del primer antagonista H_2: Tagamet® (cimetidina). Este fármaco antiúlcera transformó a la compañía en otra de gran éxito: SmithKline Beecham. Análogamente, otro antagonista H_2: Zantac® (ranitidina) que se lanzó al mercado 5 años más tarde, permitió a la empresa Glaxo adquirir Wellcome.

En cuanto al desarrollo de fármacos antitumorales, es de justicia señalar que al firmar Richard Nixon la «National Cancer Act» en 1973, se produjo una declaración de guerra al cáncer que concentró enormes recursos y ha salvado millones de vidas. Los NIH (Institutos Nacionales de Salud) tenían como objetivo prioritario solucionar el problema del cáncer y, al mismo tiempo, se impulsó un acercamiento entre los organismos públicos de investigación y las empresas farmacéuticas estadounidenses [4,5]. A pesar de estos esfuerzos el premio Nobel de Medicina Harold Varmus, que fue uno de los protagonistas, reconocía diez años más tarde cómo, a pesar de los varios miles de millones de dólares invertidos, el arsenal terapéutico disponible continuaba siendo eminentemente paliativo. Este arsenal se compone de cócteles de fármacos citotóxicos, entre los que se incluyen paclitaxel, vinblastina o daunomicina, que atacan sin distinción a las células que se dividen, afectando principalmente a los tumores porque éstos tienden a dividirse más rápidamente. Por tanto, tienen efectos secundarios muy importantes en otras células que se renuevan también rápidamente. Según Varmus, se había seguido una estrategia equivocada: dirigir los trabajos a una investigación aplicada sin conocer exactamente las claves de la enfermedad.

Este impulso permitió que las compañías farmacéuticas apreciaran la rentabilidad a largo plazo y que se estudiara **la célula hasta sus últimas consecuencias**, identificándose los elementos que intervienen en el ciclo celular. Con este cambio de estrategia las empresas pudieron recuperar parte de sus inversiones y en una docena de años **las formas de cáncer de mayor incidencia** cuentan con fármacos muy específicos y con otros, aun imperfectos, que poseen una eficacia variable**.** El Profesor Díaz Rubio analiza extensamente en esta monografía las nuevas dianas en el tratamiento del cáncer.

Animadas por el reenfoque de la investigación en cáncer y por el proyecto genoma, muchas empresas dirigieron sus expectativas de negocio a otras enfermedades sin tratamiento específico entre las llamadas «**rentables**»: cardiovasculares, neurodegenerativas, metabólicas o infecciosas**.** En consecuencia, los costes de investigación de fármacos se han disparado (la mayor inversión corresponde especialmente a los ensayos clínicos), a pesar de que se ha reducido entre dos y cuatro años el tiempo de su desarrollo respecto a los 14 años que era el promedio en 1997.

En la actualidad, las probabilidades de éxito pueden ser mayores gracias al desarrollo de la genómica y la proteómica pero, como ya se ha comentado, continúan siendo bajas. Los últimos datos respecto al coste de desarrollo de un nuevo medicamento muestran que ha pasado de 138 millones de dólares en 1975 a 802 millones en el año 2000, y la inversión en I+D de la industria farmacéutica norteamericana ha aumentado desde los 29.700 millones de dólares invertidos en el año 2001 a los 32.000 millones invertidos en el 2002. Además, debido al control de los precios por los distintos gobiernos, sólo 3 de cada 10 fármacos comercializados producen beneficios que igualan o superan el coste medio de I+D.

En otro orden de cosas, todavía no se ha confirmado que las **fusiones** de grandes empresas originen una mayor productividad innovadora, aunque éstas se han producido últimamente a una escala que hace años hubiera resultado impensable. Pfizer, que ya era líder mundial entre las empresas farmacéuticas, se ha distanciado todavía más de GlaxoSmith-Kline y de Merck, que ocupaban los puestos segundo y tercero, tras su fusión con Pharmacia. Por cierto, esta última empresa era una modesta farmacia de Estocolmo en los años 1940s y fundamentó su fuerza en la innovación de la instrumentación y de la química analítica que emanaban de la Universidad de Uppsala.

La **empresa Pfizer** merece algunos comentarios en relación con el mantenimiento de una innovación sostenida. Por ejemplo, cuando no había suficiente cantidad de limones para fabricar ácido cítrico durante la Primera Guerra Mundial, desarrolló la tecnología adecuada para fabricar dicho ácido por fermentación a partir del azúcar, y fue esta tecnología la que le permitió liderar la **producción de penicilina** en los años 40. En los años 50 desarrolló la **terramicina**, uno de los antibióticos de amplio espectro, mientras que en los años 60 y 70 sus productos más importan-

tes fueron el antidiabético **Diabinese®**, **Minipress®** para la terapia cardiovascular, y el medicamento dirigido al SNC **Sinequan®**. En los años 80 desarrolló el antiinflamatorio **Feldene®**, el antifúngico **Diflucan®** (uno de los productos «bandera» de esta compañía desde el punto de vista científico y económico cuya patente expira en el 2004), y el cardiovascular **Procardia XL®**. En los 90 lanzó **Cardura®** (cardiovascular), **Glucotrol XL®** (diabetes), **Norvase®** (cardiovascular), **Zithromax®** (antibiótico), **Zoloft®** (un antidepresivo que tuvo que luchar muy duramente para competir con Prozac® de Lilly que ya era líder mundial) y, finalmente, **Viagra®** (disfunción eréctil).

Un informe reciente de la consultora Datamonitor concluye que, tras la reorganización que ha originado la fusión de Pfizer y Pharmacia, pocas compañías disponen de los medios suficientes para mantener su independencia en un plazo de cinco años teniendo en cuenta su productividad en I+D, la expiración de patentes y la cada vez menor confianza de los inversores. El potencial de cinco compañías —AstraZéneca, Bristol-Myers Squibb, Eli Lilly, GlaxoSmithKline y Wyeth— para mantener su ritmo de crecimiento e independencia durante los próximos seis años, sugiere que Eli Lilly y AstraZéneca son las mejor situadas. Lilly tendrá que superar el vencimiento de la patente de **Prozac®**, cuyo principal impacto en la compañía se ha producido ya entre 2001 y 2002, pero cuenta con una cartera innovadora que encabeza el antipsicótico **Zyprexa®** mientras que en AstraZéneca la amenaza de genéricos está compensada con productos innovadores como **Crestor®** e **Iressa®**. Este último se comentará más adelante.

También se han multiplicado las **alianzas** de las grandes compañías farmacéuticas **con pequeñas empresas y grupos de investigación de carácter público** a fin de aumentar su capacidad científica y tecnológica, ya que para la innovación farmacéutica es imprescindible avanzar en los conocimientos acerca de cómo se desarrollan y funcionan muchas enfermedades, algunas muy complejas. El final del proyecto acerca del genoma humano ha creado mayores oportunidades para el descubrimiento de fármacos en todas las enfermedades y la **farmacogenómica**, al permitir que los fármacos se dirijan a dianas más específicas, intenta aumentar la productividad de la innovación y conseguir compuestos con menos efectos secundarios [6-8].

El conocimiento de nuevas dianas terapéuticas permite además de encontrar nuevos fármacos desarrollar **nuevas indicaciones** para viejos fármacos, como es el caso de la **memantina** (**Ebixa®),** un fármaco para el tratamiento del Parkinson de Merz Pharmaceuticals que, recientemente, se ha aprobado para el Alzheimer por ser antagonista no competitivo de los receptores NMD de ácido glutámico.

La innovación se dirige también en algunos casos al desarrollo de **nuevas formas de administración**, ya que son muy convenientes los fármacos que pueden administrarse por vía oral y requieran, como máximo, una dosis diaria para facilitar el cumplimiento de los tratamientos.

A su vez, **muchas de estas pequeñas empresas farmacéuticas no podrían subsistir sin aliarse con una gran empresa**, puesto que dirigen su esfuerzo a un único proyecto innovador pero carecen de capacidad para desarrollarlo, especialmente en lo concerniente a los procesos de fabricación del fármaco, sus ensayos preclínicos y clínicos, el control de todos los procesos, y la preparación de la documentación necesaria para su aprobación.

Es frecuente que la innovación farmacéutica se apoye en **empresas especializadas en el desarrollo de procesos de síntesis de APIs** («**Active Pharmaceutical Ingredients**»). Sus clientes pueden ser compañías que se encuentran en una fase de actividad incipiente o grandes empresas que requieren urgentemente cantidades de producto para llevar a cabo los ensayos clínicos y prefieren contratar este trabajo a otras más especializadas. Y es que los **problemas del escalado de un proceso de síntesis** pueden a veces resultar complejos, ya que la producción de fármacos a gran escala se realiza normalmente con métodos muy diferentes a los empleados en la síntesis realizada en el laboratorio debido a la necesidad de eliminar disolventes peligrosos y purificaciones cromatográficas o, simplemente, porque incluyen determinados pasos que no se reproducen a grandes escalas.

Gracias a una asociación de este tipo, se ha aprobado y comercializado el anticolesterolémico **WelChol®** (**colesevelam**), un polímero complejo con capacidad para enlazarse a los ácidos biliares y eliminarlos del torrente circulatorio obligando al hígado a secuestrar el colesterol sanguíneo para reemplazarlos. Su descubrimiento tuvo lugar en una pequeña empresa llamada GelTex, pero el escalado de su síntesis para dispo-

ner de cantidades importantes requirió la experiencia de una gran compañía como DSM Pharma Chemicals.

Otro ejemplo es la **verteporfina**, que es el principio activo de **Visudine®,** un medicamento comercializado por Novartis para el tratamiento de la degeneración macular. Tras su administración en forma inyectable se transporta por las lipoproteínas de la sangre hasta el ojo donde, tras la irradiación con láser, libera oxígeno singlete destruyendo las células que forman los vasos sanguíneos anormales (ver más adelante con algo más de detalle el significado de la **terapia fotodinámica** aplicada a la lucha anticancerosa). Este procedimiento se descubrió a principios de los años 90 en una empresa canadiense, que por aquel entonces era prácticamente una empresa virtual, y estaba liderado por una inmunóloga cuya madre había perdido la vista por esta causa. La preparación de cantidades suficientes cuando se iniciaron los ensayos clínicos en 1993 hasta que se aprobó en 1999 fue posible gracias a un contrato de dicha empresa con Raylo.

Un tercer ejemplo lo tenemos en el desarrollo de **Ranexa™** (**ranolazina**), un derivado de piperazina cuya actividad antianginosa se debe en parte a su capacidad para inhibir la oxidación de los ácidos grasos, lo que supone una innovación en este tratamiento. Fue descubierto por una pequeña compañía que sólo se dirige al tratamiento de las enfermedades cardiovasculares (CV Therapeutics), pero su escalado y fabricación para su posible comercialización si finalmente se aprueba ha sido posible con la colaboración de la empresa Dow.

También las grandes empresas pueden estar interesadas en contratar empresas más pequeñas que están especializadas en el rápido desarrollo de procesos de síntesis para facilitar los estudios clínicos de sus nuevos fármacos. Una de estas empresas es Tetrionics, fundada en 1989 por expertos en la química de la vitamina D de la Universidad de Wisconsin. Ha colaborado desde 1990 con la gran empresa Abbott para el escalado y la producción en un proceso sintético de 27 pasos del análogo de la vitamina D **paracalcitol** (**Zemplar®**), que desde su aprobación en 1998 se utiliza en el tratamiento del hiperparatiroidismo.

Otras empresas son expertas en la química de los **compuestos fluorados**, en las técnicas de **polimorfismo**, en la **catálisis asimétrica** e, incluso, en la **cristalización de APIs**.

Dado que los gobiernos son los principales clientes de las empresas farmacéuticas, la innovación farmacéutica se enfrenta a la relación **coste/eficacia**. Así, un estudio de los costes del tratamiento anual de pacientes con hepatitis C utilizando **interferón α-2b** (**Introna®**) o **interferón α-2b pegilado** (**Pegintrón®**), sólos o en combinación con **ribavirina**, concluyó que las ventajas del interferón pegilado sobre el no pegilado son demasiado pequeñas si se comparan los costes de ambos medicamentos [9].

Pegintrón® es una innovación tecnológica que permite la incorporación de interferón en liposomas estables metabólicamente y carentes de rechazo inmunológico, gracias a las cadenas de polietilenglicol (**PEG**) de su cubierta.

Una empresa farmacéutica de primera línea debe vivir impulsando la innovación a través de una adecuada organización dirigida al estímulo del desarrollo creativo [10]. Sin embargo, la suerte juega un papel muy importante, siendo frecuente que un fármaco que estaba dirigido en principio al tratamiento de un proceso determinado y ha encontrado dificultades, acabe teniendo una aplicación distinta (caso, por ejemplo, del sildenafilo).

Las administraciones públicas de todos los países avanzados, y actualmente en nuestro entorno la Comunidad Europea, apoyan los procesos de innovación con subvenciones, créditos blandos, normas de política fiscal, difusión y transferencia de resultados. En **el caso español**, la Dirección de Política Tecnológica, a través del plan «**Acción Profarma**», se ha encargado desde hace unos años de diseñar estrategias para fomentar la investigación e implantar nuevas tecnologías en el sector farmacéutico [11, 12]. En contrapartida, se pueden acelerar los registros en la medida de lo posible y participar en distintos programas, como es el caso del programa «Profit».

Además de la cofinanciación de proyectos por parte de organismos públicos internacionales, nacionales o regionales, existen Fundaciones, organismos para fomentar la interacción Universidad-Empresa y otras instituciones que deben potenciarse cada vez más.

La innovación farmacéutica requiere conocimientos muy difíciles de clasificar, dependiendo el éxito de un **capital humano** adecuado, de una clara **determinación de objetivos**, y de la existencia de **inversores dispuestos a asumir los riesgos** que supone intentar comercializar un

descubrimiento, una actitud poco frecuente en España y en general en Europa, que se encuentra en desventaja frente a Estados Unidos o Japón, fundamentalmente en el sector de la Biotecnología.

España tiene un problema adicional respecto a la mayoría de los países europeos, ya que la proporción entre el número de investigadores que trabaja en el **sistema público de I+D** y en la empresa es aproximadamente de 4:1, mientras que en dichos países casi la mitad de los investigadores desarrolla su investigación en el **sector privado**.

Sin embargo, aún constatando estas características negativas de nuestro país al mismo tiempo que su débil tejido industrial, se ha demostrado a lo largo de los últimos años la capacidad para introducir desde aquí fármacos innovadores y para ser el mayor productor mundial de otros, como es el caso de la fábrica de antibióticos β-lactámicos DSM Deretil en Villaricos (Almería) y de aspirina Bayer en La Felguera (Asturias).

2. LA INNOVACIÓN FARMACÉUTICA A LO LARGO DEL SIGLO XX

La **innovación farmacéutica** ha sido decisiva para la humanidad a lo largo del siglo XX, habiéndose producido como consecuencia de una conjunción de descubrimientos biológicos y médicos, del hallazgo de estructuras naturales activas, del desarrollo de modelos adecuados para el estudio farmacológico, de la ampliación de objetivos de la síntesis química, de la aplicación de nuevas tecnologías y, particularmente en los últimos años, de los avances de la biotecnología. Baste decir que, como consecuencia de una mejor calidad de vida, del desarrollo de la medicina y, con ella, de muchos fármacos innovadores, la esperanza de vida ha pasado de 47 años en 1900 a 77 años o más en la actualidad.

Las primeras enfermedades que se combatieron eficazmente con fármacos (denominados en general quimioterápicos) fueron las infecciosas. Gracias a Louis Pasteur y Robert Koch, que determinaron cómo algunos gérmenes son causantes de muchas de ellas, se abrieron paso las **vacunas** desde finales del siglo XIX, y Paul Ehrlich desarrolló por manipulación molecular de compuestos de arsénico el primer antisifilítico eficaz hasta la comercialización de la penicilina: el **salvarsán**.

En 1933 Gerhard Domagk, que trabajaba en la empresa química alemana I.G. Farben, encontró que el colorante rojo-anaranjado ***prontosil rubrum*** mataba a las bacterias que infectaban a ratones de laboratorio. Su metabolito activo fue el origen de las **sulfamidas**. Sin embargo, el gran descubrimiento dentro de los fármacos antiinfecciosos fue la **penicilina**, descubierta en 1928 por Sir Alexander Fleming, desarrollada posteriormente por Howard Florey y Ernst Chain y producida industrialmente en 1943. A ella le siguieron muchos otros antibióticos [13, 14].

En cuanto a los fármacos que regulan funciones fisiológicas o minimizan los efectos de una función desregulada (denominados farmacodinámicos), debemos comenzar por Felix Hoffman, que en 1910 (trabajando para la compañía alemana Bayer) desarrolló la **aspirina** por manipulación de la estructura del ácido salicílico, un compuesto aislado de la corteza de sauce que había mostrado propiedades analgésicas.

El 1921 Frederick Bamting, un científico de la Universidad de Toronto que estaba en relación con la compañía farmacéutica norteamericana Lilly, logró aislar la **insulina**, una tarea en la que habían fracasado muchos investigadores desde que a finales del siglo XIX se relacionara la diabetes con un mal funcionamiento del páncreas. La citada empresa compró los derechos para producirla a gran escala, y desarrolló la tecnología necesaria para introducirla en el mercado en 1923.

En cuanto a las enfermedades cardíacas, ya en 1799 John Ferrier había descubierto que las hojas secas de **digital** estimulan las contracciones del corazón y aumentan la sangre bombeada en cada latido. Desde 1897 se utilizó en la angina un ingrediente de la dinamita, la **nitroglicerina**, y en 1901, se empezó a utilizar para estimular el corazón la **adrenalina**, un compuesto que se había aislado de ciertas glándulas animales. En 1949 se divulgó que la raíz pulverizada de la planta tropical *Rauwolfia serpentina* se utilizaba en la India para bajar la presión sanguínea, aislándose su principio activo, la **reserpina**, tres años después. El primer **diurético** utilizado para este mismo propósito se aprobó en 1950, y el primer **β-bloqueante** se comercializó en 1967. El primer **inhibidor de ECA** y el primer **bloqueante de canales de Ca^{2+}** se aprobaron en 1981. Los fármacos **anticoagulantes** surgieron también en los años 80. La primera **estatina**, inhibidora de una de las enzimas implicadas en la biosíntesis del colesterol aplicable a patologías de las coronarias, se aprobó en 1987, después lle-

garon los antagonistas de angiotensina II, los de endoletlina y los inhibidores de renina. Actualmente, son más de un centenar los medicamentos innovadores que se están desarrollando para enfermedades cardiovasculares, procediendo alguno de ellos de la aplicación de nuevas tecnologías.

Siendo estas innovaciones farmacéuticas relevantes, es quizás más espectacular el cambio que los fármacos han propiciado desde 1950 en las llamadas enfermedades mentales que, anteriormente, producían miedo y vergüenza, mientras que hoy se manejan con bastante facilidad. Este cambio comenzó con la introducción de la **clorpromazina** para el tratamiento de la psicosis. También la **fluoxetina**, el primer inhibidor de la recaptación de serotonina selectivo (que se introdujo en 1987), revolucionó el tratamiento de la depresión.

Otro hito en la innovación farmacéutica ha sido el hallazgo de los **fármacos inmunosupresores**, que permitieron el éxito de los transplantes de órganos, encabezados por la ya comentada **ciclosporina**.

En lo que respecta al **SIDA**, una terrible plaga de la humanidad en la última parte del siglo, hay que destacar cómo ha avanzado su tratamiento en un tiempo récord. Cuatro años después de que en 1983 se identificara el virus VIH-1 causante de esta enfermedad, se aprobó el primer inhibidor de la enzima transcriptasa inversa: el **zidovudir**, y en 1995 se introdujo el **saquinavir**, que fue el primer inhibidor de la proteasa VIH-1. Los tratamientos combinados de estos dos tipos de fármacos han reducido la mortalidad en un 70%, y desde principios del 2003 se comercializa en EEUU **T-20** (**efuvirtide**, **Fuzeon®**), un inhibidor de fusión desarrollado por el laboratorio Trimeris, Inc. y Hoffman-LaRoche, que es consecuencia del descubrimiento en 1996 de los receptores de las células CD4 y de cómo el VIH logra entrar e infectar estas células.

Efuvirtide se une a una proteína de la superficie del virus llamada proteína gp41, impidiendo que éste pueda adherirse a la superficie de las células CD4. Debido a su estructura peptídica, no puede administrarse por vía oral, sino por inyección subcutánea utilizando jeringuillas similares a las de insulina. Su estructura determinó también la alianza de Trimeris con Hoffman-LaRoche por la experiencia de esta última empresa en la síntesis de péptidos y proteínas. Otros fármacos anti VIH-1 que también están en estudio clínico muy avanzado son dos inhibidores de integrasa que están siendo desarrollados por Merk y GSK.

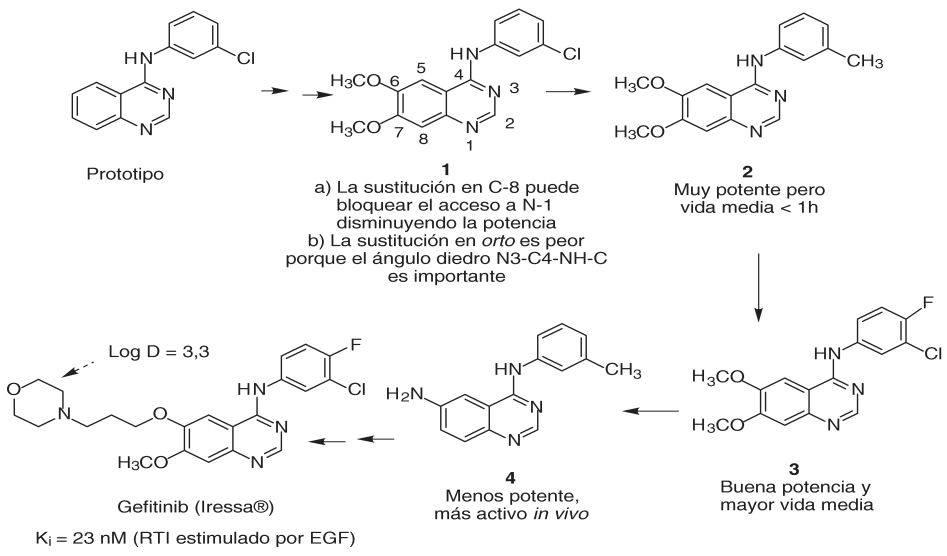
En cambio, el **cáncer** es uno de los problemas peor resueltos por la administración de medicamentos, si bien hoy se producen menos fallecimientos que hace 10 años y ciertos tumores tienen mucho mejor pronóstico. El **metotrexato**, que se desarrolló en 1948 por los Laboratorios Lederle, fue el primer antimetabolito útil como anticanceroso, al que siguieron muchos otros agentes citotóxicos. De todos los fármacos antitumorales que se han ido comercializando, hay que destacar a **paclitaxel**, un producto natural que desde su introducción en 1994 supuso un gran progreso en el cáncer de mama y de ovario, entre otros, aunque la situación sigue siendo desoladora. En el año 2000, desarrollaron un tumor maligno 5,3 millones de hombres y 4,7 millones de mujeres, y murieron de esta enfermedad 6,2 millones de personas. Además, la Organización Mundial de la Salud calcula un crecimiento en el número de afectados en los próximos años, de forma que en el 2020 se alcanzará la cifra de 15 millones de enfermos de cáncer.

Ya hemos comentado que en los últimos años se ha optado por abordar **la terapia del cáncer con compuestos más selectivos** y, por tanto, menos tóxicos. Debido a que el crecimiento incontrolado de las células tumorales está relacionado muchas veces con una señal de transducción inapropiada, han surgido muchos antitumorales que tienen como diana a los **receptores del factor de crecimiento epidérmico** (EGF = «Epidermal Growth Factor») o a una determinada **quinasa**, de las que se conocen más de 2000 en el hombre. Las quinasas, también denominadas cinasas por su acción «movilizante», son enzimas que al facilitar la fosforilación de proteínas actúan como señales de transducción. A pesar de la dificultad que presenta «a priori» encontrar inhibidores de quinasas selectivos que se unan al mismo lugar (o a lugares complementarios) que el ATP, que es el agente fosforilante, algunos antitumorales selectivos actúan de esta manera, y han surgido gracias al hallazgo de prototipos por los métodos de cribado al azar de alto rendimiento («**HTS methods**»).

Como ejemplo de las circunstancias que rodean la aprobación del registro de fármacos, comentaremos el caso del antitumoral **Gefitinib** (**Iressa®**, de AstraZeneca), recientemente aprobado por la FDA. Su desarrollo a partir de un prototipo de estructura 4-(3-clorofenilamino)quinazolina se resume en el Esquema 1 [15]. La manipulación estructural de este prototipo permitió descubrir, entre otras cosas, la importancia del ángulo die-

dro formado por los átomos N3-C4-NH-C(arilo), a fin de que el sustituyente fenilamino se disponga en una conformación que optimice su interacción con el subsitio complementario de la diana farmacológica. También se refleja en el Esquema la importancia de la biodisponibilidad y de cómo puede conjugarse este aspecto con la potencia. Gefitinib inhibe una tirosina quinasa que forma parte del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Dicha inhibición bloquea las rutas de señalización que están implicadas en el crecimiento y supervivencia de las células cancerígenas (ver también el Apartado 4). Es eficaz por vía oral en el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), y también ha mostrado actividad antitumoral en el cáncer de mama avanzado.

Gefitinib se autorizó en Japón en julio de 2002 para el tratamiento del CPNM inoperable o recurrente, pero su «carrera» no ha estado exenta de dificultades. A finales de septiembre del 2002, en una de las sedes de la FDA, un grupo de pacientes con cáncer de pulmón expuso delante de un comité de expertos de este organismo sus razones para solicitar que Iressa® no fuera rechazado, como era previsible por la necesidad de aportar más datos clínicos. Estos testimonios, contra todo pronóstico, modi-



ESQUEMA 1

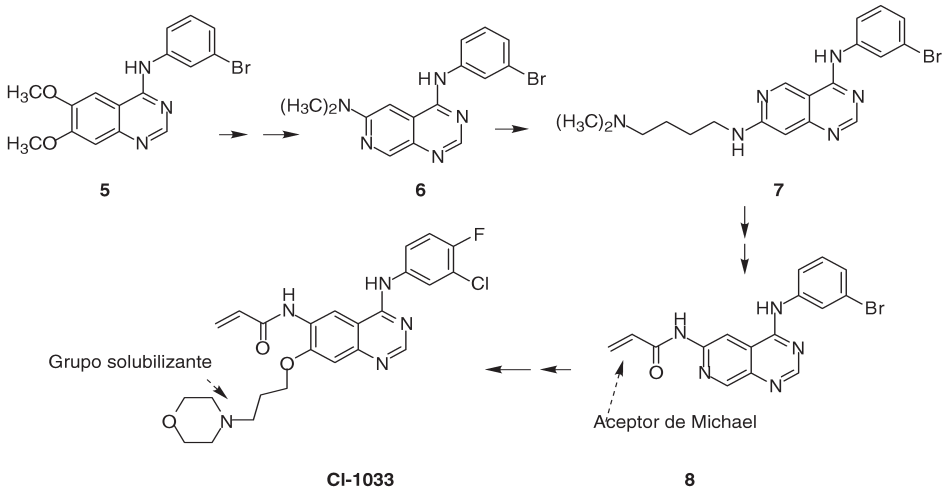
ficaron el sentido del voto de la mayoría de los ponentes, que propusieron su aprobación acelerada al no existir ningún fármaco para esta situación. Resulta bastante paradójico que, al mismo tiempo, el Ministerio de Salud de Japón hiciera públicos los informes de 81 muertes de pacientes con cáncer vinculadas aparentemente a Iressa®.

Otro ejemplo lo encontramos en **Parke-Davis** [16] que descubrió cómo la anilinoquinazolina **5** (obsérvese su analogía con la estructura **1** precursora de gefitinib) antagonizaba receptores EGF (algunos de cuyos representantes se denominan erbB) a una concentración 14 nM (Esquema 2). Como dicho compuesto era inactivo *in vivo*, la firma obtuvo el análogo **6**, que inhibía el crecimiento tumoral pero era insoluble, mientras que el compuesto **7**, más soluble, era mucho menos potente. Dado que estos receptores poseen un residuo de cisteína cuyo grupo SH interviene en la formación de enlaces de hidrógeno con los ligandos, se diseñaron estructuras que tuvieran un grupo aceptor de Michael, a fin de obtener inhibidores irreversibles mediante la adición de dicho grupo SH.

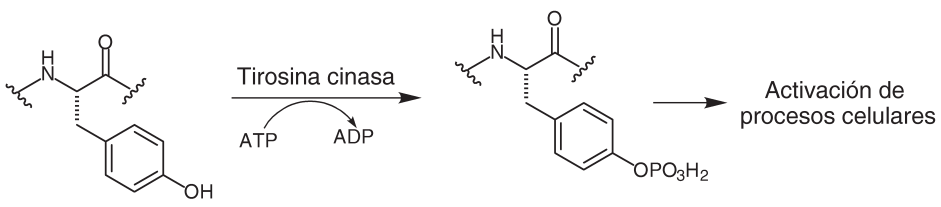
Se obtuvo así el compuesto **8** y, finalmente, el compuesto **CI-1033**, más soluble y con excelente potencia frente a varios receptores erbB. Dicho producto está en ensayos clínicos.

Un tercer ejemplo de gran éxito ha sido **Imatinib** (**Glivec®** de Novartis). Es el primer antitumoral comercializado que está dirigido a una diana asociada a una mutación genética que existe en el 95% de los casos del trastorno hematopoyético denominado leucemia mieloide crónica. Esta mutación se caracteriza por la existencia de una quinasa Abl superactivada dependiente de ATP, que está expresada por el cromosoma de Filadelfia y fosforila grupos hidroxilo de tirosina [17-19]. El cromosoma de Filadelfia se origina por una traslocación del oncogen c-Abl del cromosoma 9 que se yuxtapone con secuencias del cromosoma 22 (c-Bcr).

Por cribado al azar de alto rendimiento (HTSM), en el que se estudió la afinidad por diferentes quinasas de varios compuestos previamente sintetizados en la empresa Ciba-Geigy (hoy Novartis), surgió el prototipo 2-fenilaminopirimidina que se indica en el Esquema 3 (obsérvese de nuevo su analogía con el de gefitinib)**.** Éste tenía baja actividad y poca

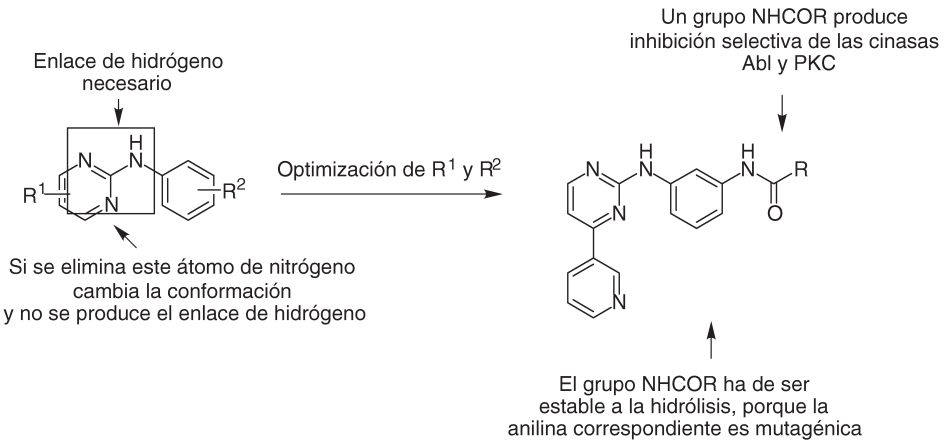


Esquema 2



selectividad, pero era fácilmente manipulable por introducción de sustituyentes en ambos anillos. Al sintetizar varios análogos, se observó que el agrupamiento de guanidina que se ha recuadrado era imprescindible para la actividad, y se supuso que debía estar implicado en enlaces de hidrógeno con la enzima. Los mejores sustituyentes R^1 y R^2 para aumentar la afinidad por la proteína quinasa C (PKC) y la quinasa Abl (la diana farmacológica deseada en este caso) fueron 3-piridilo y acilamino, pero este último debía ser un derivado estable a la hidrólisis, porque las anilinas resultantes de ésta eran mutagénicas.

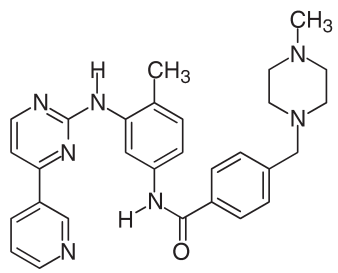
Cuando se introdujo un grupo metilo en la posición *orto* del grupo fenilo se observó que, debido a que dicho grupo impide la libre rotación del enlace NH-fenilo, el compuesto adopta una conformación afín por la



ESQUEMA 3

quinasa Abl. Finalmente, se introdujo un grupo solubilizante de tipo dialquilaminoalquilo y se llegó al imatinib**.**

La inhibición de quinasas también se dirige actualmente al tratamiento de enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide o la osteoartritis. Uno de estos fármacos es **VX-745**, actualmente en ensayos clíni-

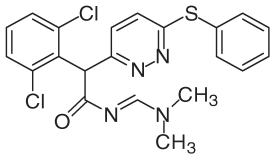


Imatinib

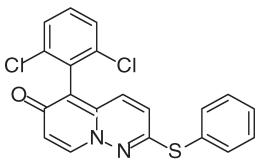
cos, que está siendo desarrollado por Vertex y Aventis [20]. **VX-745** es un inhibidor de una MAP-quinasa activada por p-38 (las MAP-quinasas son enzimas fosforilantes que se activan por mitógenos). La inhibición de esta MAP-quinasa, puede detener la producción de factores de inflamación IL-1β y TNF-α.

En Vertex Pharmaceuticals se encontró por cribado de alto rendimiento un «hit» que dio lugar al prototipo **9**. Éste se convirtió en el molde **10**, y sobre él se estudiaron diferentes sustituciones, en concreto, la modificación del resto feniltio para darle una mayor estabilidad metabólica. Se llegó así al compuesto **VX-745**, que fue activo *in vivo* en los modelos animales de artrosis y puede ser administrado por vía oral a humanos.

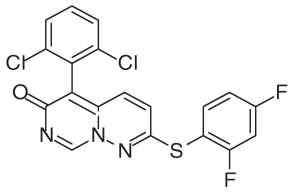
Se están desarrollando también otros fármacos innovadores en la terapia anticancerosa, entre los que destacan los que tienen como objetivo



9



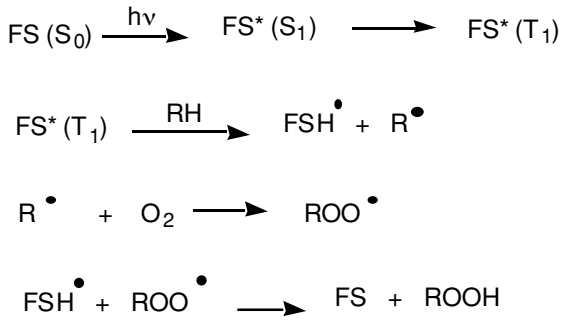
10



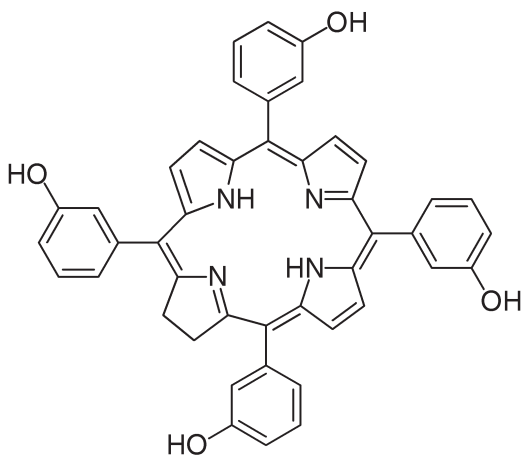
VX-745

la **inhibición de la angiogénesis**, pero dado el carácter general que se pretende en estas reflexiones, vamos a comentar cómo puede conseguirse una citotoxicidad selectiva con la **terapia fotodinámica** (ver anteriormente la **verteporfina**) que ha resurgido a partir de los primeros años 90 con la aparición de muchos **fotosensibilizantes** y el desarrollo de los láseres de diodo y de las fibras ópticas por empresas como Biolitec AG.

Cuando se inyecta por vía intravenosa un agente fotosensibilizante inactivo en la oscuridad, éste tiende a concentrarse en las lesiones neoplásicas y puede utilizarse como herramienta de diagnóstico observando la emisión de fluorescencia cuando se irradian. Pero si se plantea como un profármaco antitumoral es porque pueden también generar especies citotóxicas [21]. Cuando el agente fotosensibilizante absorbe energía radiante ($h\nu$) en la región del rojo (650-800 nm) en la que los tejidos son más transparentes, pasa de su estado fundamental (S_0) a un nivel de energía superior (S_1), que puede transformarse en un estado triplete (T_1) fotoactivo, con una vida media algo mayor que el estado singlete. En dicho estado puede reaccionar con un sustrato originando radicales libres (ver las siguientes ecuaciones) o iones que, a su vez, pueden reaccionar con oxígeno molecular dando productos citotóxicos.



Entre los fotosensibilizantes de interés se encuentran las **clorinas** (porfirinas en las que se ha reducido un doble enlace) y las bacterioclorinas (que tienen reducidos dos dobles enlaces opuestos). La ***m*-THPC** o **Foscan®** (5,10,15,20-tetrakis-*m*-hidroxifenilclorina) ha sido una de las clorinas más estudiadas [22]. Por su naturaleza anfifílica (lipófila e hidrófila), *m*-THPC se localiza preferentemente en la bicapa lipídica de la membrana de las mitocondrias y en los lisosomas. Foscan® se activa por la luz roja que emite un láser y se utiliza para eliminar los carcinomas de células escamosas en cabeza y cuello y otros tumores de la cavidad bucal cuando la radioterapia convencional, la cirugía o la quimioterapia no son adecuadas [23].



m-THPC

3. METODOLOGÍAS ACTUALES APLICADAS A LA INNOVACIÓN FARMACÉUTICA. CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO, QUÍMICA COMBINATORIA, VALIDACIÓN DE DIANAS FARMACOLÓGICAS, BIOINFORMÁTICA, NANOTECNOLOGÍA, TECNOLOGÍAS IN SILICO

En los últimos años se han identificado nuevos prototipos o **«hits»** por cribado de alto rendimiento (**HTS**, «High Throughput Screening») de las grandes colecciones de compuestos sintetizados a través de muchos años en una compañía u obtenidos por nuevas tecnologías de síntesis, como son la **química combinatoria** o la **síntesis en paralelo**. Estas últimas, proceden de una nueva forma de purificar los productos de una reacción que se descubrió hace aproximadamente 40 años ante las dificultades que entrañaba la síntesis de péptidos: la **síntesis en fase sólida**.

Estas metodologías permiten obtener colecciones, denominadas bibliotecas de compuestos, formadas por un gran número de análogos en un tiempo mucho menor que si se aplica la síntesis tradicional, en la que cada paso origina un solo compuesto. Estas **bibliotecas de compuestos** pueden estar dirigidas a dianas farmacológicas prefijadas, aunque muy habitualmente están orientadas a obtener diversidad estructural a fin de identificar nuevas dianas terapéuticas. En esta última orientación, el método HTS permite determinar actividades biológicas de forma automatizada con mínimas cantidades de producto en muy corto espacio de tiempo [24-26].

La **síntesis orientada a una determinada diana farmacológica** tiene una larga historia, aunque una orientación diferente en las universidades y en las compañías farmacéuticas. En aquéllas suele dirigirse a los productos naturales y en éstas a los fármacos o candidatos a fármacos [27]. El **análisis retrosintético**, es decir, el reconocimeiento de cuáles son los elementos estructurales que codifican las transformaciones sintéticas que se pretenden, es la base de la síntesis orientada que viene utilizándose para la preparación de muchos compuestos de gran valor en medicina y biología, como ocurre con un análogo de ecteinascidina-743 con potencial utilidad como antitumoral, la ftalascidina [28].

Dicho análisis también es imprescindible en el diseño de **«bibliotecas enfocadas»** de compuestos con circunstancias estructurales comunes

que facilitan el enlace a una determinada proteína que se ha seleccionado como diana farmacológica [29].

Sin embargo, el análisis retrosintético no se utiliza directamente en las **bibliotecas de compuestos** orientadas a obtener diversidad estructural, una metodología que tendrá cada vez mayor importancia en el descubrimiento de fármacos, ya que muchos procesos biológicos son dependientes de interacciones proteína-proteína y pueden interferirse con moléculas pequeñas que se enlazan muy eficazmente a estos lugares de interacción. **Se trata de obtener muchos compuestos nuevos con la mayor diversidad posible**.

En el descubrimiento de prototipos por el método denominado cribado de alto rendimiento (HTS) se han empleado diferentes **métodos computacionales** para valorar la **diversidad química** en una biblioteca de compuestos, y para agrupar éstos por su semejanza o diferencia en espacios suficientemente reducidos a través de sus **descriptores químicos** [30-33]. En este sentido, los **extractos de productos naturales** proporcionan una gran diversidad química y por ello han sido y siguen siendo una de las principales fuentes de fármacos [34].

El empleo del método HTS con estos extractos, va acompañado de la identificación del peso molecular de los compuestos que resulten activos, utilizando equipos LC/MS muy sensibles. Otros datos espectroscópicos pueden permitir la identificación total de su estructura, mientras que los ensayos para la determinación de si existe o no actividad biológica utilizando tan pequeñas cantidades de productos (ligando y dianas farmacológicas o células enteras), ha sido posible gracias al empleo de **metodologías analíticas miniaturizadas**, incluídas algunas dentro de la denominada **nanotecnología**. Entre éstas están las técnicas de fluorescencia o las sondas de canales iónicos.

Estas técnicas han de ser extraordinariamente sensibles, no ser destructivas y ser compatibles con la citometría de flujo o los sistemas de imagen [35]. Los ensayos de polarización de fluorescencia, por ejemplo, pueden usarse para medir la fosforilación de un sustrato por una cinasa o la inhibición de dicha fosforilación [36, 37].

Los positivos resultantes de este primer análisis, llamados ***hits***, requieren ser confirmados convenientemente con ensayos complementarios, ya que a veces resulta que no lo son cuando se estudian más profundamente. También es importante investigar su actividad biológica sobre dianas diferentes.

Una vez identificado por cualquiera de los diferentes planteamientos sintéticos un prototipo con un efecto razonablemente potente, hay que optimizar su actividad biológica y sus propiedades farmacocinéticas o perfil ADMET: Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación y Toxicidad, siendo especialmente importante, dada la necesidad prolongada de los tratamientos, que los fármacos posean buena biodisponibilidad oral. Esta optimización se consigue a través de la **manipulación molecular del prototipo**, dirigida por conocimientos y metodologías diversas, entre las que se incluyen los **modelos teóricos y el modelado molecular**. Armonizar la absorción con la potencia es un problema típico ya que, en general, la absorción mejora cuando el peso molecular va siendo menor, mientras que la potencia suele aumentar con éste. La optimización paralela de la potencia, la selectividad y las propiedades farmacocinéticas se denomina **optimización multiparamétrica**.

La **optimización** es un proceso de reiteración, en el que la información que se genera debe asimilarse, interpretarse y trasladarse a una actividad posterior. La experiencia demuestra que, cuando se encuentra un prototipo, debe pensarse si tiene o puede transformarse en una estructura con «aspecto de fármaco» («drug-like»). En este sentido, ha tenido gran aceptación la llamada **«regla de los 5»**, que sugiere para un posible fármaco las siguientes características: a) Debe tener un peso molecular < 500. b) Debe tener un logaritmo del coeficiente de reparto < 5. c) Debe tener un número de grupos donadores de hidrógeno > 5. d) Debe tener un número de grupos aceptores de hidrógeno > 2x5. De esta forma, se asegura la difusión pasiva a través de las membranas celulares y una absorción eficaz del intestino a la sangre [38,39].

La **solubilidad en agua**, que es una propiedad crítica cuyo valor mínimo para un candidato a fármaco oral debería ser de 1mg/ml, puede determinarse por métodos turbidométricos robotizados. Sin embargo, al contrario de lo que ha sucedido con las nuevas tecnologías de síntesis o de cribado de actividad biológica, **las propiedades farmacocinéticas no podían determinarse hasta ahora por técnicas de alto rendimiento**, utilizándose modelos experimentales para predecir la absorción (membranas artificiales o células de adenocarcinoma de colon caco-2, por ejemplo), el transporte a través de la barrera hematoencefálica (células del endotelio cerebral) y la estabilidad metabólica (fracciones subcelulares del hígado en presencia de los cofactores enzimáticos si fuera necesario y análisis de los metabolitos por HPLC-MS).

Recientemente, para entender mejor el reparto a través de las membranas biológicas de los iones que generan los fármacos en el organismo (alrededor de un 72% son compuestos ionizables), se han diseñado técnicas que pueden adaptarse a los métodos HTS. Una de ellas es el uso de **membranas artificiales inmovilizadas como columnas en HPLC para predecir el transporte pasivo**.

Algunas de estas membranas artificiales inmovilizadas son comerciales, o pueden prepararse enlazando covalentemente una monocapa de fosfolípidos a partículas de silice. La que se representa en la Figura 1, se fabrica **enlazando un grupo carboxilo terminal de diacilfosfatidilcolina (FC) a un grupo amina de una matriz de sílice-propilamina** que contiene poros de 300 Å. Los grupos de propilamina que, por impedimento estérico, quedan sin enlazarse de esta forma, se transforman en amidas neutras por reacción con ácido glicólico (u otros ácidos) [40].

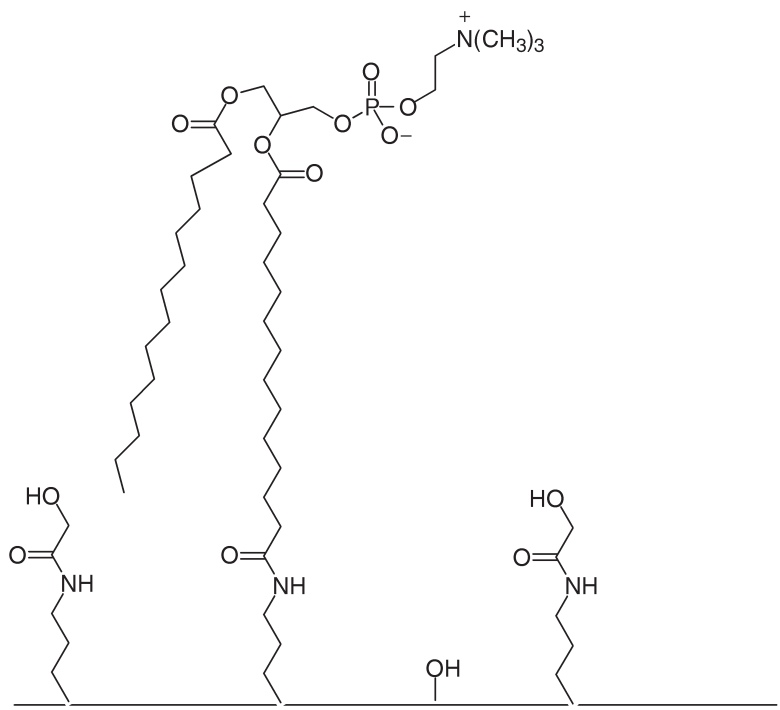


FIGURA 1. *Representación esquemática de una membrana artificial inmovilizada para su empleo en columnas de HPLC.*

La **predicción de la toxicidad** es importantísima, ya que más de un 75% de los costes de I+D se deben a los fracasos, de los que una tercera parte está relacionada con la toxicidad. Si es debida a la sobreexpresión de enzimas del grupo del citocromo P-450, puede monitorizarse la actividad enzimática o los niveles de mensaje; mientras que si es debida a su inhibición (que puede producir interacciones entre fármacos), puede determinarse *in vitro* utilizando enzimas recombinantes y ensayos fluorimétricos de alto rendimiento. La inhibición de otras enzimas presentes en fracciones hepáticas puede estudiarse adicionando sustratos adecuados y determinando su transformación por HPLC-MS [41].

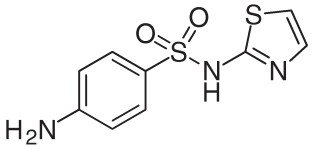
La **toxicogenómica** es una nueva área de estudio que pretende predecir y evitar las respuestas adversas de los fármacos debidas muy frecuentemente a polimorfismos en un determinado gen. Así, los relacionados con el gen MDR1 pueden tener efectos muy importantes en cuanto a la eficacia de muchos fármacos, y los relacionados con el gen CYP3A5 pueden explicar las variaciones metabólicas que afectan a un mismo fármaco en distintos enfermos [42-44].

La **metabolómica** es un nuevo análisis que puede adaptarse a estudios clínicos en humanos y permite caracterizar por resonancia magnética nuclear (RMN) los metabolitos procedentes de las biotransformaciones de los fármacos [45].

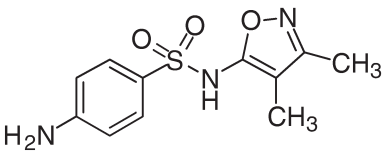
En conjunto, estas tecnologías están permitiendo el desarrollo de la **«Fisiómica»**, una caracterización del biosistema en su más amplio sentido, así como una mejor comprensión de los factores y mecanismos implicados en la acción de los fármacos a fin de obtener mejores candidatos y que éstos puedan desarrollarse en menos tiempo y con menos fracasos, así como que se abandone el modelo de medicina actual basado en «el ensayo y el error».

El desarrollo de los **antagonistas del receptor de endotelina-1 ET_A**, indicados en el tratamiento de la hipertensión, son un ejemplo de cómo puede llegarse en un tiempo récord a compuestos muy selectivos si se conoce y aisla el receptor al que van dirigidos y se utiliza el método HTS. Conocida la acción vasoconstrictora del péptido de 21 aminoácidos endotelina-1 al interaccionar con dicho receptor, se descubrió que su porción *C*-terminal era la responsable de la unión. Simultáneamente, cribados al azar realizados en distintas industrias farmacéuticas originaron

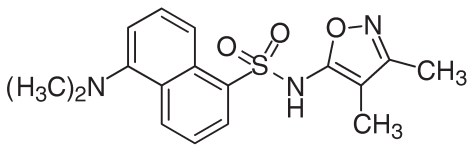
prototipos o cabezas de serie derivados de sulfonamida como sulfatiazol, sulfisoxazol, u otras, que fueron manipulados para optimizar su acción. El primero de estos compuestos que se ha comercializado ha sido **bosentán** (**Tracleer®**, de Actelion&Genentech), que se utiliza en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar [46, 47].



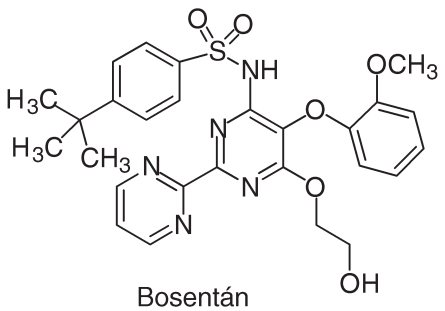
Sulfatiazol
CI_{50} = 69 μM



Sulffisoxazol
CI_{50} = 0,78 μM



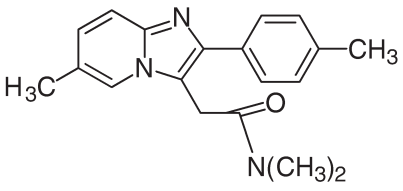
BMS 182874
CI_{50} = 0,15 μM



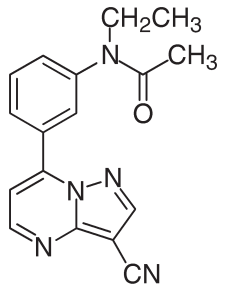
Bosentán
CI_{50} = 4,7 nM

La innovación es a veces una cuestión de selectividad y de una mejor farmacocinética. Así, los **fármacos utilizados para combatir el insomnio** han evolucionado desde una aproximación indiscriminada, como es el caso del **barbitúrico fenobarbital** (comercializado al comienzo del siglo XX), hasta los que en la actualidad se dirigen a receptores cerebrales específicos. En los años 60 se introdujeron las benzodiazepinas, que interaccionan de forma no selectiva con diversas subunidades del complejo receptor $GABA_A$, incrementando el enlace de

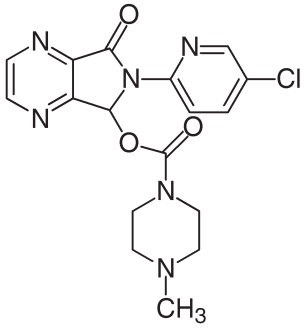
éste con el neurotransmisor GABA. Los llamados **hipnóticos no benzodiazepínicos** son superiores porque se enlazan a una sóla subunidad de este receptor, siendo por tanto más específicos. Su diseño se ha visto respaldado por el **modelado molecular**, que permitió determinar **un farmacóforo común** para todas las moléculas conocidas que poseían una acción sedante. Este farmacóforo consiste en dos átomos aceptores de protones, un grupo hidrófobo y un anillo aromático. Entre estos hipnóticos podemos citar a **zolpidem** (**Ambien®**), **zopiclona** (**Imován®**) y **zaleplón** (**Sonata®**). Un análogo de este último, denominado **indiplón**, se encuentra en Fase III. Además de no interferir con otros fármacos y no producir dependencia, poseen una vida media muy corta (desde media hora a dos horas) por lo que no mantienen el adormilamiento y pueden administrarse en el momento de acostarse o a media noche.



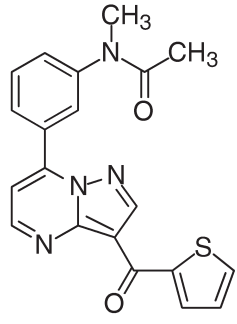
Zolpidem (Ambien®)



Zaleplón (Sonata®)



Zopiclona (Imován®)



Indiplón

Ya se ha comentado que la **innovación** en muchos casos no es de producto, sino **de nuevas formas de depósito** que facilitan el cumplimiento de estos tratamientos. Así, dentro de los fármacos contra la esquizofrenia, la **risperidona** (**Risperdal®**) es un potente antagonista de los receptores D_2 y 5-HT_{2A} que pertenece al grupo de las butirofenonas y se desarrolló en 1996 por Janssen-Cilag. Estos tratamientos son crónicos y de difícil cumplimiento, por lo que recientemente se ha desarrollado **Risperdal Consta®**, una suspensión de risperidona en microesferas de naturaleza de polímero biodegradable, que libera el fármaco de forma fija y constante durante dos semanas.

En otro orden de cosas, el conocimiento del genoma humano y la gran cantidad de aproximaciones «in silico» para explotar la información en él contenida, está proporcionando una enorme cantidad de **dianas farmacológicas** potencialmente interesantes para el desarrollo de fármacos que interaccionen con ellas, por lo que resulta imprescindible su **validación** [48].

Según un estudio realizado en 1996, los fármacos se dirigían en esa fecha hacia unas 500 dianas farmacológicas. Un 45% de éstas, eran receptores de membrana (muchos acoplados a proteína G), mientras que un 28% se dirigían a enzimas. Actualmente, la validación de las dianas farmacológicas puede hacerse a través de la utilización de **animales *knock-outs*** o **transgénicos**, a fin de averiguar si una diana que está ausente o alterada en dichos animales se asocia a un transtorno fisiológico [49]. A nivel celular, también puede inhibirse la expresión génica utilizando nucleótidos **antisentido** (ver más adelante) o **ribozimas** y estudiar las consecuencias de la carencia de una proteína. Más recientemente, se han desarrollado tecnologías que permiten **destruir selectivamente una determinada proteína** en una determinada célula.

En la mayor parte de los casos, el descubrimiento moderno de fármacos se basa en el entendimiento de cómo se produce el **reconocimiento molecular** entre los grupos del sitio activo de la diana farmacológica (enzima, receptor o canal iónico) y los grupos de los ligandos que interaccionan con él. Cuando se descubre y aisla un **receptor** y sus distintos **subtipos**, debe determinarse cuál o cuáles de estos subtipos deben bloquearse o activarse. En esta labor es muy importante disponer de animales transgénicos carentes de uno de los subtipos, como son los ratones *knock-out* a los que ya hemos hecho referencia.

Hay que señalar, que el descubrimiento de fármacos que interaccionan con **canales iónicos**, cuya disfunción es causa de múltiples enfermedades (arritmias cardíacas, diabetes, hipertensión, angina de pecho, epilepsia, etc), ha dado lugar a compuestos muy importantes, pero su total desarrollo está todavía por llegar.

La mayoría de las dianas farmacológicas son **proteínas**, cuya **estructura tridimensional** es consecuencia de las interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos que las componen. Esta estructura es determinante para su función y para el reconocimiento molecular, mientras que la secuencia de los aminoácidos no es tan relevante. De hecho, es frecuente que proteínas con secuencias distintas posean funciones biológicas semejantes, mientras que proteínas con secuencias parecidas pueden tener funciones diferentes.

La proteómica estructural ha evolucionado enormemente desde que se definió la primera estructura de una proteína en 1960 utilizando cristalografía de rayos X, de tal forma que el número de proteínas cuya estructura se conoce crece exponencialmente (el banco de datos de proteínas incluye actualmente unas 20.000 estructuras) y, aunque el diseño de fármacos basado en estos conocimientos se está desarrollando más lentamente de lo esperado, será cada vez más importante.

El estudio de la estructura cristalina de las proteínas de interés terapéutico, y de sus complejos con determinados ligandos por difracción de rayos X, se ha visto facilitado por **nuevos métodos para la recristalización de estas macromoléculas**. Hoy existen **nuevas tecnologías de cristalografía de rayos X de alto rendimiento** (HTX), que acoplan **técnicas computacionales**, o **tecnología *in silico*** para **detectar y optimizar candidatos a fármacos que puedan interaccionar con una diana deteminada**.

En plena actualidad del **síndrome respiratorio severo agudo** (**SARS**) se ha publicado el modelo de la proteasa principal (M^{Pro}, $3CL^{pro}$) que es necesaria para activar la replicación del coronavirus que lo produce (SARS-CoV) M^{Pro}. Este modelo (ver el monómero en la Figura 2) está basado en las estructuras cristalinas, determinadas por rayos X, de otra proteasa aislada de un coronavirus humano y del complejo entre otra proteasa aislada de un coronavirus porcino y un inhibidor de la misma [50,51]. En la Figura 2 se señalan los dominios I-III, se representan en

rojo las hélices a (de la *A* a la *F*) y un giro *A'* en el segmento *N*-terminal y en verde las láminas β (de la *a* a la *f*) con indicación del dominio en el que se sitúan. Se indican también los aminoácidos Cys^{144} (C144) e His^{41} (H41), ya que son la diada catalítica.

El modelado molecular sugirió que los inhibidores de la proteasa del rinovirus $3C^{pro}$, entre los que se encuentra el peptidomimético AG7088 ensayado por Pfizer contra el virus que produce el catarro común, convenientemente modificados, podrían ser de utilidad en la **quimioterapia SARS**. En la figura se representa también un modelo en el que el compuesto AG7088 (en azul) está unido al **sitio activo de la proteasa principal del coronavirus SARS** por el resto de cisteína (en amarillo).

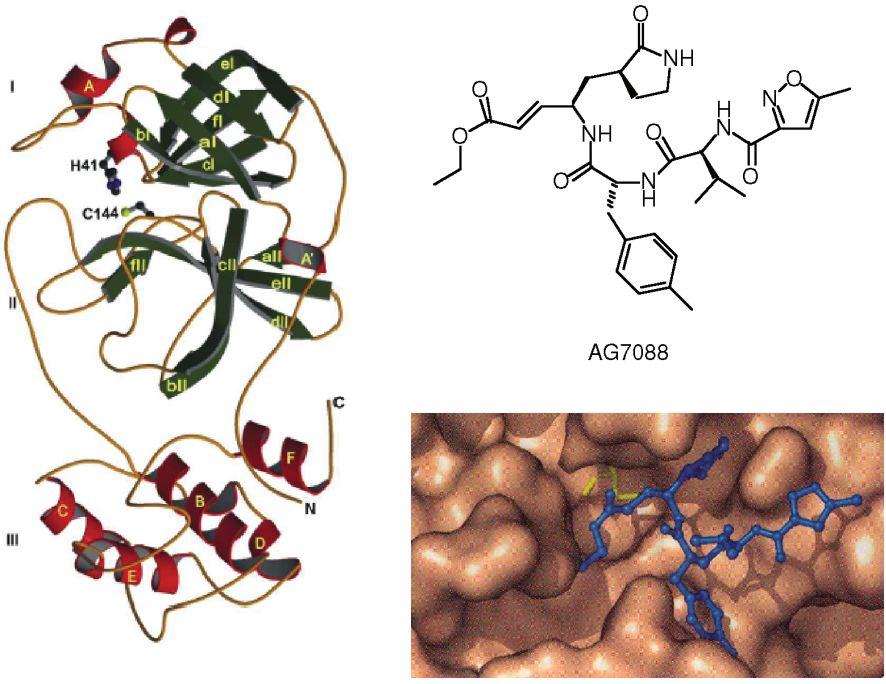


FIGURA 2. *Modelo de la proteasa (SARS-CoV) M^{Pro}, estructura del peptidomimético AG7088 inhibidor de la proteasa del rinovirus $3C^{pro}$, y modelo de enlace de dicha estructura con la proteasa (SARS-CoV) M^{Pro}*

El **sincrotrón**, un acelerador de partículas de unos 250 metros de perímetro que permite el estudio de las propiedades microscópicas de los materiales hasta los niveles de la nanotecnología, será también imprescindible para estudiar las configuraciones moleculares de las proteínas así como para analizar virus o bacterias. En el mismo sentido, la correlación entre ciertos datos de **resonancia magnética nuclear** (RMN) y la actividad biológica también es útil. Actualmente, el conocimiento de la estructura tridimensional de un gran número de proteínas y de sus complejos con ligandos específicos, unido a los avances en las técnicas computacionales, ha hecho que éstas se prefieran a veces al cribado de alto rendimiento para encontrar «cabezas de serie», porque como ya se ha comentado, el método HTS suele dar con frecuencia falsos positivos [52].

Muchas de **las técnicas computacionales** se basan en el hecho de que «las moléculas con formas y circunstancias semejantes tienen frecuentemente actividades biológicas semejantes», existiendo varios métodos para investigar bases de datos y buscar nuevos prototipos basados en la semejanza de toda o parte de la estructura. No obstante, si se tiene en cuenta que las proteínas son flexibles y que, en ciertos casos, podrían enlazarse a ligandos muy diferentes, puede entenderse que se requiera un gran número de simulaciones. Para definir un **farmacóforo**, que es la mínima porción estructural responsable de una actividad farmacológica, hay que reducir una gran información molecular y espacial que se obtiene a partir de un conjunto de moléculas activas, a un número de puntos más concreto.

¿Cómo pueden surgir las ideas que finalmente se materializan en fármacos comercializados? Es evidente que el éxito de una investigación aplicada depende de los avances en la investigación básica. Se ha dicho que, actualmente, el avance en el descubrimiento de nuevos fármacos está unido al avance de la **Bioinformática**, ya que la investigación biológica básica está siendo capaz de determinar incluso qué genes codifican las proteínas asociadas a un proceso patológico determinado.

Los resultados de estas investigaciones biológicas se almacenan en enormes bases de datos, pero tienen que convertirse en conocimientos concretos. Para ello, es necesario aplicar la **tecnología de la información**, ya que para estudiar qué funciones tienen los genes hay que disponer de un *software* capaz de analizar cantidades ingentes de información y de realizar estudios comparativos para el reconocimiento de modelos a fin de facilitar la

revolución proteómica. Puede constatarse la creación de muchas **empresas bioinformáticas** para realizar este análisis, y proporcionar así a las empresas farmacéuticas un ***software*** **que combine la información genética con** las bases de datos acerca de **la estructura de las proteínas**.

También se abre paso el término «systems biology», que no debe traducirse por «biología de los sistemas» ya que esta parcela de estudio biológico se sitúa entre los componentes individuales de la célula y el sistema, es decir, entre la biología molecular y la fisiología (que estudia el organismo entero). Se trata de romper el aislamiento que existe actualmente entre la genómica, la proteómica y la metabolómica mediante el modelado matemático de los sistemas biológicos. Estas simulaciones deben explicar o predecir cómo interactúam los componentes celulares.

Muchas compañías utilizan como modelos para estos propósitos células de cáncer de colon y de la bacteria *Escherichia coli*. La idea es que no basta con identificar una diana molecular para comenzar el descubrimiento de fármacos, sino que hay que situar a esta diana en su contexto, y entender los procesos en los que está inmersa. Esta aproximación es especialmente importante en el caso de enfermedades complejas, en las que están implicados varios genes y requieren distintas aproximaciones para su tratamiento [53].

Se supone que al menos 1/3 de los proyectos I+D de las grandes empresas farmacéuticas iutilizan tecnologías de ADN recombinante y genética molecular, y se prevé que **la Biotecnología y la bioinformática cambiarán la práctica médica**, de tal forma que averiguar la secuencia genómica de un paciente será una prueba analítica tan común como es hoy la determinación del grupo sanguíneo. Se detectarán así polimorfismos y mutaciones que permitirán una mejor medicina preventiva y una terapia personalizada. Basándose en el genotipo más que en el fenotipo, **las enfermedades se definirán por sus causas en vez de por sus síntomas**.

4. LAS INDUSTRIAS BIOTECNOLÓGICAS. ANTICUERPOS MONOCLONALES, PROTEÍNAS Y OTROS FÁRMACOS OBTENIDOS POR INGENIERÍA GENÉTICA

La industria farmacéutica está siendo presionada para encontrar nuevos caminos de innovación, existiendo una lucha entre dos tendencias:

los **fármacos de «molécula pequeña»** (los **tradicionales**) y los **de «molécula grande»** («**biológicos**»), si bien los primeros también pueden obtenerse por medios biológicos y los segundos por métodos químicos. Este es el caso del agente antitrombótico **fondaparinux sódico** (**Arixtra®**, de Sanofi-Synthelabo), un inhibidor selectivo del factor Xa.

Las grandes compañías se han desarrollado hasta ahora partiendo de **conocimientos esencialmente químicos**, guiados cada vez más por la farmacología y las ciencias clínicas [54], mientras que las empresas biotecnológicas están basadas en la **biología experimental**. Parece demostrado que cuesta menos desarrollar una «molécula pequeña» (tradicional) que una «biológica» (ya sea una molécula pequeña, una proteína o un gen), de tal forma, que una gran firma farmacéutica tradicional puede desarrollar simultáneamente 100 proyectos (teniendo en cuenta que sólo 5 acabarán teniendo éxito), mientras que en las nuevas empresas con vocación biológica, no cabe desarrollar simultáneamente más de unos 3 proyectos.

Estos dos enfoques también suelen diferenciarse en las dianas terapéuticas a las que dirigen sus fármacos. Así, los fármacos con estructura proteica se dirigen normalmente a dianas extracelulares.

También se diferencian en la metodología que se aplica para desarrollar moléculas pequeñas. Las compañías biotecnológicas que, como Biogen o Amgen, tienen proyectos de este tipo, no empiezan a desarrollar ninguna molécula hasta que se conoce exactamente qué papel juega la diana terapéutica a la que va dirigida y, en consecuencia, se sabe qué hacer cuando se obtenga y los ensayos que han de realizarse.

Otra diferencia, es que muchos fármacos de molécula grande se enfrentan a problemas de administración. Recordemos que, aunque algunas proteínas han podido ser formuladas para ser inhaladas, la mayoría requieren ser inyectadas. Por tanto, se intenta que no tengan que administrarse diariamente, y en el caso de las vacunas, que los efectos puedan conseguirse con una sola administración.

Un 26% de los nuevos fármacos introducidos en 1998 fueron productos biotecnológicos, en su mayoría proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales y se estima que **un 30% de los fármacos que se encuentran en desarrollo preclínico son biofarmacéuticos** [55]. Si un 1 ó 2% de las proteínas que codifica el genoma humano tuviera un valor

terapéutico habría que incorporar entre 120 y 280 nuevos fármacos con estructura de proteína. Sin embargo, no se espera que los productos biotecnológicos tengan un crecimiento excepcional, ya que estos fármacos también han encontrado muchas **dificultades en las fases clínicas II y III**, un periodo de desarrollo en el que se produce un 40% de fracasos en ambos tipos de fármacos. En el año 2002 se aprobaron 20 entidades biofarmacéuticas, y otras 15 ampliaron sus indicaciones. Su valor económico supone un 8% del mercado mundial de fármacos, un porcentaje que podría ascender al 15% en el año 2006.

Como la industria farmacéutica tradicional carece en general de infraestructuras para la preparación de productos biofarmacéuticos, son muchas las compañías que están asociadas a pequeñas empresas de biotecnología y/o trabajan para desarrollar ésta en un futuro. Así, GSK se ha aliado con Corixa para desarrollar el antitumoral **Bexxar®**, y ha adquirido la licencia de los fármacos del aparato respiratorio que se están experimentando en Theravance. AstraZeneca se ha aliado con Dyax, para que esta empresa le suministre un anticuerpo monoclonal que posee una gran afinidad por una diana terapéutica muy importante en Alzheimer. Biogen se ha asociado con Icos, para desarrollar un fármaco de molécula pequeña antipsoriasis que pueda competir con **Raptiva®**, de Genentech y Xoma. Roche ha adquirido la licencia de los productos oncológicos de la empresa Antisoma, incluyendo los de un producto en Fase II contra el cáncer de ovario denominado **Pemtumomab**.

Todo esto es posible tras el conocimiento de la **estructura del ADN** por Watson y Crick, que en 1953 sentó las bases de la **Biotecnología** [56]. La frase inicial de su histórico artículo era: «Deseamos proponer una estructura para la sal del ácido desoxirribonucleico (A.D.N). Esta estructura tiene características nuevas que son de considerable interés biológico». Gracias a la Biotecnología se produjeron por **ingeniería genética** a partir de 1986 los primeros **interferones**, que se utilizaron en un principio en el tratamiento de leucemia.

A partir de 1997, la ingeniería genética ha desarrollado los **anticuerpos monoclonales**, que están teniendo gran éxito en el tratamiento del cáncer y de la artritis reumatoide, como se verá más adelante. Los anticuerpos son proteínas producidas por tejidos linfoides en respuesta a la

presencia de antígenos. Su especificidad frente a una determinada proteína (antígeno) es tan grande que, aunque una célula pueda contener miles de proteínas diferentes, una preparación de anticuerpos sólo interacciona con aquéllas que tengan una pequeña porción característica del antígeno. Tradicionalmente se preparaban y todavía se preparan inmunoglobulinas a partir de antisueros, que se consiguen inyectando repetidamente a un animal un antígeno y extrayendo el suero de la sangre después de varias semanas, tras eliminar células y factores de coagulación. Con esta técnica, aunque el antígeno sea muy puro, el animal produce una gran variedad de inmunoglobulinas, por lo que se tienen **sueros polivalentes**.

En 1975, Kohler y Milstein desarrollaron los primeros **anticuerpos monovalentes**, inyectando a un animal un antígeno purificado, retirando el bazo u otros tejidos linfoides cuando se habían producido los anticuerpos, y formando células híbridas (hibridomas) con células B cancerosas procedentes de mieloma de ratón. Los hibridomas así obtenidos, creciendo y proliferando indefinidamente, produjeron una gran cantidad de un anticuerpo único que, al proceder de una sola colonia o clon, se denominó **anticuerpo monoclonal** (**AcMo**).

Los AcMo se pueden utilizar para purificar un antígeno y como pruebas de diagnóstico médico. Por ejemplo, una concentración elevada del antígeno prostético específico, APE, puede ser indicio de cáncer de próstata. En la actualidad, se está abriendo paso su uso como fármacos fácilmente reconocibles por el sufijo «**mab**» («**m**onoclonal **a**nti**b**odies»). Citaremos algunos ejemplos.

El crecimiento de las células de cáncer de mama está regulado por la estimulación autocrina o paracrina de **receptores de factores de crecimiento**, siendo los **receptores de tirosina quinasa** localizados en la membrana plasmática, los mejor caracterizados. Esta familia de proteínas está compuesta por cuatro receptores homólogos: el receptor para el **factor de crecimiento epidérmico** («EGFR») HER1 ó ErbB-1, y sus homólogos **HER2** ó **ErbB-2**, que es el más importante, HER3 ó ErbB-3, y HER4 ó ErbB-4. Todos están formados por una región extracelular que se une al ligando, una porción lipófila de transmembrana, y otra región intracelular que constituye el segmento carboxi-terminal y posee actividad tirosina quinasa.

Esta actividad intrínseca sólo se pone de manifiesto cuando se dimerizan dos receptores idénticos, o dos diferentes dentro de la misma familia, produciendo la autofosforilación de residuos de tirosina específicos del segmento intracelular del receptor. A su vez, esta fosforilación es la que provoca la **transducción de señales de mitogénesis**.

El receptor HER2 se ha propuesto como **diana para el desarrollo de fármacos antitumorales** porque está sobreexpresado en el 25-30% de los cánceres de mama humanos y, porque si se introduce en células no tumorales, las transforma en malignas. En consecuencia, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra este receptor inhiben el crecimiento de estos tumores [57].

La compañía Genentech desarrolló una serie de **AcMo murinos dirigidos contra el receptor HER2**, y uno de los más potentes lo «humanizó» por ingeniería genética. Tras superar los ensayos clínicos se le denominó **trastuzumab**, y está comercializado por Roche con el nombre de **Herceptin®**. Su administración provoca la internalización de HER2, y la supresión parcial de la formación de los heterodímeros HER2/HER3 y HER2/HER4. También tiene actividad antiangiogénica y produce otros efectos que podrían explicar su acción. Su administración en mujeres con cáncer de mama metastásico de reciente diagnóstico y niveles HER2 muy elevados, ha resultado ser un tratamiento efectivo y seguro, y su asociación con paclitaxel y adriamicina (los dos agentes quimioterápicos más activos para el tratamiento del cáncer de mama), aumenta los efectos antitumorales de dichos fármacos y el tiempo de supervivencia. Se ha aprobado **su uso sólo o en combinación con paclitaxel**, y se estudia en clínica su **asociación con otros antitumorales**, como los inhibidores de aromatasa, el cis-platino, o el docetaxel.

Otro AcMo comercializado por Roche es **rituximab** (**Mabthera®**), que está aprobado en España para el tratamiento de pacientes con linfomas de Hodgkin foliculares que hayan recaído o no respondan a la quimioterapia. **Alemtuzumab** (**MabCampath®** de Schering), es otro anticuerpo monoclonal humanizado obtenido por ingeniería genética mediante la inserción de seis regiones complementarias-determinantes del anticuerpo monoclonal de rata IgG_{2a} en una molécula de inmunoglobulina humana IgG_1. Éste es capaz de reconocer al antígeno humano CD52, una glicoproteína de membrana expresada en el 100% de los casos de

leucemia linfocítica crónica y en la mayoría de los linfomas no hodgkinianos. **Este anticuerpo**, tras su unión a los antígenos CD52 que es muy selectiva, puede provocar la lisis de las células.

Cetuximab (**Erbitux™**) es otro anticuerpo monoclonal para el **tratamiento del cáncer colorrectal** cuyo lanzamiento **se prevé en 2004**. Si recibe vía libre, el fármaco será comercializado en Europa por la empresa alemana Merck y en Norteamérica por Bristol-Myers Squibb. La historia de su desarrollo es semejante a un «thriller». El inmunólogo Sam Waksal fundó en 1984 la empresa biotecnológica ImClone Systems, que empezó a conocerse en 1999 con el hallazgo de este prometedor anticuerpo contra el cáncer. Bristol Myers, propietario de 20% de las acciones de ImClone, vió cómo duplicaban su valor y cómo comenzaron a perderlo, hasta que cayeron en picado cuando se rechazó su aprobación por la FDA por falta de resultados clínicos concluyentes.

Al retrasarse su entrada al mercado, se perdía la ventaja sobre otras empresas que desarrollan tratamientos similares (AstraZeneca con **Iressa®**, OSI Pharmaceuticals o Genta). Sin embargo, su potencial es enorme, como demuestra el caso de una paciente de 28 años diagnosticada de cáncer de colon incurable, que tras un mes de tratamiento con Erbitux™ experimentó una reducción de sus tumores que permitió su extirpación Actualmente, la FDA está en proceso de revisión de datos adicionales derivados de experimentos clínicos conducidos por Merck AG en Europa y, aunque hay quienes dudan que todo llegue a feliz término, parece que va a ser así.

Recientemente, se han comercializado como antiinflamatorios dos fármacos que inhiben la acción del **factor de necrosis tumoral** (**TNF**). El primero es un anticuerpo monoclonal específico de su receptor en la membrana celular, denominado **infliximab** (**Remicade®**) y desarrollado por Schering Plough Biotech. El segundo es la forma dímera soluble de dicho receptor, que en la naturaleza funciona como una proteína de transporte. Al asociarse extracelularmente con TNF, impide la interacción de éste con su receptor situado en la membrana celular, e impide la respuesta inflamatoria mediada por dicha citoquina. Este fármaco se denomina **etanercept** (**Enbrel®** de Wyeth-Ayerst), y es una proteína de fusión obtenida por tecnología de ADN recombinante que se ha unido a un fragmento de la inmunoglobulina humana G1. Ambos fármacos se han propuesto

para su uso en la **artritis reumatoide** (AR), una de las enfermedades que más se está beneficiando de estos nuevos tratamientos, siendo una alternativa a los **inhibidores de COX-2** o a los nuevos **inmunomoduladores**, como **tracólimo**, **micofenolato de mofetilo** o **leflunomida** [58].

Etanercept está indicado especialmente en la reducción de los síntomas de la artritis activa en pacientes con artritis psoriásica. El tratamiento anual, suponiendo una dosis de 25 mg dos veces por semana, tendría un coste aproximado de 13.000 . **Infliximab**, por otra parte, deriva de un ADN recombinante formado por genes humanos y murinos y se utiliza perfundido como inmunosupresor selectivo en la artritis reumatoide y para evitar la cirugía en la enfermedad de Crohn. El coste anual por paciente en la primera aplicación se aproxima a los 10.800 .

Abbott está estudiando el primer AcMo totalmente humano: **D2E7** (**Adalimumab**). Este anticuerpo **bloquea** el factor **TNFα** y, por tanto, se dirige a enfermedades autoinmunes como la artritis atópica juvenil y la enfermedad de Crohn.

5. FÁRMACOS EXCEPCIONALMENTE INNOVADORES. FÁRMACOS ANTISENTIDO, ENZIMAS RECOMBINANTES Y TERAPIA GÉNICA

Los **fármacos excepcionalmente innovadores** son los que suponen la introducción de un tratamiento que antes no existía. Entre ellos merecen ser mencionados **agalsidasa** α (**Replegal®** de TKT Europa) y **agalsidasa** β (**Fabrazyme®** de Genzyme), comercializados para el tratamiento de la **enfermedad de Fabry**. Ésta es una de las llamadas «enfermedades raras», que se caracteriza por un dolor y un malestar permanentes. Es una enfermedad metabólica genética producida por un gen defectuoso del cromosoma X. Por eso, la padecen de forma más importante los hombres con un cromosoma X defectuoso y las mujeres homocigóticas con dos cromosomas X defectuosos. La **agalsidasa** (α-galactosidasa A) es una **enzima humana obtenida de forma recombinante** que hidroliza el glucoesfingolípido ceramida trihexósido (Gb3 ó GTH), que se acumula cuando la enzima falta en los fluídos orgánicos y en los lisosomas de las células del músculo liso, endoteliales, ganglios, corazón, sistema nervioso, ojos, etc.

Otra gran innovación en el **tratamiento** de la **osteoporosis** consiste en la utilización de terapias anabólicas diseñadas para construir la masa ósea, en lugar de utilizar fármacos anti-osteoporosis. El primer fármaco que se comercializará para este propósito será probablemente **teriparatida** (**Forteo®**), que es una **hormona paratiroidea recombinante.**

La proteína C humana es una glicoproteína que circula por la sangre en forma inactiva, pero que cuando se activa por el complejo trombina/trombomodulina (esta última es un receptor de membrana de las células endoteliales), desarrolla su actividad de proteasa de serina y destruye los factores de coagulación Va y VIIIa con la colaboración de la proteína S. Para impedir la falta prolongada de coagulación que provoca la proteína C humana, su vida media es corta (de 7-9 h).

La deficiencia congénita de esta proteína se denomina «púrpura fulminante» pero también puede inducirse esta deficiencia por administración de anticoagulantes cumarínicos que, como la warfarina, son antagonistas de la vitamina K esencial para su síntesis en el hígado. Ambas situaciones producen un incremento en la coagulación o en la trombosis, que puede manifestarse por necrosis de la piel a consecuencia de los trombos. Mientras se desarrolla el producto recombinante, Baxter ha obtenido y comercializado la **proteína C humana** (**Ceprotin®**) extrayéndola por cromatografía de afinidad utilizando anticuerpos monoclonales murinos inmovilizados de plasma purificado.

Otra gran innovación **podría ser una vacuna contra el cáncer**. En este sentido, podemos mencionar un producto que se ha obtenido mediante la incorporación a una cepa no infecciosa de la bacteria *Salmonella typhimurium* de una porción de ADN que codifica una proteína que se produce en los vasos sanguíneos denominada **factor de crecimiento endotelial vascular 2**. Los ratones tratados con este producto mostraron un menor crecimiento en sus vasos sanguíneos, interrumpiendo el abastecimiento de sangre a los tumores.

En el terreno de la innovación farmacocinética podemos citar a la **darbepoetina α** (**Aranesp**®/Epogen®), una eritropoyetina desarrollada recientemente por **Amgen** (está comercializada también por J&J con los nombres de Erypo®/Procrit®), que está producida por ingeniería genética en células de ovario de Hamster chino (CHO-K1). Este producto biosintético es la proteína recombinante con actividad terapéutica que tiene

más éxito en la actualidad. Tiene la misma secuencia de aminoácidos que la eritropoyetina humana (EPO) y que la humana recombinante (r-HuEPO), pero posee 5 cadenas de azúcar en vez de las 3 cadenas que poseen éstas y esta circunstancia hace que **Aranesp®** posea una **vida media tres veces mayor** y pueda utilizarse **una vez a la semana** por inyección subcutánea o intravenosa en jeringuillas precargadas.

La **eritropoyetina** (**EPO**) es una glicoproteína que en su forma activa está constituida por 165 aminoácidos y regula la eritropoyesis. Al interaccionar con sus receptores específicos, que se encuentran en las células progenitoras de los eritrocitos presentes en la médula ósea, estimula la proliferación, maduración y diferenciación de éstos. Esta unión produce la inhibición de la ATPasa de Ca^{2+} y el consiguiente aumento de Ca^{2+} intracelular, que desencadena varios procesos a través de segundos mensajeros. Éstos concluyen con la transcripción y replicación del ADN, la síntesis de los correspondientes ARNm, ARN ribosómicos y de transferencia, y el consiguiente aumento en la producción de grupos hemo para la fijación del hierro.

La producción de eritropoyetina en el riñón se regula por los cambios en la oxigenación de los tejidos, y su administración controlada en el tratamiento de la anemia asociada a la insuficiencia renal crónica y a los tratamientos oncológicos, mantiene los niveles óptimos de hemoglobina [59]. Aunque la eritropoyetina humana recombinante no fue diseñada como tal molécula de forma racional, el papel fisiológico de esta proteína llamó la atención de los científicos de Amgen en los años 1980s y se seleccionó para dirigir los esfuerzos económicos y científicos necesarios para la clonación de su gen promotor.

Por otra parte, Aventis Pharma y Traskaryotics Therapies están estudiando **Dynepro**, un **fármaco génico** que activa la producción de eritropoyetina que, si se aprueba, sería el primer ejemplo de **terapia génica** accesible en el mercado.

En 1998 la FDA aprobó el primer **fármaco antisentido** denominado **fomivirseno (Vitravene®)**. Los fármacos antisentido tienen como dianas a los ácidos nucleicos (ADN y más frecuentemente ARNm) y están formados por secuencias «antisentido» o secuencias de oligonucleótidos («**oligos**») invertidas. Éstas resultan complementarias de un trozo de código genético que codifica mensajeros peligrosos. Si tienen como diana

a la doble hélice del ADN, forman localmente una triple hélice y se llaman más propiamente fármacos **antigen** [60]. Si un fármaco antisentido bloquea una secuencia de ARNm que codifica un oncogén, tendremos un antitumoral.

Los mayores problemas de los fármacos antisentido radican en cómo penetrar en las células, cómo evitar su degradación por nucleasas, y cómo obtener un enlace eficaz con la secuencia del ARNm. Los dos primeros se han resuelto a través de cambios en los agrupamientos diéster del ácido fosfórico, que enlaza los hidroxilos 3' y 5' de las unidades de ribosa. Así ocurre en **alicaforseno** (**Isis 2302**), de Isis Pharmaceuticals, que es la sal nonadecasódica de un oligonucleótido fosforotioato de fómula molecular $C_{192}H_{225}N_{75}Na_{19},O_{98}P_{19}S_{19}$. Inhibe la síntesis de la molécula 1 de adhesión intracelular ICAM-1, se encuentra en ensayos de fase III y se prevé utilizar en pacientes con la **enfermedad de Crohn**.

Hay que destacar también que el estudio de los factores que gobiernan la estructura terciaria de los ácidos ribonucleicos (ARN) está en auge y, por consiguiente, es previsible el desarrollo de fármacos dirigidos a estas estructuras como dianas farmacológicas.

Aunque los orígenes de la **terapia génica**, que consiste en transferir ADN a los pacientes, se remontan a la década de los 70, su desarrollo ha encontrado numerosas dificultades. Ya se ha comentado que **dynepro** será probablemente el primero de estos fármacos génicos y se utilizará en el tratamiento de la anemia asociada a la insuficiencia renal crónica o a los tratamientos antitumorales. Otros fármacos génicos se encuentran en fases de desarrollo avanzado. Por ejemplo, Onyx Pharmaceuticals estudia **Onix-015**, un adenovirus que inserta un fragmento de ADN en células cancerígenas que han perdido la funcionalidad del gen p53.

6. CONCLUSIÓN

Las empresas farmacéuticas están especializándose; desde las que se dedican a la preparación de genéricos, en las que la innovación se restringe en todo caso a la optimización de procesos de síntesis, a las que se han planteado liderar la innovación con todas sus consecuencias utilizando estrategias y alianzas muy diversas. Estas empresas se encuentran ante un hecho

incontestable: que la actual explosión de tecnologías sofisticadas derivadas del genoma, de sistemas robotizados y de cribado de alto rendimiento de bibliotecas de compuestos, están asociados a una reducción en la productividad si se analiza el número de fármacos que han sido aprobados por la FDA desde 1996 (Figura 3) a pesar de que los gastos en I+D siguen creciendo de tal modo que en muchos casos se ha más que duplicado el gasto desde 1995 (Figura 4). La situación en Europa es semejante [61].

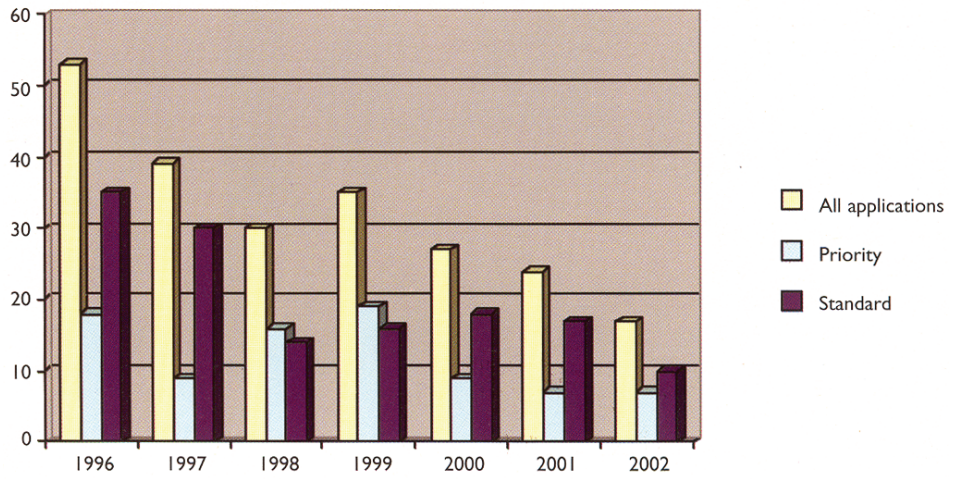


Figura 3. *Descenso de aprobaciones de nuevas moléculas por la FDA desde 1996 al 2002. Las aplicaciones estándar se refieren a fármacos con cualidades terapéuticas análogas a otros ya comercializados, mientras que las prioritarias significan un avance respecto a la terapia disponible.*

La realidad es que se dispone de una ingente cantidad de datos de los que se entiende muy poco y que ocho de los diez fármacos más vendidos en 2002 son inhibidores enzimáticos o antagonistas de dianas farmacológicas específicas que se han diseñado racionalmente o, al menos, «de forma dirigida». Entre ellos destacan dos estatinas inhibidoras de la HMG-CoA reductasa: Lipitor® (atorvastatina) de Pfizer y Zocor® (simvastatina) de Merck; dos inhibidores de la bomba de protones: Losec®/Prilosec® (omeprazol) de AstraZeneca y Ogastro®/Prevacid® (lansoprazol) de TAP Pharma; un antipsicótico atípico antagonista de neuroreceptores: Zyprexa® (olanzapina) de Lilly; un bloqueante de canales de calcio: Norvasc® (amiodipina) de Pfizer; y el inhibidor de COX-2 Celebrex® (celecoxib) de Pfizer (Pharmacia) [58].

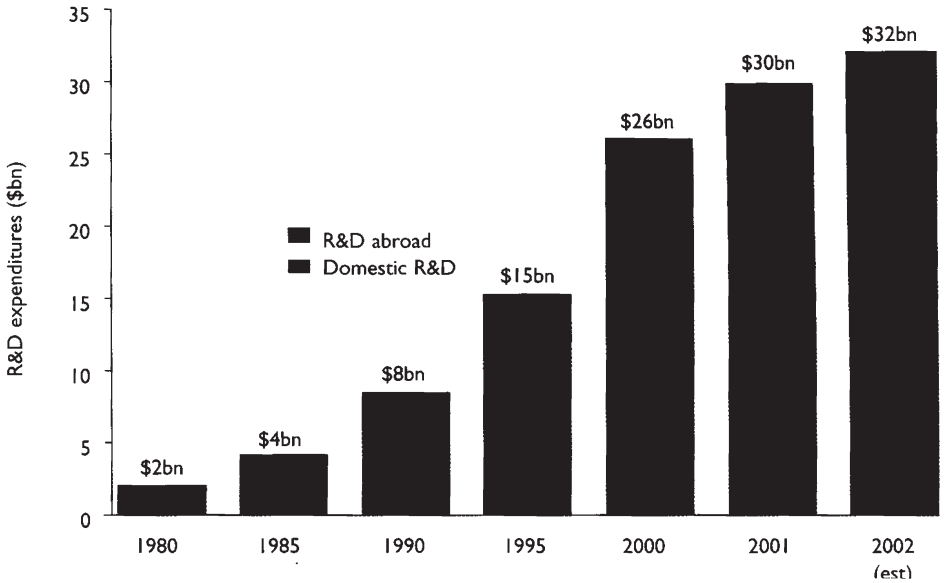


FIGURA 4. *Evolución de la inversión en I+D de las compañías farmacéuticas de USA desde 1980 al 2002 (PhRMA 2003).*

A pesar de la lentitud con que se producen los resultados, es evidente que se continuará identificándose nuevas enzimas y receptores, así como sus ligandos, que estén implicados en procesos fisiológicos o patológicos. Éstos serán nuevas dianas farmacológicas y darán lugar a fármacos con mayor eficacia que los obtenidos por química combinatoria o cribado de compuestos natuales, al ser más selectivos y con menores efectos secundarios.

El camino es conocer a fondo una enfermedad, entender su patología a nivel molecular, identificar la diana farmacológica que la produce o sus síntomas, conocer la estructura de esta diana y disponer de modelos tridimensionales, aplicar el proceso reiterado de síntesis y ensayo de compuestos para determinar su potencia y selectividad, y así poder diseñar una entidad que pueda interaccionar de forma óptima.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Goodfellow, P.N. «The pharmaceutical industry harbours a dirty secret», *Chem. Brit.*, **2002**, *3*, 3.

(2) Ganellin, C.R.;. Mitscher, L.A; Topliss, J.G. «Educating Medicinal Chemists», *Ann. Rep. in Med. Chem.* **1995**, *30*, 329.

(3) Ganellin, C.R.; Mitscher, L.A.; Clement, B; Kobayashi, T-H.; Kyburz, E.; Lafont, O.; Marcincal, A.; Monge, A.; Tarzia, G.; Topliss, J.G. «University education of medicinal chemists. Comparison of eight countries», *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 163.

(4) Zubrod, C.G. «Origins and development of chemotherapy research at the National Cancer Institute» *Cancer Treat. Rep.* **1984**, *68*, 9-19.

(5) Shoemaker, R.H.; Sausville, E.A. «Drug Development. Oxford Textbook of Oncology», 2.ª Ed.; Oxford University press, **2002**, pg. 781-788.

(6) Steere, W.C. Jr; Niblack, J. «The long-term winners are those that provide quality and value», en «Innovation», Kanter, R.M.; Kao, J.; Wiersema, F. (ed.) Harper Business, **1997**.

(7) Liggett, S.B. « Pharmacogenetic applications of the Human Genome project» *Nat. Med.* **2001**, *7*, 281-283.

(8) Mundy, C. «The human genome project: a historical perspective» *Pharmacogenomics*, **2001**, *2*, 37-49.

(9) Aizpurua, I. «Nueva formulación de interferón en el tratamiento de la hepatitis. Peginterferón a-2b (Pegintrón®)», *El farmacéutico de Hospitales*, **2002**, *133*, 9.

(10) Thompson, W.L. «Research Investiments in a Managed Care, Cost-containment Oligopsony», *Ann. Rep. Med. Chem.* **1995**, *30*, 339.

(11) «Financiación de la Innovación, Informes sobre el Sistema Español de Innovación», COTEC, Madrid, **1999**.

(12) González, A. «Objetivos: más I+D propia en España y retornos», *Diario Médico*, 25 de mayo de **2001**.

(13) Hays, J.N. «The Burdens of Desease: Epidemics and Human Response in Western History», Rutgers University Press, **1998**.

(14) Drews, J. «Drug discovery: a historical perspective», *Science*, **2000**, *287*, 1960-1064.

(15) a) Barker, A.J., Gibson, K.H.; Grundy, W.; Godfrey, A.A.; Barlow, J.J.; *et al.* «Studies leading to the identification of ZD1839 (IRESSA): an orally active selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer» *Bioor. Med. Chem. Lett.,* **2001**, *11*, 1911-1914. b) Barker, A.J. «EGFR tyrosine kinase inhibitors in the treatment of cancer», en «Medicinal Chemistry into the millenium» Campell, M.H.; Blabrough, I.S. (ed.), The Royal Society of Chemistry, **2001**, pg. 140-147.

(16) Briges, A.J. «CI-1033: An Irreversible Inhibitor of the ErbB Family of Oncogenes», Parke-Davis Pharmaceutical Research, Abstract 27th National Medicinal Chemistry Symposium, Kansas, Junio 2000.

(17) Buchdunger, E.; Zimmermann, J.; Mett, H.; Meyer, T.; Muller, M. *et al*. «Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase *in vitro* and *in vivo* by a 2-phenylaminopyrimidine derivative», *Cancer Res*. **1996**, *56*, 100-104.

(18) Le Coutre, P.; Mologni, L.; Cleris, L.; Marchesi, E.; Buchdunger, E. *et al*. «*In vivo* eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor», *J. Natl. Cancer Inst*. **1999**, *91*, 163-168.

(19) Savage, D.G.; Antman, K.H. «Imatinib mesylate. A new oral targeted therapy», *N. Engl. J. Med*., **2002**, *346*, 683.

(20) Salituro, F.G. *et al*. «Discovery of VX-745: A Novel, Orally Bioavailable and Selective p-38 MAP Kinase Inhibitor», Abstract, 27th National Medicinal Chemistry Symposium» Kansas (EEUU), Junio **2000**.

(21) a) Foote, C.S. *Photochem. Photobiol*. **1991**, *54*, 659. b) Kato, H. *Photochem. Photobiol*. **1998**, *42*, 96.

(22) Bonnett, R.; Charlesworth, P.; Fjelal, B.D.; Foley, S.; McGarvey, D.J.; Truscott, T.G. «Photophysical properties of 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyphenyl)porphyrin (*m*-THPP), 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyphenyl)chlorin (*m*-THPC), and 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (*m*-THBC): a comparative study», *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1999**, 325-328.

(23) Gupta, G.; Morton, C.A.; Whitehurst, C.; Moore, J.V.; Mackie, R.M. *Brit. J. Dermatol*., **1999**, *141*, 385.

(24) Kolbb, A.J. «Assay technologies and detection methods. High Throughput Screening. The Discovery of Bioactive Substances», Marcel Dekker Inc., **1997**, pg. 274-454.

(25) Landro, J.A.; Taylor, I.C.; Stirtan, W.G.; Osterman, D.G.; Kristie, J.; *et al*., «HTS in the new millenium: The role of Pharmacology and flexibility», *J. Pharmacol. Toxicol*. **2000**, *44*, 273-289.

(26) Cox, B.; Denyer, J.C.; Binnie, A.; Donnelly, M.C.; Evans, B.; *et al*. «Application of high-throughput screening techniques to drug discovery», *Prog. Med. Chem*. **2000**, *37*, 83-133.

(27) Schreiber, S.L.; «Target-Oriented and Diversity-Oriented Organic Synthesis in Drug Discovery», *Science*, **2000**, *287*, 1964-1969.

(28) Martínez, E. J.; Owa, T.; Schreiber, S. L.; Corey, E. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3496.

(29) Dolle, R.E.; Nelson Jr., K.H.; *J. Combinatorial Chem*. **1999***, 1*, 235.

(30) Mannhold, R.; Kubinyi, H.; Timmerman, H. «Handbook of molecular descriptors. Methods and Principles in Medicinal Chemistry», Wiley-VCH, **2000**.

(31) Nicolau, K.; Pfefferkorn, J.; Schuler, F.; Roecker, A.; Cao, G. *et al*. «Combinatorial synthesis of novel potent inhibitors of NADH: ubiquinone oxidoreductase» *Chem. Biol*. **2000**, *7*. 979-992.

(32) Willett, P.; «Chemoinformatics: similarity and diversity in chemical libraries», *Curr. Opin. Biotechnol*. **2000**, *11*, 85-88.

(33) Druker, B.J. Lydon, N.B.; «Lessons learned from the Development of an abl Tyrosine Kinase Inhibitor for Chronic Myelogenous Leukemia», *J. Clin. Invest*. **2000**, *105*, 3.

(34) Cragg, G.M.; Newmann, D.J. «Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions», *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2000**, *9*, 2783-2797.

(35) Weng, G. *et al*. «Complexity in Biological Signalling Systems», *Science*, **1999**, *284*, 92-96.

(36) Sportsman, J.R.; Lee, S.K.; Dilley, H.; Bukar, R. «Fluorescence Polarization. High Throughput Screening, The Discovery of Bioactive Substances», Marcel Dekker Inc. **1997**, pg. 389-399.

(37) Seethala, R.; Menzel, R. «A fluorescence polarization competition immunoassay for tyrosine kinases» *Anal. Biochem*. **1998**, *255*, 257-262.

(38) Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. *Adv. Drug Delivery Rev*. **2001**, *46*, 1.

(39) Smith, D.; «Absorption and distribution as factors in drug design», en «Medicinal Chemistry into the millenium»; Campell, M.H.; Blabrough, I.S. (ed.), The Royal Society of Chemistry, **2001**, pg. 331-344.

(40) Taillardat-Bertschingen, A.; Carrupt, P-A.; Barbato, F.; Testa, B. «Immobilized Artificial Membrane HPLC in Drug Research», *J. Med. Chem*. **2003**, *46*, 655.

(41) Balimane, P.V.; Chong, S.; Morrison, R.A. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **2001**, *44*, 301-312.

(42) Nuwaysir, E.F.; Bittner, M.; Trent, J.; Barrett, J.C.; Afshaeri, C.A. «Microarrays and toxicology: The advent of toxicogenomics», *Mol. Carcinog*. **1999**, *24*, 153-159.

(43) Brinkmann, U.; Roots, I.; Eichelbann, M. «Pharmacogenetics of the human drug-transporter gene MDR1: impact of polymorfism on pharmacotherapy», *Drug Discovery Today*, **2001**, *6*, 835-839.

(44) Kuehl, P.; Zhang, J.; Liu, Y. Assem, M.; Schueetz, J.; Watkins, P.B.; Daly, A.; Wrighton, S.A. *et al*. «Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expresion», *Nat. Genet*. **2001**, *27*, 383-391.

(45) Nicholson, J.K.; Lindon, J.C.; Holmes, E. «Metabolomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statical analysis of biological NMR spectroscopic data», *Xenobiotica*, **1999**, *29*, 1181-1189.

(46) Gaine, S.P.; Rubin, I.J. «Primary Pulmonary Hypertension», *Lancet*, **1998**, *352*, 719.

(47) a) Nauser, T.D.; Stites, S,W. *Ann. Farm. Physician*, **2001**, *63*, 1789. b) Dasgupta, F.; Mukherjee, A. K.; Gangadhar, N. «Endothelin Receptor Antagonists. An Overvew», *Current Medicinal Chemistry*, **2002**, *9*, 549-575.

(48) Mayer, T.U. *et al*., *Science*, **1999**, *286*, 971.

(49) Wolf, C.R.; Henderson, C.J. «Use of transgenic animals in understanding molecular mechanisms of toxicity», *J. Pharm. Pharmacol*. **1998**, *50*, 564-574.

(50) Dragovich, P.S.; Webber, S.E.; Fuhrman, S.A.; Patick, A.K.; Mattews, D.A.; Prins, T.J.; Zhou, R.; Marakovits, J.T.; Ford, C.E.; Meador, J.W.; Ferre, R.A.; Worland, S.T.; «Structure-based design of irreversible, peptidomimetic human Rhinovirus 3C protease inhibitors», en «Medicinal Chemistry into the millenium»; Campell, M.H.; Blabrough, I.S. (ed.), The Royal Society of Chemistry, **2001**, pg. 223-232.

(51) Anand, K.; Ziebuhr, J.; Wadhwani, P.; Mesters, J.R.; Hilgenfeld, R., «Coronavirus Main Proteinase ($3CL^{pro}$) Structure: Basis for Design of anti-SARS Drugs», *Science**xpress***/www.sciencexpress.org/ 13 May 2003, Page 1/ 10.1126/science.1085658.

(52) a) Giménez, G., «Hitos en la génesis y evolución del concepto de proteína: de las albúminas a las proteínas sin plegamiento», y referencias allí mencionadas; Real Academa Nacional de Farmacia, Madrid, **2004**. b) Weir, M. «Alta tecnología para los nuevos fármacos», *Diario Médico*, 25 de Junio de **2001**, pg. 68.

(53) Henry, C.M.; «Systems Biology», *Chemical &Engineering News*, **2003**, *81*, 45-55.

(54) Drews, J.; «Drug Discovery: A Historical Perspective»; *Science*, **2000**, *287*, 1960-1964.

(55) Mullin, R.; «Biotech vies for position» *Chemical&Engineering News*, **2003**, *81,* 27-38.

(56) Henry, C.M. «The Chemical Side of the Double Helix», *Chemical&Engineering News*, **2003**, *81*, 49-55.

(57) Baselga, J.; Mendelson, J.; «Monoclonal Antibodies Directed Against Growth Factor Receptors», en «Principles and Practice of the Biologic Therapy of Cancer», S.A. Rosenberg (Ed.), 3.ª edición, Lippincott Williams&Wilkins, **2000**, pg. 475.

(58) Luong, B.T.; Chong, B.S.; Lowder, D.M. «Treatment options for rheumatoid arthritis: Celecoxib, Leflunamide, Etanercept and Infliximab», *Ann. Pharmacother.*, **2000**, *34*, 743.

(59) Egrie, J.C.; Strickland, T.W.; Lane, J.; Trail, G.; Lin, F.K.; Browne, J.K.; Hines, D.K. «Characterization and biological effects of recombinant human erythropoietin», *Immunobiol*., **1986**, *172*, 213-224.

(60) Armstrong, G.S.; «Interferencia de ARN: Enseñar a las células nuevos trucos antivirales», *American Foundation for AIDS Research*, **2003**, *3*, 3-5.

(61) McCullagh, K. «Discovery Strategy. Green Fingers, Molecular Pathology and Art of Drug Design», Drug Discovery Wordl, Summer **2003**, 9-19.

Avances en Tecnología Farmacéutica

A. DOMÍNGUEZ-GIL HURLÉ y
A. MARTÍN SUÁREZ
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
Universidad de Salamanca

1. INTRODUCCIÓN

La terapéutica farmacológica, por su impacto en el cuidado de la salud y en la prevención de la enfermedad, constituye uno de los avances científicos más relevantes de la segunda mitad del siglo XX. Actualmente, los medicamentos reducen la mortalidad prematura, disminuyen la morbilidad y en el tratamiento de las enfermedades crónicas, mejoran la calidad de vida. Además, han contribuido al progreso de la cirugía y de los transplantes que han aumentado las expectativas de salud para muchos pacientes (1). Los progresos más recientes y con mayor repercusión se han producido en el tratamiento del SIDA, hepatitis C, cáncer, infarto de miocardio y artritis reumatoide (2).

La terapéutica farmacológica se ha visto favorecida por el progreso científico y el desarrollo tecnológico que se han incorporado progresivamente a la producción de medicamentos durante las últimas décadas, tal como se recoge en la figura 1.

La industria farmacéutica innovadora, mediante el impulso a la investigación básica y clínica, ha promovido el desarrollo del 90% de los medicamentos utilizados en la actualidad, siendo atribuido el 10% restante a diversos organismos públicos de carácter sanitario (3). Para desarrollar esta actividad, los laboratorios farmacéuticos invierten importantes recursos que han llegado a alcanzar en los últimos años, el 18% de sus ventas en EE.UU. y porcentajes algo inferiores en Europa y Japón.

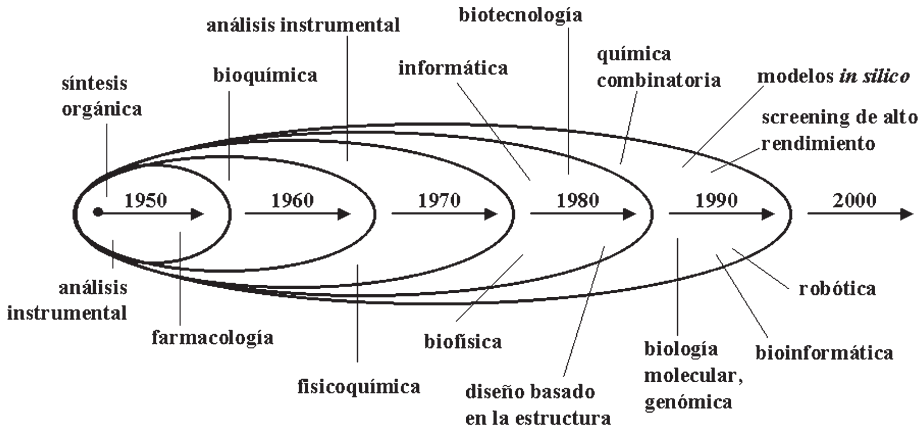


Figura 1. *La aportación científica al desarrollo y producción de medicamentos en el siglo XX.*

Las compañías farmacéuticas de EE.UU. invirtieron en I+D en el año 2002 más de 32.000 millones de dólares, un 7,7% más que en 2001 y tres veces más que en 1990 adquiriendo una posición de liderazgo entre las industrias innovadoras superando incluso a la aeronáutica y electrónica, en las que figuran compañías como Microsoft, Boeing e IBM (4).

El desarrollo de nuevos medicamentos nace de una idea empresarial basada en la existencia de lagunas terapéuticas y en la posible extensión de su uso, a amplias poblaciones de pacientes, basándose en los resultados de estudios epidemiológicos. Sin embargo, el hecho más singular es el desarrollo de una idea innovadora que requiere una importante inversión en tiempo y recursos, tanto humanos como económicos. El objetivo final de estos estudios es poder llegar a establecer la eficacia y seguridad de una nueva alternativa terapéutica, requisito previo a su comercialización y utilización clínica (5).

La figura 2 recoge las diferentes fases implicadas en el desarrollo de nuevos medicamentos. La síntesis química continua representado la mayor fuente de candidatos seguida por la biotecnología y los productos naturales. El *screening* de alto rendimiento y los modelos *in silico* facilitan la selección de sustancias activas, reduciendo sensiblemente los riesgos de fracaso en las siguientes fases del desarrollo. El primero, mediante el uso de sistemas multiensayo automatizados, permite realizar más de

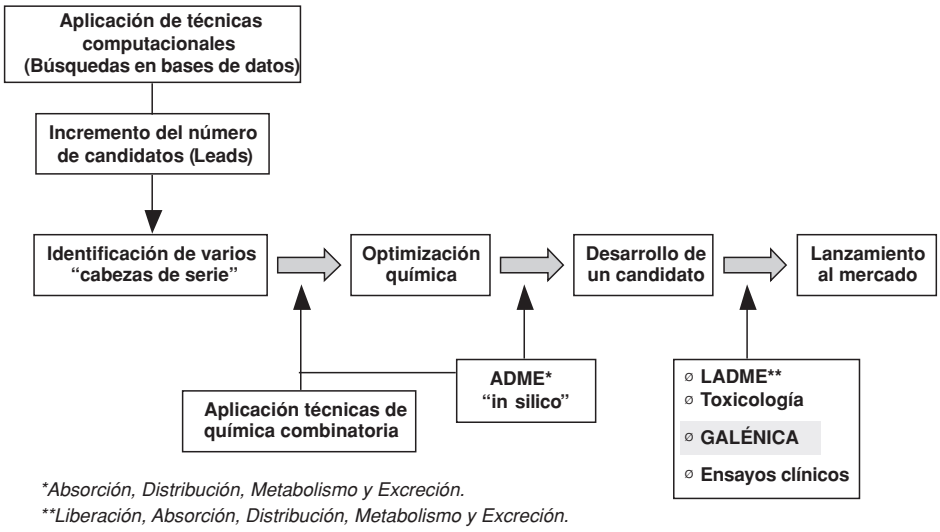


FIGURA 2. *Fases del desarrollo de medicamentos en la actualidad.*

100.000 pruebas en 2 semanas y detectar simultáneamente diferentes actividades en miles de nuevas sustancias. Los modelos *in silico* utilizan algoritmos que relacionan la estructura química y las propiedades físicoquímicas de una molécula con procesos fisiológicos, que permitan predecir su comportamiento farmacocinético *in vivo* mediante el uso de recursos informáticos (6).

Para el desarrollo de un candidato se requiere realizar estudios toxicológicos, establecer la vía y forma de dosificación, así como definir el perfil farmacocinético y la eficacia mediante los ensayos clínicos controlados.

El principal objetivo de la Galénica, denominación ya clásica que engloba a la Tecnología Farmacéutica, es el diseño, fabricación y control de formulaciones farmacéuticas. Éstas se consideran el producto resultante del proceso tecnológico que confiere a los medicamentos las características adecuadas para facilitar su administración, asegurar una correcta dosificación y alcanzar una eficacia terapéutica óptima. Por tanto, los comprimidos, cápsulas, parches transdérmicos, etc. no son simples soportes de principios activos sino que pueden llegar a modular la eficacia terapéutica y la seguridad de uso de los principios activos.

Durante los últimos años se ha producido un importante desarrollo de la formulación farmacéutica que ha permitido mejorar la efectividad y/o seguridad clínica de numerosos medicamentos, especialmente aquéllos indicados en el tratamiento de enfermedades crónicas como las cardiovasculares, psiquiátricas, etc. En ocasiones, las formulaciones farmacéuticas han conseguido prolongar la exclusividad de medicamentos ante la proximidad de caducidad de la patente. En este sentido su aportación ha sido fundamental para el desarrollo de los conocidos como supergenéricos que presentan ventajas, en ocasiones importantes, sobre aquellos fármacos que llegaron a ser importantes innovaciones terapéuticas. Es éste, el caso del MR-4 tacrolimus, una formulación de liberación controlada del agente inmunosupresor cuya patente caducará en 2007 (7). La aparición de los medicamentos biotecnológicos ha planteado la necesidad de incorporar nuevas formulaciones farmacéuticas que permitan superar algunas de las limitaciones que presentan los péptidos y proteínas para su utilización clínica. Finalmente, algunas estrategias terapéuticas nuevas como la terapia celular, la interferencia ARN o bloqueo génico post-transcripcional y la terapia génica, obligan a tomar en consideración las posibilidades que ofrecen las formulaciones farmacéuticas desarrolladas a partir de la micro y nanotecnología y de la microfabricación (8).

2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS Y BIOFARMACÉUTICAS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS

«It is now almost a century since Overton and Meyer first demonstrated the existence of a relationship between the biological activity of a series of compounds and some simple physical property common to its members»

PJ Taylor*

La actividad biológica de un fármaco está condicionada, principalmente, por dos factores: la estructura química, que determina la actividad intrínseca o potencia y la capacidad para alcanzar el lugar de acción, descrita por su perfil farmacocinético.

---

* Taylor PJ. Hydrophobic properties of drugs. In: Hansch C, Sammes PG, Taylor JB. Comprehensive Medical Chemistry 1990; 4: 241-94.

La fabricación de medicamentos exige disponer de principios activos de calidad contrastada que respondan a las exigencias recogidas en el Drug Master File (DMF), en las Farmacopeas o en otras disposiciones oficiales en materia de medicamentos, cuando ello sea necesario. En este sentido, es oportuno citar el contenido de la directiva 75/318 CEE que hace referencia a la caracterización de principios activos farmacéuticos y que está recogida en la figura 3.

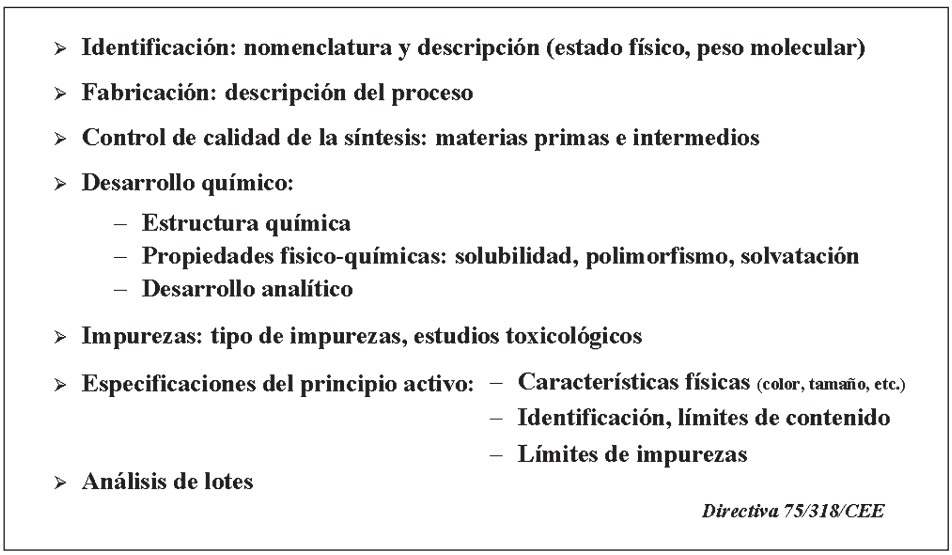


FIGURA 3. *Caracterización de principios activos (75/318 CEE).*

Debe destacarse la importancia que concede esta disposición, de ámbito europeo, a las propiedades físico-químicas como la solubilidad, el polimorfismo, la solvatación, el estado físico, tamaño de partícula, etc. Algunas de estas propiedades, no siempre consideradas en las Farmacopeas, pueden tener impacto sobre la producción industrial de los medicamentos y sobre su perfil terapéutico, por lo que deben analizarse cuidadosamente (9).

La figura 4 recoge un esquema de la interrelación de diferentes propiedades de los principios activos y la dependencia de un parámetro de importancia clínica, la biodisponibilidad, con su posible repercusión en la eficacia y/o toxicidad de los medicamentos.

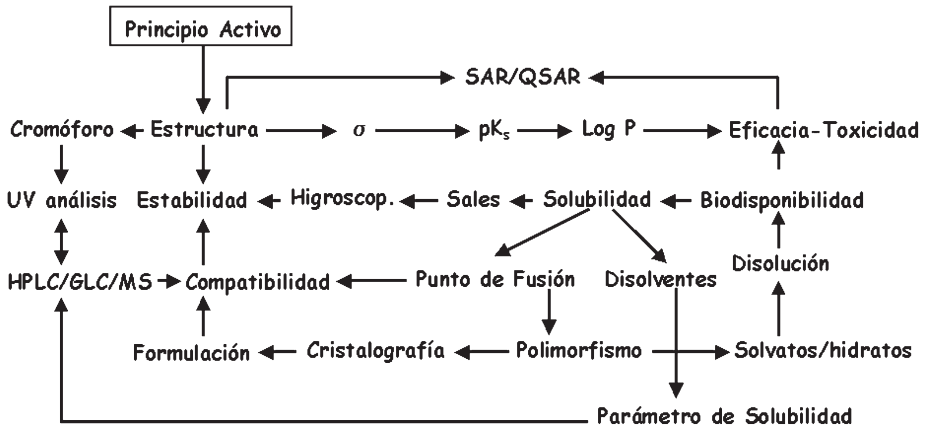


FIGURA 4. *Interrelación de diferentes propiedades de los principios activos.*

Las propiedades físico-químicas de los principios activos constituyen, sin duda, un elemento esencial en el desarrollo de formulaciones farmacéuticas destinadas a la administración de medicamentos por vía oral. JB Dressman* señalaba acertadamente: *«The physical chemical properties of a compound have a strong influence on its disolution in the gastrointestinal tract, and hence on whether or not dissolution will be the rate limiting step to its absorption».*

La absorción gastrointestinal está condicionada por: la solubilidad (que limita la concentración de un fármaco que puede encontrarse en disolución y la velocidad a la que las moléculas se disuelven), el carácter ácido/base (que define la carga de las moléculas en disolución a un determinado pH), la lipofilia (que cuantifica la distribución de una molécula entre las fases oleosas y acuosas de los componentes orgánicos) y la permeabilidad (que determina la facilidad con la que las moléculas atraviesan las membranas que separan los compartimentos corporales) (10-12).

Cuando se inicia el desarrollo de un nuevo fármaco, los estudios de preformulación ponen, con frecuencia, de manifiesto diversos problemas relacionados con las propiedades físico-químicas del principio activo. Entre ellos destacan los siguientes (13):

* Dressman JB. Dissolution testing as a prognostics tool for oral absorption immediate dosage forms. Pharm Res 1998; 15: 11-22.

1. La solubilidad del principio activo en fluidos biológicos es demasiado baja, lo que impide una velocidad de disolución adecuada para alcanzar su lugar de acción.
2. El coeficiente de reparto del principio activo es demasiado bajo, o demasiado alto, para facilitar una rápida transferencia de las moléculas a través de las capas alternativas acuosas y lipídicas, que constituyen las membranas biológicas.
3. El principio activo presenta una baja permeabilidad, lo que dificulta su absorción gastrointestinal, o su acceso a órganos y tejidos con transporte selectivo.
4. El fármaco presenta una baja estabilidad química en los fluidos biológicos antes de alcanzar el lugar de acción, lo que limita su utilidad clínica.
5. El fármaco puede sufrir una degradación metabólica por sistemas enzimáticos en la luz intestinal, en la superficie de la mucosa, en el plasma o en el hígado, antes de alcanzar la circulación sistémica. Es el efecto de «primer-paso», cuyas consecuencias pueden comprometer la eficacia clínica.
6. El fármaco presenta unas características organolépticas desagradables, como el olor o el sabor, que pueden conducir a un rechazo por el paciente, lo que se asocia al incumplimiento de la prescripción y al posible fracaso terapéutico.
7. El fármaco presenta un margen terapéutico estrecho que requiere un estricto seguimiento durante el tratamiento.
8. El fármaco puede presentar efectos tóxicos cuya frecuencia y magnitud pueden incrementarse cuando su uso es inadecuado (ej.: dosis incorrecta, interacciones, etc.).

Estos problemas deben ser cuidadosamente valorados durante la preformulación para adoptar las decisiones más convenientes con el fin de asegurar una estabilidad y biodisponibilidad óptimas del principio activo en la formulación farmacéutica seleccionada.

La biodisponibilidad es un parámetro farmacocinético que expresa la capacidad de acceso de los fármacos incorporados a una formulación a la circulación sistémica. Generalmente no se modifica con la dosis y per-

manece constante en el curso de un tratamiento, aunque está condicionada por factores fisicoquímicos, farmacéuticos y fisiopatológicos, cuyo efecto debe ser analizado (14).

La figura 5 recoge la relación entre el valor del área bajo la curva concentración sérica-tiempo (ABC), representativo de la exposición de un fármaco al organismo y, por tanto, de la biodisponibilidad y la respuesta clínica definida por una variable subrrogada o final (15).

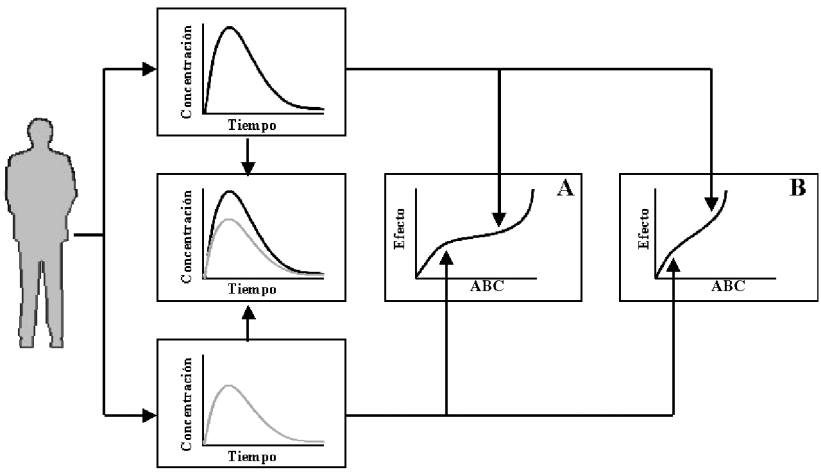


FIGURA 5. *Efecto del cambio en la biodisponibilidad en la eficacia clínica de los medicamentos.*

En el caso A, en el que no se producen cambios significativos en la respuesta al modificar el valor del ABC, los cambios en la biodisponibilidad van a tener escasa relevancia clínica. Sin embargo en el caso B, pequeñas variaciones en el valor de ABC pueden llegar a tener una importante repercusión en la evolución clínica del paciente.

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) agrupa los fármacos en función de su solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal cuando se combinan con la información de disolución *in vitro*, el SCB toma en consideración, por tanto, tres factores fundamentales: solubilidad, permeabilidad y velocidad de disolución, factores que controlan la velocidad y extensión de la absorción de fármacos incorporados a formulaciones de liberación inmediata (16, 17). La figura 6 muestra una re-

presentación del SCB incluyendo algunos ejemplos representativos. Esta clasificación ha sido adoptada, primero, por la FDA y en 1998 por la EMEA, siendo de gran utilidad no sólo en el desarrollo preclínico de nuevos medicamentos sino también en la planificación de estudios de bioequivalencia a partir de las relaciones *in vivo*/*in vitro* y para el diseño de las formulaciones farmacéuticas (18).

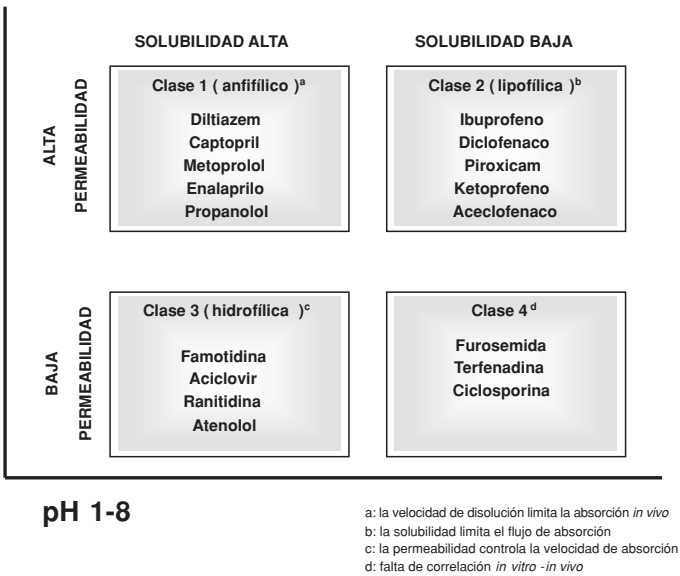


FIGURA 6. *Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB).*

Lobenberg y Amidon (19) han establecido la relación entre dosis, características de disolución, solubilidad y absorción de fármacos utilizando tres parámetros adimensionales:

1. *Número de dosis* (Do): es la relación de la dosis y la cantidad de fármaco que podría disolverse en 250 mL de fluido al pH de más baja solubilidad entre pH=1 y 8.
2. *Número de disolución* (Dn): es la relación entre el tiempo de tránsito en el intestino delgado y el tiempo necesario para su disolución, el cual incluye la solubilidad (Cs), difusión (D), densidad (p) y radio inicial de partícula de la molécula.

3. *Número de absorción* (An): relaciona el tiempo de tránsito respecto al tiempo necesario para completar la absorción en el intestino delgado.

La figura 7 representa el esquema seguido con la utilización de estos parámetros en la predicción de la absorción de medicamentos por vía oral. Nuestro grupo ha estudiado un modelo *in silico*, GASTROPLUS®(http://www.simulations-plus.com), para la predicción de absorción de medicamentos que se administran por vía oral a partir de Do, Dn y An (20).

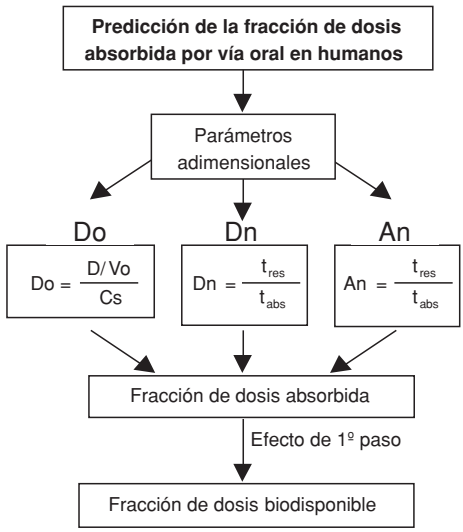


Figura 7. *Predicción de la absorción oral de medicamentos.*

Ibuprofeno, piroxicam, ketoprofeno, etc., están incluidos, de acuerdo con su solubilidad y permeabilidad, en la clase II con otros fármacos que presentan baja solubilidad y alta permeabilidad. Según Dressman*: *«The rate of dissolution of the drug was almost certain to be the principal limitation to its oral absorption for class II drugs»*. Para estos fármacos, el valor de su hidrosolubilidad es bajo y por ello también presentan un valor de Dn bajo, ya que este índice está indirectamente relacionado con

* Dressman JB. Dissolution testing as a prognostics tool for oral absorption immediate dosage forms. Pharm Res 1998; 15: 11-22.

el tiempo de disolución y, en este caso, este valor es alto. En estas condiciones, la velocidad de disolución del fármaco *in vivo* es el factor limitante de su absorción. Los estudios de velocidad de disolución *in vitro* deberán, por tanto, estudiar el perfil de disolución de la curva representativa del proceso. Es posible obtener correlaciones *in vivo*/*in vitro* si la velocidad de disolución *in vitro* es similar al proceso *in vivo*. Ello facilita la optimización en el proceso de preformulación de aquellos medicamentos que se administran por vía oral.

La figura 8 recoge una de las pantallas de la aplicación GASTROPLUS® (destinada a la evaluación de la Ranitidina, la cual, por su número de absorción, tiene una importante limitación en su biodisponibilidad por vía oral.

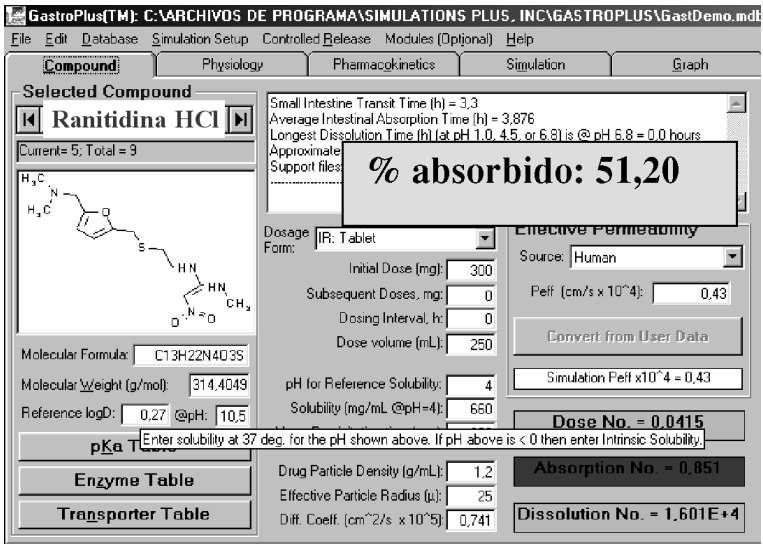


FIGURA 8. *Aplicación del sistema GASTROPLUS® a Ranitidina.*

Recientemente se ha desarrollado diverso software para los modelos *in silico* con diferentes aplicaciones como la predicción de diferentes parámetros y procesos cinéticos: absorción y distribución (GRID), lipofilia y pKa (PALLAS) y metabolismo con el sistema experto MetabolExpert LADMES (QiKProp) (21).

3. MODIFICACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD POR VÍA ORAL

Numerosos principios activos, de indudable valor terapéutico por su elevada actividad intrínseca, pueden presentar importantes limitaciones para su utilización clínica por sus características biofarmacéuticas y farmacocinéticas, especialmente por su baja biodisponibilidad. Ello puede afectar a los 5 parámetros que definen una respuesta terapéutica: 1. Magnitud del efecto terapéutico con el tiempo; 2. Probabilidad de obtener una respuesta clínica significativa; 3. Probabilidad de distribución del tiempo de iniciación del efecto; 4. Probabilidad de distribución de la supresión del efecto; y 5. Probabilidad de distribución de la duración del efecto (22).

Para mejorar la biodisponibilidad de los principios activos puede recurrirse a diferentes estrategias según sea la disolución o la permeabilidad de los factores limitantes, tal como se recoge en la figura 9. Entre los primeros puede recurrirse a modificar algunas características físicoquímicas del principio activo o a optimizar la formulación mediante la aplicación de la Tecnología Farmacéutica.

Cuando la permeabilidad es el factor limitante se plantean mayores dificultades aunque se han conseguido algunos progresos con el uso de

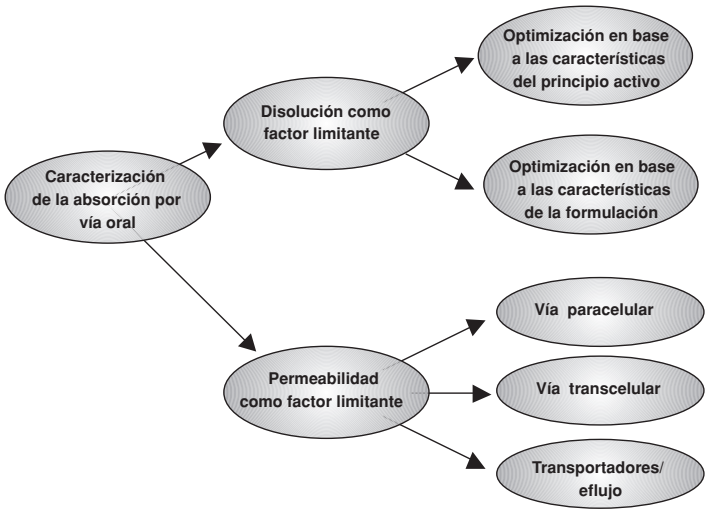


Figura 9. *Estrategias dirigidas a mejorar la absorción gastrointestinal de fármacos con problemas de biodisponibilidad.*

sistemas bioadhesivos, promotores de absorción o incorporando inhibidores de las «bombas de eflujo» y concretamente de la P-glicoproteína (23, 24).

Cuando las modificaciones químicas no son factibles, los cambios en las propiedades físico-químicas del principio activo o en la formulación pueden incrementar la biodisponibilidad por vía oral. Una de las soluciones más interesantes consiste en mejorar la solubilidad de un fármaco escasamente soluble en agua mediante la formación de sales solubles o recurriendo a la selección del polimorfo más adecuado y a determinados enantiómeros o utilizando otras estrategias, de base físico-química, aportadas por la Tecnología Farmacéutica (25-27).

3.1. Sales farmacéuticas

«Salt formation is a means of altering the physical, and biological characteristics of a drug without modifying its chemical structure»

DONAL C. MONKHOUSE, 1997*

El cambio de un ácido o base libre a la forma de sal es uno de los mecanismos utilizados para modificar las propiedades físico-químicas y biológicas de una sustancia sin cambiar su estructura química (28, 29).

El cambio en la estructura cristalina, que se produce con la formación de sales, puede tener los siguientes efectos: incrementar la solubilidad en agua de las sustancias con grupos ácidos o bases libres y mejorando su biodisponibilidad, mejorar la estabilidad física o química de los componentes ácidos, favorecer los procesos de purificación de principios activos y facilitar las operaciones de manipulación industrial de los medicamentos ácidos o básicos.

La selección de las sales farmacéuticas requiere la realización de diferentes estudios que confirmen su idoneidad no sólo por una mayor solubilidad sino también por diversas propiedades como higroscopicidad, estabilidad, polimorfismo, etc. Tal como se recoge en la figura 10 (30).

---

* Central Research, Pfizer Inc. Groton, CT. (EE.UU).

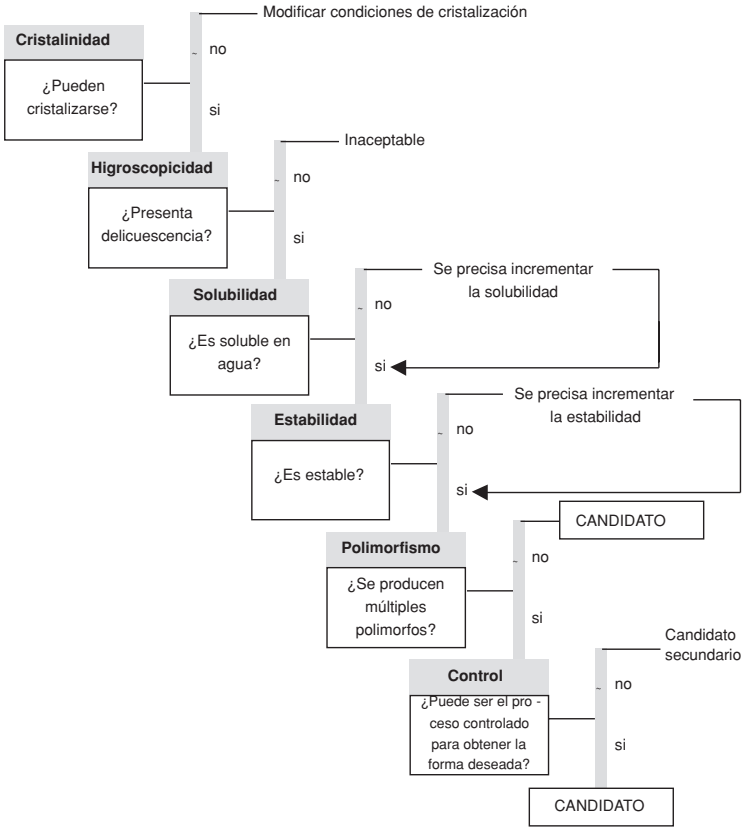


FIGURA 10. *Árbol de decisión en la selección de sales farmacéuticas.*

El uso de las sales farmacéuticas exige un conocimiento de las consecuencias que pueden derivarse en sus propiedades físico-químicas y biológicas (31). Entre ellas hay algunas muy significativas:

1. Algunas sales de principios activos modifican significativamente la velocidad y duración de la respuesta (p.ej. ibuprofeno-arginina, penicilina-procaína, etc.). Estas diferencias pueden ser críticas para las indicaciones establecidas.

2. Las diferentes sales de un mismo principio activo pueden presentar distinta intensidad del efecto farmacológico (p.ej. la reformulación del propoxifeno al comprobarse que el napsilato tiene mayor potencia y más larga duración del efecto analgésico que el clorhidrato).

3. Las diferentes sales de un mismo principio activo pueden presentar diferente biodisponibilidad. Así, el agente vasodilatador naftidrofurilo presenta una mayor biodisponibilidad cuando se administra como citrato que como oxalato.

4. Algunos aniones y cationes están asociados a determinados efectos tóxicos. Así los aniones tartrato, los cuales son habitualmente poco absorbidos por vía oral, pueden provocar nefrotoxicidad si alcanzan altas concentraciones en la circulación sistémica.

5. Diferentes sales de un mismo principio activo pueden presentar distinta capacidad para producir irritación esofágica o gástrica (p.ej., el efecto irritante del clorhidrato de alprenolol puede provocar ulceración esofágica, mientras que el benzoato de alprenolol no tiene este efecto.

6. Una determinada sal puede afectar a la estabilidad del principio activo. Por ejemplo, las sales de ácidos minerales, como clorhidratos, sulfatos y metansulfonatos son altamente polares. Los grupos polares ionizados localizados en la superficie de los cristales favorecen la humectación y promueven la higroscopicidad. Ello puede ser causa de degradación de fármacos sensibles a los procesos hidrolíticos.

La selección de la sal apropiada es un factor importante durante las fases iniciales del desarrollo de un nuevo fármaco y cualquier cambio en el anión o catión requiere la realización de estudios preclínicos y clínicos que aporten la evidencia científica necesaria (32).

3.2. Estado cristalino: desarrollo de polimorfos

Muchos compuestos orgánicos son capaces de adoptar una forma amorfa o bien una o más formas cristalinas, con diferentes disposiciones espaciales de las moléculas en la red cristalina; y a estas formas cristalinas se las conoce como polimorfos. Dos polimorfos de un mismo compuesto pueden ser tan diferentes en estructura y propiedades como dos compuestos químicamente diferentes. Los puntos de fusión, las densidades, solubilidades, forma de los cristales, propiedades eléctricas, y los espectros de difracción de rayos X son características que pueden variar con la forma polimórfica (33).

Teniendo en cuenta consideraciones teóricas, las formas amorfas presentan una velocidad de disolución más rápida que las formas cristalinas

y, por lo tanto, en general son mejor absorbidas. Estas consideraciones se basan en las energías relativas involucradas en el proceso de disolución. Un sólido amorfo carece de fuertes uniones entre sus moléculas; las moléculas se distribuyen espacialmente en el sólido de forma aleatoria, por lo que se requiere menos energía que en el sólido cristalino para que se produzca su separación, la cual tiene lugar durante el proceso de disolución. Por otro lado, las técnicas empleadas para la preparación de fármacos en estado amorfo implican generalmente una reducción del tamaño de partícula, lo cual favorece aún más el aumento de la velocidad de disolución de estas formas frente a las cristalinas.

La figura 11 recoge los difractogramas correspondientes a la diacetilmidecamicina amorfa y cristalina y los correspondientes perfiles de disolución. El estado amorfo es predeciblemente inestable, dado que existe una gran tendencia a pasar a un estado termodinámicamente más estable, con una entropía menor, como es el estado cristalino, poco soluble y cuya biodisponibilidad oral es muy baja. Por ello, este macrólido, en estado amorfo, debe ser adecuadamente estabilizado mediante la incorporación de un polímero, habitualmente la carboximetilcelulosa.

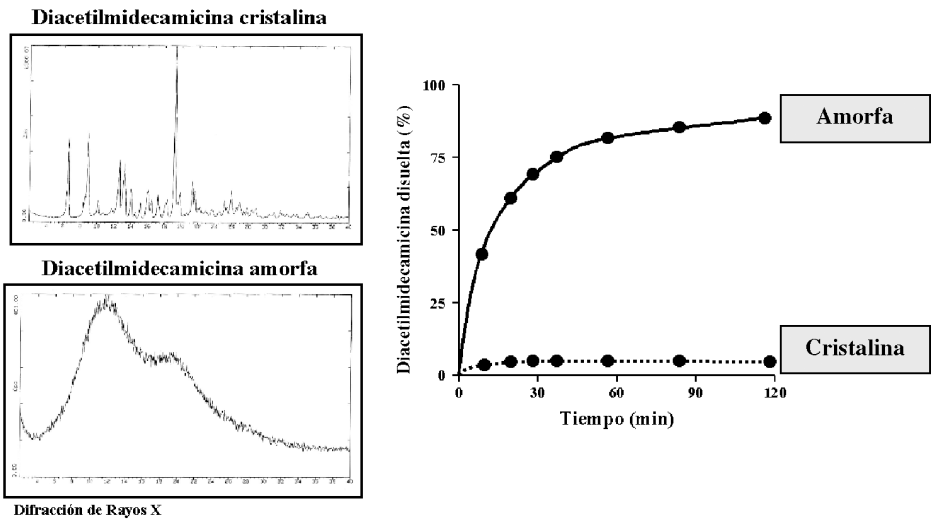
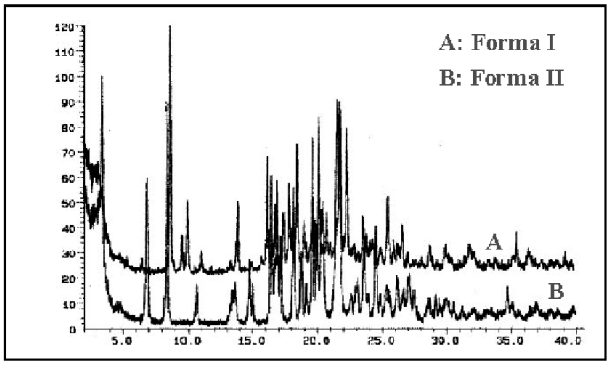


FIGURA 11. *Difractogramas y velocidad de disolución de la diacetilmidecamicina amorfa y cristalina (cedido por Laboratorios Menarini, Barcelona).*

La existencia de polimorfos es una de las principales fuentes de variación en el comportamiento de la disolución de los fármacos. La influencia del polimorfismo sobre la velocidad de disolución viene determinada por los cambios en la solubilidad de los distintos polimorfos. Uno de los ejemplos mejor conocidos es el caso del ritonavir (Norvir®) por el impacto que ha tenido en su producción industrial, debido al cambio de solubilidad en disoluciones hidroalcohólicas, tal como se aprecia en la figura 12. Aunque la Forma II era inicialmente desconocida, la no conformidad de varios lotes de Norvir® fue la causa de iniciar estudios de polimorfismo para validar el proceso de fabricación (34).



Solubilidad

Etanol/Agua	99/1	95/5	90/10	85/15	80/20	75/25
Forma I	90 mg/mL	188	234	294	236	170
Forma II	19 mg/mL	41	60	61	45	30

FIGURA 12. *Polimorfismo de Ritonavir. Efecto en la solubilidad.*

En muchos casos la adecuada selección y preparación del polimorfo apropiado puede incrementar de forma significativa la absorción y el valor terapéutico de los fármacos, particularmente de aquellos que presentan una baja solubilidad.

Debido a las diferencias conformacionales o de empaquetamiento los cristales polimórficos se diferencian en sus propiedades físicas (densidad, dureza, índice de refracción, punto de fusión, entalpia de fusión, solubi-

lidad y velocidad de disolución) y otras propiedades termodinámicas, cinéticas e incluso, el color (35). A presión y temperatura ambientes, un polimorfo puede ser termodinámicamente más estable que otro. En general, se cumple que las formas polimórficas metaestables presentan una mayor solubilidad y, en consecuencia, una mayor velocidad de disolución (36). Además, los polimorfos pueden presentar diferencias en la biodisponibilidad que son de interés para mejorar su rendimiento clínico. La selección de un determinado polimorfo puede permitir prolongar la vida de la patente o ampliarla a otros países.

3.3. Fármacos quirales: desarrollo de enantiómeros

En 1848, Luis Pasteur al lograr la separación, por medios mecánicos, de enantiómeros inicia el estudio de las propiedades físicas y químicas de las moléculas asimétricas. Además, también puede atribuirse a Pasteur la primera evidencia de las diferencias existentes entre distintos isómeros ópticos. En 1858 describe que la forma dextro del tartrato amónico es más rápidamente destruida por el *Penicillium glaucum* que el isómero levo y establece, por primera vez, el papel que desempeña la estereoquímica en los mecanismos que regulan los procesos vitales (9, 37).

Las implicaciones de la estereoquímica en la terapéutica han sido bien establecidas durante las últimas décadas. La mayoría de los sistemas biológicos tienen preferencia por una forma estereoquímica sobre otra, en numerosos procesos bioquímicos. Quizás el ejemplo mejor conocido es el hecho de que, únicamente, los α-aminoácidos son utilizados en la biosíntesis de las proteínas. Las proteínas que están frecuentemente implicadas en los procesos reactivos poseen una estructura tridimensional y establecen interacciones específicas con fármacos quirales, en su denominación actual, término procedente del griego, que significa mano (38, 39).

Los enantiómeros presentan, con frecuencia, características diferenciales que pueden llegar a tener una importante repercusión clínica. A continuación recogemos algunas situaciones de interés en diversos campos de la terapéutica:

1. Toda la actividad farmacológica puede residir en uno de los enantiomeros. Un ejemplo es la α-metildopa que es un fármaco quiral ob-

tenido por síntesis química. Sólo el S-enantiómero de la α-metildopa actúa como sustrato para la aromaticoaminoácido descarboxilasa y produce el efecto antihipertensivo. El R-enantiómero puede ser considerado, en este caso, una impureza isomérica (40).

2. Los enantiómeros presentan efectos farmacodinámicos similares aunque pueden presentar diferente farmacocinética. El esomeprazol, recientemente registrado en España, es un enantiómero que presenta un aclaramiento 3 veces más lento que el omeprazol racémico lo cual tiene implicaciones posológicas. Además, la nueva formulación favorece las condiciones de administración, especialmente en niños, viejos y en pacientes que deben recibir un inhibidor de la bomba de protones por sonda nasogástrica (41).

3. Los enantiómeros pueden tener una actividad farmacodinámica similar aunque con potencias intrínsecas muy diferentes. Ejemplos representativos de esta situación son el propranolol y el verapamilo. El S(-)propranolol es, aproximadamente 100 veces más potente que el R(+)-propranolol bloqueando la actividad cronotrópica e inotrópica del isoproterenol. La disposición del propranolol es esteroselectiva, ya que el S(-)-propranolol se une en mayor proporción a las proteínas plasmáticas que el R(+)-propranolol. El verapamilo contiene un centro quiral único dando lugar a dos isómeros: R(+)verapamilo y S(-)verapamilo. En este caso el metabolismo es estereoselectivo, siendo eliminado prefentemente el S(-)-enantiómero y con mayor permanencia en el organismo el R(+)-enantiómero (42).

4. Ambos enantiómeros pueden tener efectos terapéuticos diferentes como ocurre con el propoxifeno. El dextropropoxifeno es un agente analgésico, mientras el levopropoxifeno, aunque también posee actividad analgésica, es un agente antitusígeno. Otro ejemplo representativo lo constituye el labetalol, que al poseer dos centros quirales posee cuatro isómeros. El isómero R,R-labetalol es un β-bloqueante adrenoreceptor no selectivo, mientras que el isómero R,S-labetalol es un β_1-bloqueante adrenoreceptor y el isómero S,S-labetalol tiene una actividad farmacológica escasa. El compuesto racémico con la mezcla de los cuatro isómeros, es un agente antihipertensivo con efectos bloqueantes α_1 y β. El desarrollo del isómero R,R-labetalol, para ser utilizado como enantiómero puro, fue interrumpido debido a su hepatotoxicidad (43).

5. El distómero (enantiómero de un compuesto quiral que es menos potente para una acción particular) puede ser responsable de efectos adversos indeseables. En algunos casos, el distómero provoca efectos tóxicos que no son característicos del eutómero (enantiómero de un compuesto quiral que es más potente para una acción determinada). El trágico ejemplo de la talidomida es uno de los casos más representativos de esta situación producida a consecuencia de la quiraliad. La talidomida fue registrada hace más de 40 años como racémico por sus efectos sedantes. El R-enantiómero tiene realmente efecto sedante, mientras que el S-enantiómero posee efectos teratogénicos y fue el responsable de las anormalidades fetales sobradamente conocidas. La ketamina es otro ejemplo de esta situación, ya que mientras que la S(+)-ketamina presenta efectos analgésicos y anestésicos, el R(-) distómero produce importantes efectos secundarios, incluyendo agitación y alucinaciones (44).

6. Algunos enantiómeros presentan ventajas terapéuticas evidentes. Durante los últimos años se han registrado diversos enantiómeros que presentaban ventajas significativas respecto a las mezclas racémicas. Algunos ejemplos significativos son el levofloxacino, el S-ketoprofeno, la S-ketamina, el S-ibuprofeno, el R-salbutamol, etc. (45). Las causas más frecuentes para seleccionar un enantiómero es su mayor actividad intrínseca, mayor rapidez de acción y menores efectos adversos.

7. Algunos enantiómeros pueden presentar actividades farmacodinámicas opuestas. En esta situación los componentes de una mezcla racémica presentan efectos opuestos pudiendo predominar uno u otro modificando las condiciones de administración. Los calcioantagonistas derivados de la dihidropiridina han sido desarrollados como racémicos a excepción del nifedipino, que carece de centro quiral (46).

8. Algunos enantiómeros tienen efectos tóxicos. Lamentablemente los dos primeros fármacos desarrollados como isómeros para reemplazar a mezclas racémicas tuvieron que ser retirados por problemas de toxicidad. El dilevalol, un agonista parcial β_2, es uno de los cuatro isómeros R_1R del labetalol, un $\alpha_1\beta$-bloqueante que presentó una hepatotoxicidad no detectada con el labetalol, lo que impidió su utilización clínica. Otro ejemplo significativo es el de la fenfluramina, cuyos efectos anoréxicos son debidos, fundamentalmente, al D-isómero, mientras que el L-isómero parece ser responsable de muchos de las reacciones adversas del ra-

cémico. Recientemente, fenfluramina y dextrofenfluramina fueron retirados de su utilización clínica debido a que producían hipertensión pulmonar (40).

3.4. Pseudopolimorfos, formas anhidras y formación de complejos

Las distintas formas cristalinas bajo las cuales puede existir un determinado fármaco pueden venir determinadas, como se ha visto, por el polimorfismo, pero además por la incorporación estequiométrica de disolventes en la red cristalina del fármaco durante el proceso de cristalización, originando los denominados solvatos, o hidratos, cuando el disolvente es el agua. Estas formas cristalinas del fármaco cuando se asocian con moléculas de disolvente se conocen también como pseudopolimorfos (47).

La presencia de moléculas de agua influye en las interacciones moleculares (afectando a la energía interna y entalpía) y en el desorden cristalino. Por ello influyen en la energía libre, activad termodinámica, solubilidad, velocidad de disolución, estabilidad y biodisponibilidad.

Las formas anhidras de los fármacos presentan una mayor actividad termodinámica que sus correspondientes hidratos, por lo que, consecuentemente, las formas anhidras tienen una mayor solubilidad y una mayor velocidad de disolución que las formas hidratadas y, con frecuencia, una mayor biodisponibilidad. Esta situación se ha producido con ampicilina, teofilina, nitrofuratoína, azitromicina, paracetamol, etc.

La complejación puede definirse como la asociación reversible de moléculas de un substrato con las de un ligando para formar una nueva especie, denominada complejo, que muestra una estequiometría definida y unas propiedades físico-químicas que pueden ser, y en muchos casos lo son, sustancialmente diferentes de las de los compuestos que lo han formado.

Existen muchas posibilidades de formación de complejos, entre los que destacan los de inclusión, que se forman por interacción molecular entre una molécula denominada huésped que se incluye en el interior de otra denominada hospedador (48). Entre los compuestos que pueden actuar como hospedadores están las ciclodextrinas (CD), que por sus ca-

racterísticas estructurales, adecuado tamaño, estabilidad y ausencia de efectos secundarios han alcanzado una notable importancia en los últimos años.

En disolución acuosa, la cavidad interna apolar de las CD está ocupada por moléculas de agua que se encuentran en un estado energético desfavorable (elevada entalpía) por la repulsión polar-apolar. Esto hace que dichas moléculas puedan ser fácilmente reemplazadas por otras presentes en la solución de carácter menos polar y con un tamaño adecuado para adaptarse al interior. Las características que debe presentar un fármaco para formar complejos de inclusión con CD son, pues, el carácter polar y el tamaño adecuado para acceder a su interior (Pm 100-400) (49).

Cuando el complejo CD-fármaco se pone en contacto con un medio acuoso se disocia provocando la liberación del fármaco. La constante de estabilidad del complejo condiciona la cantidad de fármaco libre y, por tanto, la velocidad de absorción en el organismo (50). Además, pueden incrementar la estabilidad química, la solubilidad y la biodisponibilidad (51). La tabla 1 recoge algunos ejemplos de la aplicación de CD en la formulación farmacéutica.

Tabla 1

Ventajas de la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas

Propiedades farmacéuticas	*Ejemplos*
Incremento de solubilidad y velocidad de absorción	AINE; inhibidores de la COX2; hormonas esteroídicas; hipoglucemiantes orales; benzodiazepinas citotóxicos...
Inhibición de reacciones químicas de Degradación	Hidrólisis: ácido acetilsalicílico, indometacina Fotodescomposición: fenotiazinas, vitaminas liposolubles, clofibrato, metronidazol... Deshidratación: prostaglandinas E1 y E2
Aumento de la biodisponibilidad	Vía oral: espironolactona, indometacina, ketoprofeno, Ibuprofeno, etc. Vía rectal: indometacina, fenobarbital, etc. Vía transdérmica: prednisona, betametasona, dipropionato de beclometasona, etc. Vía ocular: flurbiprofeno, indometacina, etc.

En definitiva, existen en la actualidad numerosas estrategias dirigidas a modificar la solubilidad de los principios activos utilizados en la fabricación de medicamentos, que no exigen cambios en la estructura química pero que pueden modificar su biodisponibilidad. El desarrollo de profármacos, aunque va asociado a un cambio en la estructura química, debido a su inestabilidad en el organismo, recuperan la estructura original del principio activo y pueden producir cambios en la eficacia, seguridad, facilidad de administración o en la posología de los medicamentos (52).

4. FORMULACIONES DE LIBERACIÓN MODIFICADA

«The pills may pass through the stomach without dissolving, owing to the patient´s condition, the composition of the tablet or type of coating»

PROCTOR, 1862

El desarrollo experimentado en los últimos años por la tecnología farmacéutica ha facilitado el diseño y producción de formulaciones farmacéuticas de liberación modificada, que ha permitido mejorar el perfil terapéutico de numerosos medicamentos cuya eficacia y seguridad habían sido previamente establecidas en ensayos clínicos controlados y, posteriormente, contrastados en la práctica clínica. Ello ha sido posible gracias a la introducción de nuevos materiales, especialmente los polímeros biocompatibles, al mejor conocimiento de las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de los medicamentos, así como su aplicación a la optimización de la respuesta y al progreso experimentado por las operaciones industriales necesarias para la fabricación de estas formulaciones (53, 54).

El desarrollo de materiales poliméricos biocompatibles se ha producido durante los últimos cincuenta años en un intento de superar las limitaciones de algunas intervenciones médicas, especialmente en cirugía cardiovascular. Actualmente, son numerosos los que se utilizan en los sistemas de liberación modificada de fármacos que se agrupan en: polímeros no degradables [siliconas, copolímeros del óxido de etileno y el acetato de vinilo (EVAc), poliuretanos, etc.]; polímeros biodegradables [poliésteres (polímeros pLGA), copolímeros de metil-vinil éter y anhí-

drido maleico, poliortoésteres, polianhidridos, poliaminoácidos, etc.]; polimeros hidrosolubles (derivados celulósicos, quitosan, dextranos, acrilatos, acrilamidas, polietilenglicoles, etc.).

Los modelos farmacocinéticos-farmacodinámicos relacionan la dosis de fármaco administrada, la concentración alcanzada en fluidos corporales y el efecto farmacológico, expresado como variables clínicas subrrogadas o finales de la respuesta. Esta relación puede ser sencilla, como ocurre con los antibióticos, analgésicos, etc. o en ocasiones muy compleja, como es el caso de la eritropoyetina, la hormona del crecimiento, etc. Los primeros modelos se desarrollaron para caracterizar efectos rápidos, directos y reversibles. Posteriormente, se han descrito modelos para fármacos con mecanismos de acción indirectos que dan lugar a un retraso en la respuesta farmacológica. El uso de estos modelos permite hacer predicciones de posibles cambios en la intensidad y duración de la respuesta cuando se modifican las características de una formulación farmacéutica (55).

Los cambios recientes que se han producido en la fabricación industrial de medicamentos se han dirigido principalmente al aumento de la productividad incorporando sistemas automatizados que incluyen, en ocasiones, la robótica y a mejorar la seguridad del producto.

Los objetivos clínicos que se plantean al diseñar una formulación de liberación modificada son, de acuerdo con el *National Prescribing Center* del Reino Unido (2000), los siguientes (56):

- Aumentar el intervalo de dosificación con el fin de mejorar el cumplimiento de la prescripción médica.
- Reducir las fluctuaciones de las concentraciones séricas de los fármacos (C_{max}/C_{min}) con objeto de disminuir los efectos adversos y/o mejorar la efectividad terapéutica.
- Controlar el lugar de liberación del fármaco para incrementar su efectividad terapéutica.

Además, algunas formulaciones de liberación controlada pueden mejorar las condiciones de administración como ocurre con los liotabs‹ de piroxican, fenotidina y rizatriptan, especialmente en pacientes geriátricos o aquéllos que tienen dificultades para la deglución.

4.1. Formulaciones orales

El proceso de liberación de los principios activos desde las formas de dosificación constituye un factor limitante de la absorción de aquellos medicamentos que se administran por vía extravascular. En el caso de las formulaciones orales, la liberación es un proceso previo a la absorción gastrointestinal y puede modificar su biodisponibilidad, tanto en magnitud como en velocidad y, en consecuencia, condicionar la intensidad y duración del efecto terapéutico.

La vía oral es de elección en aquellos tratamientos crónicos que deben ser administrados durante meses o años como, antihipertensivos, hipocolesterolémicos, antiarrítmicos, antipsicóticos, inmunosupresores, antirreumáticos, etc. En este tipo de tratamientos el incumplimiento es un hecho bien conocido aunque su repercusión sanitaria y económica no ha sido suficientemente evaluada (57).

El incumplimiento es responsable de fracasos terapéuticos con progresos de la enfermedad, y en ocasiones, de reacciones adversas de los medicamentos. Ello puede producir una mayor utilización de recursos sanitarios principalmente hospitalizaciones, visitas médicas, precauciones en el seguimiento, tratamientos alternativos, etc. (58).

El denominado efecto de la «primera dosis» se produce con algunos fármacos como antihipertensivos o antipsicóticos y ocasionan reacciones adversas que obligan a adoptar precauciones especiales para mejorar el perfil de tolerancia y asegurar el cumplimiento de la prescripción. Con los antihipertensivos se puede producir hipotensión ortostática, síncope y otros efectos posturales. En estas situaciones, las formulaciones de liberación modificada mejoran la seguridad de uso de los medicamentos.

Las formulaciones orales son también utilizadas en el tratamiento de procesos agudos de gravedad moderada, como muchas infecciones respiratorias que no requieren ingreso hospitalario. Durante la última década, la disponibilidad de medicamentos con elevada biodisponibilidad oral ha promovido su utilización en pacientes hospitalizados y en aquéllos que deben completar el tratamiento en el medio ambulatorio.

La selección de fármacos candidatos para ser incorporados a formulaciones orales de liberación controlada debe estar basada en criterios fí-

sico-químicos, biofarmacéuticos, famacocinéticos y clínicos. Las características ideales que deben presentar son: semivida de eliminación corta, buena absorción gastrointestinal con escaso efecto de «primer-paso», baja dosificación por alta actividad intrínseca y riesgo de toxicidad asociado a frecuentes oscilaciones de las concentraciones séricas (C_{max}/C_{min}).

Para fármacos con una semivida de eliminación ($t_{1/2}$) inferior a 8 horas, las formulaciones de liberación controlada permiten reducir la frecuencia de la administración y mantienen relativamente constantes las concentraciones séricas. Para fármacos con margen terapéutico estrecho, las formulaciones de liberación controlada permiten incrementar la eficacia y reducir las reacciones adversas. El intervalo de dosificación (() puede relacionarse con la $t_{1/2}$ y con el margen de concentraciones séricas (C_{max}/C_{min}) por la siguiente ecuación:

$$\tau \leq 1.44 \, . \, t_{1/2} \ln C_{max}/C_{min}.$$

Debido a que el proceso de liberación se realiza gradualmente a través del tracto gastrointestinal, el fármaco debe absorberse en un determinado segmento intestinal. Los medicamentos con «ventanas de absorción» pueden ver limitada su capacidad para incorporarse a formulaciones de liberación controlada.

Los fármacos ampliamente metabolizados presentan dificultades adicionales que pueden limitar las ventajas potenciales de estas formulaciones. Si el efecto de «primer-paso» alcanza la saturación con una formulación convencional, su biodisponibilidad puede descender si se alcanza el nivel de no-saturación con la formulación de liberación controlada. Finalmente, se prefieren fármacos con elevada actividad y dosis baja para desarrollar formulaciones que puedan ser ingeridas cómodamente por el paciente.

Un requerimiento básico en este tipo de formulaciones es que el proceso de liberación del fármaco *in vivo* pueda ser predecible. Para ello se requiere conocer los mecanismos implicados en el proceso y la posibilidad de modularlo aplicando principios físico-químicos. Estos mecanismos se agrupan en los siguientes tipos de sistemas: los controlados por disolución, los controlados por difusión, los erosionables con difusión y disolución y los controlados osmóticamente.

Resulta evidente que se puede lograr una baja velocidad de disolución recurriendo a la formación de sales o derivados, utilizando materia-

les de recubrimiento o incorporando a la formulación excipientes que retrasen la velocidad de disolución. Algunas formulaciones de fenilpropanolamina, clorfeniramina, clorpromazina y azetazolamida se diseñaron utilizando sistemas controlados por disolución.

Los sistemas controlados por difusión se caracterizan por utilizar una barrera, habitualmente un polímero insoluble, para controlar el proceso de liberación. En ocasiones, el núcleo de la formulación esta recubierto por una membrana semipermeable aunque, más frecuentemente, se recurre a matrices poliméricas a las que se incorpora el fármaco cuya liberación va a ser controlada.

La formulación de principios activos utilizando polímeros hidrofílicos, como los derivados celulósicos o los carbómeros, constituyen una alternativa interesante en las formulaciones de liberación controlada destinadas a la administración por vía oral. La liberación del principio activo a partir de estos sistemas se produce después de un proceso de hidratación de las macromoléculas por erosión de la matriz y disolución-difusión del principio activo.

La figura 13 recoge los perfiles de disolución y la evolución de las concentraciones séricas de claritromicina en una formulación de liberación inmediata y en otra liberación controlada por erosión combinada con difusión y disolución. La claritromicina unidía es una excelente alternativa al tratamiento de las infecciones respiratorias con ventajas farmacocinéticas y farmacodinámicas (59).

Los sistemas terapéuticos gastrointestinales (GITS) están formulados como comprimidos constituidos por un sistema osmótico conocido como «push-pull» que controla la velocidad de salida del fármaco en el lumen gastrointestinal. La velocidad de liberación se ajusta, aproximadamente, a una cinética aparente de orden cero, durante un periodo de 12-16 horas, con objeto de conseguir concentraciones plasmáticas del medicamento relativamente constantes durante un intervalo de dosificación de 24 horas (60).

El comprimido consta de una capa superior «pull» que contiene el fármaco y excipientes osmóticos y una segunda capa «push» formada únicamente por excipientes osmóticos. Ambas capas se unen durante el proceso de compresión para formar un comprimido mononúcleo. Este núcleo está recubierto de una membrana rígida de naturaleza celulósica, permea-

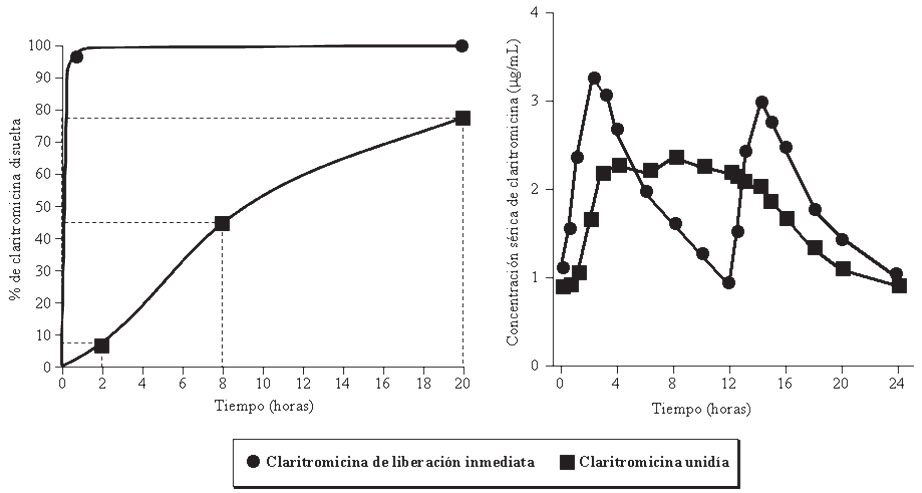


Figura 13. *Velocidad de disolución y perfil de concentraciones séricas de claritromicina (τ = 12 h) y claritromicina unidía τ = 24h).*

ble al agua e impermeable a los iones, al fármaco y a los excipientes osmóticos incluidos en la formulación, que presenta, sobre la capa que contiene el fármaco, un orificio de diámetro perfectamente definido (61).

Cuando el sistema se pone en contacto con un medio acuoso, el agua penetra a través de la membrana, debido a la existencia de un gradiente de presión osmótica a una velocidad constante por la naturaleza de la membrana. En la capa «push» se genera «in situ» una disolución o suspensión de fármaco micronizada, mientras que en la capa «pull» los excipientes osmóticos, de naturaleza polimérica, se empiezan a expandir. Como consecuencia de la expansión de la capa «pull» la suspensión del fármaco se expele a través del orificio perforado en la cubierta. El volumen del sistema permanece esencialmente constante durante este proceso, de forma que la velocidad de liberación del fármaco se hace igual a la velocidad a la cual el agua difunde a través de la membrana. Por este mecanismo los fármacos se liberan de forma continua cuando el comprimido GITS progresa a lo largo del tracto gastrointestinal (60).

En definitiva, estas formulaciones han sido diseñadas para proporcionar tasas de liberación de fármaco independientes de la erosión, desintegración, pH o motilidad del tracto gastrointestinal, ya que es debida fundamentalmente a un proceso osmótico a través de la membrana semipermeable. El

control de estos factores para la doxazosina, un antihipertensivo α-adrenérgico, ha sido demostrado mediante estudios de disolución *in vitro* y en estudios farmacocinéticos que se recogen en la figura 14 (60).

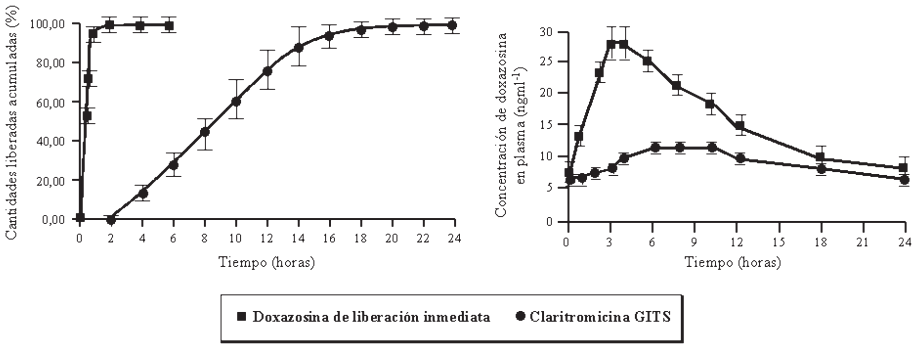


FIGURA 14. *Perfil de disolución y concentraciones plasmáticas de doxazosina con la formulación de liberación inmediata y con el GITS.*

Esta tecnología ha sido también aplicada en el desarrollo de Ditropan XL, Adalat XL, Concerta, Minipres XL, Volmax, etc.

Las primeras formulaciones orales de liberación controlada se desarrollaron en la terapéutica antihipertensiva, aunque recientemente su aplicación se ha ampliado a otros campos de la terapéutica como es el tratamiento de las enfermedades psiquiátricas, tal como se recoge en la tabla 2.

TABLA 2

Formulaciones orales con liberación controlada de psicofármacos (62)

	Ventajas
Antidepresivos	
Paroxetina	Reduce náuseas y mejora el perfil de tolerancia
Venlafaxina	τ = 24 h. Reduce náuseas y mejora el perfil de tolerancia
Fluoxetina	τ = 1 semana
Bupropion	τ = 12 h. Reduce convulsiones y mejora el perfil de tolerancia
Bupropion	τ = 24 h. En desarrollo clínico
Gepirona	τ = 12 h. En desarrollo clínico. Se asociaría con buspirona. Mejor tolerancia.
Selegilina	En desarrollo clínico. Mejor perfil farmacocinético. Menores interacciones.

TABLA 2 *(Cont.)*

Formulaciones orales con liberación controlada de psicofármacos (62)

	Ventajas
Estimulantes	
Metilfenidato	Liberación durante 12 h. No efecto de alimentos. Mayor duración de efecto. OROS®
Metilfenidato	Liberación durante 8 h. No efecto de alimentos. SODA®
Metilfenidato	Liberación durante 4 h. Interferencia con alimentos
S-Anfetamina	Liberación durante 9 h.
Antipsicóticos	
Litio	τ = 24 h. Elimina efectos adversos asociados a C_{max}
Divalproex	τ = 12 h. Mejor perfil de tolerancia
Alprazolan	τ = 12 h. Reduce «clock watching»
Indiplon	En desarrollo clínico como hipnótico

τ = intervalo posológico.

4.2. Formulaciones parenterales

La vía parenteral presenta, en relación a la vía oral, una serie de ventajas para la administración de medicamentos. Entre ellas destacan la rapidez de acción con la vía intravenosa, su elevada biodisponibilidad y la ausencia del efecto de «primer-paso». Además, con el uso de la vía intramuscular o subcutánea es posible controlar el proceso de liberación durante largos periodos de tiempo, que pueden alcanzar varios meses. Ello presenta indudables ventajas en el tratamiento de enfermedades crónicas especialmente en aquellos pacientes en los que existe alto riesgo de incumplimiento o en determinadas situaciones clínicas que requieren una permanencia muy prolongada de los medicamentos en determinados órganos o tejidos (63).

Las formulaciones parenterales de liberación modificada, conocidas como «depot» están constituidas por disoluciones en vehículos oleosos o suspensiones acuosas u oleosas destinadas a la administración subcutánea o intramuscular.

En las primeras, la velocidad de liberación del fármaco depende, fundamentalmente, del coeficiente de reparto aceite/agua y a medida que este

aumenta se reduce la velocidad de transferencia a los espacios tisulares. El coeficiente de reparto se puede incrementar recurriendo a la formación de profármacos, generalmente ésteres con ácidos grasos de cadena corta, como acetato o valerato o de cadena media, como decanoato. La asociación de diferentes ésteres de un nuevo fármaco hace posible modular la rapidez y duración de los efectos como ha ocurrido con formulaciones de testosterona de liberación controlada (64).

Igualmente, se han desarrollado suspensiones acuosas que contienen principios activos de baja solubilidad o cuya solubilidad ha sido reducida por formación de derivados como ácidos o bases orgánicas. La velocidad de liberación está controlada por la disolución de las partículas en los fluidos tisulares, por lo cual las características como tamaño, estado cristalino, etc., deben ser cuidadosamente controladas. Ejemplos bien conocidos son las suspensiones que combinan insulina-Zn-protamina e Insulina-Zn-cristalina y amorfa.

Para fármacos de elevada solubilidad es posible recurrir a suspensiones mediante la incorporación del fármaco en partículas esféricas de matrices poliméricas biocompatibles y biodegradables. Las características del polímero van a controlar la velocidad de liberación del fármaco por distintos mecanismos: difusión a través de canales y poros (cuando se trata de matrices poliméricas), difusión a través de membranas (cuando se utilizan reservorios) o degradación del polímero. Una nueva formulación «depot» de risperidona, formulada como una suspensión acuosa de partículas poliméricas en las que está disperso el fármaco, permite su administración cada dos semanas, disminuye los efectos adversos, incrementa el cumplimiento del tratamiento y reduce las hospitalizaciones en relación a las formulaciones convencionales (65).

Para administración i.v. también se han utilizado formulaciones de liposomas y micropartículas de antibióticos (ampicilina, amikacina y anfotericina B) y de agentes anticancerosos (doxorrubicina y daunorrubicina) consiguiéndose disminuir la toxicidad sistémica y algunas mejoras en la eficacia (66).

El desarrollo de polímeros implantables, que liberan agentes citotóxicos de forma controlada en el sistema nervioso central, abre nuevas posibilidades en el tratamiento de neoplasias malignas intracraneales que tienen, actualmente, un mal pronóstico. Estos sistemas de liberación ase-

guran elevadas concentraciones en la proximidad del tejido tumoral superando las limitaciones en eficacia y seguridad que ofrecen los agentes citotóxicos cuando se administran por vía oral o intravenosa.

Gliadel® es un dispositivo constituido por un copolímero biodegradable, el polifeprosan 20®, que consiste en poli [bis(p-carboxifenoxi)] propano: ácido sebácico en relación molar 20:8, que permite controlar la liberación local de carmustina. Este tipo de polímeros presentan algunas características interesantes, como la posibilidad de controlar fácilmente la degradación modificando la proporción del monómero. Ello significa que la liberación de carmustina puede controlarse desde algunos días a semanas o incluso meses. Además, el proceso de liberación se ajusta a una cinética próxima al orden cero, lo que asegura concentraciones constantes en la proximidad del lugar de acción. Mediante este sistema de administración las concentraciones de carmustina en el tejido tumoral alcanzan valores de 100 a 1000 veces más altos que cuando se recurre a la vía intravenosa. Aproximadamente, 62 mg de carmustina liberada desde Gliadel® alcanzan concentraciones cerebrales más altas que las que se consiguen con una dosis de 3000 mg de carmustina administrada por vía intravenosa y además, con menores efectos adversos. Gliadel® fue aprobado en septiembre de 1995 por la FDA para el tratamiento del glioblastoma multiforme recurrente y actualmente esta disponible en nuestro país (67). En el 2003, la FDA lo aprobó en glioma maligno de alto grado, diagnosticado de «novo».

Se han comercializado diferentes implantes poliméricos de inserción en el tejido subcutáneo para obtener niveles de fármaco sostenidos durante largo tiempo para goserelin, levonorgestrel, testosterona y estradiol.

4.3. Formulaciones transdérmicas

En 1981 se comercializaba en EE.UU. el primer parche transdérmico (*Transderm Scop*) y en el año 2000, entre los 7 fármacos entonces aprobados por la FDA para su uso por vía transdérmica, se movía un mercado mundial superior a los 200 millones de dólares. En el momento actual, no sólo se está estudiando administrar por esta vía nuevos fármacos, también se plantea para fármacos administrados por otras vías o para moléculas muy potentes que por problemas asociados con la forma de dosificación no han llegado a utilizarse en terapéutica (68).

La liberación del principio activo desde un sistema transdérmico es continua y a velocidad controlada, idealmente con cinética de orden cero. De este modo, la cantidad que llega al lugar de absorción será constante manteniéndose los niveles plasmáticos durante el tiempo de aplicación del sistema. Las principales ventajas que presenta esta vía de administración frente a la oral, es el acceso del fármaco a la circulación sistémica, sin atravesar el tracto gastrointestinal ni presentar efecto de «primer-paso», ser una vía no invasiva, de fácil administración, muy bien aceptada por los pacientes, y con posibilidad de interrumpir la administración si aparecen efectos adversos graves.

La absorción de los fármacos administrados por esta vía se efectúa por difusión pasiva, a través de las distintas capas de la piel, hasta alcanzar los capilares sanguíneos de la endodermis. La velocidad de absorción depende de su concentración en la superficie de la piel, lo cual condiciona el gradiente de concentraciones. Para mantener constante este gradiente, que daría lugar a una velocidad de absorción de orden cero, la velocidad de liberación del fármaco por el dispositivo debe ser inferior a la velocidad de absorción.

La principal limitación es que no todos los fármacos pueden administrarse por esta vía sino sólo aquéllos con unas determinadas características fisicoquímicas. Por las grandes diferencias en contenido acuoso y lipídico entre el estrato córneo y la epidermis-dermis, únicamente presentan una absorción adecuada los fármacos con un balance hidrofilia-lipofilia intermedio con coeficientes de reparto octanol/agua comprendidos entre 10 y 1000. Igualmente, es necesario que presenten solubilidad acuosa mayor de 1mg/ml, masa molecular menor de 500 Da y suficiente potencia para no necesitar una velocidad de administración mayor de 10 mg/día, dada la lenta difusión del fármaco desde la superficie de la piel a los vasos sanguíneos. Cuando se cumplen estos criterios esta ruta es útil para tratamiento crónico con moléculas de baja biodisponibilidad oral y corta semivida, que necesitarían recurrir a administraciones parenterales muy frecuentes. Algunos inconvenientes que puede presentar la administración transdérmica es una alta frecuencia de irritación y sensibilización, dificultad de adhesión en ciertos tipos de piel, así como la complejidad de su fabricación y alto coste (69).

Los sistemas terapéuticos transdérmicos se suelen clasificar en sistemas matriciales, con reservorios o mixtos. En el primer tipo, el fármaco está dis-

perso homogéneamente en una matriz polimérica y para su liberación debe difundir a través de ella hasta la superficie de la piel, siendo la velocidad de difusión en el polímero la que controle la velocidad de liberación. En los sistemas con reservorio existe un depósito de fármaco rodeado de una membrana polimérica que controla la velocidad de liberación.

A finales de 2002 se encontraban en diversas fases de desarrollo clínico diferentes sistemas transdérmicos, parches y geles de los siguientes medicamentos: alprostadilo, dexametasona, diclofenaco, dihidrotestosterona, estradiol, metilfenidato, homona paratiroidea, flubiprofeno, estradiol/progrestina, rotigotina, testosterona, etc. (70).

Existen algunas técnicas físicas que permiten aumentar la permeabilidad de la piel, entre ellas la más desarrollada es la iontoforesis, que consiste en utilizar una corriente eléctrica de baja intensidad para favorecer el paso de moléculas a través de la piel (71). Por ejemplo, Iomed Inc (www.iomed.com) ha desarrollado Phoresor® un sistema que utiliza la iontoforesis para la administración de lidocaína como anestésico local.

4.4. Formulaciones pulmonares, nasales y oculares

La vía inhalatoria presenta algunas características ideales para la consecución de efectos sistémicos como elevada superficie de absorción, unos 100 m^2 y pequeño espesor, de 100-200 nm. Sin embargo, la mucosa pulmonar constituye una barrera importante para el paso de aquellos fármacos que están destinados a alcanzar el epitelio, que se ve acentuada en presencia de procesos inflamatorios o infecciosos.

Diversos factores dependientes del fármaco como carga de las partículas, solubilidad y tamaño, así como las propiedades biofísicas del mucus afectan a la capacidad para atravesar esta barrera (72). Así, se ha demostrado la existencia de una relación inversa entre el peso molecular del fármaco y la difusión a través del mucus, que es especialmente manifiesta a partir de 30 kDa. La difusión a través del mucus se ve dificultada por la fijación a algunos componentes como la mucina, ADN, etc. y al efecto de diversas enzimas. Entre los factores que aumentan la capacidad de difusión figuran la superficie efectiva de tensoactivo y el incremento en el tiempo de retención de las partículas.

La vía inhalatoria ha ocupado, durante las últimas décadas, un lugar destacado en el tratamiento de las enfermedades respiratorias como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o los procesos infecciosos asociados a la fibrosis quística. Para ejercer un efecto localizado, el fármaco debe alcanzar de forma eficiente la superficie a través del flujo aéreo, penetrando o incluso atravesando la barrera mucosa para alcanzar su lugar de acción. La tecnología de aerosoles ha alcanzado en los últimos años tal desarrollo que permite el control de las variables que pueden reducir el rendimiento del proceso y aumentar la utilidad clínica.

Los agentes mucolíticos (dornasa-α) y las antiproteasas (inhibidores leucoproteasa, proteínasa-α_1, etc) son más efectivos cuando se dispersan en las secreciones del flujo aéreo en aquellas zonas en las que se produce una mayor obstrucción. Los antioxidantes y los factores de crecimiento precisan, sin embargo, alcanzar las células epiteliales mientras que la terapia de transferencia génica precisa no sólo alcanzar el epitelio pulmonar sino también alcanzar las glándulas submucosas o las células progenitoras de epitelio.

La administración de formas de liberación sostenida en el pulmón presenta el inconveniente adicional de la necesidad de retrasar la retirada de las partículas por los mecanismos normales de aclaramiento del pulmón. Incorporando fosfolípidos en la superficie de las partículas depositadas en los alveolos se pueden camuflar las partículas y reducir su captura por los macrófagos alveolares (73).

Actualmente se encuentran en desarrollo formulaciones que incorporan fármacos encapsulados en diferentes tipos de vectores. El ácido retinoico encapsulado en liposomas ha visto reducida su toxicidad pulmonar y sistémica en relación a los aerosoles convencionales. Además, se han conseguido concentraciones en el tumor más elevadas lo que ha aumentado su efectividad en el tratamiento de neoplasias (74). Conjuntamente se están estudiando por diversos grupos los sistemas de aerosolización que puedan aumentar su biodisponibilidad local (75). Actualmente, se está investigando la utilización de partículas porosas de mayor tamaño para liberación sostenida de fármacos por vía pulmonar en el tratamiento de la tuberculosis. Estas partículas, de naturaleza lipídica o polimérica, por su tamaño y baja densidad se pueden depositar en la región alveolar y acceder a la circulación sistémica (76).

Otro problema al que se enfrenta la administración de fármacos por vía pulmonar es que sólo una pequeña proporción del fármaco que sale del inhalador llega a la zona adecuada de los pulmones. Esto, además de ineficacia, da lugar a efectos secundarios por acción sistémica de fármacos administrados para tratamiento local en los pulmones. Por este motivo, es necesario que con las nuevas formulaciones se desarrollen nuevas generaciones de inhaladores que consigan una liberación del fármaco más eficaz y reproducible. Ya existen en el mercado los llamados inhaladores inteligentes que, aunque con mayor coste, consiguen una mayor precisión en la liberación del fármaco (77).

La administración nasal ha recibido en los últimos años considerable atención, especialmente para conseguir efecto sistémico de fármacos con dificultad para su administración por vías no parenterales. Esto es debido a algunas características diferenciales respecto al tracto gastrointestinal y otras mucosas, como la escasa actividad proteolítica, la reducida cobertura mucosa, el pH, que se mantiene próximo a la neutralidad y la ausencia de alimentos o productos de la digestión que pueden reducir la biodisponibilidad. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes como la rápida eliminación debida al aclaramiento muco-ciliar, la irritación nasal, la variabilidad en la biodisponibilidad y los fracasos asociados a una incorrecta administración.

Recientemente se ha producido un gran incremento en el mercado mundial de fármacos de acción sistémica comercializados como formulaciones nasales. Por ejemplo, fármacos para el tratamiento de la migraña, donde es necesario un rápido comienzo del efecto, (sumatriptan, zolmitriptan, dehidroergotamina y butorfanol), fármacos como estradiol que presenta mayor biodisponibilidad que administrado por vía oral o péptidos como desmopresina, y calcitonina evitando los problemas de baja permeabilidad y degradación en el tracto gastrointestinal. Están en desarrollo nuevas formulaciones de administración nasal para morfina, midazolan, fentanilo, AINEs, leuprolide, insulina, hormona paratiroidea e interferón, así como diferentes tipos de vacunas (78). Además, se ha demostrado que los fármacos pueden llegar al sistema nervioso central desde la cavidad nasal por trasporte directo a través de la región olfativa. Esto abre una interesante posibilidad de rápido acceso de fármacos al cerebro para tratamiento del dolor, Parkinson, Alzheimer..., pero será necesario desarrollar nuevas formulaciones que consigan aumentar la fracción de fármaco absorbida.

Para aumentar la absorción, sobre todo de fármacos polares, se utilizan promotores, viscosizantes y sistemas bioadhesivos que consiguen retrasar el aclaramiento mucociliar prolongando el contacto entre la formulación y los lugares de absorción. Con este fin se han utilizado en formulaciones de morfina con quitosan y ciclodextrinas, que presentan propiedades bioadhesivas y promotoras de la absorción intercelular (79).

Los sistemas habituales de administración ocular de fármacos incluyen aplicación local (inyecciones subconjuntivales, perioculares intravítreas e implantes) y el uso de vías sistémicas. Sin embargo, ambos métodos tienen importantes limitaciones para su aplicación en diferentes indicaciones clínicas. La administración de fármacos por vía oral y sistémica no permite alcanzar, en la mayoría de las ocasiones, concentraciones terapéuticas en los tejidos oculares y los incrementos de dosis tienen limitaciones de tipo toxicológico. Los sistemas de aplicación local permiten alcanzar concentraciones eficaces en el tejido ocular si la formulación está bien diseñada, pero por tratarse de métodos invasivos se corren riesgos debidos a posibles hemorragias, infecciones, desprendimiento de retina y otras lesiones localizadas. Recientemente, se ha desarrollado un sistema que utiliza la iontoforesis para la liberación ocular de fármacos (OcuPhor®) que ofrece un sistema reproducible y no invasivo para medicamentos amónicos como los antiinflamatorios no esteroides (80).

5. FORMULACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

«I´m very excited by the fact that the first protein delivery systems are coming on the market and that a lot of a protein delivery systems are moving into the clinic...»

ROBERT S. LANGER*

Los medicamentos obtenidos por Biotecnología constituyen una clase terapéutica emergente en la clínica que presenta unas características diferenciales no sólo por su origen, sino también por su estructura química y algunas propiedades farmacológicas.

* Robert S. Langer es profesor de ingeniería química y biomédica en el Instituto Tecnológico de Massachussets (Boston).

Aunque la Biotecnología moderna nace en 1953 al conocerse la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN), su incorporación a la terapéutica humana no se produce hasta comienzos de los años 80 con la utilización de la insulina y de la hormona de crecimiento recombinantes en terapia sustitutiva. Desde entonces se han incorporado al arsenal terapéutico unos 80 medicamentos, aunque cerca de 400 biomoléculas para el diagnóstico y tratamiento de unas 200 enfermedades se encuentran en diferentes fases de investigación clínica. (81).

Los medicamentos biotecnológicos incluyen proteínas obtenidas por ingeniería genética, anticuerpos monoclonales producidos mediante la tecnología del hibridoma, vectores para el transporte de material genético, fragmentos de anticuerpos, oligonucleótidos antisentido, vacunas, etc. (82).

La estructura química que presentan la mayoría de los productos biotecnológicos condiciona algunas propiedades que pueden limitar su utilización terapéutica y que se reflejan en su perfil farmacocinético. Entre ellas destacan la baja biodisponibilidad por vía oral, dificultades para su distribución tisular y celular y un aclaramiento plasmático elevado. Las proteínas recombinantes son degradables, por enzimas proteolíticas, pueden ser rápidamente excretadas a través del riñón, generan anticuerpos neutralizantes y presentan una semi-vida de eliminación corta (factor de necrosis tumoral: 3-10 minutos, estreptoquinasa: 4-10 minutos, factor activador del plasminógeno: 8-12 minutos, hormona del crecimiento: 15-30 minutos, etc.).

La investigación en biotecnología sanitaria se mantiene muy activa y actualmente está dirigida no solo a la búsqueda de nuevas moléculas con fines diagnósticos y terapéuticos, sino también al estudio de nuevas indicaciones y a la mejora del rendimiento terapéutico mediante cambios en la formulación farmacéutica.

5.1. Formulaciones orales

Los péptidos y proteínas presentan una baja biodisponibilidad por vía oral, generalmente inferior al 1%, por lo que en principio no son candidatos idóneos para utilizar esta vía de administración. Ello es debido a su inestabilidad en el medio fuertemente ácido del estómago, al efecto pro-

ducido por las peptidasas intestinales, y especialmente a su escasa permeabilidad como consecuencia del tamaño molecular, la carga eléctrica y la elevada polaridad. La mayoría de las proteínas recombinantes se incluyen dentro de la clase III del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, solamente algunas pertenecen a la clase IV y es excepcional que algunas biomoléculas se incluyan en la clase I. Es decir, los productos obtenidos por biotecnología suelen presentar una solubilidad en agua alta o moderada y una permeabilidad intrínseca baja o muy baja (83).

La capacidad de los fármacos para atravesar las barreras biológicas constituye un parámetro biofarmacéutico de gran interés del que depende no sólo la absorción, sino también la distribución, el metabolismo y la excreción. Aunque las diferentes membranas biológicas presentan unas características específicas, los principales constituyentes siempre son: fosfolípidos, colesterol, esfingolípidos y glicolípidos. Por tanto, para que un fármaco supere las diferentes membranas biológicas y alcance su lugar de acción debe presentar un balance adecuado entre hidrofilia y lipofilia, que se expresa habitualmente por el coeficiente de reparto octanol-agua (P) o más fácilmente por log P. Este parámetro es, como ya hemos anticipado, un buen predictor de la permeabilidad de muchos fármacos y puede ser correlacionado con diversos parámetros farmacocinéticos. Ello no es posible cuando se trata de péptidos y proteínas debido a que en su estructura están presentes numerosas funciones polares que forman puentes hidrógeno con los grupos hidroxilo de la fase acuosa. Los péptidos presentan, en consecuencia, coeficientes de reparto más altos, que no se corresponden con la permeabilidad. No obstante pueden obtenerse buenas correlaciones cuando se determina el número de puentes de hidrógeno potenciales que pueden establecerse con el agua. De esta forma es posible anticipar el efecto de las modificaciones estructurales en la absorción oral de péptidos de interés terapéutico, lo que es de gran utilidad en el desarrollo de nuevas moléculas. La desolvatación potencial que presentan diferentes péptidos ha podido ser relacionada con parámetros farmacocinéticos que describen el proceso de absorción como C_{max} y AUC.

Factores fisiológicos como el tiempo de tránsito gastrointestinal, la dilución y las interacciones con componentes de los alimentos reducen la fracción de dosis disponible para la absorción de péptidos y proteínas. Finalmente, el efecto del «primer-paso» y las «bombas de eflujo» también

son responsables de la escasa biodisponibilidad oral que presentan los productos obtenidos por biotecnología.

Pese a esta situación sabemos que algunos medicamentos con estructura peptídica como antibióticos β-lactámicos, inhibidores de la ECA o la ciclosporina presentan valores de biodisponibilidad que permiten su administración por vía oral y tienen acreditado su valor terapéutico. Asimismo, pequeños péptidos procedentes de la digestión de las proteínas de la dieta o incluso algunos antígenos naturales solubles se absorben intactos.

A diferencia de otros fármacos, algunas proteínas recombinantes presentan una actividad intrínseca muy elevada hasta el punto de poder admitir que una biodisponibilidad del 10% podría ser suficiente para alcanzar los objetivos terapéuticos cuando se administran por vía oral.

Se han desarrollado diferentes estrategias para incrementar la biodisponibilidad oral de péptidos y proteínas mediante el control de alguno de los factores anteriormente mencionados. Entre ellos destacan los cambios estructurales para modificar la polaridad o reducir el efecto de «primer-paso» sin que su actividad biológica se vea comprometida. Con el mismo objetivo se ha recurrido a la asociación con sustancias bioadhesivas que retrasan sensiblemente el tránsito intestinal e incrementan el tiempo de contacto con la superficie de la mucosa. Entre ellos destacan los biopolimeros glucídicos, como el quitosan y sus derivados, que incrementan la absorción de macromoléculas por bioadhesión y modulan la permeabilidad al actuar en los espacios intercelulares (84).

En estos últimos años se han realizado importantes progresos en la formulación farmacéutica de péptidos y proteínas que van a permitir disponer de importantes medicamentos que pueden ser administrados por vía oral. Actualmente, se encuentran en un avanzado estado de desarrollo numerosas formulaciones: las que utilizan la tecnología de micropartículas, aquéllas que dirigen el fármaco a zonas especificas del tracto intestinal para acceder a los sistemas de transporte y las destinadas a conseguir una liberalización colónica (85, 86).

Las micropartículas y nanopartículas están diseñadas para conseguir la captación y traslocación intestinal de proteínas de interés terapéutico como enzimas, hormonas, vacunas, etc. Las micropartículas se absorben

por distintos mecanismos: persorción, endocitosis, transporte paracelular y a través del tejido linfoide asociado al intestino (GALP). Las placas de Peyer son estructuras linfoepiteliales que constituyen un elemento esencial en el intestino para la adquisición de inmunidad. Actualmente, se considera que las células M de las placas de Peyer son la diana para las vacunas orales y micropartículas que contienen proteínas de alto interés terapéutico. El diámetro de las partículas es uno de los factores que condiciona el paso a través de la mucosa intestinal y la mayoría de estudios sugieren que debe ser inferior a 0,5 nm. Por debajo de este valor crítico se produce una selectividad en la captación por las placas de Peyer frente a los enterocitos. Otros factores que potencian la captación por el GALP son la estabilidad de las partículas en la luz intestinal, la ausencia de carga superficial, la hidrofobicidad superficial, conseguida frecuentemente por la absorción de diferentes polímeros y la presencia de ligandos especificos como las lectinas.

Por último, es interesante destacar los resultados obtenidos, en estudios experimentales, cuando se asocian a proteínas terapéuticas, las denominadas «moléculas transportadoras». Se trata de derivados N-acetilados de aminoácidos no aromáticos (p.e. 4-[4-[(2-hidroxibenzoil) amino] fenil] butírico), que incrementan sensiblemente la biodisponibilidad por vía oral de la insulina, la hormona de crecimiento, el interferón α-2b, etc. Aunque el mecanismo de acción no es bien conocido, al parecer son responsables de cambios conformacionales que facilitan la traslocación de proteínas a través de las membranas biológicas (85).

Diversas compañías (Emisphere Technologies, Amarillo Biosciencies, Endorex, Elan Pharmaceuticals, Enerex, etc.) han diseñado y desarrollado formulaciones orales de péptidos y proteínas (hormona de crecimiento, insulina, calcitonina, interferón-(, alergenos, etc.) incorporadas en micropartículas biodegradables. La compañía Acambis está desarrollando nuevas vacunas orales frente a la fiebre tifoidea y fiebre del viajero que se encontraban en fase III a finales del año 2002.

La compañía Novex (http://www.novexcorp.com) ha desarrollado una tecnología basada en la formación de conjugados con pequeños polímeros que ha permitido el desarrollo de una formulación de insulina oral, con absorción dosis-dependiente cuya eficacia ya ha sido demostrada en pacientes diabéticos en ensayos clínicos.

5.2. Formulaciones parenterales

Debido a las limitaciones de la vía oral, los péptidos y proteínas se administran habitualmente por vía parenteral, preferentemente endovenosa. La mayoría de estas moléculas presentan un rápido aclaramiento, lo que conduce a valores bajos en la semi-vida de eliminación

Los problemas que surgen con la administración parenteral de macromoléculas que presentan un rápido aclaramiento ha estimulado el desarrollo de diferentes actuaciones dirigidas, en principio, a modificar el perfil farmacocinético y en consecuencia, facilitar su administración. Ello se ha conseguido mediante conjugación con diversos polímeros, por hiperglicosilación de las proteínas y con el desarrollo de formulaciones parenterales de liberación controlada (87, 88).

La conjugación de péptidos y proteínas con diversos polímeros constituye actualmente un área de gran interés especialmente en la terapéutica oncológica a la que se han incorporado proteínas antitumorales, enzimas, citoquinas, etc. La conjugación con polímeros produce cambios significativos en el perfil farmacocinético de las macromoléculas, permitiendo superar algunas de las limitaciones que presentaban para su utilización clínica. El principal cambio es un incremento en la semi-vida de eliminación con un aumento de la captación celular por endocitosis. Una vez en sangre, se produce la liberación del conjugado a los compartimentos endosómicos y lisosómicos de la célula con descenso del pH (5,5-6,0). Una vez alcanzado el lisosoma se produce la degradación metabólica por acción de las hidrolasas intracelulares.

La pegilación de proteínas con una o varias cadenas de polietilenglicoles (PEG) es, posiblemente, el mecanismo de conjugación más desarrollado. Los PEG son polímeros lineales o ramificados constituidos por unidades de óxido de etileno (-CH2-O-CH2-) que presentan dos grupos hidroxilo terminales, los cuales pueden ser activados químicamente (89). La reacción de pegilación más frecuente implica al grupo ε-amino de la lisina o los grupos amino terminales de las proteínas, aunque actualmente se dispone de diversas alternativas englobadas dentro de la pegilación de segunda generación. Las biomoléculas conjugadas presentan propiedades físico-químicas diferentes de las proteínas originales como cambios conformacionales, impedimento estérico, capacidad de unión electrostáti-

ca, valores de pK locales de la lisina, hidrofobicidad punto isoeléctrico, etc. Estos cambios pueden quedar reflejados, en principio, por alteraciones en la actividad detectada mediante ensayos *«in vitro»* y en la eficacia, establecida utilizando ensayos *«in vivo»*. La fijación a receptores se reduce progresivamente al aumentar la masa molecular del polímero lo que produce un descenso de la actividad cuando se utilizan ensayos *»in vitro»* con tiempos de incubación cortos. Sin embargo, la eficacia de la proteína se incrementa como consecuencia de los siguientes mecanismos:

a) Retraso en el aclaramiento renal de la proteína que produce un incremento en la semi-vida de eliminación y en el valor del área bajo la curva de niveles séricos. Este último parámetro refleja el «periodo de exposición» y se relaciona, en ocasiones, con la eficacia en modelos pK-pD.

b) Mayor estabilidad frente a las enzimas responsables de la degradación de peptidos y proteínas frecuentemente como consecuencia del impedimento estérico.

c) Menores efectos adversos debido a que el PEG reduce significativamente la inmunogenicidad y antigenicidad de las proteínas.

La pegilación produce importantes cambios en el perfil pK-pD de los péptidos y proteínas utilizados en clínica. Actualmente se dispone de seis proteínas pegiladas aunque, al menos, más de doce se encuentran en diferentes fases de desarrollo clínico. La PEG-ADA (adenosin desaminasa) está aprobada para el tratamiento de la deficiencia de ADA en pacientes con inmunodeficiencia combinada grave. Se trata de un conjugado de ADA con múltiples cadenas de PEG de un peso molecular de 5kDa. La consecuencia más inmediata es un cambio en la semi-vida de eliminación de la enzima de unos pocos minutos a aproximadamente 24 horas.

La asparraginasa pegilada o pegaspargasa ha sido aprobada en el tratamiento de la leucemia linfoide crónica y se obtiene mediante unión covalente de la enzima con múltiples cadenas lineales de PEG con un peso molecular de 5kDa, lo que produce una molécula más estable cuya semivida de eliminación se incrementa en 14 veces en relación a la enzima no conjugada (90).

La pegilación de interferones también produce cambios significativos en el perfil farmacocinético-farmacodinámico que han supuesto un pro-

greso en el tratamiento de la hepatitis C y otras indicaciones (91). Actualmente, la asociación de interferones pegilados y rivabirina es el tratamiento de referencia aceptado por la comunidad científica internacional.

La pegilación de los factores de crecimiento hematopoyético ha conducido a un cambio en las pautas de dosificación que han podido ser adaptadas a la duración de los ciclos en la quimioterapia del cáncer.

Durante los pasados 20 años han sido estudiados numerosos conjugados de proteínas con PEG (citotóxicos, antioxidantes, enzimas, trombolíticos, citoquinas, etc.) aunque sólo algunos se encuentran en fase de desarrollo clínico. La conjugación con PEG ha sido aplicada también a oligonucleótidos y lípidos para aumentar su solubilidad, estabilizar las moléculas, incrementar la permeabilidad o disminuir el aclaramiento (92).

Estrategias futuras en el desarrollo de la pegilación estarán orientadas a la pegilación inestable «PEG-prodrugs», pegilación híbrida «PEG-TNFα», PEG-inmunoconjugados, hidrogeles, etc.

Los glicoconjugados son aquellos compuestos resultantes de la unión covalente de una fracción glucídica con otro compuesto que puede ser protídico o lipídico. La eritropoyetina recombinante es una glicoproteína utilizada desde hace más de 10 años en el tratamiento de la anemia renal. Su excreción renal es mínima, pero es ampliamente metabolizada en el hígado vía receptores de la galactosa. Los residuos de ácido sialico eliminados en el proceso de biotransformación aseguran la estabilidad de la hormona y su actividad biológica. El metabolito desprovisto de ácido siálico es rápidamente eliminado, siendo la semi-vida de eliminación de la eritropoyetina de 4-8 horas.

Diversos estudios experimentales han demostrado que hay una relación directa entre el contenido de ácido siálico y la semivida de eliminación de las glicoproteínas, lo que ha sido un estímulo para la búsqueda de nuevas moléculas.

La darbepoetina es un análogo hiperglicosilado de eritropoyetina que presenta distintas propiedades físico-químicas y biológicas. La figura 15 recoge la estructura de ambas moléculas estimulantes de la eritropoyesis, así como la evolución de los niveles séricos obtenidos tras su administración por vía intravenosa. La principal consecuencia del cambio producido en el perfil farmacocinético será la modificación del intervalo posológico que pasará de 3 a 4 días con la eritropoyetina a 7-14 días con la darbepoetina (93).

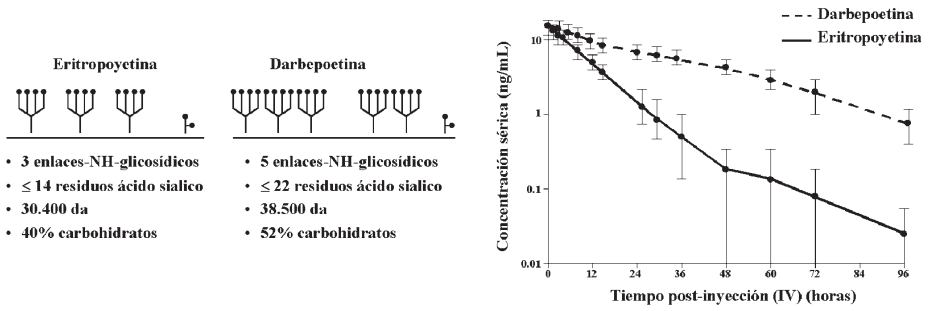


FIGURA 15. *Estructura y farmacocinética de eritropoyetina y darbepoetina.*

En los últimos años, se han desarrollado numerosas matrices poliméricas biodegradables y biocompatibles que se han incorporado a microcápsulas, microesferas, nanoesferas e implantes para conseguir una liberación prolongada de pequeñas moléculas. Actualmente, algunos de estos polímeros se utilizan en el diseño de formulaciones parenterales de medicamentos obtenidos por biotecnología (94). Entre ellos destacan los poli (α-hidroxiácidos) como el ac. poliláctico y el ac. polihidroxibutírico y co-polímeros, especialmente del ac .láctico-ac. glicólico. Estos productos no son inmunogénicos y permiten, por sus propiedades físico-químicas, controlar la velocidad de liberación de péptidos y proteínas. El diseño y fabricación de estas formulaciones difiere de los habitualmente utilizados con fármacos de bajo peso molecular que presentan, en general, una mayor estabilidad durante los procesos de separación de fases, evaporación de disolventes, emulsión, atomización, etc. Estos procesos exigen temperaturas elevadas, concentraciones altas de tensoactivos, mezcla de disolventes, etc. que provocan, en muchos casos, una degradación acelerada de proteínas. Para evitar la pérdida de actividad asociada a la degradación química debe recurrirse a la liofilización de las proteínas, homogeneización de la suspensión proteína-polímero, secado por atomización en nitrógeno liquido, eliminación del disolvente del polímero con etanol y filtración y secado bajo vacío (95). Estas técnicas han sido utilizadas en el desarrollo de microesferas de liberación controlada de proteínas recombinantes, como la hormona de crecimiento interferón-α, interleuquina-2, calcitonina, hormona liberadora de tirotropina, etc.

Los ensayos clínicos en fase I con una formulación de hormona del crecimiento demostraron que, en pacientes adultos con deficiencia hormonal, se mantienen los niveles séricos en valores superiores a los basales un promedio de 23 días. La figura 16 recoge la evolución de las concentraciones séricas de una dosis de Nutropin Depot, una formulación de liberación controlada utilizando tecnología proleasa y de la formulación convencional que debe administrase una vez al día.

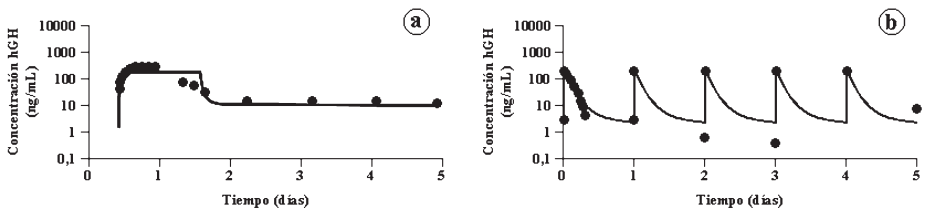


Figura 16. *Concentraciones séricas de hormona de crecimiento (hGH).*
a) *inyección subcutánea de 160 mg de Nutropin depot (24,00 mg de rhGH);*
b) *inyección subcutánea de rhGH 0,86 mg/día*

Los estudios clínicos en fase II y III han demostrado la eficacia de la formulación mediante variables intermedias como la IGF-1, que fueron confirmados posteriormente a su aprobación por la FDA.

La liberación de las proteínas microencapsuladas en el organismo es un proceso complejo e incluye habitualmente la hidratación de las partículas, disolución del fármaco con difusión a través de los poros de la matriz polimérica y biodegradación del polímero. La duración del proceso de liberación está condicionada por diversos factores como la composición del polímero, la presencia de modificadores de la liberación, etc.

La posibilidad de modular el proceso de liberación ha permitido el diseño de vacunas para administración en dosis únicas. Las micropartículas (1-200 μm) del copolimero láctico-glicólico están siendo utilizadas como portadores de antígenos para la inmunización frente a bacterias, virus y parásitos. Sin embargo, el progreso es lento debido a que no existe un consenso sobre la cinética óptima de liberación y por las dificultades para mantener la estabilidad física y química de los antígenos.

La mayor complejidad de estas formulaciones en relación con las de liberación inmediata obliga a adoptar precauciones especiales en la optimización de su producción industrial. Los principales puntos críticos son la integridad de la proteína y el valor de la C_{max} en ratas, utilizada como parámetro farmacocinético que refleja la eficacia del proceso de encapsulación.

5.3. Formulaciones pulmonares y nasales

La vía pulmonar constituye una alternativa a la vía oral para la administración de péptidos y proteínas destinados tanto a conseguir una acción local en el sistema respiratorio como para producir efectos sistémicos. El uso de biomoléculas se inició hace más de 70 años cuando se comprobó la absorción parcial de la insulina administrada en forma de aerosol (96).

Las moléculas pequeñas se absorben por difusión pasiva o transporte mediado por receptores. En el caso de macromoléculas, los péptidos pequeños, con un peso molecular inferior a 40 kDa pueden absorberse por transporte paracelular, mientras que para valores superiores participa la transcitosis, mediada, en algunos casos, por receptores de membrana. El proceso puede ser relativamente rápido, con valores de C_{max} de 10-30 minutos para pequeños péptidos solubles, hasta varias horas cuando se trata de grandes proteínas. La compañía Inhale Therapeutics Systems desarrolla actualmente la fase I de una formulación para administración pulmonar de Avonex, interferón β-1a, que evita las dolorosas inyecciones intramusculares en el tratamiento de la esclerosis múltiple. La insulina inhalatoria puede representar, en los próximos años, una alternativa en el tratamiento de la diabetes tipo I. Actualmente, se conoce su perfil farmacocinético incluyendo la variabilidad inter e intraindividual, su efectividad clínica y la preferencia por los pacientes en relación a la vía subcutánea. La figura 17 muestra la evolución de las concentraciones séricas de insulina obtenidas después de la administración de una dosis única utilizando distintas vías de administración (97).

La vía nasal puede ser también utilizada para la administración de péptidos y proteínas destinadas a ejercer efectos sistémicos. Para molé-

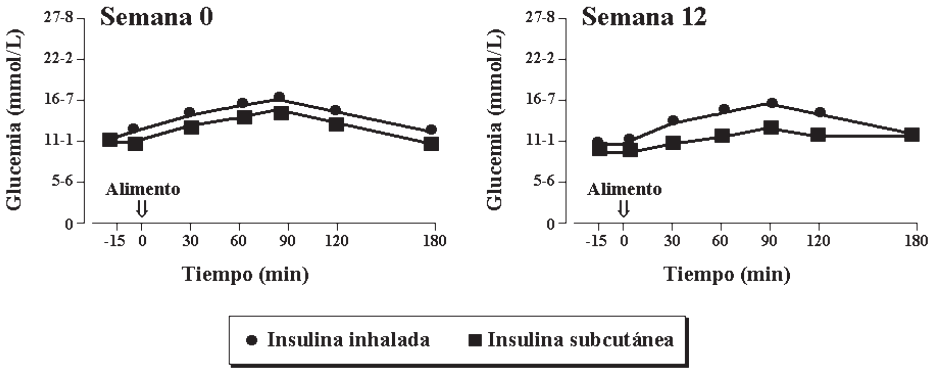


FIGURA 17. *Evolución de la respuesta a la insulina administrada por vías subcutánea e inhalatoria.*

culas pequeñas, constituidas por 10 aminoácidos, la biodisponibilidad es elevada alcanzando, en algunos casos, el 100%. Sin embargo, para moléculas mayores de 25 aminoácidos se produce un descenso muy acusado de la biodisponibilidad hasta el 1% o incluso valores inferiores.

Las posibilidades de la vía nasal para la administración de biomoléculas pueden verse aumentadas con la incorporación de agentes viscosizantes que aumentan su tiempo de contacto con la mucosa y moléculas bioadhesivas que incrementan la permeabilidad.

La vía nasal ha sido utilizada por sus ventajas para la administración de hormonas peptídicas (desmopresina, occitocina, calcitonina, etc.) aunque debe asegurarse el cumplimiento por los pacientes. En un avanzado estado de desarrollo se encuentran formulaciones para administración endonasal de glucagón, insulina, hormona de crecimiento, hormona liberadora de hormona de crecimiento, somatostatina, etc. La formulación de insulina ha tenido mayores dificultades debido a su tendencia a la agregación de hexámeros en disolución acuosa y a su naturaleza hidrofílica. Por ello, para su introducción en clínica ha precisado de la incorporación de promotores de absorción.

La vía nasal parece ofrecer buenas expectativas para la administración de vacunas. Los antígenos administrados por vía intranasal pueden absorberse a través de los nódulos linfáticos cervicales, pasar directamente a la circulación sistémica debido a la alta densidad en la vascula-

rización de la mucosa o ser captados por el tejido linfoide nasal (NALT) rico en células M con capacidad para el transporte vesicular transcelular de partículas y macromoléculas.

Se han aplicado diversos métodos para incrementar la respuesta de anticuerpos a antígenos liberados en la mucosa nasal: encapsulación de antígenos y coadministración con adyuvantes como la enterotoxina del cólera, la toxina termolabil de *E. coli*, etc. En Junio de 2003 la FDA aprobó para su comercialización FluMist® la primera vacuna con virus vivos de la gripe para administración intranasal, destinada a la prevención de los virus A y B (98).

Los ensayos clínicos han demostrado que la vacunación intranasal de la gripe es una buena alternativa a los sistemas de inmunización parenteral. Las ventajas de la vacuna recombinante intranasal no son sólo logísticas, sino también inmunológicas en niños y jóvenes sin inmunidad sustancial preexistente (99).

5.4. Vectorización de proteínas recombinantes

La incorporación de los fármacos a órganos y tejidos corporales es un proceso cinético complejo con una gran repercusión en la respuesta terapéutica. La velocidad de distribución puede estar limitada por la perfusión sanguínea o por la permeabilidad lo que condiciona el acceso y permanencia en su lugar de acción. La fracción de la dosis de un fármaco que alcanza finalmente los tejidos o incluso los espacios intracelulares depende de numerosos factores, muchos de ellos dependientes de sus propiedades físico-químicas. Por ello, las pequeñas moléculas con un óptimo coeficiente de reparto acceden con facilidad a los compartimentos periféricos y presentan valores elevados del volumen aparente de distribución, a diferencia de los péptidos y proteínas que presentan valores relativamente pequeños. El elevado peso molecular de algunas biomoléculas constituye un factor limitante de la distribución tisular. Sin embargo, en algunos casos es posible alcanzar el lugar de acción en concentración suficiente para producir una respuesta terapéutica adecuada.

La especificidad en la localización del lugar de acción de muchos fármacos obtenidos por biotecnología obliga a mayores exigencias en su per-

fil de distribución. El desarrollo de los factores de crecimiento y genes recombinates para promover la angiogénesis en el infarto de miocardio es un buen ejemplo de la importancia de esta característica farmacocinética (100). La administración endovenosa del factor de crecimiento de fibroblastos (FCF) no produce respuesta angiogénica en modelos experimentales de isquemia miocárdica. Por ello, ha sido necesario recurrir a la administración directa en el miocárdio, en el saco pericárdico o en el espacio perivascular para alcanzar la respuesta terapéutica deseada.

Una situación más problemática se plantea cuando se precisa el acceso intracelular de genes y oligonucleotidos antisentido cuya diana está localizada en el compartimento citosol/núcleo (101). En el momento actual la escasa capacidad de internalización y la inadecuada compartimentalización intracelular constituyen un problema básico en el progreso de la terapéutica antisentido. Recientemente, se han desarrollado diferentes métodos físicos (microinyección, bombardeo de partículas o «pístola génica», permeabilización, electroporización, etc.), que mejoran la captación celular de los oligonucleótidos en relación a los métodos convencionales de conjugación o aquellos que recurren a transportadores (liposomas, lipoplexes, policationes, etc.).

La selectividad en la distribución permite mejorar la relación beneficio-riesgo de numerosos medicamentos lo que puede incrementar su potencial terapéutico. Esta última consideración ha vuelto a poner de actualidad el concepto de «bala mágica» idealización introducida por Paul Erlich hace casi un siglo y que gracias a la biotecnología puede convertirse en una realidad (102).

Los sistemas de transporte coloidal como liposomas, nanopartículas, microsferas, etc. han sido utilizados para prolongar el tiempo de circulación de numerosas moléculas, protegerlas de la degradación y dirigirlas a tejidos diana. Estos sistemas tienen dificultades para acceder a los tejidos sanos, debido, entre otros factores a su tamaño especialmente si supera 20 nm, considerado el tamaño crítico para la mayoría de los tejidos.

Los liposomas son opsomizados por las proteínas plasmáticas en la circulación sistémica y reconocidos por el sistema retículoendotelial (SRE) acumulándose preferentemente en el hígado. Los liposomas son vehículos adecuados para el transporte de péptidos y proteínas inmunomoduladoras debido a su absorción linfática y a la captación y metabo-

lismo por los macrófagos. Ello ha impulsado el desarrollo de liposomas conteniendo interleuquina-2, factores de crecimiento eritropoyético e interferones. Además, los liposomas como algunas macromoléculas, pueden acumularse también en los tumores debido a la falta de del drenaje linfático normal y a la lenta velocidad de difusión.

Para evitar o reducir la captación por el SRE se ha optado preferentemente por incrementar la hidrofilidad superficial mediante sialoconjugados sintéticos y más recientemente con PEG. Estos liposomas de lento aclaramiento conocidos como «stealth» han sido utilizados para la vectorización activa y pasiva de medios diagnósticos y terapéuticos.

Las mayores dificultades se plantean para dirigir los liposomas a aquellos tejidos donde normalmente no se acumulan. Ello ha obligado al desarrollo de diferentes tipos de vectores como oligosacáridos, oligonucleótidos, péptidos, proteínas, vitaminas, anticuerpos monoclonales y receptores.

En principio sería posible dirigir los liposomas a todo tipo de células siempre que los vectores sean adecuados, aunque algunos problemas como el acceso a los tejidos y el rápido aclaramiento pueden disminuir las posibilidades terapéuticas.

El desarrollo de los anticuerpos monoclonales representa una de las técnicas más poderosas para dirigir fármacos, tóxicos, isótopos y enzimas a su lugar de acción. El Gemtuzumab es un anticuerpo recombinante humanizado dirigido frente al antígeno CD33 y unido a la calicheamicina, un potente antibiótico tumoral. Se trata del primer fármaco vectorizado introducido en quimioterapia y ha sido aprobado por la FDA a finales del año 2000 en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda en casos de recidivas. El gemtuzumab se une al antígeno CD33, expresado en el 80-90% de los pacientes con leucemia mieloide aguda, penetrando en la célula y liberando el agente citotóxico que provoca la muerte celular.

El potencial terapéutico de estos agentes se ha incrementado desde la introducción de la tecnología del hibridoma en los años 70 y actualmente se dispone de fármacos inhibidores de la reactividad aloinmune y autoinmune, antitumorales, antiplaquetarios antivirales etc. En España se han introducido recientemente el transtuzumab, el infliximab y el rituzimab, aunque otros muchos se encuentran en diferentes fases de desarro-

llo, alcanzando casi un 25% de todos los productos obtenidos por biotecnología (103).

A pesar de las ventajas potenciales que presentan al fijarse selectivamente a las células diana, su incorporación a la terapéutica presentó mayores dificultades de las inicialmente previstas. Entre ellas figuran la capacidad limitada de penetración tisular que depende, entre otros factores, de las dimensiones del anticuerpo. Los anticuerpos convencionales son proteínas de elevado peso molecular que presentan una baja capacidad de acceso a tejidos especialmente aquéllos que tienen escasa vascularización. En terapéutica oncológica con anticuerpos monoclonales, la relación de concentraciones entre el tumor y la circulación sistémica se incrementa lentamente durante varios días debido a la eliminación del anticuerpo y en menor grado a la captación tumoral (104).

La extravasación de los anticuerpos monoclonales se produce fundamentalmente por difusión o convección a través de los poros en el endotelio vascular y en menor medida por transcitosis. Los vasos sanguíneos de los tejidos tumorales presentan una mayor permeabilidad que las paredes vasculares de los tejidos normales. La inflamación está asociada con cambios regionales de la estructura, composición química y permeabilidad del endotelio vascular. Sin embargo, a la convección a través del endotelio vascular se opone la presión de los fluídos en el nódulo tumoral.

El incremento del transporte de macromoléculas en la inflamación es debido a la producción de poros (0,08-1,4 (m) en el endotelio de las vénulas postcapilares asociado a la contracción de las células epiteliales. Se admite que las macromoléculas con un peso molecular hasta 37.000 pasan por procesos relacionados con la difusión. Con un peso molecular superior a 50.000 quedaría limitada la permeabilidad en tejidos normales aunque, no necesariamente, en tejidos inflamatorios o tumorales (105).

La patofisiología de los tejidos tumorales difiere significativamente de la de los tejidos normales que los rodean. En el tejido tumoral persisten dos tipos de vasos: la vasculatura persistente junto con los vasos resultantes de la respuesta angiogénica inducida por las células tumorales. Hay importantes diferencias en la composición celular, la forma de la membrana basal y el tamaño de los espacios interendoteliales. Una vez que la molécula alcanza el espacio intersticial su transporte es regulado por las propiedades fisiológicas locales. El intersticio tumoral se caracteriza por su gran volumen intersticial,

una alta capacidad de difusión y ausencia de drenaje linfático. La elevada presión intersticial de los tejidos tumorales retrasa la extravasación de macromoléculas, mientras que la gran permeabilidad y la alta difusibilidad intersticial de las macromoléculas facilitan su migración a los tejidos tumorales. Adicionalmente, la ausencia de drenaje linfático facilita la acumulación de las macromoléculas en el tumor y en los tejidos que rodean el lecho vascular.

Diversos estudios han demostrado que la captación de los anticuerpos monoclonales por los tejidos tumorales es baja y representa el 0,0001 al 0,01% de la dosis administrada. No obstante, la relación concentración tumoral/concentración en tejidos normales es habitualmente >3:1 alcanzando valores de 30-40:1 en algunas localizaciones (105).

Se han realizado considerables esfuerzos para superar algunas de las limitaciones que presentan los anticuerpos monoclonales para su utilización clínica, entre ellas la reducción de su tamaño. Así se han desarrollado fragmentos de anticuerpos obtenidos por digestión química y tecnología recombinante como son los fragmentos $F(ab')_2$ Fab y Fv, los cuales presentan la ventaja de mejorar la penetración tumoral, aumentar el aclaramiento plasmático y reducir el poder inmunogénico.

La conjugación de anticuerpos monoclonales con liposomas, denominados inmunoliposomas, presenta algunas ventajas respecto al complejo anticuerpo monoclonal-fármaco. Los liposomas pueden contener una gran variedad de medios diagnósticos y terapéuticos tanto de carácter hidrofílico como lipofílico, contienen una alta cantidad de principio activo por unidad de peso, protegen el agente encapsulado y facilitan el acceso a células antigénicas (106, 107).

Pese a estas ventajas, demostradas en estudios *in vitro*, su disposición *in vivo* presenta importantes limitaciones, que han podido ser superadas asociando diversos ligandos. Actualmente se están realizando importantes progresos con el uso de fragmentos Fab´ incorporados a liposomas estabilizados con PEG.

6. EL FUTURO DE LA FORMULACIÓN FARMACÉUTICA

Actualmente se está produciendo un importante incremento en el desarrollo de formulaciones de liberación modificada, hecho impulsado, en

parte, por la expiración de más de 50 patentes en 2005 entre las que se incluyen importantes medicamentos susceptibles de mejorar su rendimiento terapéutico. Este incremento afecta también a principios activos protegidos por patente, especialmente dentro del grupo de fármacos biotecnológicos, según se deduce de los resultados recogidos en el reciente informe del *Centre for Medicines Research International* de 2003 (108).

Las formulaciones orales de liberación modificada continúan ocupando el primer lugar dentro de los programas de I+D de las compañías farmacéuticas, según informaba *The Pharmaceutical R&D Compendium* en 2000 (109). Las formulaciones destinadas a la administración por vía oral ocupan un lugar destacado seguidas de aquéllas que se administran por vía intravenosa, pulmonar y transdérmica. Dicho informe señala que en 2001 se destinó un 15% del presupuesto total en I+D al desarrollo de formulaciones de liberación modificada, las cuales representaban casi el 50% de todos los proyectos de I+D de la industria farmacéutica en EE.UU.

El futuro de la formulación farmacéutica no sólamente es previsible, sino que ya se ha convertido en un presente, calificado de apasionante, por el Prof. Teruo Okano del *Institute of Advanced Biomedical Engineering* de Tokio, al hacer referencia a las aportaciones de la nanociencia en la optimización del proceso de liberación de los medicamentos desde las nuevas formas de dosificación. Para los lectores interesados en este tema les remitimos a la página web del *Institue of Nanotechnology* (http://www.nano.org.uk).

La aplicación de la micro y nanotecnología a la biomedicina ofrece un enorme potencial para el desarrollo de nuevos medios diagnósticos y terapéuticos. En los últimos años, la tecnología de la microfabricación ha sido aplicada con éxito en algunas áreas sanitarias incluyendo agentes de diagnóstico (*lab-on-a-chip*), así como a sistemas, técnicas y aparatos para el *screening* de alto rendimiento en la búsqueda de candidatos a nuevos medicamentos (110).

Aunque la investigación en dispositivos microfabricados para aplicaciones biomédicas (BIOMEMS) se ha desarrollado significativamente, todavía son escasas las experiencias en las aplicaciones terapéuticas de la microtecnología (111).

La tecnología de la microfabricación ha sido aplicada para controlar el proceso de liberación en dispositivos programables que pueden ser implan-

tados en el organismo como son los microchips. La primera descripción de las aplicaciones potenciales de los microchips en este área de la terapéutica fue publicada en 1999 en *Nature* por Rober S. Langer (112). El prototipo consistía en una pequeña lamina de silicio de 17 mm x 17 mm x 310 μm (superficie de una moneda de 2 céntimos de euro) que contenía 34 reservorios de fármaco. Los reservorios de 25 nl estaban sellados con una fina lámina de oro para servir de ánodo en una reacción electroquímica de apertura, incorporándose posteriormente válvulas poliméricas. Los primeros estudios están siendo dirigidos al tratamiento del cáncer y la hepatitis B, habiéndose iniciado recientemente los primeros ensayos clínicos (113, 114).

Otras aplicaciones de la tecnología de la microfabricación son: las microagujas de silicio para aplicación transdérmica (115), las micropartículas bioadhesivas para sistemas de liberación por vía oral (116) y las biocápsulas para el alotransplante en ausencia de inmunosupresión, que ha sido recientemente aplicado al tratamiento de la diabetes (117).

Numerosas enfermedades están asociadas con deficiencias en las funciones metabólicas o secretoras desempeñadas por las células. La infusión o transplante de células constituye, desde la introducción de las transfusiones sanguíneas, una alternativa para la liberación de factores, hormonas o enzimas que no pueden ser producidas por células o tejidos. La microencapsulación de células es una estrategia basada en la inmovilización de células en matrices poliméricas recubiertas por membranas semipermeables. Estas matrices permiten proteger las células de la respuesta inmune del huésped y aumentar la producción de los factores que las células secretan. En principio, presenta ventajas sobre la encapsulación de proteínas por la posibilidad de regular el proceso de liberación en función de los requerimientos fisiológicos. Esta técnica exige trabajar con materiales altamente biocompatibles que no estimulen la respuesta inmune del huésped ni interfieran en la homeostasis celular. Por otra parte, resulta prioritario adaptar el sistema de inmovilización, en este caso las microcápsulas a las propiedades intrínsecas de la línea celular a inmovilizar. El alginato sódico es considerado el polímero ideal para generar tanto la matriz como la cubierta externa de las microcápsulas, mientras que se recurre a la poli-L-lisina como el polication destinado a recubrir la matriz de alginato. En los últimos años diferentes tipos de células (fibroblastos, islotes pancreáticos, mioblastos, etc.) han sido encap-

suladas dando lugar al desarrollo de páncreas e hígado bioartificiales, así como posibles alternativas al tratamiento de la enfermedad de Parkinson, cáncer, diabetes, etc. (118).

La terapia génica, cuyas posibilidades, excesivamente optimistas, se apuntaron desde finales de los años 80 al conocerse los resultados de los primeros estudios experimentales lleva asociada una importante complejidad técnica que incluye la obtención de sistemas eficaces de transferencia (119). Aunque, hasta el momento se han desarrollado numerosos vectores, principalmente virales, ninguno alcanza las exigencias requeridas para que la terapia génica llegue a un nivel de desarrollo que la permita ser considerada una alternativa a la terapéutica farmacológica. Los vectores no virales presentan algunas ventajas relacionadas con una mayor bioseguridad y facilidad de manipulación, así como no presentar limitación inicial de tamaño del ADN a transportar. Entre estos vectores destacan los policationes, como los dendrímeros de poliandoaminas, los conjugados moleculares (poliplexes), los liposomas catiónicos (lipoplexes y algunos derivados peptídicos (peptiplexes) (120)

Diferentes compañías han surgido, principalmente en EE.UU., Alemania y Francia, que se han especializado en el diseño y fabricación de nuevas formulaciones que utilizan una avanzada tecnología.

Tabla 3

Principales compañías especializadas en nuevas formulación de liberación modificada (121)

Compañía	*Tecnología*	*Descripción del producto*
NanoSpectra Biosciences (Houston, TX)	Nanopartículas	Nanopatículas en terapias oculares.
Sontra Medical Corporation (Franklin)	Tecnología ultrasonidos	Sono Prep(ultrasonidos vía transdérmica.
MacroMed Inc. (Sandy, UT) EE.UU.	Microesferas PLGA	Mejoras en la biodisponibilidad
Neurotech SA (Evry) Francia	Células encapsuladas	Microencapsulación de células humanas
CellMed (Alzenau, Alemania)	Células encapsuladas	Terapéutica ocular y tumoral
MicroCHIPS Inc. (Bedford, MA) EE.UU.	Microchips	Dispositivos microfabricados. Vía parenteral
Nektar Therapeutics (S. Carlos, CA) EE.UU.	Pegilación	PEG-proteínas, oligonucleótido
Insert Therapeutics (Pasadena, CA) EE.UU.	Ciclodextrinas	Complejos con ciclodextrina
ALZA (Mountain view, CA) EE.UU.	Nanotecnología	Doxil(nanopartículas-PEG
Advectus Life Sci (W Vancouver) EE.UU.	Nanotecnología	Citotóxicos para tumores cerebrales
Eurand (Nogent-Cedex). Francia	Glytech	Inhibición o bloqueo reversible de la P-glicoproteína

Las nuevas formulaciones farmacéuticas además de su interés sanitario, al permitir mejorar la efectividad clínica y/o la seguridad de uso de los medicamentos, tienen también un gran interés desde el punto de vista industrial por su elevado impacto económico.

El mercado de las formulaciones de liberación modificada en EE.UU. experimentará un crecimiento desde los 34.400 millones de dólares en el año 2001 hasta los 74.400 millones de dólares previstos en el año 2008 (122). La tabla 4 recoge la previsión de ventas de formulaciones de liberación controlada en EE.UU. para el periodo 2001-2008.

TABLA 4

Previsión de ventas de formaulaciones de liberación controlada en EE.UU. en millones de dólares

	2001	*2002*	*2003*	*2008*	*IMA (%)*
Formulaciones de liberación controlada (vías oral, inyectable y tópica)	17.710,2	19.482,8	21.475,6	34.102,6	9,7
Implantes y dispositivos intrauterinos	1.000	1.185	1.387,2	2.485,4	12,4
Fármacos de liberación transdérmica	2.010,3	2.311,9	2.648,1	4.485,4	11,1
Vectorización de fármacos	6.271,3	7.309,2	8.317,7	15.471,9	13,2
Fármacos de liberación transmucosa	7.358,8	8.409,9	9.714,8	17.713,6	12,8
Otros	107,8	119,5	131	211,1	10
Total	34.458,4	38.818,3	43.674,4	74.470	11,3

* Incremento Medio Anual.

Las posibilidades de la formulación farmacéutica en el futuro parecen ilimitadas y están asociadas al desarrollo tecnológico que tiene tan alto impacto en nuestra sociedad en el comienzo del nuevo milenio. Los momentos actuales son considerados críticos para la industria farmacéutica innovadora, al haber descendido, de forma alarmante, el número de nuevas entidades químicas que hagan aportaciones interesantes en los diferentes campos de la terapéutica. Por ello, la Tecnología Farmacéutica se encuentra en una situación inmejorable para aplicar su potencial en el desarrollo de nuevas formulaciones que permitan mejorar el perfil terapéutico de los medicamentos que siguen siendo considerados un elemento esencial de la asistencia sanitaria.

Cuando finalizábamos la redacción de esta capítulo se publicaba en el *Journal of the American Medical Association* (123) un artículo sobre la capacidad del ET-216, una proteína obtenida mediante ingeniería genética, para reducir la placa de ateroma en las arterias de pacientes que habían sufrido un síndrome coronario. ¿Será éste un nuevo desafío para la Tecnología Farmacéutica?

7. BIBLIOGRAFÍA

(1) Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. (2003) Toward the future: visionary policies for the next 25 years. (http://www.phrma.org).

(2) Gibaldi, M. (2002) Gibaldi´s Drug Therapy. A Critical Review of Therapeutics. McGraw-Hill. Health Professions Division. New York.

(3) Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. (2003) A Decade of Innovation. Advances in the pharmaceutical treatment. (http://www.phrma.org).

(4) Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. (2003) Dramatic Growth of Research and Development. (http://www.phrma.org).

(5) Banker, G.S. (1996) Drug products: their role in the treatment of disease, their quality and their status as drug delivery systems. En: Modern Pharmaceutics 3.ª ed. Drugs and the Pharmaceutical Sciences, vol. 72. Marcel Dekker. New York.

(6) Waterbeemd, H., Gifford, E. (2003) ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? Nat. Rev. Drug Discovery 2: 192-204.

(7) Tymchak, W. (2003) Clinical trial of FK506E (MR4). Discusion of Cardiol. University of Alabama.

(8) Orive, G., Hernández, M.R., Gascón, A., et al. (2003) Drug delivery in biotechnology: present and future. Curr. Opin. Biotechnol. (en preparación).

(9) Byrns, S., Pfeiffer, R., Ganey, M. (1995) Pharmaceutical solids: a strategic approach to regulatory considerations. Pharm. Res. 12: 945-953.

(10) Avdeef, A. (2001) Physicochemical profiling (Solubility, Permeability and Charge State). Curr. Topics Med. Chem. 1: 277-351.

(11) Hörter, D., Dressman, J.B. (1997) Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. Adv. Drug Deliv. Rev. 25: 3-14.

(12) Zhao, Y.H., Abraham, M.H., Lee, J. (2002) Rate limited steps on human oral absorption an QSAR studies. Pharm. Res. 17: 1446-1457.

(13) Kerns, E.H. (2001) High throughput physicochemical profiling for drugs discovery. J. Pharm. Sci. 90: 1838-1858.

(14) Washington, N., Washington, C., Wilson, C. (2001) Psysiological pharmaceutics. En: Barriers to drug absorption. 2.ª ed. Taylor and Francis, London.

(15) Kanfer, I. (2002) Report on the international workshop on the biopharmaceutics classification system (BCS): scientific and regulatory aspects in practice. J. Pharm. Pharm. Sci. 5: 1-4.

(16) Waiver of in vivo Bioavailability and Bioequivalence studies for inmediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System. FDA Center for Evaluation and Research (CDER), Agosto 2000.

(17) Martínez, M.N., Amidon, G.L. (2002) A Mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. J.Clin. Pharmacol. 42: 620-643.

(18) Seip, M. (2003) Biopharmaceutics classification system «State of the art in development and practice». Master for regulatory and practice.

(19) Löbenberg, R., Amidon, G.L. (2000) Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption. Pharm. Res. 17: 439-450.

(20) García Sánchez, M.J. (2003) Predicción de la absorción de medicamentos por vía oral: aplicación de modelos «in silico». Real Academia de Medicina de Valladolid.

(21) En: http://www.nature.com/review/drugdisc. Último acceso Marzo, 2003.

(22) Lippman, M. (1995) On set of analgesic agent revisited. Clin. Pharmacol. Ther. 57: 366.

(23) Leonard, G.D., Polgar, O., Bates, S.E. (2002) ABC transports inhibitors: new targets, new agents. Curr. Opin. Invest. Drugs 3: 1652-1659.

(24) Varma, M.V., Ashokray, Y., Dey, C.S. (2003) P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. Pharmacol. Res. 48: 347-359.

(25) Desarrollo farmacéutico de las formulaciones con Ibuprofeno-Arginina. Laboratorio Zambón. Barcelona.

(26) Tong, W.Q., Whitesell, G. (1998) In situ salt screening; a useful technique for discovery support and preformulation studies. Pharm. Dev. Technol. 3: 215-223.

(27) Byrn, S., Pfeiffer, R., Ganey, M., et al. (1995) Pharmaceutical solids: a strategic approach to regulatory considerations. Pharm. Res. 12: 945-955.

(28) Davies, G. (2001) Changing the SALT, changing the drug. Pharm. J. 266: 322-323.

(29) Davies, G. (2001) Different salt, different product-implications for drug approval and public health in Europe. ESRA Reporteur 8: 28-32.

(30) Salt selection. (Último acceso: http//www.ssci-inc.com).

(31) Stahl, P.H., Wermuth, C.G. (2003) Handbook of pharmaceutical salts. IUPAC. Wiley-VHC, New York.

(32) Wells, J. (1996) Pharmaceutical preformulation: the psysicochemical properties of drug substances. In Scientific principles of dosage form design. Marcel Dekker. New York.

(33) Vippagunta, S.R., Brittain, H.G., Grant, D.J.W. (2001) Cristalline solids. Adv. Drug Deliv. Rev. 48: 3-26.

(34) Bauer, J., Spanton, S., Henry, R. (2001) Ritonavir: an extraordinary example of conformational polymorfism. Pharm. Res. 18: 859-866.

(35) Zhan, G.Z., Gu, C.H., Zell, M. (2002) Crystallization and transitions of sulfamerazine polymorphs. J. Pharm. Sci. 91: 1089-1100.

(36) Gu, C.H., Young, V., Grant, D.J. (2001) Polymorfism Screening: influence of solvents on the rate of solvent-mediated polymorfic transformation. J. Pham. Sci. 90: 1878-1890.

(37) Caldwell, J. (1992) The importance of stereochemistry in drug action and disposition. J. Clin. Pharmacol. 32: 925-929.

(38) Brocks, D., Jamali, F. (1995) Stereochemical aspects of pharmacotherapy. Pharmacotherapy 15: 551-564.

(39) Stoschitzky, K., Koshucharova, G., Lercher, P., et al. (2001) Stereoselective effects of (R) —and (S)— carvedilol in humans. Chirality 13: 342-346.

(40) Aboul-Enein, H.Y., Abou Basha, L.I. (1997) Chirality and drug hazards. En: The Impact of Dtereochemistry on Drug Development and Use. Chapter 1. Aboul-Enein, H.Y., Wainer, I.W. (eds). John Wiley and Sons, Inc. New York. Pág. 1-17.

(41) Gentar, R.M., Rinoli, G., Fioccar, R. (2003) Effects of 6-12 months of esomeprazol treatment on the gastric mucosa. Am. J. Gastroenterology 98: 1257-1265.

(42) Gal, J. (1993) Indirect methods for the chromatographic resolution of drug enantiomers: Synthesis and separation of diastereomeric derivatives. En: Drug Stereochemistry: Analytical Methods and Pharmacology, 2nd edition. Wainer, I.W. (ed). Marcel Dekker, New York. Pág. 65-106.

(43) Abernethy, D.R., Andrawis, N.S. En: Stereochemistric Drugs in Therapeutics Clinical Perspectives, 2nd edition. Living, W., Wainer, I.W. (eds). Marcel Dekker, New York. Pág. 386-394.

(44) Kroemer, H., Fromm, M., Eichelbaum, M. (1996) Stereoselectivity in drug metabolism and action: effects of enzyme inhibition and induction. Ther Drug Monit. 18: 388-392.

(45) Brocks, D.R., Jamali, F. (1995) Stereochemical aspects of pharmacotherapy. Pharmacotherapy 15: 551-564.

(46) Powell, J.R., Ambre, J.J., Ruo, T.I. (1988) The efficacy and toxicity of drug stereoisomers. En: Drug Stereochemistry. Analytical Methods and Pharmacology. Wainer, I.W., Drayer, D.E. (eds). Marcel Dekker, New York. Pág. 245-268.

(47) Panchaluga, R., Sumil Thomas, N. (2000) Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. Int. J. Pharm. 200: 131-150.

(48) Uekama, K. (1999) Cyclodextrins in drug delivery system. Adv. Drug Deliv. Rev. 36: 1-2.

(49) Szente, L., Szejtli, J. (1999) Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in develipments. Adv. Drug Deliv. Rev. 36: 17-28.

(50) Stella, V.J., Rao, V.M., Zannou, E.A., et al. (1999) Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. Adv. Drug Deliv. Rev. 36: 3.-16.

(51) Stella, V.J., Rao, M.V., Jannon, E.A. (1999) Mechanisms of drug release from ciclodextrin complex. Adv. Drug Deliv. Rev. 36: 3-16. MAL

(52) Testa, B., Caldwell, L. (1996) Prodrug revisited: the «ad hoc» approach as a complement to ligand desing. Med. Res. Rev. 16: 233-241.

(53) Urquhart, J. (2000) Controlled drug delivery: therapeutic and pharmacological aspects. J. Int. Med. 248: 357-376.

(54) Benson, H., Prankerd, R. (1997) Optimisation of drug delivery. 3. Sustained/controlled-release oral drug delivery. Australian J. Hosp. Pharmacy 27: 381-389.

(55) Meibohm, B., Derendorf, H. (2002) Pharmacokinetic/pharmacodynamic studies in drug product development. J. Pharm. Sci. 91: 18-31.

(56) National Prescribing Centre. (2000) McRec Bulletin. Modified-release preparations. 11: 13-15.

(57) Hughes, D.A., Bagust, A., Haycox, A., et al. (2001) Accounting for noncompliance in pharmacoeconomic evaluations. Pharmacoeconomics 19: 1185-1197.

(58) Hughes, D.A., Gagcust, A., Hagcox, A. (2001) Accounting for noncompliance in pharmacoeconomics evaluations. Pharmacoeconomics 19: 1185-1197. MAL

(59) Adam, D., Glaser-Caldow, E., Wachter, J., et al. (2001) Compartive efficacy of clarithromycin modified-release and clarithomycin immediate-release formulations in the treatment of lower respiratory tract infection. Clin. Ther. 23: 585-595.

(60) Chung, M., Vashi, V., Puente, J., et al. (1999) Clinical pharmacokinetics of doxazosin in a controlled-release gastrointestinal therapeutic system (GITS) formulation. Br. J. Clin. Pharmacol. 48:678-687.

(61) Shionoiri, H., Yasuda, G., Yoshimura, H., et al. (1987) Antihipertensive effects and pharmacokinetics of single and consecutive administration of doxazosine in patients with mild to moderate essential hypertension. J. Cardiovasc. Pharmacol. 10: 90-95.

(62) Stalth, S.M. (2003) At long last, long lasting psychiatric medications: an overview of controlled-release technologies. J. Clin. Psychiat. 64: 355-356.

(63) Reddy, K.R. (2000) Controlled-release, pegylation, liposomal formulations: new mechanisms in the delivery of injectable drugs. Ann. Pharmacother. 34: 915-923.

(64) Benson, H., Prankerd, R. (1998) Optimisation of drug delivery. 6. Modified-release parenterals. Australian J. Hosp. Pharm. 28: 99-104.

(65) Love, R. (2002) Strategies for increasing treatment compliance: the role of long-acting antipsychotics. Am. J. Health Sist. Pharm. 59 (Supl 8): S10-S15.

(66) Murillo, M., Espuelas, S., Prior, S., et al. (2001) Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénicas. Rev. Med. Univ. Navarra 45: 19-34.

(67) Olivi, A., Grossman, S.A., Tatter, S. (2003) Dose escalating of carmustine in surgically implanted polymers in patients with recurrent malignant glioma: a new approach to brain tumor therapy CNS consortium trial. J. Clin. Oncol. 21: 1845-1849.

(68) Naik, A., Kalia, Y.N., Guy, R.H. (2000) Transdermal drug delivery: overcoming the skin´s barrier function. Pharm. Sci. Technol. Today 3: 318-326.

(69) Asbill, C.S., El-Kattan, A.F., Michniak, B. (2000) Enhancement of transermal drug delivery products. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 17: 621-658.

(70) Gordon, R.D. (2003) 4 Myths about transdermal drug delivery transdermal drug delivery. Drug Delivery Technol. 8: 28-35.

(71) Allen, L.V. (2002) Basic of compounding: Iontophoresis. Int. J. Pharm. Compoud 6: 194-197.

(72) Suárez, S., Hickey, J.A. (2000) Drug properties affecting aerosol behavior. Respir. Care 45: 652-666.

(73) Carveth, H.J., Kanner, R.E. (1999) Optimizing deposition of aerosolised drugs in the lung: a review. Medscape Gen. Med. 1: 1-10.

(74) Brooks, A.D., Tong, W., Benedetti, F., et al. (1999) Inhaled aerosolization of all-trans-retinoic acid for targeted pulmonary delivery. Cancer Chemother. Pharmacol. 44: 277-283.

(75) Parthasarathy, R., Gilbert, B., Mehta, K. (1999) Aerosol delivery of liposomal all-transv-retinoic acid to the lungs. Cancer Chemother. Pharmacol. 44: 187-192.

(76) Ardí, J.G., Chadwick, T.S. (2000) Sustained release drug delivery to the lungs. An option for the future. Clin. Pharmacokinet. 39: 1-4.

(77) Lawrence, R.N. (2001) Intelligent inhalers for systemic administration? Drug Discov. Today 6: 445-446.

(78) Illum, L. (2003) Nasal drug delivery possibilities, problems and solutions. J. Contr. Releas. 87: 187-198.

(79) Illum L. (2002) Nasal drug delivery: new developments and strategies. Drug Discov. Today 7: 1184-1189.

(80) Fischer, G.A., Parkinson, T.M., Sziel, M. (1998) The future of ocular drug delivery. Drug Technology 62: 1-10.

(81) Convergence: Ernst & Young Biotechnology Industry, Millennium Edition, 2000.

(82) Steinberg, F.M., Raso, J. (1998) Biotech Pharmaceuticals and Biotherapy: An overview. J. Pharm. Pharm. Sci. 1998; 1: 48-59.

(83) Norris, D.A., Puri, N., Sinko, P.J. (1998) The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates. Adv. Drug Deliv. Rev. 34: 135-154.

(84) Brayden, D.J., O'Mahony DJ. (1998) Novel oral drug delivery gateways for biotechnology products: polypeptides and vaccines. Pharm. Sci. Technol. Today 1: 291-299.

(85) Stoll, B.R., Leipold, H.R. (2000) A mechanistic análisis of carrier-mediated oral delivery of proteins therapeutics. J Control Release 64: 217-30.

(86) Burke, P.A., Putney, S.D. (1998) Improving protein therapeutics with sustained-release formulations. Nat. Biotchnol. 16: 153-157.

(87) Bartus, R.T., Tracy, M.A., Emerich, D.F. (1998) Sustained delivery of proteins for novel therapeutic products. Science 281: 1161-1162.

(88) Langer, R. (1998) Drug delivery and targeting. Nature 392: 5-10.

(89) Milton, H. (ed). (1997) Poly (ethylenglycol) Chemistry and Biological Applications. American Chemical Society. Washington DC.

(90) Holle, L. (1997) Pegaspargase: an alternative? Ann. Pharmacother. 31: 616-623.

(91) Charles, S., Harris, J., Milton, C. Improving hepatitis C. (2000) Ther Modern Drug Discov. 5: 59-67.

(92) Mehvar, R. (2000) Modulation of the pharmacokintics and pharmacodynamics of protein by polyethilene glycol conjugation. J. Pharm. Pharm. Sci. 3: 125-136.

(93) Macdongall, I.C. (2000) Novel erythropoiesis stimulating factor. Semin. Nephrol. 20: 375-381.

(94) Reddy Rajender, K. (2000) Controlled-release, Pegylation, Liposomial formulations: new mechanisms in the delivery of inyectable drugs. Ann. Pharmacother. 34: 915-923.

(95) Kumar, M.N. (2000) Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. J. Pharm. Pharm. Sci. 3: 234-258.

(96) Bruce, K.R. (2000) Experimental macromolecular aerosol therapy. Respiratory Care 45: 684-694.

(97) Skyler, J.S., Cefalu, W.T., Kourides, I.A. (2001) Efficacy of inhaled human insulin in type 1 diabetes mellitus: a randomised proof-of-concept study. Lancet 357: 331-335.

(98) http://www.flumist.com (consultado 14-11-2003).

(99) Cohen, G.M., Nettelman, M.D. (2000) Economic impact of influenza vaccination in preschool children. Pediatrics 106: 973-976.

(100) Kornowski, R., Fuchs, S., Martín, L. (2000) Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis. Circulation 101: 454-458.

(101) Prankerd, R.J., Benson, G., Haerther, A.E. (1999) Optimisation of Drug Delivery 12. Delivery of gene therapy. Australian J. Hosp. Pharm. 29: 149-154.

(102) Francis, G.E. (ed). (2000) Drug Targeting Strategies, Principles and applications. Humana Press Totowa. New Jersey.

(103) Alpaugh, K., Von Mehern, M. (1999) Monoclonal antibodies in cancer treatment. A Review of Recent Progress. Biodrugs 12: 209-236.

(104) Reilly, R.M., Sandhu, J. (1995) Problems of delivery of monoclonal antibodies. Pharmaceutical and pharmacokinetics solutions. Clin. Pharmacokin. 28: 126-142.

(105) Takakura, Y., Mahato, R., Hashida, M. (1998) Extravasation of macromolecules. Adv. Drug Deliver. Rev. 34: 93-108.

(106) Forssen, E., Willis, M. (1998) Ligand-targeted liposomes. Adv. Drug Deliv. Rev. 29: 249-271.

(107) Oku, N., Tokudome, Y., Asai, T. (2000) Evaluation of Drug Targeting strategies and liposomal trafficking. Current Pharmaceutical Desing 6: 1669-1691.

(108) Kermani, F., Findlay, G. (2003) Making drug delivery alliances successful. Drug Delivery Technology.

(109) Findlay, G., Dermani, F. (ed). The Pharmaceutical R&D Compendium 2000: CMR International/Scrip´s Complete Guide to trends in R&D. http://www.cmr.org/ r&dcompendium.html.

(110) Drews, J. (2000) Drug discovery: a historical perspective. Science 287: 1960-1964.

(111) Tao, S.L., Desai, T.A. (2003) Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores. Adv. Drug Deliver. Rev. 55: 315-328.

(112). Santini, J.T., Cima, M.J., Langer, R. (1999) A controlled-release microchip. Nature 397: 335-338.

(113) Santini, J.T., Richards, A.C., Scheidt, R., et al. (2000) Microchips as controlled drug-delivery devices. Angew Chem. Int. Ed. Engl. 39: 2396-2407.

(114) Zhan, J.D., Peshmukh, A.A., Pisano, A.P., et al. (2001) Continuos on-chip micropumping through a microneedle. En: Int. 14th Conf. MEMS. Pág. 503-506.

(115) Saffran, M., Kumar, G.S., Neckers, D.C., et al. (1990) Biodegraadable azopolymer coating for oral delivery of peptide drugs. Biochem. Soc. Trans. 18: 752-754.

(116) Henry, S., McAllister, D.V., Allen, M.G., et al. (1998) Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery. J. Pharm. Sci. 87: 922-925.

(117) Desai, T.A., Chu, W.H., Tu, J.K., et al. (1998) Microfabricated immunoisolating biocapsules. Biotechnol. Bioeng. 57: 118-120.

(118) Orive, G., Hernández, M.R., Gascón, A., et al. (2003) Cell encapsulation: promises and progress. Nat. Med. 9: 104-107.

(119) Anderson, W.F. (1998) Human gene. Therapy 392: 25-31.

(120) Luo, D., Saltzman, M. (2000) Synthetic DNA delivery systems. Nat. Biotech. 18: 33-39.

(121) Business Communications Company: Industry research and technical marketanalysis. (http://www.bccresearch.com).

(122) Baichwal, A., Neville, D.A. (2003) Adding value to products´Life-Cycle management: product end through drug delivery systems. Drug Deliver. Technol. FALTAN VOL Y PGS. (LO HE BUSCADO EN PUB MED Y NO APARECE)

(123) Nissen, S.E., Tsunoda, T., Tuzcu, E.M. (2003) Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes. J. Am. Med. Assoc. 290: 2292-2300.

Nuevos fármacos basados en productos naturales de origen microbiano

FERNANDO PELÁEZ y OLGA GENILLOUD
Centro de Investigación Básica Merck, Sharp & Dohme de España, S.A.
Josefa Valcárcel, 38 • 23027 Madrid

INTRODUCCIÓN

Los metabolitos microbianos han tenido un extraordinario impacto en la calidad de vida de la humanidad durante el pasado siglo. Antibióticos, antifúngicos, inmunosupresores y agentes hipolipemiantes derivados de compuestos de origen microbiano han sido usados en la clínica durante los últimos 50 años, contribuyendo significativamente al bienestar de la humanidad y al espectacular aumento de la esperanza de vida observado durante la segunda mitad del siglo XX. La enorme diversidad de estructuras químicas observada entre los metabolitos de origen microbiano derivan de un número relativamente pequeño de rutas biosintéticas básicas (principalmente poliquétidos, péptidos no ribosomales y terpenoides, y sus posibles combinaciones), que se han diversificado enormemente durante el curso de la evolución. A la vista de esta notable diversidad estructural, no es en absoluto sorprendente que podamos encontrar metabolitos microbianos con actividad biológica en una amplia diversidad de áreas terapéuticas.

Este capítulo presenta una revisión de los productos naturales de origen microbiano más relevantes por su potencial terapéutico descritos durante la última década. Por obvias razones de espacio, es imposible describir todos los compuestos descubiertos o las actividades biológicas descritas, incluso para este limitado periodo de tiempo. La selección se ha realizado según criterios de impacto médico o científico y el estado de desarrollo. Se hace especial hincapié en aquellos compuestos que han

progresado recientemente más allá del mero descubrimiento a subsiguientes etapas de desarrollo (actividad *in vivo* en modelos animales, química médica o desarrollo clínico). Los compuestos y sus actividades biológicas se han ordenado por áreas terapéuticas.

ANTIBACTERIANOS

Los productos naturales han sido tradicionalmente el objeto de intensivos programas de búsqueda de nuevos antibióticos. La mayoría de los antibióticos introducidos en la clínica para el tratamiento de las infecciones bacterianas en los últimos 50 años han sido productos naturales producidos por bacterias del grupo de los actinomicetos. La evolución de la terapia antibacteriana a lo largo de estos años ha sido intensa, al tener que responder cada vez más rápidamente al creciente problema de la aparición de resistencias frente a los nuevos compuestos en los patógenos más importantes. Otros criterios como el aumento del espectro, la eficacia, el margen de seguridad y la estabilidad de los nuevos fármacos han impulsado también el desarrollo de una amplia colección de compuestos semi-sintéticos a partir de moléculas de origen microbiano. Dentro de los antibióticos de origen natural destacan dos grandes grupos de compuestos definidos por su mecanismo de acción, los inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana y los que actúan a nivel de la síntesis de proteínas.

Pared celular

La síntesis de los componentes de la pared celular es una diana clave en las bacterias. El peptidoglicano en concreto es un componente esencial de la pared bacteriana, que determina su rigidez y resistencia frente a las diferencias de presión osmótica, y es un polisacárido donde se alternan, unidos mediante enlaces β-1,4, monómeros de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico. A este último se une una cadena lateral pentapeptídica entre cuyos residuos se establecen enlaces amida que confieren rigidez a la estructura. Su síntesis es un proceso complejo con múltiples etapas que se llevan a cabo a ambos lados de la membrana citoplasmática. El número de inhibidores específicos para cada

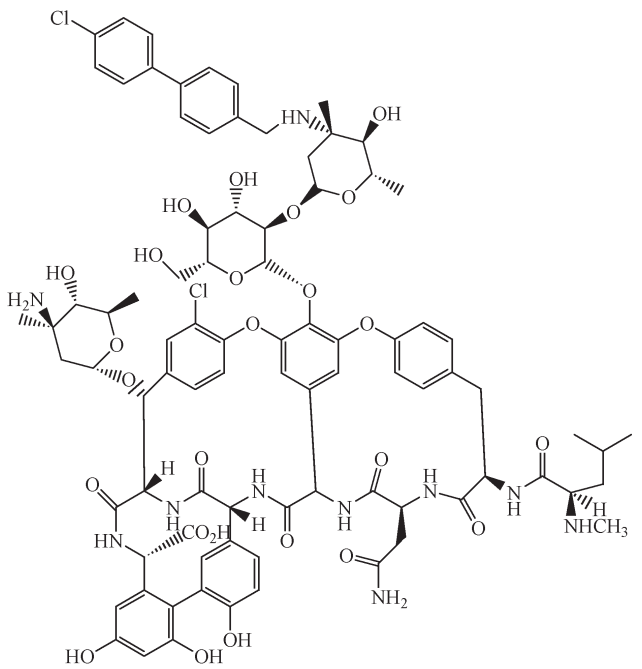
una de las etapas de su síntesis, descritos a lo largo de las últimas décadas, es interminable, por lo que nos ocuparemos aquí sólo de aquellos compuestos desarrollados más recientemente que han llegado a tener aplicación clínica.

Los inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana tienen sus mejores representantes en dos grandes grupos de compuestos, los β-lactámicos y los glicopéptidos de la clase de la vancomicina. Los antibióticos β-lactámicos están representados por las penicilinas, las múltiples generaciones de cefalosporinas, los carbapenems como la tienamicina (imipenem) y las monobactamas (nocardicinas y aztreonam), y son inhibidores de las transpeptidasas del peptidoglicano. Durante décadas se ha generado una larga colección de nuevos antibióticos de esta familia, tanto naturales como semi-sintéticos o puramente de síntesis, que a través de sus diferentes espectros de acción y resistencia a β-lactamasas han buscado contrarrestar la aparición de resistencias, sobre todo en patógenos Gram positivos (estafilococos meticilin-resistentes, enterococos ampicilin-resistentes y pneumococos penicilin-resistentes). Dada la naturaleza mayoritariamente sintética de los compuestos más recientes de este grupo comercializados o en desarrollo, no nos detendremos en su discusión. Aún así, es importante recalcar que aún en nuestros días muchos de estos compuestos son antibióticos de primera elección en muchos tipos de infecciones comunitarias, dado su amplio espectro de acción (Bush y cols., 2000).

Los antibióticos glicopeptídicos vancomicina y teicoplanina surgieron en su momento como alternativa terapéutica a la rápida difusión de resistencias a los β-lactámicos en microorganismos Gram positivos. Esta familia de compuestos actúa mediante su unión a precursores de la pared bacteriana, en concreto al dipéptido D-Ala-D-Ala terminal del glicosilpentapéptido, por lo que inhibe tanto los procesos de transglicosilación como de transpeptidación (Walsh, 2003). La vancomicina, descubierta en 1955, es un glicopéptido soluble producido por una cepa de *Amycolatopsis orientalis* que sigue siendo utilizada en el ámbito hospitalario, sin aparición de resistencias cruzadas con otros antibióticos, representado el antibiótico de primera elección para el tratamiento de infecciones severas por *Staphylococcus aureus* meticilin-resistente (MRSA) así como por otros Gram-positivos multiresistentes. La resistencia a vancomicina se identifi-

có por primera vez en 1986 en cepas de *Enterococcus faecium,* que sintetizaban un precursor D-Ala-D-Lac resistente al antibiótico (VRE). Desde entonces la incidencia de VRE se está extendiendo en el medio hospitalario, sobre todo en casos de inmunodeficiencia por SIDA, quimioterapia y estados postoperatorios. La teicoplanina se descubrió en 1984, y está producida por una cepa de *Actinoplanes teichomyceticus*. Este glicopéptido presenta el mismo espectro antimicrobiano que la vancomicina, y es ampliamente utilizado en Europa aunque todavía no ha sido aprobado en USA. Se diferencia por su carácter más lipofílico, por lo que consigue una buena penetración tisular, y dada su larga vida media permite una única administración diaria (Khare y Keady, 2003; Zhu, 1999).

Más recientemente, se han desarrollado derivados semi-sintéticos de los glicopéptidos naturales, con el fin de combatir las resistencias emergentes a éstos. Entre ellos destacan la oritavancina (Fig. 1) y la dalba-



Oritavancina

FIGURA 1. *Oritavancina, un antibiótico glicopéptido de la familia de la vancomicina que actúa sobre la síntesis de la pared celular.*

vancina (Fig. 2). La oritavancina (LY 333328), desarrollada por Elli Lilly, es un derivado del compuesto natural cloroeremomicina, que difiere de la vancomicina solo en la presencia de dos epi-vancosaminas. A diferencia de otros glicopéptidos, la oritavancina no se une con gran afinidad al dipéptido precursor de la pared, y su actividad parece estar relacionada con la facilidad con que esta molécula dimeriza. La formación de estos dímeros le permitiría actuar por un segundo mecanismo de acción, inhibiendo también la etapa de transglicosilación. Esta inhibición es la que le confiere su eficacia frente a VRE, siendo activa en un modelo animal de ratón. Este compuesto se encuentra en fase III de desarrollo y durante estos ensayos clínicos no se ha observado la aparición de resistencias (Khare y Keady, 2003; Woodford, 2003; Zhu, 1999).

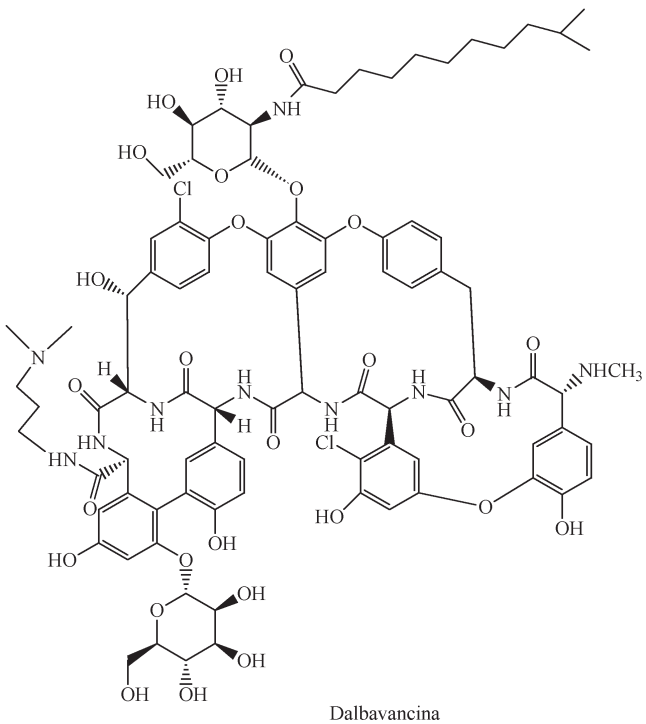


FIGURA 2. *Dalbavancina, un antibiótico glicopéptido de la familia de la vancomicina que actúa sobre la síntesis de la pared celular.*

La dalbavancina (BI-397) fue desarrollada por Biosearch Italia a partir del análogo de teicoplanina A-40926, que carece del residuo de acetilglucosamina presente en la teicoplanina, producido por una cepa de *Nonomurea* sp. Este compuesto, actualmente en fase II de desarrollo clínico, destaca por su gran eficacia *in vivo* frente a Gram positivos. La dalbavancina presenta buena actividad frente a cepas de *S. aureus* susceptibles y meticilin resistentes y a enterococos sensibles a glicopéptidos, pero no sobre cepas vanA. Por el contrario, la oritavancina es activa frente a enterococos vanA y vanB. Ésto ha determinado que la dalbavancina se desarrolle esencialmente para combatir infecciones por MRSA y la oritavancina para infecciones por VRE (Abbanat y cols., 2003; Khare y Keady, 2003; Zhu, 1999; Woodford, 2003).

El glico-lipo-depsipéptido ramoplanina (Mc Cafferty y cols., 2002) es otro candidato clínico prometedor para el tratamiento de las infecciones por Gram positivos aerobios y anaerobios resistentes a glicopéptidos, macrólidos y β-lactámicos. Desde su descubrimiento por Biosearch Italia a partir de una cepa de *Actinoplanes* sp. en 1984, no se ha detectado la aparición de resistencias, tanto en laboratorio como en la clínica. Algo más tarde se descubrió un compuesto análogo, la ramoplanosa, también producido por otra cepa de *Actinoplanes*. Este compuesto actuaría a nivel del la fase 2 de la síntesis del peptidoglicano, secuestrando el intermediario lipídico II e impidiendo la acción de la translocasa MurG y de las transglicosilasas. A diferencia de otros glicopéptidos, la ramoplanina se une a la zona MurNAc-(GlcNAc)-Ala-g-D-Glu pirofosfato del Lípido II y no existe resistencia cruzada con ningún otro glicopéptido. Este antibiótico presenta un amplio espectro frente a Gram positivos tanto *in vitro* como *in vivo*, incluyendo enterococos, estafilococos, bacilos, estreptococos, *Listeria monocytogenes* y anaerobios tales como *Clostridrium difficile*. Sin embargo, no tiene actividad frente a Gram negativos. Actualmente se encuentra en fase III de ensayos clínicos, dada su buena tolerancia y eficacia demostrada en los ensayos de fase II frente a infecciones intestinales por VRE. Sin embargo, su uso está limitado por su mala absorción sistémica. Actualmente hay en ensayos de fase III nuevos derivados con aplicación en infecciones gastrointestinales por enterococos resistentes a glicopéptidos (GRE) (Woodford, 2003).

La amplia difusión de las resistencias ya mencionada también ha conducido a reevaluar viejos compuestos. Este es el caso de las manopepti-

micinas, una mezcla de antibióticos glicopéptidicos cíclicos producidos por una cepa de *Streptomyces hygroscopicus* aislada a finales de los 50, con actividad frente a bacterias Gram positivas. Recientemente, se ha visto que el complejo de antibióticos (manopeptimicinas α a ε) tiene actividad *in vitro* frente a MRSA y VRE por inhibición de la síntesis de la pared bacteriana. Por no presentar resistencia cruzada con otros antibióticos que actúan sobre la pared celular, se supone que actuaría sobre otra etapa de la síntesis del peptidoglicano (Singh y cols., 2003).

Otra diana que también se ha estudiado en la síntesis de la pared celular es la translocasa MraY, enzima responsable de la adición del UDP-N-acetil-muramico pentapéptido para formar el intermediario Lípido I. Para investigar la inhibición de esta proteína integral de membrana se están utilizando como modelos químicos los inhibidores de origen natural liposidomicinas, mureidomicinas y pacidamicinas, también denominados uridil-péptidos. Estos compuestos presentan limitaciones, tales como un espectro antimicrobiano muy pequeño y una alta frecuencia de resistencias, pero dada su baja toxicidad se han examinado otros derivados (Woodford, 2003). Aventis está investigando análogos modificados de liposidomicinas (riburamicinas) y entre ellos el compuesto RU75411 que inhibe varios tipos de Gram positivos, incluyendo MRSA y GRE, aunque algunas cepas de *S. aureus* son resistentes (Woodford, 2003).

Síntesis de proteínas

El otro gran grupo de antibióticos lo componen los inhibidores de la síntesis de proteínas. Dentro del grupo de inhibidores que actuan a nivel de la subunidad 30S se encuentran los aminoglicósidos y las tetraciclinas, antibióticos descubiertos hace décadas a partir de distintos actinomicetos. Dada la facilidad de generación de resistencias, no se ha dedicado un excesivo esfuerzo al desarrollo de nuevos derivados de aminoglicósidos, mientras que recientemente se han descrito las glicilciclinas, derivados semisintéticos de la tetraciclina con el mismo mecanismo de acción y diseñados para evitar el reflujo y la protección ribosomal, dos mecanismos de resistencia comunes a tetraciclinas. Dentro de este nuevo grupo de antibióticos cabe destacar la tigeciclina (GAR-936), un derivado semi-sintético de minociclina que bloquea la entrada del aminoacyl-tRNA al sitio A,

deteniendo la elongación de cadena peptídica. Este compuesto se encuentra en fase III, y presenta más eficacia que la vancomicina en modelos MRSA y MSSA, sin resistencia cruzada con tetraciclinas. Presenta un amplio espectro frente a Gram positivos y muchos Gram negativos. Su eficacia *in vivo* ha sido demostrada en diferentes modelos animales, aunque presenta los mismos efectos secundarios que otras tetraciclinas (Abbanat y cols., 2003; Bush, 2000; Woodford, 2003).

Los macrólidos se introdujeron en el campo de los anti-infecciosos con la eritromicina A, una lactona macrocíclica producida por una cepa de *Saccharopolyspora erythraea*, descubierta en 1952. Este compuesto se une específicamente al 23S rRNA y bloquea la traducción por liberación del peptidil-tRNA e impidiendo la aproximación del péptido en crecimiento (Walsh, 2003). La rápida aparición de resistencias y los problemas de inestabilidad del compuesto en medio ácido, poca absorción por vía oral y problemas gastrointestinales asociados han llevado a la aparición de una generación de análogos semi-sintéticos, como la azitromicina (Zitromax®) y claritromicina (Biaxin®), ambos con mayor estabilidad y mejor farmacocinética, pero al igual que la eritromicina con poca actividad frente a bacterias resistentes a macrólidos por metilación del rRNA 23S (Chopra, 1998). Esto ha conducido al desarrollo de los ketólidos, un nueva clase de macrólidos con buen espectro de actividad frente a Gram positivos, como una alternativa a los β-lactámicos para infecciones del tracto respiratorio, otitis media e infecciones cutáneas. La cetromicina y la telitromicina (HMR 3647, Ketek®) son dos de los compuestos con actividad frente a Gram positivos resistentes a macrólidos que están siendo desarrollados para infecciones respiratorias. Actúan sobre la subunidad 50S, uniéndose reversiblemente al dominio V del 23S rRNA, provocando la liberación prematura del péptido naciente. Aunque estos compuestos son mucho más potentes que otros macrólidos sobre *S. pneumoniae*, también se han observando efectos adversos e interacciones con otros compuestos. La telitromicina (Fig. 3), desarrollada por Aventis, es hasta el momento el único ketólido aprobado en Europa, y está pendiente su aprobación en USA. El futuro de la cetromicina es incierto, dado que Abbott no ha seguido con los estudios de fase III (Abbanat y cols., 2003; Ackermann y Rodloff, 2003; Bush y cols., 2000).

Las estreptograminas constituyen otra familia de antibióticos naturales aislados de cepas de *Streptomyces*. Existen dos grupos, A y B, no re-

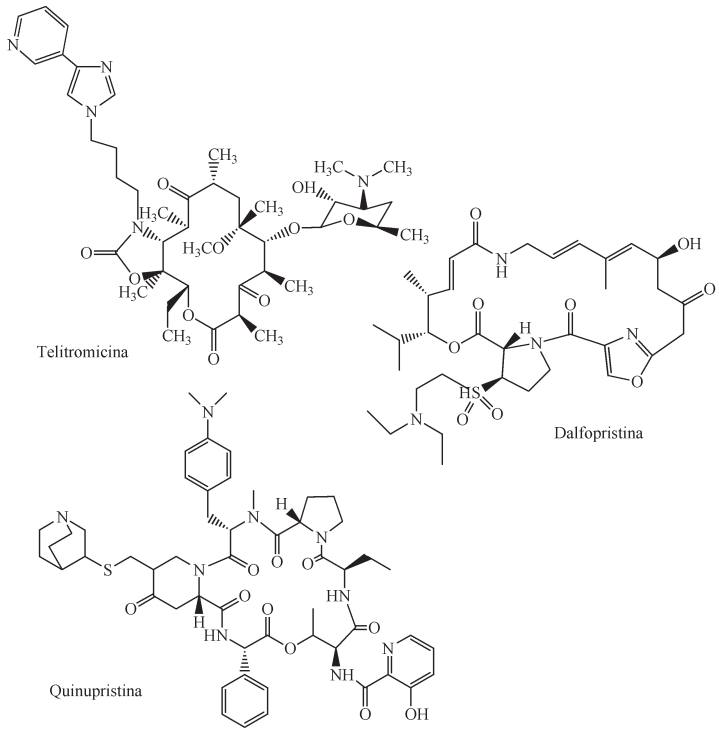
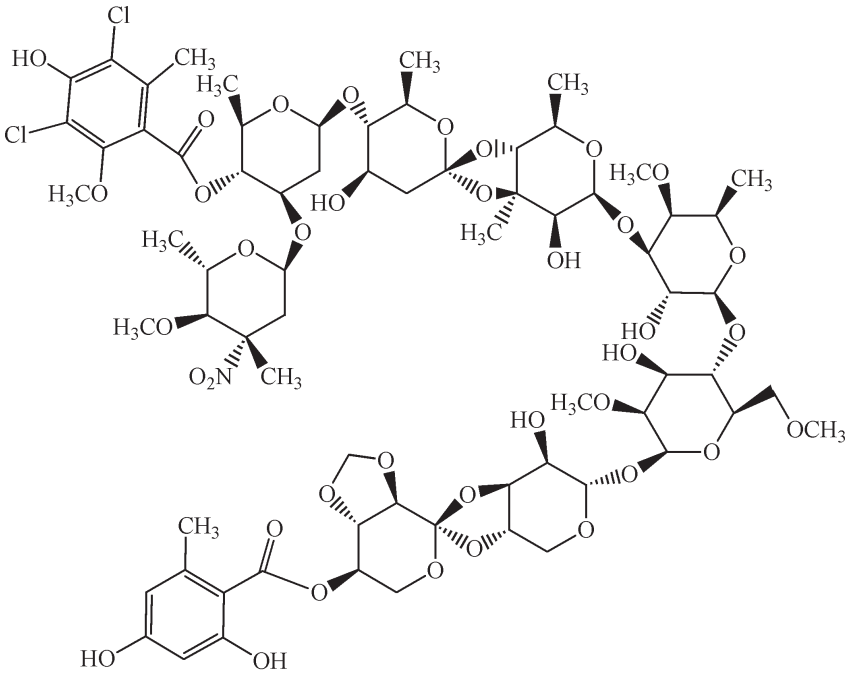


FIGURA 3. *Antibióticos que actúan sobre la síntesis de proteínas. Dalfopristina y Quinupristina, compuestos de la familia de las estreptograminas. Telitromicina, un ketólido derivada de la eritromicina.*

lacionados estructuralmente, y actúan sinérgicamente inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas. El grupo A está compuesto por una serie de macrolactonas de 23 eslabones del tipo de la virginiamicina, madumicina y griseoviridina. Uno de estos compuestos, la pristinamicina (mezcla de pristinamicina IA y IIA), producido por *S. pristinaespiralis*, se ha utilizado durante algunos años en Europa como antibiótico oral. El grupo B se compone de hexadepsipéptidos cíclicos del tipo de la etamicina. Todos los microorganismos que producen estos compuestos lo hacen en forma de mezclas. La virginiamicina, producida por *S. virginiae,* difiere ligeramente de la pristinamicina. A partir de estos compuestos Aventis ha desarrollado el Synercid® (RP-59500), una estreptogramina inyectable compuesta de dos macrociclos, dalfopristina y quinupristina (Fig. 4) en relación 70/30 (v/v). Ambos son derivados semisintéticos de componen-



SCH-27899 (Ziracin®)

FIGURA 4. *SCH-27899 (Ziracin®), un antibiótico de la familia de las everninomicinas, oligosacáridos inhibidores de la síntesis de proteínas.*

tes de los grupos A y B respectivamente y su mecanismo de acción es el mismo que el de la familia de pristinamicinas. La quinupristina actúa bloqueando el sitio de la peptidil transferasa en el ribosoma, mientras que la dalfopristina estimula la disociación del peptidil-tRNA del ribosoma. El efecto sinérgico se debe a que los cambios conformacionales inducidos por un compuesto favorecen la unión estable del otro. Por separado ambos compuestos son solo bacteriostáticos, mientras que combinados presentan potente actividad frente a *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *E. faecium*, aunque son poco efectivos frente a *E. faecalis* (Bonfiglio y Furneri, 2003; Bush y cols, 2000; Chopra, 1998; Khare y Keady, 2003).

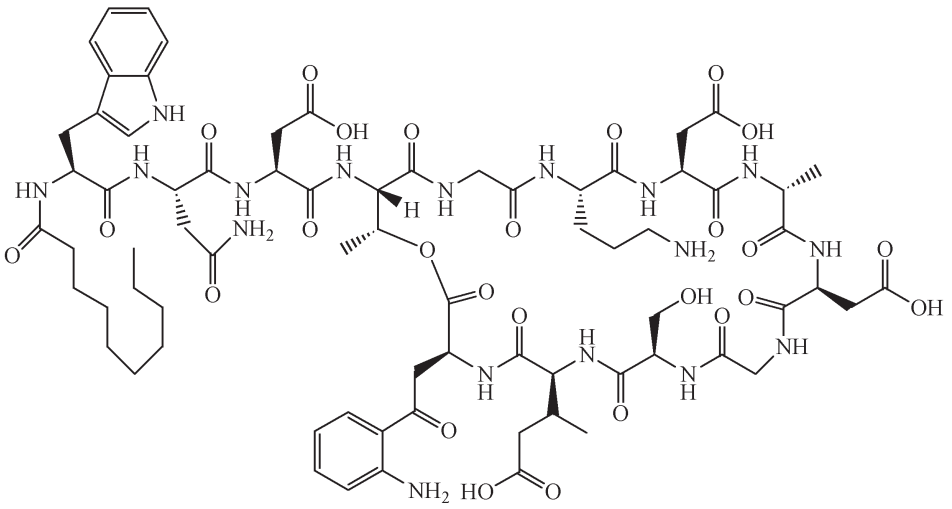
Las everninomicinas son un grupo de antibióticos oligosacáridos producidos por una cepa de *Micromonospora carbonacea* var. *africana*, que han dado lugar al desarrollo por Schering-Plough del SCH-27899 (Zira-

cin®, Fig. 4), suspendido tras los estudios de fase III al no presentar un buen balance eficacia/seguridad (Chu y cols., 2002; Zhu, 1999). No obstante, estos compuestos presentan excelente actividad frente a Gram positivos, incluyendo *S. pneumoniae*, MRSA, VRE y *E. faecalis*. Se ha propuesto que estos compuestos inhiben la síntesis de proteínas actuando sobre la proteína ribosomal L16, en la subunidad 30S del ribosoma. Dado su mejor perfil de tolerancia y toxicidad, pueden suponer una alternativa a la vancomicina. No obstante, el uso extendido en Europa de la avilamicina, un oligosacárido relacionado, como estimulante del crecimiento en animales, ha podido crear un reservorio de resistencias frente a este nuevo compuesto.

Dentro del grupo de los inhibidores de la síntesis de proteínas también se encuentran los tiopéptidos, entre los que destaca el tiazolil péptido GE2270A, aislado de una cepa de *Planobispora rosea*, que al igual que otros antibióticos de la misma familia (GE37468 y amythiamicin), actúa sobre el 23S rRNA, bloqueando el factor de elongación EF-Tu. Éste es también la diana de los antibióticos de la clase de la kirromicina y la pulvomicina, aunque difieren en su mecanismo de acción. El GE2270A carece de actividad frente a Gram negativos, por no penetrar en la célula, mientras que presenta una potente actividad frente a Gram positivos, incluidas cepas resistentes, en modelos experimentales de endocarditis por estreptococos en ratón (Lociuro y cols., 1997).

Otras dianas

Los lipopéptidos son compuestos naturales con actividad antibiótica descubiertos en los años 80 por científicos de Lilly. Entre ellos se encuentra la daptomicina, que no rebasó los ensayos de fase II dados sus problemas potenciales de toxicidad. Sin embargo, recientemente se ha reevaluado la utilización de la daptomicina como agente de amplio espectro para Gram positivos, y en especial para cepas multi-resistentes. Este compuesto es producido por una cepa de *Streptomyces roseosporus* y consiste en una cadena de ácido decanoico unido al triptófano de un péptido cíclico de 13 residuos (Fig. 5). Cubist, que adquirió los derechos sobre este compuesto para desarrollarlo, espera lanzar una formulación intravenosa (Cinedin®) en 2003. Su mecanismo de acción no está del todo claro y su efecto puede deberse a múl-



Daptomicina

FIGURA 5. *Daptomicina, antibiótico lipopéptido sin mecanismo de acción bien definido.*

tiples causas, incluyendo la inhibición de la síntesis del peptidoglicano y del acido lipoteicoico y la disipación del potencial de membrana. No penetra la membrana citoplasmática y mata las células Gram positivas alterando la funcionalidad de la membrana celular a diferentes niveles, alterando el transporte y despolarizando la membrana. Tiene actividad *in vitro* frente a la mayoría de los Gram positivos, incluyendo MRSA, VRE. Es más efectivo que la vancomicina en modelos de infecciones sistémicas de ratón con MRSA y MSSA, pero requiere niveles plasmáticos de calcio superiores a los fisiológicos. Los primeros ensayos clínicos comenzaron en 1999, con resultados prometedores en los ensayos de fase I y II. Los ensayos de fase III están en desarrollo para el tratamiento de endocarditis, bacteremia e infecciones por VRE, y hasta la fecha no se han reseñado casos de resistencia en aislados clínicos (Tally y cols., 1999; Abbanat y cols., 2003; Woodford, 2003).

ANTIFÚNGICOS

Las infecciones fúngicas en el hombre varían desde las afecciones superficiales de la piel y uñas hasta las infecciones sistémicas con altos porcenta-

jes de mortalidad. Las infecciones fúngicas invasivas causadas por especies de *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus neoformans* y otros patógenos representan una creciente amenaza para la salud pública. La prevalencia de estas infecciones ha aumentado significativamente durante la pasada década, principalmente a causa del aumento de la población inmunosuprimida (enfermos de SIDA, pacientes oncológicos recibiendo quimioterapia, pacientes con transplantes de órganos), el uso de catéteres centrales y una población en creciente envejecimiento, entre otros factores. Sólo un número limitado de agentes antifúngicos (polienos y azoles, básicamente) han estado disponibles hasta hace poco tiempo para el tratamiento de este tipo de enfermedades. Estos agentes muestran importantes limitaciones, tales como la nefrotoxicidad de la anfotericina B, y la creciente incidencia de resistencia a los azoles. Aunque las formulaciones lipídicas de los polienos y las nuevas generaciones de azoles han mejorado los fármacos originales, el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos, preferiblemente con nuevos mecanismos de acción, es aún una urgente necesidad médica (Vicente y cols., 2003). En las últimas décadas se han descrito un elevado número de metabolitos microbianos con actividad antifúngica. La gran mayoría de estos compuestos antifúngicos han sido descubiertos usando ensayos sin modo de acción específico, ésto es, buscando compuestos capaces de inhibir el crecimiento de una levadura u hongo filamentoso escogido como diana. Comparativamente hablando, el número de agentes antifúngicos para los cuales se conoce el mecanismo de acción es pequeño. Estos fármacos serán el tema del resto de esta sección.

Pared celular

Una de las dianas de nuevos antifúngicos más activamente investigadas en los últimos años es la pared celular fúngica. Los agentes que actúen a este nivel deberían ser inherentemente selectivos y tener propiedades fungicidas, lo que resulta particularmente atractivo para el desarrollo clínico. Hasta el presente, la síntesis de glucano es el único proceso en la síntesis de la pared celular que ha sido usado con éxito para desarrollar nuevos fármacos en este área. El glucano es un polisacárido compuesto por monómeros de glucosa unidos por enlaces β-1,3 o β-1,6, y es un componente esencial de la pared celular, que garantiza muchas de sus propiedades físicas. Los inhibidores de síntesis de glucano pose-

en actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* en diferentes modelos animales. Los más clásicos inhibidores de síntesis de glucano son las equinocandinas, hexapéptidos cíclicos *N*-acetilados con una cadena alifática de variable longitud. Los diferentes miembros de la familia de las equinocandinas se distinguen en los sustituyentes del anillo hexapeptídico o en la cadena de ácido graso lateral. Desde que la primera equinocandina fue descubierta a principios de los 70, se han descrito numerosos miembros de esta familia, siempre procedentes de hongos (Vicente y cols., 2003).

Las pneumocandinas, un tipo de equinocandinas producidas por el hongo *Glarea lozoyensis*, han sido utilizadas con éxito por Merck para desarrollar un antifúngico que se ha lanzado recientemente al mercado. La equinocandina semisintética acetato de caspofungin (Cancidas®) es un aza-derivado de la pneumocandina B_0 (Fig. 6). Los ensayos clínicos han demostrado que este fármaco es bien tolerado y resulta eficaz en el tratamiento de la aspergilosis invasiva y las candidiasis esofágica e invasiva (Villanueva y cols., 2002; Mora-Duarte y cols., 2002). Este fármaco ha sido aprobado en el 2001 en Europa y USA para su uso contra la aspergilosis invasiva en pacientes refractarios o intolerantes a otras terapias. Más recientemente se ha añadido una indicación para candidiasis invasiva y esofágica. Otro agente antifúngico de la misma familia es la micafungina (Funguard®), una equinocandina con un grupo sulfato en uno de los radicales del núcleo hexapeptídico, comercializado recientemente en Japón por Fujisawa para el tratamiento de las infecciones por *Aspergillus* y *Candida*. En ensayos clínicos muy avanzados se encuentra igualmente la anidulafungina, otra equinocandina con un grupo terfenilo en la posición del ácido graso (Vicente y cols., 2003).

El éxito obtenido con estos lipopéptidos inhibidores de la síntesis de glucano ha impulsado el interés de la industria en la búsqueda de otros tipos estructurales con ventajas respecto a las equinocandinas (especialmente debido a la falta de absorción oral de éstas). Así, otra clase de inhibidores de síntesis de glucano descubiertos recientemente son un grupo de triterpenos con un radical polar glicosídico (enfumafungina, Fig. 6) o de otro tipo (Vicente y cols., 2003). Aunque estos compuestos son inactivos o sólo débilmente activos *in vivo* en modelos animales, representan un nuevo paradigma en la búsqueda de nuevos antifúngicos con este mecanismo de acción, y podrían ser útiles como base para desarrollar fármacos antifúngicos superiores a las equinocandinas.

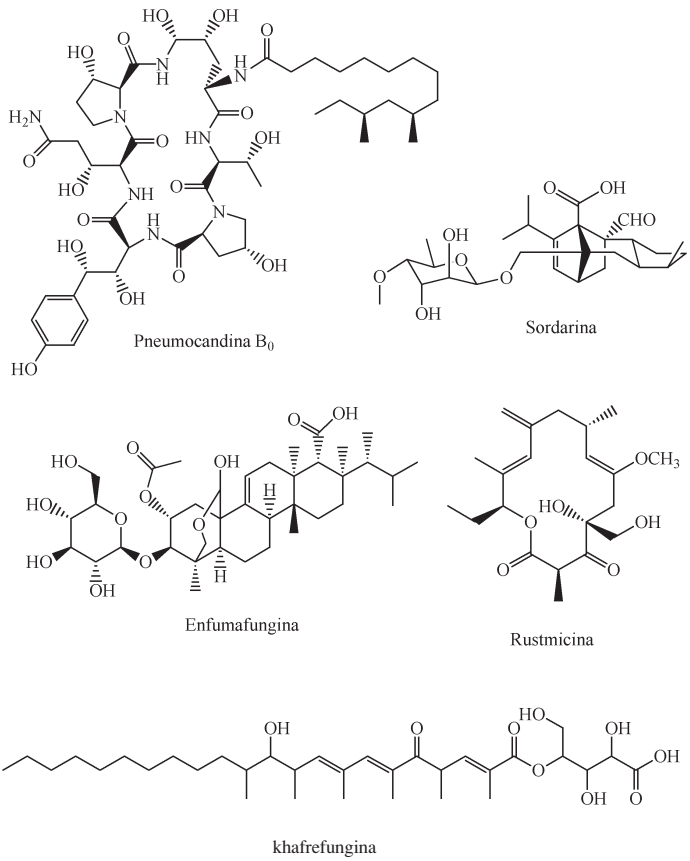


FIGURA 6. *Agentes antifúngicos. Pneumocandina B_0 y Enfumafungina, inhibidores de la síntesis de glucano. Rustmicina y Khafrefungina, inhibidores de la síntesis de esfingolípidos. Sordarina, un inhibidor de la síntesis de proteínas.*

Síntesis de esfingolípidos

Aunque solo están presentes en pequeña proporción en la membrana plasmática fúngica, los esfingolípidos son esenciales para un buen número de funciones celulares en hongos, y la inhibición de su síntesis resulta en la inhibición del crecimiento y muerte celular (Mandala y Harris, 2001). Aunque la mayoría de las etapas en la ruta de síntesis de esfingolípidos en hongos y mamíferos son similares, existen algunas enzimas que se encuentran sólo en hongos, lo que hace que ésta sea una

potencial diana para la búsqueda de nuevos antifúngicos. Tres enzimas clave en esta ruta se han usado como diana para buscar nuevos antifúngicos: la serina-palmitoil transferasa, la ceramida sintasa y la inositol fosfoceramida sintasa. Se han aislado inhibidores de estos tres enzimas tanto a partir de hongos como de actinomicetos (Vicente y cols., 2003; Mandala y Harris, 2001). Las esfingofunginas, viridiofunginas y otros compuestos son inhibidores de la serina-palmitoil transferasa. La fumonisina B1 y la australifungina inhiben la ceramida sintasa, mientras que las aureobasidinas, la khafrefungina y la rustmicina (Fig. 6) inhiben la inositol ceramida sintasa. Aunque algunos de estos compuestos mostraron una elevada potencia, ninguno de ellos ha sido desarrollado como un fármaco, debido a problemas de solubilidad, débil actividad *in vivo* o toxicidad en modelos animales.

Síntesis de proteínas

La síntesis de proteínas ha sido tradicionalmente una atractiva diana para el desarrollo de agentes antimicrobianos. Aunque la aplicación de esta idea a la búsqueda de antifúngicos se ve dificultada debido a la similitud entre las maquinarias implicadas en la síntesis de proteínas en hongos y mamíferos, el factor de elongación 2 (EF2) ha sido identificado como una diana adecuada, ya que es funcionalmente distinto de su homólogo en mamíferos. La más importante familia de agentes antifúngicos que actúan a este nivel son las sordarinas. La sordarina (Fig. 6) fue aislada en los años 60 por Sandoz a partir de fermentaciones de *Sordaria araenosa*. Las sordarinas son inhibidores selectivos y potentes de la transducción, que actúan desestabilizando el complejo EF2-ribosoma. Los compuestos de esta familia inhiben la transducción *in vitro* en *Candida albicans, C. tropicalis*, *C. kefyr* y *Cryptococcus neoformans* en grado variable, aunque son ineficaces en otras especies de *Candida*. Varios compuestos relacionados estructuralmente se han aislado de diversas especies de hongos (Vicente y cols., 2003). La potente actividad *in vitro* y su amplio espectro, así como el hecho de que algunos derivados semi-sintéticos desarrollados por Glaxo hayan mostrado eficacia en modelos animales y presenten favorables características farmacocinéticas y toxicológicas han hecho de estos compuestos candidatos prometedores a su evaluación en la clínica.

ANTITUMORALES

Los compuestos de origen microbiano se encuentran entre los agentes anticancerígenos quimioterapéuticos más utilizados desde hace décadas en la clínica. Tradicionalmente, se ha tratado de agentes citotóxicos que actúan sobre el ADN, bien como agentes intercalantes o alquilantes que provocan su rotura, o por interacción con el proceso de replicación. Estos compuestos, descubiertos en la década de los 60, incluyen a miembros de las familias de la antraciclina, bleomicina, actinomicina, mitomicina y del ácido aureólico (mitramicina), todos ellos producidos por diferentes cepas de *Streptomyces*. Los agentes más importantes con aplicación en clínica son las antraciclinas daunomicina y su derivado doxorubicina, utilizadas para el tratamiento de leucemias, linfomas no Hodking y cáncer de mama; la aclarubicina (o aclacinomicina A) presenta actividad frente a leucemias y tumores sólidos y representa una nueva clase de compuestos inhibidores de las topoisomerasa I y II; las bleomicinas glicopeptídicas A2 y B2 (Blenoxane®) utilizadas para el tratamiento de carcinomas de células escamosas y linfomas; los peptólidos como la D-actinomicina; los mitosanos como la mitomicina C; y la mitramicina**,** otro compuesto extremadamente citotóxico utilizado en la clínica sólo de manera muy restringida, por sus efectos secundarios, para el tratamiento de ciertos tumores como el carcinoma de testículo o la enfermedad de Pager (Cragg y Newman, 2000). Sin embargo, dada la falta de tratamientos eficaces para ciertos tipos de tumores, y por los numerosos efectos secundarios producidos por los existentes, es ésta un área en la que se ha seguido investigando activamente en las últimas décadas. Así, en los últimos años se ha desarrollado un gran número de compuestos naturales o semi-sintéticos con actividad antitumoral, algunos de los cuales han llegado a ensayos clínicos. Algunos de los más relevantes se describen a continuación.

La equinomicina es un péptido cíclico de la familia de las quinoxalinas, producido por una cepa de *Streptomyces echinatus,* que actúa como agente bis-intercalante del ADN. Este compuesto, que presenta citotoxicidad sobre líneas celulares de cáncer de colon, se ha incluido en estudios de fase II sobre sarcomas metastáticos de tejidos blandos, aunque sin éxito (Gradishar y cols., 1995).

Todavía en desarrollo está la tiocoralina, un nuevo agente anticancerígeno derivado de una cepa de *Micromonospora marina* con actividad

sobre líneas celulares de cáncer de colon. Este compuesto actúa deteniendo el ciclo celular en la fase G1 como consecuencia de su acción sobre la replicación del ADN y más específicamente a nivel de la fase de elongación, actuando sobre la ADN polimerasa alfa (Erba y cols., 1999).

Las enediinas naturales fueron descubiertas en 1987 y tienen como representantes dos nuevas clases de compuestos antitumorales, las esperamicinas y las calicheamicinas, producidas respectivamente por cepas de *Actinomadura verrucosospora* y *Micromonospora echinospora*. Estos compuestos presentan un mecanismo de acción singular, dado que contienen una unidad de (Z)1,5-diin-3-eno que se ha propuesto se intercala en el surco menor del ADN de las células, iniciando una serie de reacciones de cicloaromatización y la formación transitoria de bencenos biradicales que producen roturas en ambas hebras del ADN. La neocarzinostatina es otro compuesto relacionado, descubierto en 1965, que se ha vuelto a estudiar dada su similitud con las eneiidinas. En los últimos años, han surgido otras clases de eneiidinas (dinemicinas, kedarcidina, C-1027 y maduropeptina) producidas por diferentes cepas de actinomicetos. Todos estos compuestos son potentes citotoxinas, con IC_{50} en ensayos de inhibición de crecimiento de tumores del orden picomolar, que actúan también rompiendo la doble hélice, induciendo la inhibición de la replicación y la activación de la proteína quinasa dependiente de ADN (Thorson y cols., 2000). Recientemente se ha utilizado otra aproximación, acoplando estos anticancerígenos a anticuerpos específicos de epítopos tumorales. El primer producto de este tipo aprobado por la FDA en el 2000, Mylotarg®, es un conjugado de la calicheamicina con un anticuerpo recombinante humanizado con especificidad por el antígeno CD33, comunmente expresado en células de leucemia mieloide (Hamann y cols., 2002).

Los ciclopropilindoles son otros compuestos citotóxicos que actúan como agentes alquilantes, entre los que destacan las duocarmicinas y el CC-1065, ambos producidos por especies de *Streptomyces*. Estas moléculas se encuentran entre los antitumorales más potentes, aunque no han llegado todavía a la clínica. Estos compuestos son muy estables hasta que se unen al surco menor del ADN, alquilándolo específicamente tras ser activados por un ataque nucleófilo. Todos los compuestos naturales presentan citotoxicidad frente a líneas celulares de leucemia L1210 en el rango picomolar, mientras que el CC-1065 presenta incluso mejores actividades

antitumorales en un modelo *in vivo*. El CC-1065 no puede ser utilizado en humanos por sus efectos tóxicos, pero ha servido para reenfocar las investigaciones en la obtención de nuevos compuestos de esta clase con mejor perfil en modelos *in vivo* (Searcey, 2002; Cacciari y cols., 2000).

La leinamicina es un compuesto producido por una cepa de *Streptomyces atroolivaceus*, descubierto en 1989 y con un amplio espectro de actividad antibacteriana y antitumoral, sobre todo en tumores resistentes a los fármacos antitumorales utilizadas en la clínica. Este compuesto es un híbrido de tiazolilpéptido-poliquétido con una estructura no observada anteriormente en productos naturales, en forma de macrolactona de 18 eslabones unida a un grupo 1,3-dioxo-1,2 ditiolano. La leinamicina actúa alquilando el ADN en presencia de grupos tiol como agentes reductores, lo que determina la rotura de una de las hebras (Gates, 2000). Presenta una potente actividad antitumoral en modelos *in vivo* de tumores en ratón resistentes a otros agentes. Se ha descrito la síntesis de nuevos derivados tioéster de leinamicina más estables con actividad antiproliferativa en el rango nanomolar en ensayos *in vitro* y actividad antitumoral *in vivo*. Entre ellos se encuentra el KF22678, con actividad superior al cisplatino y un amplio espectro de actividad frente a modelos de carcinoma de pulmón, colon, ovario y próstata (Ashizawa y cols., 1999).

La rebecamicina (Fig. 7) es un alcaloide indolocarbazol, producido por el actinomiceto *Lechevalieria aerocolonigenes*, que inhibe la ADN topoisomerasa I con un IC_{50} del orden micromolar, y que *in vivo* inhibe el crecimiento de células tumorales de adenocarcinoma de pulmón. Existen otros indolocarbazoles relacionados, como la staurosporina o el K252a, también producidos por especies de actinomicetos. Se han desarrollado análogos de rebecamicina semi-sintéticos que en función de sus estructuras actúan inhibiendo la topoisomerasa I y/o las proteína quinasas. Algunos de estos compuestos presentan actividad antiproliferativa en el rango micromolar y son más específicos que la rebecamicina. Uno de los derivados más avanzados, el NSC 655649, demostró actividad antineoplásica frente a carcinoma de colon, pero no ha superado los estudios de fase II (Prudhomme, 2003; Goel y cols., 2003).

Las epotilonas A y B (Fig. 7) son una nueva clase de productos naturales con actividad antiproliferativa de amplio espectro frente a diferentes líneas celulares cancerosas. Actúan por un mecanismo distinto a

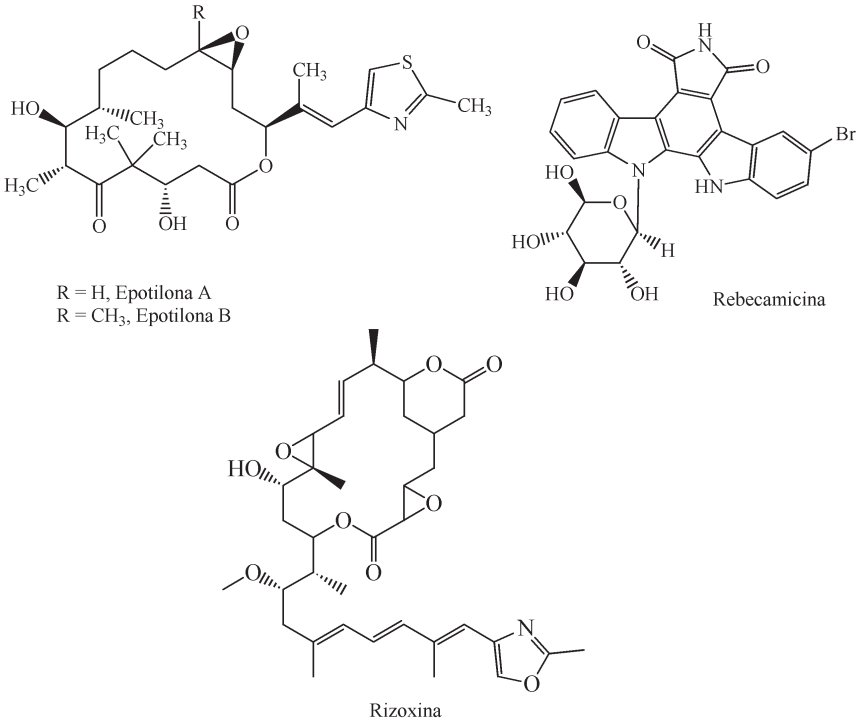


FIGURA 7. *Agentes antitumorales. Rebecamicina, un inhibidor de la ADN topoisomerasa I. Epotilonas A y B y Rhizoxina, agentes que actúan por interacción con los microtúbulos.*

los anteriormente descritos, induciendo, al igual que el paclitaxel, la polimerización de los heterodímeros de tubulina y estabilizando los microtúbulos. Se describieron en 1993, producidas por la myxobacteria *Sorangium cellulosum,* junto con otros variantes. Las epotilonas C y D son tan potentes en la inducción de la polimerización de tubulina *in vitro* como las A y B, aunque son menos activas *in vivo*. Las epotilonas son potentes inhibidores del crecimiento de células cancerosas *in vitro* en el orden nanomolar o subnanomolar, siendo la epotilona B de 5 a 25 veces más potente que la A o el paclitaxel, e inhibiendo el crecimiento de líneas celulares tumorales humanas de pulmón, colon, próstata y otras. Al contrario que el paclitaxel, son también activos frente a líneas tumorales resistentes a multiples fármacos, y en líneas celulares resistentes a paclitaxel por mutaciones en la tubulina. Su perfil preclínico las ha convertido en importantes cabezas de serie en la búsqueda de nuevos antitumorales, y

están sirviendo de modelos para la preparación de análogos no naturales. Se están llevando a cabo ensayos clínicos con dos compuestos, la epotilona B, ahora en fase II, y el BMS247550, su análogo lactámico (Florsheimer y Altmann, 2001; Borzilleri y Vite, 2002).

Otro compuesto de origen natural que actúa interaccionando con la tubulina es la rhizoxina (Fig. 7), una lactona macrocíclica producida por el hongo *Rhizopus chinensis*. Este compuesto es un antimitótico que, al contrario que las epotilonas o el paclitaxel, inhibe la polimerización de la tubulina uniéndose al mismo sitio de unión que los alcaloides de la vinca (Hamel, 1992). La rhizoxina mostró una buena actividad *in vivo* contra varios modelos de cáncer en ratones, incluyendo leucemias y tumores de órgano sólido, así como líneas de leucemia resistentes a vincristina y doxorrubicina. El compuesto ha sido ensayado en fase II en cáncer de pecho, melanoma y otros tipos con resultados poco prometedores, aunque mostró alguna actividad en cáncer de pulmón de células no pequeñas (Kaplan y cols., 1996). Estudios más recientes en humanos han evaluado el uso de este candidato a dosis prolongadas, para chequear la hipótesis de que la falta de eficacia puede deberse en parte a una exposición inadecuada al fármaco (Tolcher y cols., 2000). Se han descrito otros compuestos derivados de hongos con el mismo mecanismo de acción, tales como la phomopsina A (Hamel, 1992), pero éstos aún no se han probado en humanos.

La geldanamicina (Fig. 8) es otro antitumoral, producido por una cepa de *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*, perteneciente al grupo de las benzoquinonas conocidas también como ansamicinas (herbimicina A, macbecinas y ansatrieninas, entre otras). Inicialmente se pensó que la geldanamicina actuaba interfiriendo con los mecanismos de transducción de señales de las células tumorales por inhibición de una protein tirosina quinasa oncogénica. Posteriormente, se ha demostrado que inhibe la actividad ATPasa de la Hsp90 (*chaperone heat shock protein*), que mantiene la conformación, estabilidad y la función de proteínas quinasas oncogénicas implicadas en la transducción de señales que conducen a la proliferación y progresión del ciclo celular y a apoptosis. Las Hsp90 son hiperproducidas en varios tipos de cáncer, lo que ha llevado a considerar su potencial como una nueva diana antitumoral, y el de la geldanamicina como fármaco anticancerígeno. Su derivado 17-alil-amino,17-demeto-

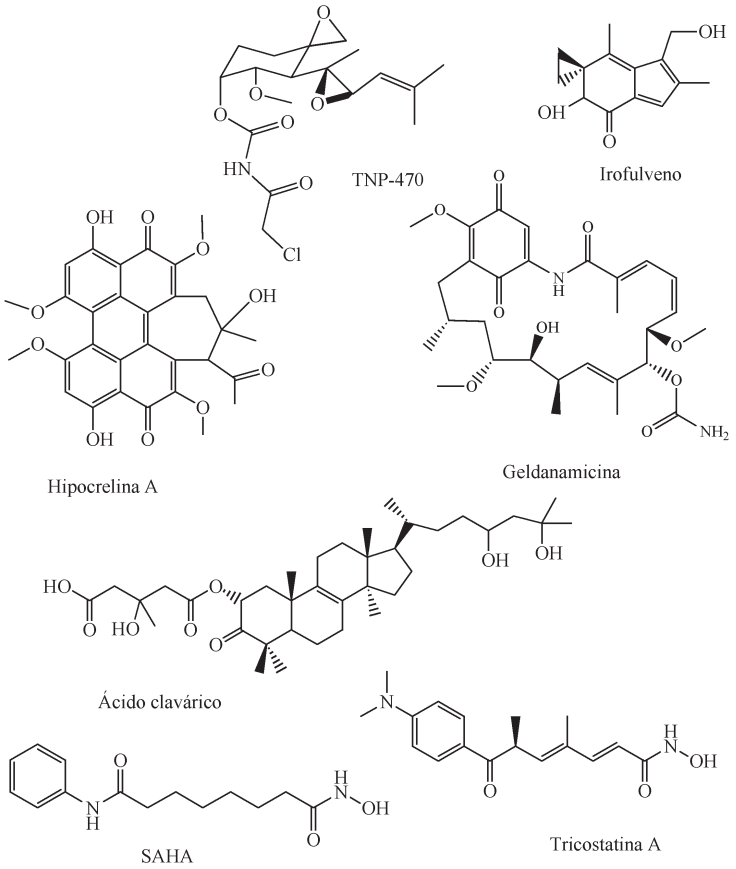


FIGURA 8. *Agentes antitumorales. TNP-470, un inhibidor de la metionina aminopeptidasa-2 que bloquea la angiogénesis. Irofulveno, un compuesto citotóxico sin mecanismo de acción claro. Hypocrelina A, un agente sensibilizador celular. Geldenamicina, un inhibidor de la actividad ATPasa de la Hsp90. Acido clavárico, un inhibidor de la ras FPTasa. Tricostatina A y SAHA (suberoyl anillide hydroxamic acid), inhibidores de la HDAC.*

xigeldamicina presentó buenos perfiles de actividad y selectividad en modelos preclínicos de ratón y ha progresado a fase I con resultados esperanzadores (Maloney y Workman, 2002).

Las illudinas son un grupo de antibióticos sesquiterpénicos que han sido descritos como agentes antibacterianos y antitumorales, y están producidos por basidiomicetos de los géneros *Omphalotus* y *Coprinus*. Un derivado de la illudina S, el irofulveno (6-hidroximetilacilfulveno, MG-114, Fig. 8) ha demostrado una buena actividad en modelos animales de

cáncer, bien solo o en combinación con otros agentes antitumorales. Este compuesto fue ensayado en ensayos clínicos en fase II en varios modelos de cáncer, pero los resultados publicados no han sido muy esperanzadores (Pierson y cols., 2002). Aunque su modo de acción no está claro, se ha demostrado que el irofulveno promueve la apoptosis mediada por caspasas en células tumorales por un mecanismo que implica la activación de las quinasas Erk 1/2 y JNK 1 (Wang y cols., 2002).

Las hipocrelinas (Fig. 8) son pigmentos derivados de *Hypocrella bambusae* y *Shiraia bambusicola,* dos hongos usados en medicina tradicional en China, y que han sido estudiados intensivamente por su capacidad de sensibilizar células a la luz y a los ultrasonidos. Aparentemente, el efecto de estas quinonas policíclicas se debe a la formación de peróxido de hidrógeno en las células tras la fotoactivación, lo cual desemboca en la apoptosis por activación de la caspasa-3 (Ali y cols., 2002). Derivados de las hipocrelinas se han estudiado para el tratamiento potencial de cáncer de colon y de pecho, así como en enfermedades no relacionadas, tales como psoriasis, acné y otras.

Aunque la mayoría de los compuestos utilizados contra el cáncer fueron descubiertos como citotóxicos, se han realizado grandes esfuerzos en identificar agentes antitumorales usando ensayos basados en los procesos bioquímicos relacionados con la cascada de acontecimientos que median la proliferación celular. Una de las etapas enzimáticas más tempranamente identificada como esencial en la malignidad celular fue la prenilación de la proteína Ras. Las proteínas Ras sufren una modificación post-transduccional consistente en la unión de un grupo farnesilo que permite su anclaje a la superficie interior de la membrana plasmática. Se sabe que inhibidores de la farnesil proteína transferasa (FPTasa), la enzima que cataliza esta prenilación, pueden inhibir el crecimiento de células tumorales. En nuestro propio programa de screening de productos naturales de origen microbiano hemos identificado al menos nueve familias distintas de inhibidores de FPTasa (Vilella y cols., 2000). El más interesante de los compuestos descubiertos es el ácido clavárico (Fig. 8), producido por el basidiomiceto *Hypholoma sublateritium*. Este es uno de los pocos inhibidores reversibles naturales de la FPTasa que es competitivo con respecto a la proteína Ras, e inhibe su procesamiento en células NIH3T3 transformadas con *ras*, sin indicios de toxicidad. El ácido clavárico se ha

utilizado como modelo apara obtener inhibidores más efectivos en un programa de química médica (Vilella y cols., 2000). Hay otros inhibidores interesantes de la FPTasa descritos por otros grupos, tales como el TAN-1813, producido por una especie no determinada de *Phoma*, que induce la reversión morfológica de células NIH3T3 transformadas con K-*ras*, con actividad en modelos de ratones (Ishii y cols., 2000). También es activa en modelos de ratones y en otros sistemas, la manumicina, un inhibidor de FPTasa competitivo con farnesil pirofosfato, aislado a partir de una cepa de *Streptomyces* sp. (Vilella y cols., 2000).

Una de las dianas más prometedoras para el desarrollo de agentes antitumorales estudiadas en los últimos años es la histona deacetilasa (HDAC). Los inhibidores de la HDAC (InHDAC) son capaces de inducir la reversión morfológica de las células transformadas con un oncogén al fenotipo normal. Existen numerosas líneas tumorales susceptibles a los InHDAC, y los estudios realizados en modelos de roedores han demostrado que estos compuestos reducen el crecimiento de tumores y la metástasis *in vivo* (Kramer y cols., 2001). La acetilación y des-acetilación de las histonas es crítica en la regulación de la transcripción en células eucarióticas, de forma que la inhibición de la HDAC produce como resultado en un aumento en la expresión de algunos genes y la inhibición de otros. La síntesis de $p21^{WAF1}$ (un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina) es el efecto que se observa más consistentemente, lo que explicaría el bloqueo del ciclo celular descrito en células tratadas con InHDAC (Kramer y cols., 2001). Además, también se ha descrito que estos compuestos inhiben la angiogénesis en modelos de carcinoma en ratón, aumentando la expresión del p53 y de otros supresores de tumores y reduciendo la expresión de factores angiogénicos, por lo que los InHDAC podrían ser útiles como agentes antitumorales también por sus propiedades anti-angiogénicas (Kim y cols., 2001).

Se han descrito varios metabolitos microbianos que son potentes inhibidores de la HDAC. Los más característicos son los tetrapéptidos cíclicos conteniendo un radical epoxi-cetona producidos por hongos, tales como trapoxinas, chlamidocina y HC-toxina, y ácidos hidroxámicos como la tricostatina A, aislada de *Streptomyces hygroscopicus* (Kramer y cols., 2001; Darkin-Rattray y cols., 1996). Los primeros son inhibidores irreversibles de la HDAC con eficacia a niveles del orden nanomolar, y se

unen covalentemente a la enzima a través del grupo epóxido (Kramer y cols., 2001). Otros tetrapéptidos relacionados, pero sin el radical epoxicetona, han sido también identificados como inhibidores de la HDAC, tales como la apicidina, de la que se habla posteriormente como agente antiparasitario (Darkin-Rattray y cols., 1996). La tricostatina A (Fig. 8) y otros compuestos estructuralmente relacionados, tales como el SAHA (suberoyl anillide hydroxamic acid, Fig. 8), son inhibidores reversibles de la enzima. Además, se han sintetizado compuestos híbridos combinando el tetrapéptido de la trapoxina y radicales similares al ácido hidroxámico de la tricostatina A, que son inhibidores reversibles con potencias en el rango de subnanomolar (Furumai y cols., 2001). El potencial de algunos inhibidores de la HDAC como agentes terapéuticos se está evaluando en la actualidad en ensayos clínicos (Kramer y cols., 2001). En concreto, el SAHA ha demostrado buenos resultados, tanto en monoterapia como en combinación, para el tratamiento de varios tipos de cáncer, en ensayos de fase II. Tambien ha mostrado resultados prometedores en fase II el depsipéptido FK228 (FR-901228), otro inhibidor irreversible de la HDAC producido por *Chromobacterium violaceum*.

La fumagilina, un viejo antibiótico que se ha utilizado con éxito como agente antiparasitario, como se describe más adelante, se ha usado para desarrollar un agente antitumoral. En concreto, su derivado semi-sintético TNP-70 (Fig. 8) ha sido estudiado en modelos de varios tipos de cáncer. Estos compuestos son potentes agentes anti-angiogénicos, que inhiben la neovascularización bloqueando el ciclo celular en las células endoteliales en fase G1 tardía. La diana de la fumagilina y sus derivados es la metionina aminopeptidasa-2 (MetAP-2) (Sin y cols., 1997). El papel fisiológico de esta enzima, que elimina los residuos metionina terminales de los péptidos, es todavía oscuro. Su expresión se correlaciona con el crecimiento celular, pero se expresa tanto en células endoteliales como de otros tipos, de modo que la selectividad de estos compuestos para inhibir el ciclo celular en células endoteliales puede implicar otros factores. Trabajos recientes han mostrado que en células endoteliales, el TNP-470 produce la acumulación de $p21^{CIP/WAF}$, lo que lleva al bloqueo del ciclo celular en la transición entre las fases G1 y S. Este compuesto se encuentra en fase de investigación clínica para el tratamiento del sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cerebro, pecho y de otros tipos (Kruger y cols., 2000).

ANTIPARASITARIOS

Las avermectinas (Fig. 9), descubiertas en Merck en 1976 a partir de una cepa de *Streptomyces avermitilis,* son lactonas macrocíclicas con actividad antiparasitaria. Estos productos naturales de extraordinaria potencia sirvieron de base para el desarrollo de la ivermectina (Ivomec®), un derivado semi-sintético que se introdujo en el mercado en 1981. Este compuesto revolucionó el área de los antiparasitarios dado su amplio espectro frente no solo a parásitos intestinales y sistémicos, sino también sobre insectos ectoparásitos en diferentes tipos de ganado, así como por su aplicación en la prevención de la oncocercosis humana (Mectizan®). Posteriormente, se han desarrollado un buen número de análogos sintéticos, como la doramectina, con un perfil muy similar. Las avermectinas están estructuralmente relacionadas con las milbemicinas, descubiertas anteriormente como acaricidas y que difieren en la ausencia de disacáridos unidos al macrociclo. Estos compuestos comparten el mismo mecanismo de acción sobre los canales de cloro de las membranas neuronales y del músculo de los invertebrados. Este efecto sobre el flujo de iones cloruro induciría la parálisis en artrópodos y nemátodos, mientras que en invertebrados se ha visto que las avermectinas potencian el aumento de la permeabilidad a iones cloruro mediada por GABA (Meinke, 2001).

Numerosas enfermedades infecciosas en hombres y animales, incluyendo la malaria, cryptosporidiosis, toxoplasmosis y coccidiosis, son producidas por protozoos del subphyllum *Apicomplexa*. El tetrapéptido cíclico apicidina (Fig. 9), producido por especies de *Fusarium*, fue descubierto en Merck como un agente eficaz frente a un amplio rango de parásitos de este grupo (Darkin-Rattray y cols., 1996). Este compuesto es un potente inhibidor, en el rango nanomolar, de la HDAC del parásito, y muestra un amplio espectro de actividad *in vitro* contra miembros de los Apicomplexa, así como actividad *in vivo* en un modelo de malaria por *Plasmodium berghei* en ratón. Se han descrito también derivados semisintéticos con potencias en el rango picomolar. Otros tetrapéptidos relacionados de origen fúngico que inhiben la HDAC de mamíferos, como la HC-toxina, tienen también potente actividad antiprotozoica, comparable a la apicidina, e inhiben la HDAC de los parásitos (Darkin-Rattray y cols., 1996). Como se ha discutido previamente, estos inhibidores de la HDAC se han estudiado extensamente por su interés como posibles agentes antitumorales.

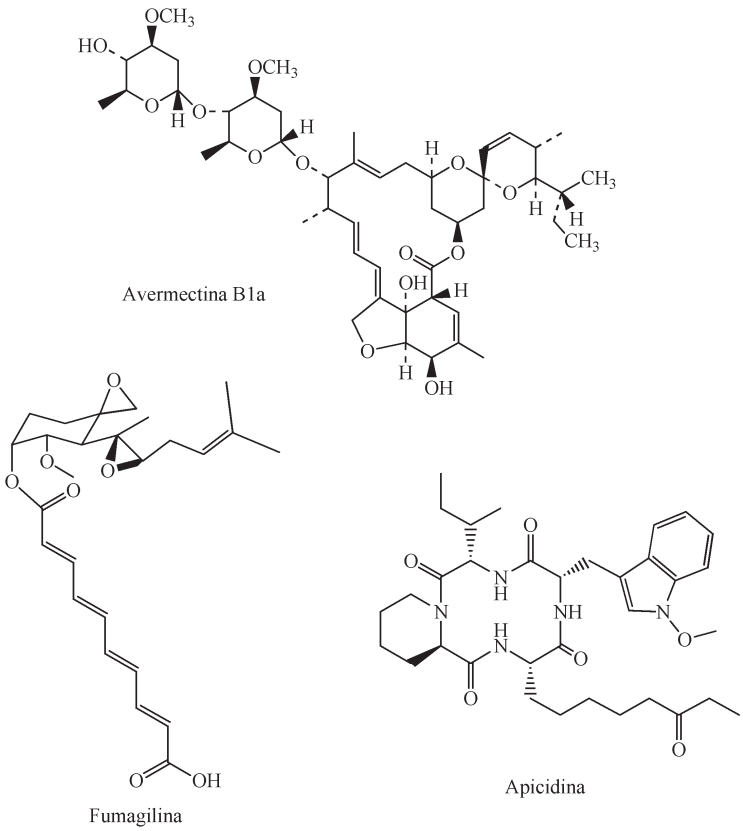


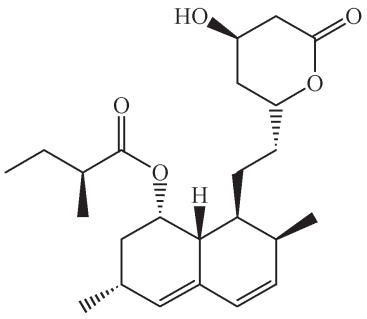
FIGURA 9. *Agentes antiparasitarios. Avermectina B1a, un compuesto que actúa sobre los canales de cloro de invertebrados. Fumagilina, un inhibidor de la metionina-aminopeptidasa-2 con actividad contra microsporidios. Apicidina, un inhibidor de la HDAC con actividad contra protozoos del Subphyllum Apicomplexa.*

La fumagilina (Fig. 9) fue descubierta como antibiótico en los 50. Este compuesto ha sido usado para el tratamiento de la microsporidiosis, con buenos resultados en ensayos clínicos (Molina y cols., 2002). La microsporidiosis, enfermedad para la que no existe tratamiento satisfactorio en la actualidad, está producida por *Enterocytozoon bieneusi*, y cursa con diarrea crónica, mala absorción y debilitación en pacientes inmunosuprimidos. Además de sus propiedades como agente antiparasitario, la fumagilina tiene actividad anti-angiogénica, y algunos derivados han sido llevados a ensayos clínicos como antitumorales, como se ha discutido con anterioridad.

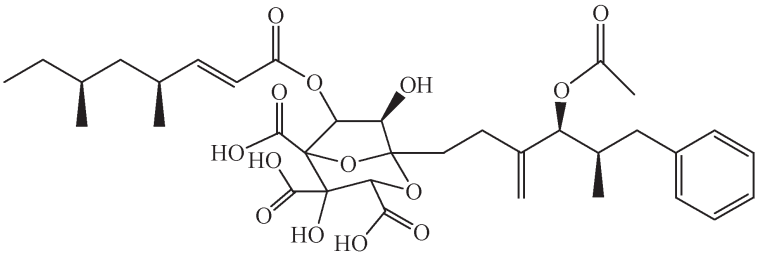
ATEROSCLEROSIS

Gran parte del prestigio que los microorganimos, y en concreto los hongos, puedan haber merecido como una fuente importante de compuestos útiles para la industria farmacéutica, hay que atribuirla a las estatinas, inhibidores de la 3-hidroximetil-glutaril-CoA reductasa que son los fármacos hipolipemiantes más utilizados. La primera estatina natural introducida en la clínica, la lovastatina (Mevacor®, Fig. 10) fue descubierta por el grupo de Merck a finales de los años 70 (Shu, 1998; Patchett, 2002). Un derivado semisintético, la simvastatina (Zocor®), le siguió rápidamente, y en años siguientes otras estatinas naturales (pravastatina) o totalmente sintéticas (atorvastatina, fluvastatina) de otras compañías alcanzaron el mercado. Numerosos ensayos clínicos han demostrado los beneficios de las estatinas en la prevención de las enfermedades coronarias, en sujetos con índices de colesterol elevados o incluso normales. Así, las estatinas han tenido un impacto enorme en la vida de millones de pacientes con riesgo cardiovascular (Best y Jenkins, 2001). Además, se está evaluando el potencial de las estatinas para el tratamiento de otras dolencias, tales como la enfermedad de Alzheimer.

Resulta por tanto poco sorprendente que ésta haya sido un área en la que se han realizado extensos esfuerzos por parte de numerosos grupos, habiéndose identificado numerosas dianas que han sido usadas en procesos de screening para identificar nuevos agentes útiles para tratar la aterosclerosis. Uno de los descubrimientos más interesantes de la última década en este terreno fue el de los ácidos zaragózicos o escualestatinas (Fig. 10). Estos compuestos son potentes inhibidores de la escualeno sintasa, una enzima clave en la biosíntesis de esteroles, con IC_{50s} en el rango picomolar. La escualeno sintasa cataliza la primera etapa exclusiva en la síntesis de colesterol, la condensación de dos moléculas de farnesil-difosfato. Los ácidos zaragózicos fueron descubiertos simultáneamente por los grupos de Merck y Glaxo (Bergstom y cols., 1995). Un gran número de análogos naturales fueron aislados directamente de diversas especies de hongos o producidos por biosíntesis dirigida con precursores, y estos compuestos han sido sometidos a estudios extensivos de química médica. Los ácidos zaragózicos mostraron actividad en modelos animales, pero a pesar de las expectativas surgidas, problemas de toxicidad malograron su desarrollo como fármacos de uso clínico (Shu, 1998). Otros inhibido-



Lovastatina



Ácido zaragócico A

FIGURA 10. *Inhibidores de la síntesis de colesterol. Lovastatina (Mevacor®), un inhibidor de la HMG-CoA reductasa. Acido zaragózico A, un inhibidor de la escualeno sintasa.*

res naturales de la escualeno sintasa han sido descritos posteriormente, pero ninguno mostraba características que hayan permitido su desarrollo como futuros candidatos a fármacos.

INMUNOSUPRESORES

Sin lugar a dudas, uno de los mayores éxitos de la medicina moderna es el desarrollo de las técnicas de transplante de órganos, éxito posible sólo tras el desarrollo de agentes inmunosupresores eficaces. En este campo, el descubrimiento de la ciclosporina A (Sandimmune®) por científicos de Sandoz y su aplicación para el transplante de riñón en 1978 representa un punto de inflexión, y la ciclosporina pronto fue el fármaco inmunosupresor más usado en la clínica (Plosker y Barradell, 1996). La

ciclosporina A, un metabolito producido por *Tolypocladium inflatum* y otros hongos, suprime la respuesta inmune bloqueando la cascada de transducción dependiente de calcio que media la activación de los receptores de células T, inhibiendo la producción de interleukina-2 (IL-2). Para una revisión de su mecanismo de acción ver Kunz y Hall (1993).

Tras la ciclosporina, se introdujo en el mercado otro inmunosupresor con un mecanismo de acción similar, producido por una cepa de *Streptomyces tsukubaensis*, el FK506 o tacrolimo (Prograf®), desarrollado por Fujisawa, aprobado su uso en 1994 para el transplante de hígado y en 1997 para el transaplante renal. Además, el tacrolimo ha sido recientemente aprobado para el tratamiento de la dermatitis atópica (Protopic®), y está siendo ensayado en fase II y III para el tratamiento de la artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunes. En cuanto a su mecanismo de acción, el FK506 se une a la FKBP (FK506 binding protein), mientras que la ciclosporina lo hace a otra proteína, la ciclofilina, pero tras unirse a sus receptores ambos inhiben la calcineurina, una fosfatasa dependiente de calcio implicada en la cascada de señalización celular mencionada (Kunz y Hall, 1993). A pesar de la indudable utilidad de estos fármacos, los importantes efectos secundarios que presentan, especialmente su nefrotoxicidad, han impulsado la búsqueda de otros agentes inmunosupresores con diferentes mecanismos de acción.

La rapamicina (sirolimus, Rapamune®), un metabolito producido por una cepa de *Streptomyces hygroscopicus*, ha sido introducido en la práctica clínica recientemente (desde 1999 en USA y desde el 2001 en Europa). La rapamicina (Fig. 11), al igual que el tacrolimo, es un macrólido y también se une a la FKBP, pero no inhibe la calcineurina, sino que suprime la proliferación celular de los linfocitos y la producción de IL-2 a través de la inhibición de una fosfatidilinositol 3-quinasa denominada TOR (target of rapamycin), que resulta en el bloqueo del ciclo celular en la transición G1/S por inhibición de las ciclinas que regulan la división celular (Crespo & Hall, 2002).

La espergualina es un compuesto inmunosupresor y antitumoral, aislado en 1982 del *Bacillus laterosporus,* a partir del cual se ha desarrollado el derivado 15-deoxiespergualina (Fig. 11), utilizado en la clínica para el tratamiento del rechazo agudo de transplante de riñón (Amemiya, 1996). Este compuesto inhibe la maduración de linfocitos T estimulada

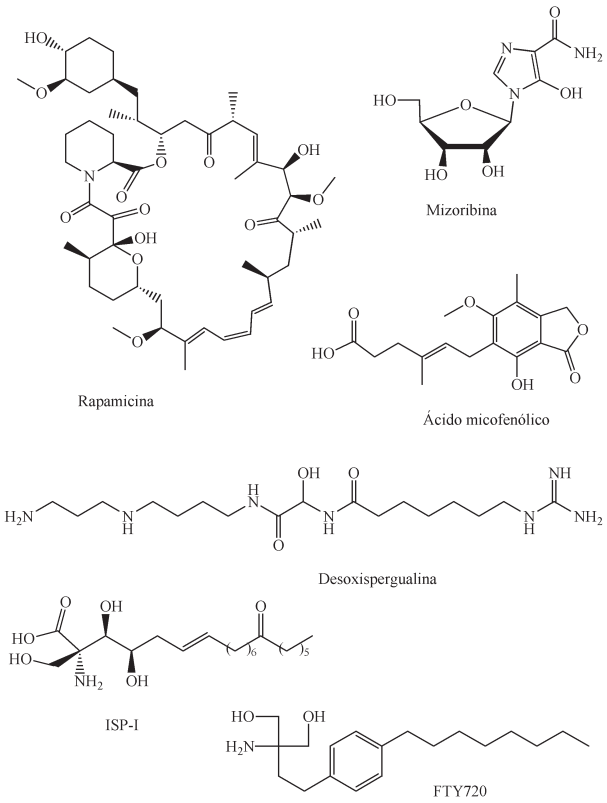


FIGURA 11. *Agentes inmunosupresores. Rapamicina, un inhibidor de la fosfatidilinositol-3 kinasa TOR. Mizoribina y Acido micofenólico, inhibidores de la síntesis de purinas. Deoxispergualina, un inhibidor de Hsc70. ISP-I (miriocina), un inhibidor de la serina-palmitoil transferasa. FTY720, un agonista de los receptores de S1P.*

por IL-2 por interacción con Hsc70, un miembro de la familia de las Hsp70, inhibiendo su localización en el núcleo. En ensayos clínicos se ha observado que revierte el rechazo agudo en un 60-70%, obteniéndose una supervivencia del implante en el 90% de los casos.

Otro inmunosupresor de origen natural es el ácido micofenólico (Bentley, 2000). Este compuesto (Fig. 11), producido por especies de *Penicillium* y otros hongos, fue descubierto como antibiótico a principios del siglo XX, y muestra una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo antibacteriana, antifúngica, antiviral y antitumoral. La búsqueda de derivados del compuesto natural con mayor disponibilidad oral lle-

vó al descubrimiento del profármaco 2-morfolino-etil éster (micofenolato mofetilo, CellCept®), aprobado por la FDA para la prevención del rechazo en transplante renal en 1995, y para el transplante de corazón en 1998. Este fármaco, habitualmente co-administrado con otros agentes inmunosupresores y menos tóxico que aquellos, ha sido también usado experimentalmente para el tratamiento de la artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunes, tales como lupus y psoriasis. El ácido micofenólico es un inhibidor de la inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, enzima involucrada en la biosíntesis *de novo* de guanina, lo cual resulta en una inhibición de la síntesis de ADN. Los linfocitos T y B son particularmente sensibles al ácido micofenólico porque, a diferencia de otros tipos celulares, dependen totalmente de la ruta de síntesis de guanina *de novo*, y prácticamente carecen de la capacidad de reutilizar las purinas libres liberadas en procesos catabólicos. Posiblemente, como consecuencia de la disminución de los niveles de GTP, el compuesto también previene la glicosilación de las moléculas de adhesión implicadas en la infiltración de linfocitos y monolitos en los lugares de rechazo del órgano.

La mizoribina o verdina (Fig. 11) es otro metabolito de origen fúngico con igual mecanismo de acción que el ácido micofenólico, aunque estructuralmente no relacionado. Este compuesto, producido por *Eupenicillium brefeldianum*, se está usando en la clínica en Japón para el transplante de riñón y varias enfermedades autoinmunes (Tsuzuki, 2002).

En los últimos años, ha aparecido un buen número de publicaciones describiendo compuestos de origen microbiano con actividad inmunosupresora. El más interesante de ellos ha sido el denominado ISP-I (Fig. 11). Este compuesto, producido por el hongo *Isaria sinclairii*, fue descubierto como un potente inmunosupresor en 1994, aunque había sido ya aislado de otros hongos como agente antifúngico. El compuesto era más potente que la ciclosporina en varios modelos, pero a diferencia de ésta, no inhibía la producción de IL-2. Posteriormente, se descubrió que el ISP-I es un potente inhibidor (en el rango picomolar) de la serina palmitoiltransferasa, bloqueando la síntesis de esfingolípidos e induciendo apoptosis en una línea de linfocitos T citotóxicos dependiente de IL-2 (Nakamura y cols., 1996). Aunque el producto no es directamente utilizable como candidato clínico, debido a problemas de solubilidad y toxi-

cidad, se han descrito varios análogos sintéticos con mejores propiedades. Uno de estos derivados, el FTY720 (Fig. 11), mostró eficacia en modelos animales de transplante y de varias enfermedades autoinmunes, y se ha ensayado con éxito en ensayos clínicos de transplante de riñón (Brinkmann y Lynch, 2002). El mecanismo de acción del FTY720 parece ser diferente al del ISP-I, ya que no es un inhibidor de la síntesis de esfingolípidos, sino que actúa a través de los receptores S1P (edg), receptores que tienen a la esfingosina 1 fosfato como ligando natural. Aunque el FTY720 es un débil ligando de estos receptores, el metabolito éster fosfato que se forma de manera natural tras su administración en ratas y ratones, tiene una alta afinidad por varios miembros de esta familia de receptores. La activación de los receptores S1P se ha relacionado con la inducción de linfopenia en animales. La retención de los linfocitos en los nodos linfáticos inhibiría la infiltración de linfocitos en los órganos transplantados (Mandala y cols., 2002).

INFLAMACIÓN

Se ha descrito recientemente que el ácido terreico es un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (Btk) en mastocitos. La Btk es activada por interacción con el receptor de IgE de alta afinidad, y está implicada en las cascadas de señalización que llevan a la exocitosis de citoquinas proinflamatorias en la respuesta alérgica. El ácido terreico (Fig. 12) fue aislado originalmente en 1942 como antibiótico a partir de *Aspergillus terreus*, e inhibe la síntesis de proteínas bloqueando la formación de leucil-tRNA en bacterias sensibles. Sin embargo, también se ha demostrado que es un inhibidor específico de la interacción entre Btk y PKC, lo que resulta en una recapitulación del fenotipo de las mutaciones de Btk, sin bloquear muchas otras funciones celulares. Aunque este compuesto no puede ser usado en la clínica debido a su citotoxicidad, podría ser usado como cabeza de serie para generar inhibidores de Btk con mejor perfil terapéutico (Kawakami y cols., 1999).

Aún más recientemente se han descrito unos nuevos macrólidos denominados efomicinas, producidos por una cepa de *Streptomyces* sp., que inhiben la adhesión de leucocitos al endotelio mediada por selectina, tanto *in vitro* como en modelos de ratones. La adhesión mediada por selectina como

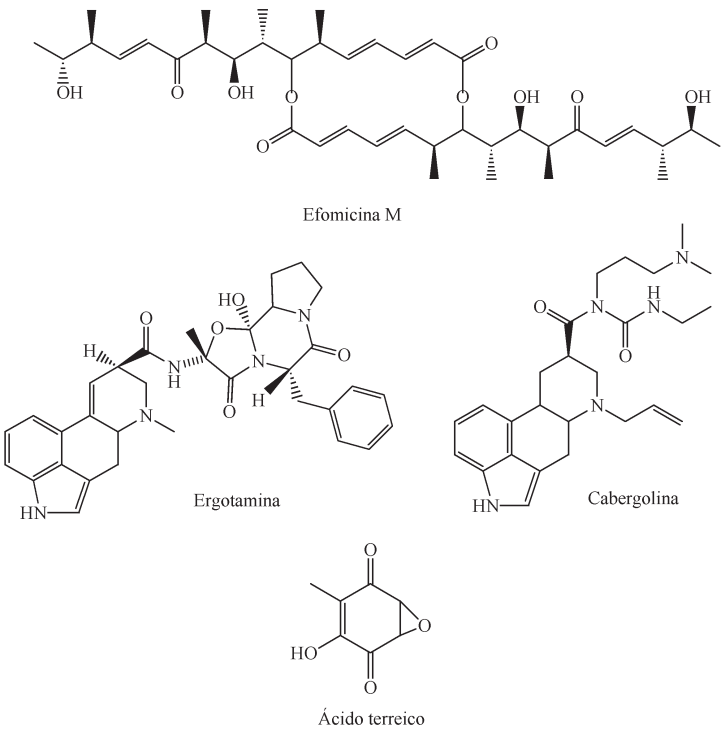


FIGURA 12. *Efomicina M, un agente anti-inflamatorio que inhibe la adhesión de leucocitos al endotelio. Acido terreico, un anti-inflamatorio que inhibe la tirosina quinasa de Bruton (Btk). Ergotamina, un compuesto anti-migraña. Cabergolina, agonista del receptor de dopamina utilizado para tratar la enfermedad de Parkinson.*

iniciador del reclutamiento de leucocitos parece ser relevante en diversas patologías, desde psoriasis y artritis reumatoide hasta infarto de miocardio. Además, la efomicina M (Fig. 12), un derivado semisintético de estos compuestos, demostró eficacia en la disminución de la inflamación cutánea en dos modelos de psoriasis en ratones, mostrando buenas propiedades farmacocinéticas y baja toxicidad. Aparentemente, el efecto de las efomicinas estaría mediado por la inhibición específica de la selectina (Schön y cols., 2002).

SISTEMA NERVIOSO

Los compuestos de origen microbiano más relevantes clínicamente en este área son los alcaloides del ergot. La ergotamina (Fig. 12), el principal

alcaloide del hongo *Claviceps purpurea*, fue la causa de envenenamientos masivos en Europa en la Edad Media, debido a la ingestión de pan de centeno contaminado con esclerocios del hongo (Tfelt-Hansen y cols., 2000). El compuesto, aislado en 1918, ha sido usado para el tratamiento de la migraña desde 1926, sin alternativas específicas durante varias décadas. La ergotamina es capaz de unirse a varios receptores de neurotransmisores, pero a las concentraciones terapéuticas parece actuar principalmente como agonista de los receptores de serotonina 1B/1D, de dopamina D_2 y de los α-adrenoceptores. El efecto farmacológico más evidente de la ergotamina es la vasoconstricción, particularmente acusada en la carótida, lo cual se pensaba constituía la base de sus propiedades anti-migraña, pero hay investigaciones que apuntan que tal efecto puede ser más debido a la inhibición de la inflamación neurogénica y la transmisión neuronal. Aunque este fármaco ha sido usado durante décadas (Cafergot®, Ergostat®), su utilidad es todavía sujeto de controversia (Tfelt-Hansen y cols., 2000). Además, debido a su escasa selectividad, produce numerosos efectos secundarios que limitan su aplicabilidad, y con la introducción de los triptanes, mucho más específicos, la ergotamina ha dejado de ser el fármaco de elcción para médicos y pacientes.

Otros alcaloides del ergot estructuralmente similares usados en la clínica incluyen la ergotoxina (Hydergine®), un vasodilatador para tratar anomalías en la circulación periférica, y la bromocriptina (2-bromo-ergocriptina), un derivado semisintético que es un potente agonista de los receptores D_2 de dopamina, y que se ha utilizado para tratar la enfermedad de Parkinson desde los años 70 (Samuelson, 1999). Este último compuesto también reduce la secreción de prolactina y de hormona del crecimiento, por lo que se ha usado también para detener la producción de leche y para el tratamiento de la acromegalia (Samuelson, 1999) y de la hiperprolactinemia debida a prolactinomas. Otros análogos desarrollados más recientemente, como la cabergolina o el terguride, son también agonistas del receptor de dopamina y se están utilizando para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y de las hiperprolactinemias (Shu, 1998).

DIABETES

Uno de los descubrimientos más interesantes de la última década en el campo de los metabolitos microbianos de interés terapéutico fue el de

la bis-desmetil-asterriquinona B1, DMAQ-B1 (Fig. 13). Este compuesto fue descubierto como un agente mimético de insulina con disponibilidad oral mediante un proceso de screening diseñado para detectar moléculas que activaran la tirosina quinasa del receptor de insulina en humanos (Zhang y cols., 1999). El compuesto, producido por un hongo del género *Pseudomassaria*, era selectivo para el receptor de insulina frente a otros receptores con tirosina quinasa asociada, tales como los de IGF-1 o EGF. El compuesto reproduce la actividad de la insulina en varios ensayos bioquímicos y celulares, incluyendo la estimulación del transporte de glucosa en células completas. Lo que es más interesante, la administración de la DMAQ-B1 por vía oral en dos modelos de diabetes de tipo II en ratones produjo una disminución significativa de los niveles de glucosa y la supresión de los altos niveles de insulina asociados con estos mode-

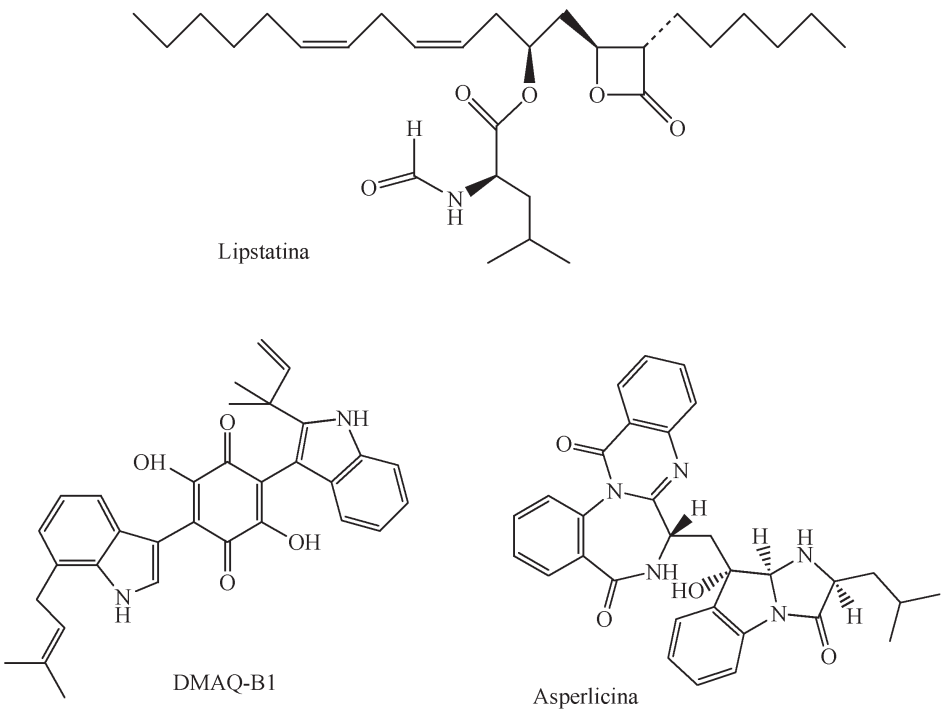


FIGURA 13. *Lipstatina, un inhibidor de la lipasa pancreática para el tratamiento de la obesidad. DMAQ-B1 (desmetil-asterriquinona B1), un activador de la tirosina quinasa del receptor de insulina con potencial para el tratamiento de la diabetes. Asperlicina, un antagonista del receptor de colecistoquininas CCK-A.*

los animales. El descubrimiento fue saludado como un avance importante en el desarrollo de nuevos agentes antidiabéticos orales. Posteriormente, se han descrito derivados semi-sintéticos con mejores características que la DMAQ-B1 y con potencial como agentes anorexigénicos. La administración de estos compuestos via intracerebroventricular resulta en una reducción de la ingesta de comida y el peso corporal en ratas. Además, en un modelo de obesidad inducida por una dieta rica en grasas en ratones, estos compuestos produjeron una disminución del aumento de peso, la adiposidad y la resistencia a insulina (El Air y cols., 2002).

OBESIDAD

El orlistat o tetrahidrolipstatina (Xenical®) es el primero de una nueva clase de compuestos desarrollado por Roche para combatir la obesidad severa, cuyo mecanismo de acción es la inhibición de las lipasas. Este fármaco es un derivado de la lipstatina (Fig. 13), un compuesto producido por una cepa de *Streptomyces toxytricini*. Este compuesto, que no es absorbido, ejerce su acción en el lumen del intestino delgado y reduce la absorción de grasa en casi el 30% por inhibición de las lipasas gástricas y pancreáticas. El orlistat se está utilizando tanto para la reducción de peso en pacientes obesos como en aquellos que además padecen diabetes de tipo 2 (Proietto y cols., 2000; Heck y cols., 2000).

ANTAGONISTAS DE COLECISTOQUININA

Las colecistoquininas (CCKs) son hormonas peptídicas y neurotransmisores ampliamente distribuidas a través del tracto gastrointestinal y el sistema nervioso central, y median un buen número de funciones fisiológicas. Existen dos subtipos de receptor, CCK-A y CCK-B, el primero de los cuales predomina en tejidos periféricos, mientras que el segundo es más abundante en sistema nervioso central. La asperlicina (Fig. 13) fue descubierta en 1984 por científicos de Merck como un antagonista selectivo de CCK-A producida por *Aspergillus alliaceus* (Chang y cols., 1985). Este descubrimiento representó un hito científico, siendo uno de los primeros ligandos no peptídicos descritos para un receptor de un péptido. La

asperlicina fue utilizada para desarrollar otros antagonistas más potentes, tales como el candidato clínico MK-329 (devazepide) y otros compuestos que han sido ensayados en humanos (Patchett, 2002). Así, el devazepide fue ensayado como una posible terapia anti-ulcerosa, pero problemas de toxicidad detuvieron su desarrollo. Debido a que tanto el MK-329 como la asperlicina inhibieron el crecimiento de tumores de páncreas en ratones atímicos, el MK-329 fue ensayado en pacientes con cáncer pancreático, pero no demostró eficacia. Otros derivados de la asperlicina selectivos para receptores CCK-B han sido desarrollados más recientemente como candidatos para el tratamiento de ansiedad, pánico y dolor (Shu, 1998). Algunos de estos compuestos se han ensayado ya en humanos, con resultados poco concluyentes (McDonald, 2001).

CONCLUSIONES Y FUTURO

Como se ha visto en este capítulo, los metabolitos microbianos poseen una amplia gama de actividades biológicas, desde antibióticos en el más amplio sentido de la palabra, hasta inhibidores o activadores de enzimas, receptores y otros procesos biológicos. En algunos casos ésto ha resultado en fármacos clínicamente útiles, con un impacto muy importante en la historia de la medicina moderna. Otros compuestos progresaron más allá de la etapa de descubrimiento, pero tuvieron que ser abandonados por una u otra razón, o están todavía en ensayos clínicos.

La vasta diversidad estructural de los metabolitos secundarios de origen microbiano, combinada con su reconocida capacidad para interaccionar con sistemas biológicos, debería hacer a hongos y bacterias una fuente atractiva de compuestos para los programas de descubrimiento de fármacos en la industria. Sin embargo, debido a la fuerte competencia de la química de síntesis y a las dificultades asociadas a la investigación en productos naturales, es evidente que este tipo de programas han perdido el favor de la industria farmacéutica. Las desventajas comúnmente asociadas a los productos naturales van desde los altos costes y el tiempo requerido para aislar y elucidar las estructuras de los compuestos activos, hasta la percepción de que los extractos de productos naturales no son compatibles con algunas de las tecnologías de detección en los ensayos usados en laboratorios de *ultra-high throughput screening* (cribado de alta densidad). Aunque parte de lo ante-

rior es cierto, sigue siendo verdad que los microorganismos son una valiosa fuente de nuevas estructuras químicas con actividad biológica, y ello debería mantenerlos como un recurso más para la industria. Una reciente revisión ha estimado que el 50% de todas las NCEs (nuevas entidades químicas) aprobadas por la FDA en el periodo 1981-2002 son de origen natural o están inspiradas en moléculas existentes en la naturaleza, sin contar vacunas y otras macromoléculas de uso terapéutico (Newman y cols., 2003). Sólo mediante la superación de las desventajas mencionadas, utilizando sistemas más eficientes para recortar el tiempo y los costes necesarios para avanzar desde las cepas aisladas hasta los compuestos activos, podrán los microorganismos volver al sitio que les corresponde, en el núcleo de los programas de descubrimiento de nuevos fármacos en la industria farmacéutica.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Air, E.L., Strowski, M.Z., Benoit, S.C., *et al.* (2002) Small molecule insulin mimetics reduce food intake and body weight and prevent development of obesity. Nature Med. 8: 179-183.

(2) Ali, S.M., Chee, S.K., Yuen, G.Y., *et al.* (2002) Hypocrellins and hypericin induced apoptosis in human tumor cells: a possible role of hydrogen peroxide. Int. J. Mol. Med. 9: 461-472.

(3) Abbanat, D., Macielag, M., Bush, K. (2003) Novel antibacterial agents for the treatment of serious Gram positive infections. Expert Opin. Investig. Drugs 12: 379-399.

(4) Ackermann, G., Rodloff, A.C. (2003) Drugs of the 21st century: telithromycin (HMR 3647) - the first ketolide. J. Antimicrobial Chemother. 51: 497-511.

(5) Amemiya, H. (1996) 15-deoxyspergualin: A newly developed immunosuppressive agent and its mechanism of action and clinical effect: A review. Artificial Organs 20: 832-835.

(6) Ashizawa, T., Kawashima, K., Kanda, Y., *et al.* (1999) Antitumor activity of KF22678, a novel thioester derivative of leinamycin. Anti Cancer Drugs 10: 829-836.

(7) Bentley, R. (2000) Mycophenolic acid: a one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant. Chem. Rev. 100: 3801-3825.

(8) Bergstrom, J.D., Dufresne, C., Bills, G.F., *et al.* (1995) Discovery, biosynthesis and mechanism of action of the zaragozic acids: potent inhibitors of squalene synthase. Annu. Rev. Microbiol. 49: 607-639.

(9) Best, J.D., Jenkins, A.J. (2001) Novel agents for managing dyslipidaemia. Expert Opin. Investig. Drugs 10: 1901-1911.

(10) Bonfiglio, G., Furneri, P.M. (2003) Patents on streptogramin antibiotics. Expert Opin. Ther. Patents. 13: 651-659.

(11) Borzilleri, R.M., Vite, G.D. (2002) Epothilones: new tubulin polymerization agents in preclinical and clinical development. Drugs Future 27: 1149-1163.

(12) Brinkmann, V., Lynch, K.R. (2002) FTY720: targeting G-protein-coupled receptors for sphingosine 1-phosphate in transaplantation and autoimmunity. Curr. Opin. Immunol. 14: 569-575.

(13) Bush, K., Macielag, M., Clancy, J. (2000) 'Superbugs': new antibacterials in the pipeline. Emerging Drugs 5: 347-365.

(14) Cacciari, B., Romagnoli, R., Baraldi, P.G., *et al*. (2000) CC-1065 and the duocarmycins: recent developments. Expert Opin. Ther. Patents 10: 1853-1871.

(15) Chang, R.S.L., Lotti, V.J., Monaghan, R.L., *et al*. (1985) A potent nonpeptide cholecystokinin receptor antagonist with selectivity for peripheral tissues isolated from *Aspergillus alliaceus*. Science 230: 177-179.

(16) Chopra, I. (1998) Protein synthesis as a target for antibacterial drugs: current status and future opportunities. Expert Opin. Investig. Drugs 7: 1237-1244.

(17) Chu, M., Mierzwa, R., Jenkins, J., *et al*. (2002) Isolation and characterization of novel oligosaccharides related to Ziracin. J. Nat. Prod. 65: 1588-1593.

(18) Cragg, G.M., Newman, D.J. (2000) Antineoplasic agents from natural sources: achievements and future directions. Expert Opin. Investig. Drugs 9: 2783-2797.

(19) Crespo, J.L., Hall, M.N. (2002) Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66: 579-591.

(20) Darkin-Rattray, S.J., Gurnett, A.M., Myers, R.M., *et al*. (1996) Apicidin: a novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93: 13143-13147.

(21) Erba, E., Bergamaschi, D., Ronzoni, S., *et al*. (1999) Mode of action of thiocoraline, a natural marine compound with anti-tumour activity. Br. J. Cancer 80: 971-980.

(22) Florsheimer, A., Altmann, K.-H. (2001) Epothilones and their analogues - a new class of promising microtubule inhibitors. Expert Opin. Ther. Patents 11: 951-968.

(23) Furumai, R., Komatsu, Y., Nishino, N., *et al*. (2001) Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 98: 87-92.

(24) Gates, K.S. (2000) Mechanisms of DNA damage by leinamycin. Chem. Res. Toxicol. 13: 953-956.

(25) Goel, S., Wadler, S., Hoffman, A., *et al*. (2003) A phase II study of rebeccamycin analog NSC 655649 in patients with metastatic colorectal cancer. Investig. New Drugs 21: 103-107.

(26) Gradishar, W.J., Vogelzang, N.J., Kilton, L.J., *et al*. (1995) A phase II clinical trial of echinomycin in metastatic soft tissue sarcoma-An Illinois Cancer Center study. Investig. New Drugs 13: 171-174.

(27) Hamann, P.R., Hinman, L.M., Beyer, C.F., *et al*. (2002). An anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. Choice of linker. *Bioconjugate Chem. 13*: 40-46.

(28) Hamel, E. (1992) Natural products which interact with tubulin in the vinca domain: Maytansine, rhizoxin, phomopsin A, dolastatins 10 and 15 and halichondrin B. Pharmacol. Ther. 55: 31-51.

(29) Heck, A.M., Yanovski, J.A., Calis, K.A. (2000) Orlistat, a new lipase inhibitor for the management of obesity. Pharmacotherapy. 20: 270-279.

(30) Ishii, T., Hayashi, K., Hida, T., *et al*. (2000) TAN-1813, a novel ras-farnesyltransferase inhibitor produced by *Phoma* sp. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities in vitro and in vivo. J. Antibiot. 53: 765-778.

(31) Kaplan, S., Hanauske, A.R., Pavlidis, N., *et al*. (1996) Single agent activity of rhizoxin in non-small-cell lung cancer: A phase II trial of the EORTC Early Clinical Trials Group. Br. J. Cancer 73: 403-405.

(32) Kawakami, Y., Hartman, S.E., Kinoshita, E., *et al*. (1999) Terreic acid, a quinone epoxide inhibitor of Bruton's tyrosine kinase. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 96: 2227-2232.

(33) Khare, M., Keady, D. (2003) Antimicrobial therapy of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection. Expert Opin. Pharmacother. 4: 165:177.

(34) Kim, M.S., Kwon, H.J., Lee, Y.M., *et al*. (2001) Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. Nature Med. 7: 437-443.

(35) Kunz, J., Hall, M.N. (1993) Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression. Trends Biochem. Sci. 18: 334-338.

(36) Krämer, O.H., Göttlicher, M., Heinzel, T. (2001) Histone deacetylase as a therapeutic target. Trends Endocrinol. Metabol. 12: 294-300.

(37) Kruger, E.A., Figg, W.D. (2000) TNP-470: An angiogenesis inhibitor in clinical development for cancer. Expert Opin. Investig. Drugs 9: 1383-1396.

(38) Lociuro S., Tavecchia P., Marzorati E., *et al*. (1997) Antimicrobial activities of chemically modified thiazolyl peptide antibiotic MDL 62,879 (GE2270A). J. Antibiotics 50: 344-349.

(39) Maloney, A., Workman, P. (2002) HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds. Expert. Opin. Biol. Ther. 2: 3-24.

(40) Mandala, S., Hadju, R., Bergstrom, J., *et al*. (2002) Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. Science 296: 346-349.

(41) Mandala, S.M., Harris, G.H. (2001) Isolation and characterization of novel inhibitors of sphingolipid synthesis: australifungin, viridiofungins, rustmicin, and khafrefungin. Methods Enzymol. 311: 335-348.

(42) Mc Cafferty, D.G., Cudic, P., Frankel, B.A., *et al*. (2002) Chemistry and biology of the ramoplanin family of peptide antibiotics. Biopolymers (Peptide Science) 66: 261-284.

(43) McDonald, I.M. (2001) CCK_2 receptor antagonists. Expert Opin. Ther. Patents 11: 445-462.

(44) Meinke, P.T. (2001) Perspectives in animal health: old targets and new opportunities. J. Med. Chem. 44: 641-659.

(45) Molina, J.M., Tourneur, M., Sarfati, C., *et al*. (2002) Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis New Engl. J. Med. 346: 1963-1969.

(46) Mora-Duarte, J., Betts, R., Rotstein, C., *et al*. (2002) Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. New Engl. J. Med. 347: 2020-2029.

(47) Nakamura, S., Kozutsumi, Y., Sun, Y., *et al*. (1996) Dual roles of sphingolipids in signaling of the escape from and onset of apoptosis in a mouse cytotoxic T-cell line, CTLL-2. J. Biol. Chem. 271: 1255-1257.

(48) Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. (2003) Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. J. Nat. Prod. 66: 1022-1037.

(49) Patchett, A.A. (2002). 2002 Alfred Burger Award address in medicinal chemistry. Natural products and design: interrelated approaches in drug discovery. J. Med. Chem. 45: 5609-5616.

(50) Pierson, A.S., Gibbs, P., Richards, J., *et al*. (2002) A phase II study of Irofulven (MGI 114) in patients with stage IV melanoma. Investig. New Drugs 20: 357-362.

(51) Plosker, G.L., Barradell, L.B. (1996) Cyclosporin. A review of its pharmacological properties and role in the management of graft versus host disease. Drug Eval. 5:59-90.

(52) Proietto, J., Fam, B.C., Aisnlie, D.A., *et al*. (2000) Novel anti-obesity drugs. Expert. Opin. Investig. Drugs 9: 1317-1326.

(53) Prudhomme, M. (2003) Rebeccamycin analogues as anti-cancer agents. Eur. J. Med. Chem. 38: 123-140.

(54) Samuelson, G. (1999) Drugs of Natural Origin. 551 pg. Pharmaceutical Press: Stockholm (Suecia).

(55) Schön, M.P., Krahn, T., Schön, M., *et al*. (2002) Efomycine M, a new specific inhibitor of selectin, impairs leukocyte adhesion and alleviates cutaneous inflammation. Nature Med. 8: 366-372.

(56) Searcey, M. (2002) Duocarmycins-Natures prodrugs? Current Pharmaceutical Design. 8: 1375-1389.

(57) Shu, Y.-Z. (1998) Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. J. Nat. Products 61: 1053-1071.

(58) Sin, N., Meng, L., Wang, M.Q.W., *et al*. (1997) The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94: 6099-6103.

(59) Singh, M.P., Petersen, P.J., Weiss, W.J., *et al*. (2003) Mannopeptimycins, new cyclic glycopeptide antibiotics produced by *Streptomyces hygroscopicus* LL-AC98: antibacterial and mechanistic activities. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 62-69.

(60) Tally, F.P., Zeckel, M., Wasilewski M.M., *et al*. (1999) Daptomycin: a novel agent for Gram-positive infections. Expert Opin. Investig. Drugs 8: 1223-1238.

(61) Tfelt-Hansen, P., Saxena, P.R., Dahlöf, C., *et al*. (2000) Ergotamine in the acute treatment of migraine. A review and European consensus. Brain 123: 9-18.

(62) Thorson, J.S., Sievers, E.L., Ahlert, J., *et al*. (2000) Understanding and exploiting nature's chemical arsenal: The past, present and future of calicheamicin research. Current Pharmaceutical Design 6: 1841-1879.

(63) Tolcher, A.W., Aylesworth, C., Rizzo, J., *et al*. (2000) A phase I study of rhizoxin (NSC 332598) by 72-hour continuous intravenous infusion in patients with advanced solid tumors. Ann. Oncol. 11: 333-338.

(64) Tsuzuki, K. (2002) Role of mizoribine in renal transplantation. Pediatr. Int. 44: 224-231.

(65) Vicente, F., Basilio, A., Cabello, A., *et al*. (2003) Natural products as a source of antifungals. Clin. Microbiol. Infect. 9: 15-32.

(66) Vilella, D., Sánchez, M., Platas, G., *et al*. (2000) Inhibitors of farnesylation of Ras from a natural products screening program. J. Ind. Microbiol. Biotech. 25: 315-327.

(67) Villanueva, A., Gotuzzo, E., Arathoon, E.G., *et al*. (2002) A randomized double-blind study of caspofungin versus fluconazole for the treatment of esophageal candidiasis. Am. J. Med. 113: 294-299.

(68) Walsh, C.T. (2003) Antibiotics. Actions, Origins, Resistance. Washington D.C: ASM Press. Pg. 1-335.

(69) Wang, W.X., Waters, S.J., MacDonald, J.R., *et al*. (2002) Irofulven (6-hydroxymethylacylfulvene, MGI 114)-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells is mediated by ERK and JNK kinases. Anticancer Res. 22: 559-564.

(70) Woodford, N. (2003) Novel agents for the treatment of resistant Gram-positive infections. Expert Opin. Investig. Drugs 12: 117-137.

(71) Zhang, B., Salituro, G., Szalkowski, D., *et al*. (1999) Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. Science 284: 974-977.

(72) Zhu, J. (1999) Recent developments in reversing glycopeptide-resistant pathogens. Expert Opin. Ther. Patents 9: 1005-1019.

Farmacogenética, farmacogenómica y proteómica en la medicina personalizada

MANUEL ORTEGA MATA
Académico de Número

Fue en el año 1959 cuando Fredrich Vogel (1) usó por primera vez el término Farmacogenética, para designar el estudio del papel que juega la variación de los genes individuales en la respuesta a los medicamentos, ante los numerosos ejemplos de lo que solía denominarse idiosincracia a medicamentos tales como: anestésicos, opiáceos, quimioterápicos anticancerígenos, etc.

Farmacogenómica, por su parte, tiene su inicio más recientemente y su relación con la Farmacogenética no está exenta de controvertidas interpretaciones entre los investigadores de la materia.

Una aproximación que nos puede ayudar a entender el contenido de la Farmacogenómica, podemos encontrarla si nos fijamos en el sufijo «**ómica**», que ya aparece en la genómica, y que como sabemos, representa el estudio del total de genes presentes en cualquier organismo. El mismo sufijo aparece en la Proteómica, que estudia el conjunto de proteínas, y sus interacciones, que se pueden encontrar en un instante dado en una determinada célula. De acuerdo con lo anterior, la Farmacogenómica habrá que verla por tanto, como el estudio del total de genes farmacológicamente relevantes, así como de la forma en que dichos genes manifiestan sus variaciones y de qué manera estas variaciones pueden interaccionar para configurar el fenotipo de cada individuo, en lo que afecta a su respuesta a los medicamentos.

Una forma de introducirnos en el estudio de esos genes que hemos denominado farmacológicamente relevantes, es la consulta de los textos de Farmacología.

La cifra de dichos genes se estima que puede estar entre 500 y 1.000. Sin embargo, la Compañía Cura-Gen (New Haven, Connecticut) manifiesta que está trabajando con 8.200 genes que para ellos representan los que denominan *pharmaceutical tractable genoma* (2). Lo aconsejable, tal vez, si se desea profundizar en el tema, es acudir a la página Web de PharmGKB (http://www.pharmgkb.org/) y así conocer datos actualizados sobre los citados genes.

Variabilidad en la respuesta de los pacientes a los medicamentos constituye la regla, y no la excepción, para la gran mayoría de los mismos. Por eso, el llegar a comprender las bases moleculares de la acción farmacológica, o tóxica, de los medicamentos, así como los determinantes genéticos que pueden influir en sus respuestas farmacológicas, optimizará el uso de los mismos, en lo que ya se conoce como medicina personalizada, que viene a significar la administración a cada individuo del medicamento adecuado a la patología que padece, a las dosis también adecuadas para salvaguardar la eficacia y seguridad del mismo, y en el horario prefijado, compatible con lo anterior.

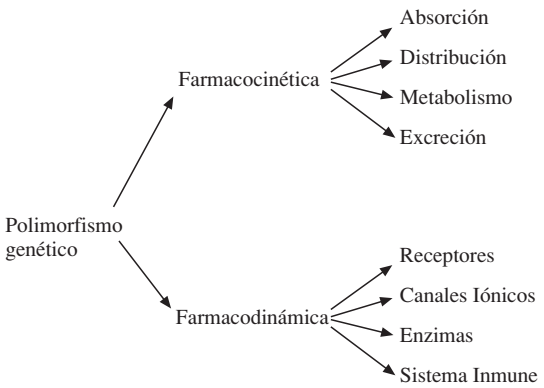
El fundamento de la variabilidad en la respuesta a los medicamentos en la especie humana, hay que buscarlo en su polimorfismo genético, que se produce por la variación en la secuencia del ADN y que puede ser de varios tipos: a) por la simple sustitución de una base, lo que da origen a lo que se conoce como *polimorfismo de un nucleótido* (SNP); b) por inserción o delección de una base en el ADN; c) por la inserción o deleccción de un conjunto de bases, en número de cientos a miles; d) inserción o delección, repetidas veces, de una o más bases, constituyendo los denominados microsatélites.

En lo que respecta a los SNP, son ya alrededor de cuatro millones los registrados en las bases de datos, a las que se puede acudir en consulta para su actualización (www.ncbi.nlm.nih.gov/ SNP).

La consecuencia genotípica para un determinado individuo, dependerá de la localización en el gen de los citados SNP, que podremos resumirlos así: a) que se sitúe en la región codificadora del gen, con la consiguiente alteración de la secuencia de los aminoácidos de la proteína codificada, lo que puede afectar a su estructura y, por tanto, a su papel fisiológico en el organismo humano; b) que se sitúe el SNP en la región reguladora del gen, lo que puede conllevar que se vea afectada la capacidad de enlace de los

factores de transcripción al gen y, en definitiva, que se vean afectados los niveles normales de expresión del citado gen; c) que se localicen en las regiones no-codificadoras del genoma, en cuyo caso está por conocer el impacto que pueden tener sobre el fenotipo de un individuo, aunque su estudio es del mayor interés como marcadores en la identificación forense y en determinados procesos patológicos de origen genético.

Concretándonos al organismo humano, la acción farmacológica de un medicamento estará condicionada por el polimorfismo genético, que influirá tanto en el proceso de farmacocinética como en el de farmacodinámica, que pueden representarse esquemáticamente así:



El principal problema con el que hay que enfrentarse para que la que se ha denominado medicina personalizada llegue a tener plena vigencia, es el de poder disponer de la metodología analítica que nos permita identificar la existencia de un determinado polimorfismo genético en la persona a la que se pretende medicar, y que pueda, en algún sentido, condicionar dicha medicación

Afortunadamente, se está avanzando mucho en el desarrollo de las técnicas analíticas, como tendremos ocasión de comprobar, que nos permiten adentrarnos en la búsqueda del polimorfismo genético, a través de los siguientes caminos: a) identificación de los SNP; b) identificación de la existencia de pérdidas o multiplicación de los genes implicados y c) la determinación de los perfiles de expresión de los genes mediante la utilización de los «chips» de ADN apropiados.

TRANSPORTADORES

El papel que juegan los transportadores en los procesos de absorción, distribución y excreción de los medicamentos es esencial, condicionando sus procesos farmacocinéticos en el organismo humano.

No es intento fácil tratar de sistematizar el estudio de estos transportadores, si tenemos en cuenta que, la estimación que se hace sobre el número de genes codificadores de los mismos es superior a 500, pero que pueden llegar a los 1.200.

En un primer intento podemos considerar aquéllos que por su función actúan como una bomba que consume energía, cuya misión es la de exportar al sustrato correspondiente desde el interior al exterior de las células, constituyendo la superfamilia de transportadores conocidos como *ATP-binding cassette* (ABC). Hasta el momento son más de 40 ABC transportadores humanos los que han sido identificados y secuenciados. Dichos transportadores se clasifican en 7 subfamilias que van desde la ABC-A a la ABC-G.

El más estudiado dentro de este primer grupo es la P-glicoproteína (P-gp) considerada la responsable del fenómeno de resistencia a múltiples fármacos (MDR) en el tratamiento de procesos cancerosos con los quimioterápicos, en virtud de su expresión en las membranas de las células cancerosas (MDRI/P-gp). Se trata de una proteína glicosilada con un peso molecular de 170kDa, que contiene 1280 aminoácidos formando dos mitades homólogas con seis segmentos transmembrana hidrofóbicos y un segmento intracelular, con un sitio de enlace para el ATP. Dichas dos mitades están unidas por un polipéptido flexible de enlace.

Esta P-gp se expresa también en diversos tejidos humanos normales, como el hígado, el riñón, el páncreas y en la barrera hemato-encefálica. De especial interés es comprobar que la P-gp se expresa funcionalmente en los enterocitos que bordean el epitelio del tracto intestinal, donde juega un importante papel, en unión a los procesos metabólicos, en la función de barrera del intestino a los medicamentos y xenobióticos en general. En el caso de los fármacos, quiere decir que la P-gp puede condicionar la biodisponibilidad de los mismos, independientemente de su naturaleza química, como ocurre, por ejemplo, en la ciclosporina A, la digoxina, la vimblastina, el talinolol, etc.

Avancemos que ya en el año 2000, Hoffmeyer (3) había detectado para el gen codificador de la P-gp, o MDR1, o ABCB1, según la nomenclatura utilizada, la existencia de 15 SNP. A título de ejemplo podemos citar el polimorfismo en el exón 26, en la posición 3435 (C3435T), que constituye una mutación silente, lo que quiere significar que está afectada la expresión del gen, y concretamente los niveles de P-gp en el duodeno. Ello lleva consigo, por ejemplo, que aquellos individuos portadores de dicha mutación verán afectada, muy significativamente, la absorción intestinal de la digoxina.

Un segundo tipo de transportadores de membrana lo constituyen las denominadas proteínas relacionadas con la resistencia a los quimioterápicos de las células cancerosas (MRPs), descubiertas en las células cancerosas que presentaban resistencias que no eran atribuibles a los transportadores MDR. Son también unas glicoproteínas capaces de transportar un amplio grupo de fármacos, habiéndose caracterizado un conjunto de ellas desde la MRP1 a la MRP6, distribuidas ampliamente en el organismo humano, y predominantemente en hígado, riñón e intestino. Por esta última circunstancia, cualquier mecanismo que conlleve procesos de inhibición o inducción de los MRP puede contribuir sustancialmente a la biodisponibilidad oral de ciertos fármacos.

El polimorfismo genético de los MRPs está menos estudiado que el de los MDRs, aunque su existencia está comprobada por la información que proporcionan los fenotipos clínicos de determinadas enfermedades hereditarias. Tal es el caso de la MRP2, expresada principalmente en el hígado y cuya función fisiológica más importante es la de la excreción de los glucurónidos de bilirrubina a la bilis, y que se ha relacionado con el denominado síndrome de Dubin-Johnson (DJS), caracterizado por una excreción hepato-biliar alterada. La base molecular del citado síndrome es la ausencia de funcionalidad en el gen MRP2, consecuencia de tres mutaciones en el mismo, lo que hace que no se detecte proteína MRP2 en el hígado de los pacientes con DJS. En algunos individuos, sin embargo, la presencia de los otros miembros de la familia de MRPs en la membrana de los hepatocitos puede compensar, en parte, este defecto de transporte de los compuestos conjugados de bilirrubina.

Un tercer grupo de transportadores se diferencia de los anteriores en que participan en la absorción de sus sustratos (fármacos) al interior de

las células en cuyas membranas se encuentran. Por lo general actúan acoplados a H^+ o Na^+, por lo que la actividad de estos transportadores no sólo dependerá de su capacidad intrínseca de enlace a los sustratos, sino también en función de los gradientes electroquímicos a través de las membranas celulares.

Están descritos los siguientes:

OATs – transportadores para aniones orgánicos.

OATPs – transportadores polipéptidos para aniones orgánicos.

OCTs – transportadores para cationes orgánicos.

PepTs – transportadores peptídicos.

Por su presencia en la pared intestinal, serán determinantes en la biodisponibilidad de gran número de fármacos administrados oralmente. Como ejemplo tenemos el OAT1, que media en la absorción intestinal del antibiótico β-lactámico, cefaloridina; de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) como la aspirina, indometacina y salicilatos; del antitumoral metotrexato, etc. Sustratos endógenos de este transportador son los aniones orgánicos, prostaglandina E2, glutarato, α-cetoglutarato, etc.

El OATP1, por su parte, se localiza principalmente en el cerebro y en el hígado y media en el transporte de ácidos biliares, de la bromosulftaleína, del estradiol 17-glucurónido, del glucósido cardiotónico ouabaína, etc. El OATP2 se expresa específicamente en el hígado y juega un papel fundamental en la incorporación de fármacos aniónicos y sus metabolitos.

Otros fármacos que son sustratos para estos transportadores son: la L-DOPA, el captoprilo, el aciclovir, el ácido valproico, la pravastatina, la cimetidina, el verapamilo, etc.

El polimorfismo genético en este tipo de transportadores es bien manifiesto, como se puede observar en el trabajo de Lidia y cols. (4), en el que catalogan 258 SNP en los genes codificadores de los mismos.

Para la actualización de todo lo referente a los diferentes tipos de transportadores de membrana en el organismo humano (HMTD), se dispone de una base de datos en donde figuran las estructuras, función, distribución en los diferentes tejidos, familia codificadora de genes, polimorfismos, enfermedades relacionadas con cada uno de los transportadores, etc. (http://www.aaps-pharmaceutica.com/scientificjournals/pharmsci/journal/20html).

Hacer una mención de algunos de los trabajos recientemente publicados sobre el polimorfismo genético de los transportadores es la mejor manera de ilustrar su importancia en el diagnóstico de determinados procesos patológicos, junto a su consecuente tratamiento medicamentoso, orientado indudablemente a la prometedora medicina personalizada.

Podemos citar en primer lugar el SIDA, con tratamientos de larga duración con los diferentes «cocktail» de retrovirales y proteasas, que en determinados casos pueden presentar efectos secundarios muy graves. Para instaurar el tratamiento hay dos tendencias; iniciarlo tan pronto se conoce que el paciente es seropositivo para el HIV, o esperar su comienzo hasta que la cifra de CD4 alcance un cierto valor.

En 1998, el HHS *(US Department of Health and Human Services*) recomendaba iniciar el tratamiento en los pacientes que presentaran unas cifras de CD4 inferiores a 500, o que su concentración viral en sangre por mililitro fuese de 20.000 copias de HIV. Estas cifras se cambiaron posteriormente hasta 350 CD4 y 55.000 copias, todo ello tratando de evitar los efectos secundarios y de que el virus adquiriera resistencia a los fármacos. También se han propuesto tratamientos intermitentes de 7 días seguidos de otros 7 días de descanso, o tratamiento durante 18 meses con un seguimiento analítico de la concentración viral, suspendiendo el tratamiento hasta que se compruebe que la citada concentración viral se incrementa.

Dada la magnitud del problema del tratamiento del SIDA Cohen (5) se pregunta qué papel y cuánta ayuda podemos encontrar en la farmacogenética, y muy particularmente si los transportadores del tipo de las P-gp, pueden explicar las diferencias interindividuales en los resultados del tratamiento.

Fellay y colaboradores en un trabajo muy interesante (6) estudian el comportamiento de un grupo de enfermos de SIDA, sometidos a tratamiento con «nelfinavir» y «efavirenz», en los cuales se determinan, previamente, sus características genéticas en lo referente a la expresión de la P-gp (MDR1) y la de las enzimas metabolizadoras CYP3A4, CYP3A5, CYP2D6 y CYP2C19.

Concretándonos en el transportador MDR1, ya hemos apuntado anteriormente, que presenta un polimorfismo genético en el exón 26, en la

posición 3435 (C3435T), lo que origina que se encuentren pacientes con los genotipos TT, CC y CT, que se caracterizan por sus niveles de expresión de la P-gp.

Fellay y cols. hacen un seguimiento de las concentraciones plasmáticas de los fármacos antiretrovirales, así como de los niveles de expresión de la P-gp, de la viremia y del número de células CD4, que permita controlar la efectividad del tratamiento. Lo que encuentran es que a los seis meses de iniciado el tratamiento los enfermos con genotipo TT mostraron un mayor incremento en la recuperación de las células CD4 (257/μL) y una mayor disminución de la viremia, frente al incremento de sólo 165 y 121 células/μL para los genotipos CT y CC, respectivamente. En la discusión se plantean que el beneficio inmunológico que presentan los enfermos con genotipo MDR1 3435TT, que se caracterizan por su baja expresión de la P-gp, puede deberse a una mayor facilidad para la penetración de los fármacos en las poblaciones de células susceptibles a la infección por el HIV-1. Aunque, desgraciadamente, no hay curación para el SIDA en el momento presente, el conocimiento del genotipo para el transportador MDR1, nos puede ayudar a la hora de establecer las pautas de tratamiento más efectivo para cada uno de los individuos.

Otro ejemplo muy demostrativo de la influencia del genotipo MDR1 3435 TT, lo tenemos en el caso de la administración oral de la digoxina, cuya biodisponibilidad será significativamente mas alta en los individuos portadores del mismo (7), dado que la expresión de la Pgp en el duodeno, es muy inferior a la que corresponde a los homozigotos CC y heterozigotos CT. Ello tiene como reflejo el que para la misma dosis de digoxina, los portadores TT tengan una concentración plasmática un 38% más alta que los portadores CC. Si se tiene en cuenta, además, que la digoxina es secretada en el túbulo proximal renal, precisamente con intervención de la P-gp, los individuos con genotipo TT verán reducida su eliminación, lo que puede ponerles en riesgo evidente de presentar posibles efectos adversos a la digoxina, ya que por una parte se aumenta su biodisponibilidad a la vez que su eliminación se ve reducida.

También es interesante otro grupo de transportadores que se localizan en la membrana presináptica del terminal nervioso, que pertenecen

a las **denominadas proteínas transportadoras sodio-dependientes** y entre las que encontramos a la transportadora de la serotonina (5HTT), que juega un papel crítico en la terminación de la neurotransmisión serotoninérgica. Desde el punto de vista farmacológico, representan una diana para fármacos inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (5-HT), como pueden ser la fluoxetina, la sertralina y la paroxetina, en virtud de su implicación en el comportamiento humano, en el estado mental del individuo y, en definitiva, en las condiciones psiquiátricas.

Si nos fijamos, por ejemplo, en los estados depresivos, del 30 al 40% de los pacientes no responden satisfactoriamente al tratamiento inicial impuesto, con el inconveniente añadido de que han debido pasar no menos de seis semanas para comprobar dicha realidad. De ahí el interés que para aproximarse, también en estos casos, a la medicina personalizada, tienen los estudios encaminados al conocimiento del polimorfismo del gen codificador de esa proteína (8,9,10,11).

La proteína 5HTT es codificada por el gen SLC6A4 *(Solute carrier family*) y está situada en el cromosoma 17q11.1 y 17q12, ocupando 31 Kpb que incluyen 14 exones. Se han descrito dos polimorfismos para el citado gen, manifestándose uno de ellos por la presencia de un número variable de copias de un elemento formado por 17 pb, en su segundo intrón. El número de repeticiones pueden ser de 9, 10, 11 o 12 copias, constituyendo los alelos STin2.9, STin2.10, STin2.11 y STin2.12, respectivamente. Este último es el más frecuente y se le designa como alelo **l** («*large*») y a todos los demás como alelos **s** («*small*»). Lo importante es que al no estar situado este polimorfismo en la región codificadora del gen, no se verá alterada la estructura de la proteína codificada 5HTT, pero sí se verá alterado el elemento regulador de la transcripción. El otro polimorfismo es del tipo inserción/delección, y lo constituyen cuatro alelos con unas unidades de 22 pb, que se repiten 14,16,18 o 20 veces. También aquí al alelo de 14 repeticiones, que es muy frecuente, se le designa como alelo **s** y a los demás como alelos **l**, con las consecuencias fisiológicas, como en el caso anterior, de variaciones en la expresión genética.

Efectivamente, en cultivos de líneas celulares de linfoblastos humanos pertenecientes a individuos homozigotos para el alelo **l**, se en-

cuentra una mayor concentración del ARNm de la 5-HT, lo que indica un aumento significativo de la expresión genética, y casi el doble de recaptación de la 5HT, que las de los individuos de genotipos l/s o s/s.

La consecuencia inmediata de los polimorfismos citados, es su asociación a estados neuróticos y a la psicopatología en general.

Concretándonos en la acción farmacológica en relación al polimorfismo de los pacientes, se ha podido ver una mayor eficacia en la respuesta farmacológica de la fluoxetina en los portadores del alelo **l** (12) y lo mismo en la eficacia de la paroxetina en el tratamiento de la depresión, también en portadores del alelo **l**, (13).

METABOLIZADORES DE FÁRMACOS

Tras la administración de un fármaco, el organismo humano procede a su eliminación bien por excreción sin modificación alguna del mismo, o bien tras un proceso previo de biotransformación, con la formación de metabolitos, que podrán ser activos o inactivos. Dicho proceso de biotransformación se realiza, por lo general, en dos fases, lo que da origen a los denominados metabolitos de fases I y II.

Para llevar a cabo este proceso, existen en el organismo humano más de treinta familias de enzimas metabolizadoras, en las que el polimorfismo genético constituye prácticamente la regla general, con la consecuencia de que dichas variantes genéticas podrán originar cambios funcionales en la proteína codificada. De acuerdo con ello, encontraremos individuos con fenotipo de metabolizadores lentos, normales, rápidos y ultra-rápidos. Los primeros serán aquellos en los que la enzima codificada carece de actividad; los normales serán portadores de al menos una copia del gen activo, mientras que los rápidos o ultra-rápidos tendrán duplicado o multiplicado el gen activo.

Las consecuencias para los individuos portadores de estos polimorfismos genéticos podrán ir, desde la ausencia de actividad farmacológica del fármaco administrado, hasta la toxicidad severa del mismo. La importancia de la medicina personalizada se hace una vez más evidente.

En una monografía publicada por la Real Academia Nacional de Farmacia tratamos el tema de la gran familia de los citocromos P450 (CYP) (14), por lo que en esta ocasión, limitaremos su estudio a casos muy concretos.

Tomemos el caso de un fármaco inhibidor de la bomba de protones como es el omeprazol, que usado en combinación con determinados antimicrobianos, tiene una marcada utilidad terapéutica en el tratamiento y prevención de las úlceras gástricas y duodenales. En su uso para la erradicación del *Helicobacter pylori,* la pauta terapéutica recomendada es la de 20 mg de omeprazol dos veces al día durante una semana, unido a 500 mg de amoxicilina en cuatro tomas diarias durante una semana y 200 mg de claritromicina, también en cuatro tomas diarias durante una semana. Siguiendo este protocolo terapéutico, la bibliografía nos muestra que en aquellos pacientes con fenotipo de metabolizadores lentos, se consigue en todos ellos la total erradicación del *H. pylori*. Por el contrario, en los pacientes con fenotipo de metabolizadores rápidos, el fracaso terapéutico es patente en un porcentaje relativamente alto.

Si nos fijamos en el proceso de metabolización del omeprazol, se sabe que en él interviene preferentemente el citocromo P450 CYP2C19 y, en menor proporción, el CYP3A4, dando origen a la formación de dos metabolitos el 5'-hidroxiomeprazol y la omeprazol-sulfona, los cuales en una segunda fase y con intervención de las citadas enzimas, se transforman en omeprazol hidroxisulfona.

Estudiado el polimorfismo del CYP2C19 se ha comprobado que además del que se denomina normal CYP2C19*1, se encuentran otros dos alelos, el CYP2C19*2 y el CYP2C19*3, por lo que los individuos se distribuirán en seis grupos diferentes, atendiendo a su genotipo:

Homozigoto CYP2C19*1//CYP2C19*1 - metabolizadores rápidos.

Heterozigoto CYP2C19*1//CYP2C19*2 - metabolizadores rápidos.

Heterozigoto CYP2C19*1//CYP2C19*3 - metabolizadores rápidos.

Homozigoto CYP2C19*2//CYP2C19*2 - metabolizadores lentos.

Homozigoto CYP2C19*3//CYP2C19*3 - metabolizadores lentos.

Heterozigoto CYP2C19*2//CYP2C19*3 - metabolizadores lentos.

Dado el papel clave que juega el omeprazol en la terapia de erradicación del *H. pylori*, Kita y cols. (15) se plantearon el estudio farmacocinético del omeprazol en individuos sanos con los diferentes genotipos arriba mencionados. Administraron una dosis única de omeprazol de 20, 40, y 80 mg determinando a continuación las concentraciones plasmáticas máximas (C_{max}) y el área bajo la curva de los niveles plasmáticos del omeprazol y sus metabolitos. Basándose en los resultados obtenidos llegaron a la conclusión de que, para alcanzar la eficacia terapéutica de erradicación del *H. pylori* que se obtiene en los pacientes metabolizadores lentos con 20 mg de omeprazol dos veces al día, dicha dosis debe elevarse a 80 mg dos veces al día en el caso de los metabolizadores rápidos.

De forma empírica ya Furuta y cols. (16) habían informado que obtenían la erradicación del *H. pylori* en pacientes clasificados como metabolizadores rápidos con dosis de omeprazol de 40 mg tres veces al día.

Otro ejemplo demostrativo lo tenemos con el fármaco antiarrítmico propafenona metabolizado por el citrocromo CYP2D6, caracterizado también por su marcado polimorfismo. Más de 75 alelos CYP2D6 se han descrito hasta ahora, de los que se puede obtener información en http://www.imm.ki.se/cypalleles. Jazwinska y cols. (17) analizaron la posible correlación existente entre la eficacia antiarrítmica de la propafenona y el fenotipo para el CYP2D6, en 42 pacientes con «fibrilación auricular paroxística» a los que administraban entre 300 y 450 mg/día de propafenona por vía oral. Determinaron la concentración plasmática del fármaco a los 7 días de iniciado el tratamiento, así como a los 11 días y al final del mismo al cabo de 3 meses. Lo relevante de los resultados es que la eficacia del tratamiento fue del 100% en los pacientes con fenotipo de metabolizadores lentos, bajando al 61% en los clasificados normales, y al 0%, es decir, total ineficacia del tratamiento en los de metabolizadores ultra-rápidos.

Citaremos, finalmente, uno de los mejores ejemplos en donde se pone de manifiesto la importancia que están teniendo en la actualidad y su prometedor futuro, los conocimientos derivados de la farmacogenética en el día a día de la clínica médica. Se trata del polimorfismo genético de la enzima tiopurina metil transferasa (TPMT), que participa en el proceso de metabolización de la 6-mercaptopurina (6-MP), de su profármaco aza-

tioprina y de la tioguanina. Su utilización terapéutica es muy variada ya que están indicados en el tratamiento de pacientes con neoplasias, artritis reumatoides, enfermedad inflamatoria intestinal, procesos dermatológicos, enfermedades autoinmunes y en los trasplantes de órganos.

El proceso metabólico de estos derivados de la tiopurina conduce a la formación del compuesto tioguanina nucleótido (TGN), un metabolito activo. Son varias las enzimas encargadas de este proceso, siendo la principal la hipoxantina-fosforibosil-transferasa. En fase posterior el TGN es inactivado, bien por oxidación por la enzima xantina-oxidasa o por metilación por la tiopurina-metil-transferasa.

Numerosos estudios ponen de manifiesto la aparición de toxicidad hematopoyética grave, a veces mortal, cuando ciertos pacientes han sido tratados con dosis de tiopurinas convencionales. La explicación de estos procesos está en el hecho de que en el tejido hematopoyético la actividad de la enzima xantina-oxidasa es mínima, quedando por tanto como único mecanismo de inactivación del TGN la metilación por TPMT. De aquí la importancia de conocer el polimorfismo genético que nos marcará la actividad de la TPMT, ya que la acción tóxica de los fármacos que tratamos vendrá dada por la nula o baja actividad de la misma.

Al menos ocho variantes alélicas están asociadas con una baja actividad de la enzima TMPT (18). De los estudios de población se deduce que aproximadamente el 90% de los individuos tienen actividad alta, el 10% actividad intermedia y el 0,3% actividad baja o no detectable.

Si fijamos nuestro interés en la azatioprina, un fármaco utilizado durante años como tratamiento inmunosupresor en pacientes sometidos a transplantes de órganos, podemos ver que su uso se ha extendido para el tratamiento de enfermedades a las que se le supone un origen inmunológico. Este es el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal, de la que existe un estudio con más de 700 pacientes que reciben una dosis fija de 2 mg/kg/día, en el que se describe que el 5% de los pacientes mostraron signos evidentes de toxicidad para la médula ósea, y de entre ellos, tres desarrollaron pancitopenia y dos murieron tras un proceso séptico. La pregunta inmediata es si estas muertes podían haber sido evitadas con un tratamiento individualizado, tras el estudio de las características genéticas de los pacientes, en lo que se refiere a la TPMT.

Para determinar la actividad de las TPMT, se puede recurrir a una prueba bioquímica utilizando hematíes lisados del paciente. En este caso, hay que tener en cuenta la posibilidad de falsos resultados si el paciente ha sido sometido previamente a transfusiones sanguíneas, como suele ser muy frecuente en las patologías como las leucemias, en las que están indicados los derivados de la tiopurina. En la actualidad, sin embargo, con la tecnología de los *chips* de ADN es posible detectar todas las mutaciones conocidas del gen codificador que conducen a la inhibición de la actividad de la TPMT, con una seguridad casi completa.

RECEPTORES

Con la administración de la mayoría de los fármacos, lo que se busca es su interacción en el organismo con las denominadas dianas terapéuticas, entre las cuales se incluyen los receptores, y de cuya interacción se espera la respuesta farmacológica deseada.

Numerosos estudios han permitido identificar la existencia de polimorfismos en dichos receptores, lo que condicionará las diferencias interindividuales como respuesta a un determinado fármaco.

En este caso, sin embargo, estas diferencias interindividuales no son tan manifiestas como las que se han podido apreciar en el del polimorfismo de las enzimas metabolizadoras, en que podían llegar a verse diferencias en su actividad de hasta 1000 veces, en más y en menos, entre los distintos individuos. Para los receptores, las máximas diferencias en respuesta farmacológica derivadas del polimorfismo genético, no superarán las veinte veces.

Tomaremos como ejemplo el de los fármacos que actúan como agonistas selectivos del receptor β_2-adrenérgico, que constituyen los principales agentes broncodilatadores para el tratamiento de los procesos asmáticos, uno de los grandes problemas de la clínica médica actual. Están publicados datos referidos al Reino Unido, en los que se indica que la prevalencia de los procesos asmáticos es de 3 a 4 veces más alta en los adultos y 6 veces más alta en los niños que lo era hace 25 años (*Asthma Audit 2001 summary*). Otros datos significativos son que, en el momento actual, el número de individuos en tratamiento de procesos asmáticos es de 5,1 millones, con un coste estimado de 850 millones de libras por año.

Los procesos asmáticos son consecuencia de una serie de interacciones complejas entre la exposición al medio ambiente, y constituyentes genéticos de susceptibilidad. Igualmente, las grandes diferencias interindividuales, en la respuesta a los tratamientos, también encuentran su explicación en la influencia de factores ambientales y genéticos.

En la búsqueda de tratamientos que resuelvan los problemas individuales, Dewar y Hall (19) se preguntan si la respuesta a la medicina personalizada para los procesos asmáticos no estará en la farmacogenética.

El gen que codifica el receptor β_2-adrenérgico se encuentra en el cromosoma 5q31-32. Dicho receptor actúa acoplado a un miembro de la gran familia de las proteínas G, que funcionan como transductores de señales en las membranas celulares, conectando receptores a efectores. Las proteínas G están formadas por tres sub-unidades α, β γ, estando identificadas actualmente 20 subunidades α, 6 β y 11 γ. En una primera aproximación se habla de que, en el genoma humano, se encuentran aproximadamente unas 600 proteínas G acopladas a receptores.

Los receptores β_2-adrenérgicos están ampliamente distribuidos en nuestro organismo, y juegan un importante papel en la regulación de las funciones cardiacas, vasculares, pulmonares y metabólicas. En el caso de los pulmones, su estimulación produce una acción brocodilatadora.

Se han identificado cinco SNPs diferentes en el receptor β_2, los cuales se asocian con alteraciones en la expresión, regulación o acoplamiento del receptor. Tal es el caso del SNP que origina un cambio en el aminoácido en posición 16 de Arg a Gly, en el que los pacientes homozigotos para la arginina muestran una mayor respuesta a los agonistas β_2. Está demostrado en la respuesta a la administración oral de albuterol, que es 6,5 veces más alta en pacientes con genotipo Arg/Arg que en los Gly/Gly, medida por el FEV_1 (volumen expiratorio forzado en 1 segundo), aunque en ambos casos las concentraciones plasmáticas del albuterol eran similares (20).

Otros trabajos vienen a demostrar que el tratamiento de los pacientes asmáticos con inhaladores de agonistas β_2, muestra una mejor relación entre la respuesta broncodilatadora y el haplotipo del paciente, que entre dicha respuesta y cualesquiera de los SNP (21). Ello no es de extrañar dado que la estructura del haplotipo puede definir mejor las consecuencias fenotípicas que la que se puede predecir de un SNP.

De ahí que se haya planteado la realización de un nuevo tipo de mapa genómico, el mapa de haplotipos (Hap.Map), con el que se podrá acelerar la búsqueda de genes relacionados con enfermedades complejas (22). Recordemos que un haplotipo lo constituye un bloque definido de ADN, que se sitúa dentro de un espacio fijado de un cromosoma, y en él se integrarán un cierto número de SNP_s que serán los que definen a cada haplotipo.

Otro tipo de fármacos que se usa en el tratamiento de los procesos asmáticos son los glucocorticoides, agentes conocidos por su potente acción antiinflamatoria. Sin embargo, la práctica clínica reconoce la existencia de un grupo de pacientes que no responde a esta medicación y que se pueden clasificar como asmáticos resistentes a los glucocorticoides. En ellos se incluirán aquellos en los que tras recibir, por ejemplo, 40 mg de prednisolona durante una o dos semanas, no se aprecia mejoría en el valor del FEV_1. Los glucocorticoides en el organismo se unen a un receptor localizado en el citoplasma celular, originando un cambio conformacional del mismo, a la vez que se produce una disociación de su complejo proteico. Están descritas variantes genéticas en el gen codificador del receptor para los glucocorticoides, pero la manera en que estas variantes pueden condicionar el fenotipo de individuos resistentes, está por estudiar (23, 24).

Otra importante patología que podría beneficiarse mucho de los estudios farmacogenéticos y farmacodinámicos, son los trastornos psiquiátricos en los que es frecuente encontrar personas que no reponden a los tratamientos al uso. Así en el caso de la esquizofrenia, en el que tras el tratamiento con antipsicóticos se puede encontrar entre un 20% y un 30% de pacientes que no responden en forma deseable a los tratamientos iniciales, con el consiguiente sufrimiento de los pacientes y sus familiares. La esquizofrenia está considerada como enfermedad mortal, ya que alrededor del 10% de los pacientes fallecen tras un acto suicida.

Los trastornos psiquiátricos, en general, están asociados a múltiples genes, proteínas y rutas metabólicas, que pueden interaccionar entre si. En la esquizofrenia, de acuerdo con la evidencia actual, están implicadas la dopamina, la serotonina, el glutamato, el ácido gamma amino butírico (GABA) y diversos neuropéptidos.

En las pautas de tratamiento farmacológico se utilizan neurolépticos denominados típicos o convencionales, que pueden ocasionar efectos extrapiramidales no deseados, y neurolépticos atípicos, capaces de

mejorar tanto los síntomas positivos como los negativos de la esquizofrenia sin ocasionar estos efectos extrapiramidales. Como representante de estos últimos tenemos la clozapina, que clínicamente muestra su utilidad en aquellos pacientes que no responden a la terapia convencional. La eficacia de la clozapina parece deberse a su capacidad para interactuar con diversos receptores cerebrales, exhibiendo una acción antagonista simultánea sobre los receptores de dopamina, serotonina, noradrenalina, acetilcolina e histamina. Fármacos de este tipo en el tratamiento de enfemedades de origen tan complejo, están evitando el empleo de la polifarmacia.

Existe la hipótesis del papel que está jugando la dopamina en la esquizofrenia, fundamentada en las observaciones de que compuestos con acción agonista sobre los receptores de dopamina, son capaces de producir psicosis que se asemejan a los síntomas de la esquizofrenia, mientras que los medicamentos efectivos en el tratamiento, son antagonistas de los citados receptores. Se conocen cinco subtipos de receptores para la dopamina, D_1, D_2, D_3, D_4 y D_5, codificados por los genes DRD1 a DRD5, en todos los cuales la existencia de polimorfismos se ha puesto bien de manifiesto. Estos receptores actúan acoplados a diferentes miembros de la ya citada superfamilia de proteínas G.

En los estudios farmacogenéticos, se investiga la relación entre la respuesta de los pacientes a los antipsicóticos y su genotipo para los codificadores de los receptores.

Se puede tomar como ejemplo el gen DRD4 con gran número de polimorfismos, que se caracteriza por el hecho de que la afinidad de la clozapina a su receptor D4 es muy superior a la del receptor D_2. La bibliografía sobre estos estudios farmacogenéticos es muy abundante, pero la realidad es que, hasta el momento, no se ha encontrado una relación específica entre los diferentes subtipos de receptor, y una determinada terapia antipsicótica (25, 26, 27).

CANALES IÓNICOS

A la hora de iniciar el estudio de los canales iónicos, nada mejor para ello que reproducir las palabras del Prof. Tamargo con motivo de

su ingreso en la Real Academia de Ciencias Veterinarias, cuando al tratar de justificar el tema elegido con tal fin decía: *Así tras sopesar diversas opciones, decidí abordar un tema de rabiosa actualidad, a cuyo nombre, recientemente acuñado, nos tendremos que acostumbrar, las canalopatías*.

Hoy se sabe que la existencia de mutaciones en los genes que codifican las subunidades proteicas que constituyen los canales iónicos de Na, K, Ca y Cl, son las primeras causas de patologías tan diversas como pueden ser: cuadros de epilepsia, ataxia, degeneración neuronal, miotonía, hipertermia maligna, arritmias, etc. Todo ello en virtud de que como consecuencia de dichas mutaciones, se puede estar aumentando o inhibiendo una determinada función celular.

Dichos canales permiten el flujo de iones a su través, a una velocidad muy superior a la de cualquier otro sistema biológico (hasta 10^8 iones/segundo frente a solo 10^3 iones/segundo para el caso de un transportardor). Otra característica muy significativa es que este flujo se realiza con una gran selectividad, pues por ejemplo, los canales de K son, al menos, 10.000 veces más permeables para el K que para el Na.

Para avanzar en el estudio de los canales iónicos fijaremos nuestra atención, en primer lugar, en los denominados canales de Na epiteliales, los cuales están formados por tres subunidades, α, β y γ. Cada subunidad se supone que posee dos dominios transmembrana, un largo lazo extracelular y un extremo carboxi terminal que se ubica dentro del citoplasma celular. Estos canales epiteliales los encontramos en las nefronas, en el colon, en las glándulas salivares y sudoríparas y en el epitelio pulmonar.

De manera especial, es de destacar el importante papel que pueden estar desempeñando en el desarrollo de la hipertensión que, como sabemos, constituye el mayor factor de riesgo en procesos cardiacos, en accidentes vasculares cerebrales y en el fallo renal. Se suele hacer una clasificación de la hipertensión en la denominada Mendeliana, que es una forma monogénica, y en la poligénica o hipertensión esencial.

Entre los muchos factores que pueden afectar a la presión sanguínea, el papel más importante lo juega el riñón, al regular el balance del Na. En ello participan los transportadores de dicho ión, al ser responsables de su reabsorción.

Un primer indicio de cómo influyen las características genéticas individuales en el proceso de la hipertensión, lo tenemos en la respuesta, tan demostrativa, a la ingesta de sal. Según esta respuesta, nos encontramos con una serie de individuos en los cuales la restricción de la ingesta de sal va acompañada de una disminución de los valores de la presión arterial, mientras que para otros individuos dicha restricción se acompaña de una variación muy leve o nula de la misma.

Efectivamente, se han identificado mutaciones y delecciones en la porción carboxi-terminal de las subunidades β y γ del canal de Na, con las consecuencias consiguientes en las funciones fisiológicas de los mismos. Así, si estos cambios genéticos llevan consigo un incremento en la actividad de los canales, ello se traducirá en una reabsorción excesiva de Na, que tendrá su reflejo en un cuadro de hipertensión. Eso está ocurriendo, por ejemplo, en los pacientes con el síndrome de Liddle.

Por el contrario, si la mutación lo que lleva consigo es una disminución en la actividad de los canales, lo que se estará produciendo es una pérdida de sales, que se puede acompañar de deshidratación.

Entre las mutaciones identificadas, aproximadamente el 88% corresponden a la subunidad β, y el restante 12% a la subunidad γ. Ello no quiere significar que no se puedan encontrar nuevas mutaciones en la subunidad α, que puedan a su vez contribuir al diagnóstico de nuevas formas de hipertensión.

A ello dedican su trabajo Xue y colaboradores (28) que traemos a colación con objeto de poner de manifiesto el importante papel que las técnicas analíticas instrumentales están jugando en la rápida identificación de los polimorfismos genéticos, datos cruciales en el desarrollo de la medicina personalizada.

En este estudio sobre la genética de la hipertensión participan 184 habitantes de las Islas Seychelles, pertenecientes a 31 familias a las que se extraen muestras de ADN de su sangre periférica. Tras un proceso de amplificación PCR, usando *Taq polimerasa,* y un posterior marcaje de los productos obtenidos con fluoresceína se procede a su estudio electroforético. La técnica usada es la de electroforesis capilar, con capilares de un diámetro interno de 50 μm y una longitud de 30 cm. La separación de las diferentes fracciones se realiza a una intensidad de 18 μA. Con

ello se obtienen los diferentes perfiles electroforéticos que permitan identificar los diferentes genotipos de los participantes, representativos del polimorfismo genético.

Pasando a los canales de K nos encontramos con numerosos ejemplos de la implicación del polimorfismo genético en la actividad de ciertos fármacos. En el conjunto de proteínas estructurales de las membranas celulares, los canales de K forman el grupo más heterogéneo de las mismas. De acuerdo con la forma en que los canales son activados se hace una clasificación en dos grupos: los activados por cambios de voltaje, y los que lo hacen por mediación de agonistas.

Otra forma de clasificación es atendiendo a la topología de las subunidades que lo forman. Así tendremos canales de K con 6 segmentos transmembrana y 1 poro (6TM-1P), con 2 segmentos y 1 poro (2TM-1P), e igualmente el formado por 4 segmentos transmembrana y 2 poros (4TM-2P).

Al estar formados los canales por cuatro subunidades α y cuatro subunidades β, el canal será un homotetrámero si las cuatro unidades β son idénticas o un heterotetrámero, si lo constituyen distintas subunidades productos de distintos genes. Como todas las combinaciones son posibles, se postula la existencia de cientos de canales de K diferentes en nuestro organismo, en los cuales el polimorfismo genético jugará un papel importante. Un ejemplo es el canal KvLQT1, formado por una subunidad α (KVLQT1) codificada por el gen KCNQ1 y una subunidad β (MinK) codificada por el gen $KCNE_1$; otro es el canal HERG codificado por los genes HERG y KCNE2 que codifican las subunidades α y β, respectivamente. Estas subunidades KVLQT1 y MinK no sólo vamos a encontrarlas en el corazón y en el oído interno, sino que también son abundantemente expresadas en muchos tejidos epiteliales (riñón, intestino, pulmón, timo y páncreas) aunque en estos últimos casos no estén bien delimitadas, hasta el momento, las funciones fisiológicas que desempeñan.

Existe una arritmia cardiaca, poco común, que se caracteriza por la aparición de una prolongación del intervalo QT del electrocardiograma, por lo que se habla de síndrome de QT largo (LQTS). Es una enfermedad genética transmisible, cuya causa está en las mutaciones que presentan los genes codificadores de las subunidades constituyentes de los canales de K, que acabamos de mencionar. La enfermedad aparece en 1 de cada 1.000-3.000 individuos.

Pero lo más importante para nosotros es que este LQTS puede ser inducido por gran número de fármacos, como los antiarrítmicos, ciertos antihistamínicos, antibióticos y antipsicóticos, entre otros. Este proceso puede ser muy peligroso, pues predispone a la aparición en el electrocardiograma de las denominadas *torsades de pointes* (TdP), fibrilación ventricular y muerte repentina.

Como muy ilustrativo podemos citar el trabajo de Sesti y cols. (29) que hacen el estudio genético de 98 pacientes que experimentaron una prolongación excesiva del intervalo QT (>600 mseg), o que desarrollaron TdP durante el tratamiento. El estudio está centrado en la subunidad KCNE2 constituida por un polipéptido de 123 aminoácidos. Las mutaciones en el gen codificador se traducen en cambios en los aminoácidos del polipéptido. Un paciente con LQTS inducido por procainamida, presentaba una mutación en la que en el aminoácido 54 se sustituía la treonina por metionina (M54T). En otro paciente el LQTS fue inducido por la oxatomida, un antagonista de los receptores H1-histaminérgicos, y el paciente presentaba una sustitución del residuo 57 de treonina por isoleucina (I57T). La sustitución de valina por alanina en la posición 116 (A116V) la presentaba un paciente con una historia de paros cardiacos, asociada al consumo de cocaína y alcohol y tratado durante seis años con quinidina y mexiletina. La quinidina ya había sido asociada con anterioridad con LQTS y al suprimir la mexiletina se le presentó un síncope con TdP.

Finalmente, el que da título al trabajo, es el caso de un paciente de 45 años, con un historial de síndrome de Marfan, que presentaba un intervalo QT normal en su electrocardiograma y que desarrolló LQTS al ingerir, tan sólo, tres dosis orales de trimetropina-sulfametoxazol para el tratamiento de una infección menor. En este caso, el SNP consistía en la sustitución de alanina por treonina en la posición 8 (T8A) en MiRP1. Lo destacable de este SNP es que, según los autores, está presente en el 1,6% de la población general.

En posteriores trabajos puede verse (30) como se amplía la búsqueda de mutaciones, no sólo en los genes codificadores de los canales de K, sino también en los de Na (SCN5A). El grupo lo componen 92 pacientes, incluyendo 27 de ellos que presentaban un marcado alargamiento del intervalo QT (>600 ms) al poco de iniciar la medicación, culpable del LQTS inducido, pero que volvían a los valores normales tras la su-

presión de la misma. Los resultados demuestran que los pacientes en los que la medicación inducía la aparición de TdP, eran portadores de mutaciones en tres genes codificadores de canales iónicos cardiacos.

Resulta evidente por lo expuesto, la necesidad de poder disponer de técnicas de diagnóstico genético que nos permitan identificar las posibles mutaciones de todos los exones, de al menos cinco de los genes que codifican las subunidades de los canales cardiacos de Na y K, y que son factores determinantes del LQTS inducido por fármacos. Para ello, Larsen y cols. (31) desarrollan un método automático con el empleo de la electroforesis capilar, por las ventajas, según los autores, de la velocidad en ejecución y su alta reproducibilidad, además de poder simultanear el análisis de 96 muestras en paralelo por el uso de un «array» de capilares.

El ADN se extrae de sangre completa del paciente, o simplemente de una muestra de sangre depositada sobre papel de filtro. Tras un proceso de amplificación por PCR, 1 a 3 μl de este producto se mezclan con 12 μl de formamida desionizada, 0,5 μl de NaOH (0,3 N) y 0,5 μl de Genestan 500 ROX tamaño estándar (*Applied Biosystems*). Las muestras fueron desnaturalizadas a 95º C durante 5 minutos y enfriadas a 4º C. La separación electroforética se realizó en un equipo automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*). El instrumento tiene dispositivo para 2X96 tubos de muestras, con capacidad para su inyección automática. Se pueden inyectar tres muestras marcadas con colorantes fluorescentes diferentes, en cada tubo y ser analizadas simultáneamente por su fluorescencia inducida por láser. El desarrollo electroforético se realiza a 15.000 voltios durante 25 minutos. El tiempo total del proceso es de aproximadamente 35 minutos.

Para el análisis de los datos que proporciona el electroferograma hacen uso del software GeneScan ver. 3.5.1 (*Applied Biosystems*), que les permite identificar los picos que caracterizan las mutaciones. Según los autores, el método automático descrito es muy eficiente y rápido en la investigación de mutaciones.

PROTEÓMICA

Es evidente que para alcanzar esa deseable medicina personalizada, es necesario poder conseguir como punto de partida, un diagnóstico se-

guro del estado patológico del paciente, del que se derivará la terapéutica adecuada.

En este proceso la proteómica jugará, está jugando ya, un papel fundamental. A diferencia del genoma, su equivalente proteico o proteoma es una entidad dinámica, que cambia constantemente en respuesta a los procesos celulares, como pueden ser el estrés, estados patológicos o tratamientos medicamentosos.

Si nos fijamos en el proteoma de la sangre humana y gracias una vez más a las técnicas analíticas instrumentales disponibles, hoy conocemos que se ha confirmado la existencia de 490 proteínas y polipéptidos diferentes. Si tenemos en cuenta que muchos de ellos tienen su procedencia en estados patológicos a nivel celular, es evidente que si se logra descifrar el mensaje del que son portadores, se estará en condiciones de poder conocer, con toda exactitud, su procedencia y el proceso molecular que ha motivado su liberación a la sangre.

Los trabajos en el campo de la proteómica se orientan en dos direcciones: a) la identificación de cada una de estas proteínas, lo que constituye el primer paso para conocer el fenotipo molecular de cada enfermedad, b) el estudio de la función de cada proteína o proteómica funcional. En este último caso se busca conocer el tipo de interacciones de cada proteína con otras moléculas, ya que para poder ejercer sus efectos forman complejos den-tro de la célula o sobre la propia membrana celular. Los sistemas de comunicación celular tienen su base en estas interacciones y por otra parte, pequeños cambios en la estructura de la proteína pueden significar la iniciación de una determinada patología, o la progresión de la misma.

Los grandes avances en el estudio de la proteómica, y más concretamente, en poder descifrar el complejo proteoma de la sangre, hay que atribuirlo al desarrollo de la espectrometría de masas en sus nuevas modalidades de MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization - time-of-flight*) y, más recientemente, de SELDI-TOF (*surface-enhanced laser desorption/ionization -time-of flight*). En breves palabras, un espectrómetro de masas consiste en una fuente de iones, un analizador de masas que nos mide la relación de masa a carga de cada uno de los analitos ionizados, y un detector que nos registra el número de iones con una determinada relación masa/carga.

En la técnica de MALDI la muestra en estado seco acoplada a una matrix cristalina, se sublima e ioniza por intermedio de pulsos de láser. En la técnica SELDI, un refinamiento de MALDI, la muestra se deposita sobre un chip de características diferentes (hidrofóbico, iónico, catiónico y enlazante metálico) buscando el hacer una preselección de las proteínas de la muestra, de acuerdo con sus afinidades frente al material enlazante del chip, antes de proceder a su análisis en el espectrómetro de masas.

Estos chips son suministrados por *Ciphergen Biosystems Inc*. Las lecturas del detector constituyen el perfil proteómico de la muestra problema, que en un sistema de baja resolución proporcionará 15.500 datos para un intervalo m/z de 500 a 20.000. Para el caso de un sistema de alta resolución se generarán hasta 400.000 datos en el intervalo m/z comprendido entre 500 y 12.000.

Un sistema de farmacoinformática basado en la inteligencia artificial, es el encargado de analizar este gran número de datos y de ellos, el propio sistema puede aprender, adaptar y ganar experiencia, hasta el punto de que puede reconocer un nuevo fenotipo para el que el propio sistema no había sido programado, y que nunca con anterioridad el sistema lo había analizado.

Para profundizar en el tema de las posibilidades de la espectrometría de masas en los estudios sobre proteómica, nos remitimos al trabajo de revisión publicado por Aebersold y Mann (32).

Como ejemplo de los cambios tan dramáticos que se esperan conseguir en la forma en que una enfermedad puede ser detectada y monitorizada, con el uso de la espectrometría de masas, citaremos los resultados alcanzados en procesos cancerosos. En ellos se comprueban las ventajas de una rápida detección en los estados iniciales del proceso canceroso, de la posibilidad de desarrollar una medicina personalizada, del seguimiento de posibles recesiones, así como poder conocer cualquier tipo de toxicidad inducida por la propia medicación.

Petricoin y cols (33) utilizan la técnica de SELDI-TOF en la investigación del cáncer de ovario, con vistas a un diagnóstico muy temprano del mismo, por las evidentes ventajas que ello reportará a la supervivencia de los pacientes.

Existe un biomarcador para el cáncer de ovario, el antígeno 125 (CA 125), cuya concentración es anormal en alrededor del 80% de las pacien-

tes en un estado avanzado de la enfermedad, mientras que en las pacientes en el estado I de la enfermedad, sólo presentan un incremento del CA125 alrededor del 50% de las mismas. Por estas circunstancias, el valor predictivo positivo que se le da a este simple marcador es de sólo el 10%.

En una primera fase los autores obtienen el espectro proteómico de sangre de 50 mujeres no afectadas de cáncer y lo comparan con el de otras 50 mujeres diagnosticadas de cáncer. Usan chips de interacción hidrofóbica modelo C16, y el Protein Biology System 2 SELDI-TOF (*Ciphergen Biosystems, Freemont, CA. USA*). Desarrollan un algoritmo genético que funciona de manera similar a una selección natural para el estudio de los datos m/z recolectados. Con ello es posible diferenciar los diagramas proteómicos de las afectadas del de las no afectadas.

En un segundo ensayo ciego, analizan las sangres de 116 mujeres, de las que 50 padecían cáncer de ovario y entre las cuales, 18 casos se consideraba en estado I. Todos los casos fueron correctamente identificados. De las 66 muestras restantes de sangre de mujeres no afectadas, 63 fueron reconocidas como negativas. Por todo ello, los autores concluyen que el método MALDI-TOF usado, presenta una sensibilidad del 100%, una especificidad del 95% y un valor predictivo positivo del 94%.

El citado autor y colaboradores (34) aplican la misma técnica para el diagnóstico del cáncer de próstata. También para este tipo de cáncer se viene utilizando como indicativo un marcador, el PSA (*prostate-specific antigen*). La técnica utilizada es similar a la descrita utilizando un chip de interacción hidrofóbica C16, del que se determina el espectro de masas. Aproximadamente 15,200 datos, definidos por los correspondientes valores de m/z, son analizados por el sistema informático que integra el algoritmo genético. Según los autores, el diagrama proteómico predice correctamente 36 de 38 pacientes con cáncer de próstata, a la vez que 177 de 228 pacientes fueron clasificados correctamente de hiperplasia benigna.

Teniendo en cuenta que un nivel alto de PSA en individuos asintomáticos conlleva, por lo general, la práctica de una biopsia, y dado que en los resultados para individuos con valor alto de PSA, sólo entre el 25% y 35% se confirmó, por su diagrama proteómico, la existencia del cáncer de próstata, es evidente que de popularizarse el análisis de MALDI-TOF se podrían evitar innecesarias biopsias que pasarían a ser utilizadas sólo como técnica confirmatoria.

Con el mismo propósito de poder distinguir por el diagrama proteómico del suero, a los individuos con cáncer de próstata de aquellos que padecen una hiperplasia benigna, o están sanos, Adma y cols. (35) utilizan también la técnica de SELDI-TOF. La muestra en este caso la constituyen 167 pacientes con cáncer, 77 con hiperplasia benigna y 82 sanos, con intervalo de edades semejantes a los anteriores.

El chip con el que obtienen los mejores resultados es del tipo metal enlazante, concretamente con el IMAC-Cu (IMAC-3-*Ciphergen Biosystems, Inc*). La detección de los picos para el intervalo de masas entre 2.000 y 40.000 Da, se realizó con el *Ciphergen SELDI software* versión 3,0(y 3.0, y para el análisis de los mismos desarrollan un algoritmo Peak Miner, que les permite realizar análisis estadísticos, con el fin de poder identificar los picos del espectro de masas con la mayor capacidad para discriminar los tres grupos, los de cáncer de próstata, los de hiperplasia benigna y los individuos sanos.

Según los resultados, la técnica permite una sensibilidad del 83%, una especificidad del 97% y un poder predictivo del 96%. Los autores indican que tienen en estudio valorar el proteoma SELDI de sueros de pacientes, antes y después de una prostatectomía, al objeto de encontrar datos indicadores de una enfermedad recurrente o que nos permitan conocer la agresividad del cáncer.

La misma técnica SELDI-TOF es usada por Qu y colaboradores (36) en el análisis del cáncer de próstata. En este caso, las muestras de suero se elevaban a 386, de ellas 197 procedían de pacientes con cáncer de próstata, 92 de individuos con hiperplasia benigna de próstata y 96 de individuos sanos. El chip de proteína usado fue el IMAC-3, previamente activado con SO_4Cu; los 124 picos detectados en el espectro de masas fueron analizados por un sistema informático, que les permite hacer su clasificación. El primer clasificador AdaBost separa completamente los proteomas de enfermos de cáncer de los que no lo padecen, alcanzando, según los autores, una sensibilidad y especificidad del 100%. Con un segundo clasificador (*Boosted Decision Sturup Feature Selection*), aunque era de interpretación más fácil, se alcanzó solamente una sensibilidad y especificidad del 97%.

Con este tipo de técnicas lo que se busca es un diagnóstico diferencial, sin que para ello sea necesaria la identificación de las proteínas/po-

lipéptidos en que se ha basado el análisis. Sin embargo, si llegado el momento se pudiesen conocer dichas identidades, ello sería un gran paso para entender el papel que pueden estar jugando en la oncogénesis del cáncer de próstata, lo que permitirá identificar nuevas dianas terapéuticas y desarrollar nuevos medicamentos.

El cáncer de pulmón también ha sido estudiado por Zhang y colaboradores (37), en la búsqueda de nuevos biomarcadores. Analizan 169 muestras de sueros procedentes de 103 pacientes con cáncer pulmonar, clasificados clínicamente como en los estados 0, I, II y III; 41 de mujeres sanas y 25 de enfermos con procesos pulmonares benignos. Los chip de proteínas (*Ciphergen*) fueron activados previamente con Ni. De acuerdo con sus resultados concluyen, que se consigue una sensibilidad del 93% para todos los pacientes con cáncer y una especificidad del 91% para todos los controles.

El análisis proteómico por la técnica de MALDI-TOF no está restringido al suero humano, sino que su utilidad es evidente para otros fluídos orgánicos, como la orina, el líquido cefalorraquídeo o el líquido sinovial. La información que se podrá obtener de ellos será fundamental, no sólo para establecer diagnósticos rápidos y seguros, sino también para valorar la eficacia del tratamiento prescrito, en el marco de la futura medicina personalizada.

A título de ejemplo podemos citar el trabajo de Thongboonkerd y colaboradores (38) analizando el proteoma de la orina humana normal. Para ello someten las muestras a un tratamiento previo de separación de las proteínas por precipitación con acetona o por ultracentrifugación. A continuación, someten los productos obtenidos a una separación por electroforesis en gel de poliacrilamida por la técnica bidimensional (2D-PAGE) y las proteínas, así separadas, se analizan por MALDI-TOF.

Las proteínas identificadas fueron 67. La acetona precipita las proteínas más ácidas e hidrofílicas, mientras que la ultracentifugación fracciona las más básicas e hidrofóbicas y las proteínas de membrana. Entre ellas se encuentran las proteínas transportadoras, complemento, chaperona, receptores, enzimas, etc.

El análisis informático les permitió conocer que 47 eran proteínas únicas, y el resto hasta 67 formas múltiples de las mismas proteínas, transformadas preferentemente por glicosidación.

En este tipo de técnicas con aislamientos previos de las proteínas por métodos diferentes, están puestas grandes esperanzas en la información que pueden proporcionar para el estudio de la función renal y su patofisiología, así como en el descubrimiento de biomarcadores de patologías diversas.

En definitiva, y a la vista de lo expuesto, el acoplamiento de los nuevos avances de la espectrometría de masas (MALDI-TOF y SELDI-TOF) con los sistemas de tratamiento de datos que la farmacoinformática puede proporcionar, nos hace pensar, con fundamento, que los modos en que se efectúa el diagnóstico y tratamiento de una enfermedad cambiarán drásticamente en el futuro, que se prevé próximo.

A ello contribuirá la rapidez en la ejecución y el relativamente bajo coste del proceso y, sobre todo, la alta especificidad y sensibilidad que hasta ahora se ha logrado en relación con otras técnicas. A todo esto se puede añadir que el volumen de muestras requerido para el análisis es mínimo, que el espectro de masas se podría realizar en el propio laboratorio clínico y ser enviado, a un laboratorio central, que disponga del sistema informático adecuado para realizar el tipo de análisis que desea.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Vogel, F. (1959) Moderne probleme der Human genetik. Ergeb Inn. Med. Kinderheilkd. 12: 52-125.

(2) Gura, T. (2002) After the gold rush: Gene firms reinvent themselves. Science 297: 1982-1984.

(3) Hoffmeyer, S., Burk, O., Von Richter, O., *et al*. (2000) Funtional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity «in vivo». Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 3473-3478.

(4) Lidia, A., Saito, S., Sehine, A., *et al*. (2001) Catalog of 258 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding three organic anion transportes, three organic anion-transporting polipeptides, and three NADH: ubiquinone oxidoreductase flavoproteins. Human Genet. 46: 668-683.

(5) Cohen, J. (2002) Confronting the limits of Sciences Science 296: 2320-2324.

(6) Fellay, J., Marzolini, C., Meaden, E.R., *et al*. (2002) Response to antiretroviral treatment in HVI-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. Lancet 259: 30-36.

(7) Sakalda, T., Nakamura, T., Horinouchi, M., *et al*. (2001) MDRI genotype related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. Pharm. Res. 18: 1400-1404.

(8) Steimer, W., Muller, B., Leucht, S., *et al*. (2001) Pharmacogenetics: a new diagnostic tool in the management of antidepressive drug therapy. Clin. Chim. Acta 308: 33-41.

(9) Hahn, M.K., Blakely, R.D. (2002) Monoamine transporter gene structure and polymorphisms in relation to psychiatric and other complex disorders. Pharmacogenomics J. 2: 217-235.

(10) Hariri, A.R., Mattay, V.S., Tessitore, A., *et al*. (2002) Serotonin transporter genetic variation and the response of the human amygdala. Science 297: 400-403.

(11) Ueno, S. (2003) Genetic polymorphisms of serotonin and dopamine transporter in mental disorders. J. Med. Invest. 50: 25-31.

(12) Smelardi, E., Zanardi, R., Benedetti, F., *et al*. (1998) Polimorphism within the promoter of the serotonin transporter gene and antidepressant efficacy of fluvoxamine. Mol. Psychiatry 3: 508-511.

(13) Zanardi, R., Benedetti, F., Di Bella D., *et al*. (2000) Efficacy of paroxetine in depression is influenced by a functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene. J. Clin. Psychopharmacol. 20: 105-107.

(14) Ortega, M. (2000) Desarrollo de fármacos selectivos. En: Salud, Educación y Energía: Recursos cualificados para el siglo XXI. Monografía VII. RANF. 81-109.

(15) Kita, T., Sakaede, T., Aoyama, N., *et al*. (2002) Optimal Dose of Omeprazole for CYP2C19 extensive metabolizers in anti-*Helicobacter pylori* therapy: pharmacokinetic considerations. Biol. Pharm. Bull. 25: 923-927.

(16) Furuta, T., Takashima M., Shirai, N., *et al*. (2000) Effect of genetic differences in omeprazole metabolism on cure rate for *H. pylori* infection and peptic ulcer. Clin. Pharmacol. Ther. 67: 684-689.

(17) Jazwinska, T.E., Orzechowska, J.K., Niewinski, P., *et al*. (2001) The influence of CYP2D6 polymorphism on the antiarrhythmic efficacy of propafenone in patients with paroxysmal atrial fibrillation during 3 months propafenone prophylactic treatment. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. 39: 288-292.

(18) Krynetski, E., Evans, W.E. (1998) Pharmacogenetics of cancer therapy: getting personal. Am. J. Hum. Genet. 63: 11-16.

(19) Dewar, J.C., Hall, I.P. (2003) Personalized prescribing for asthma: is pharmacogenetics the answer?. J. Pharm. Pharmacol. 55: 279-289.

(20) Lima, J.J., Thomason, D.B., Mohamed, M.H.N., *et al*. (1999) Impact of genetic polymorphisms of the beta(2)-adrenergic receptor on albuterol bronchodilator pharmacodynamics. Clin. Pharmacol. Ther. 65: 519-525.

(21) Drysdale, CM., McGraw DW., Stack, C.B., *et al*. (2000) Complex promoter and coding region beta 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict *in vivo* responsiveness. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 10483-10488.

(22) Stacey, B.G., Schaffner, S.F., Nguyen, H., *et al*. (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. Science 296: 2225-2229.

(23) Koper, J.W. Stolk, R.P., de Lange, P., *et al*. (1997) Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. Hum. Genet. 99: 663-668.

(24) Ruíz, M., Lind, U., Gaufels, M., *et al*. (2003) Characterization of two novel mutations in the glucocorticoid receptor gene in patients with primary cortisol resistance. Clin. Endocrinol. 55: 363-371.

(25) Pickar, D., Rubinow, K. (2001) Pharmacogenomics of psychiatric disorders. Trends Pharmacol. Sci. 22: 75-83.

(26) Scharfetter, J. (2001) Dopamine receptor polymorphisms and drug response in schizophrenia. Pharmacogenomics 2: 251-261.

(27) Basile, V.S., Massellis, M., Potkin, S.G., *et al*. (2002) Phamacogenomics in schizophrenia: the quest for individualized therapy. Hum. Mol. Genet. 11: 2517-2530.

(28) Xue, M-Z., Bonny, O., Morgenthaler, S., *et al*. (2002) Use of constant denaturant capyllary electrophoresis of pooled blood samples to identify single-nucleotide polymorphisms in the genes (Scnn1a y Scnn1b) encoding the α and β subunits of the epithelial sodium channel. Clin. Chem. 48: 718-728.

(29) Sesti, F., Abbott, G.W., Wei, J., *et al*. (2000) A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 10613-10618.

(30) Yong, P., Kanki, H., Drolet, B., *et al*. (2002) Allelic variants in long-QT disease genes in patients with drug-associated torsades de points. Circulation 105: 1943-1948.

(31) Larsen, L.A., Johnson, M., Brown, C., *et al*. (2001) Automated mutation screening using dideoxy finger printing and capillary array electrophoresis. Hum. Mutat. 18: 451-457.

(32) Aebersold, R., Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. Nature 422: 198-207.

(33) Petricoin, E.F., Ardekani, A.M., Hitt, B.A., *et al*. (2002) Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. Lancet 359: 572-77.

(34) Petricoin, E.F., Ornstein, D.K., Paweletz, C.P., *et al*. (2002) Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer. J. Natl. Cancer Inst. 94: 1576-1578.

(35) Adam, B-L., Qu, X., Davis, J.W., *et al*. (2002) Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithme distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasi and healthy men. Cancer Res. 62: 3609-3614.

(36) Qu Y., Adam, B.L., Yasui, Y., *et al*. (2002) Boosted decision three analysis of surface enhanced laser desorption/ionization mass spectral serum profiles discriminates prostate cancer from noncancer patients. Clin. Chem. 48: 1835-1843.

(37) Zhang, L.J., Rosenzweig, J., Wang, X.X., *et al*. (2002) Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. Clin. Chem. 48: 1296-1304.

(38) Thongboonkerd, V., MeLeish, K.L., Arthur, J.M., *et al*. (2002) Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. Kidney Int. 62: 1461-1469.

Ingeniería genética y biotecnología

JOSÉ LUIS GARCÍA

Centro de Investigaciones Biológicas.
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

1. INTRODUCCIÓN

Si se acepta en un sentido amplio que la Biotecnología es «la tecnología aplicada a la utilización de los seres vivos o partes de éstos con fines prácticos o industriales», es indudable que la historia de la Farmacia constituye una parte significativa de la historia de la Biotecnología o viceversa. La mayoría de los medicamentos y principios activos que se han venido utilizando desde la antigüedad hasta el desarrollo de la moderna química orgánica procedían de los seres vivos. Incluso hoy en día muchos de los denominados compuestos «líderes», que sirven de base para la síntesis de los nuevos medicamentos se obtienen originalmente a partir de extractos de seres vivos. La denominada Biotecnología Tradicional ha sido en gran medida liderada por los sectores farmacéutico y agroalimentario y, por eso, no resulta sorprendente que las primeras aplicaciones y desarrollos de la Moderna Biotecnología surgieran en estos dos campos y, en particular, en el sector farmacéutico mejor desarrollado tecnológicamente.

Cuando a principios de la década de 1970 Cohen y colaboradores (1973) publicaron el primer experimento de Ingeniería Genética se produjo la señal de partida para una carrera tecnológica que alcanza su punto culminante en 1982 con la puesta en el mercado de la insulina humana recombinante (Andersen y Krummen, 2002). En apenas doce años se desarrollan las técnicas básicas de la Ingeniería Genéti-

ca que hoy en día constituyen el soporte de la Moderna Biotecnología y todo ello gracias a una industria farmacéutica muy potente que ve en la Biotecnología un área de expansión extraordinaria para producir nuevos medicamentos hasta entonces inabordables para los químicos orgánicos.

En este capítulo se pretende mostrar de forma panorámica lo que han supuesto y supondrán en el futuro las herramientas de la Ingeniería Genética y sus aplicaciones en el sector de la Biotecnología Farmacéutica. Unas breves pinceladas sobre las tecnologías servirán para conocer a los actores y el atrezo de esta historia, que no son otros que los seres vivos, y las herramientas y técnicas que utiliza la Ingeniería Genética. A continuación, se analizarán los usos de esta tecnología para producir fármacos de pequeño tamaño como por ejemplo, los antibióticos, los aminoácidos, o las vitaminas. Pero, por supuesto, la producción de macromoléculas con propiedades terapéuticas abandera el desarrollo de este sector y a la que se dedicará buena parte del capítulo. La relevancia de las empresas de base biotecnológica dentro del sector farmacéutico merece una especial consideración sobre todo para intentar anticipar cual será su futuro más inmediato. Es evidente que el tamaño actual de este campo de estudio es tan grande que en el empeño se podrán quedar sin tratar en suficiente profundidad algunos aspectos que el lector puede sin duda considerar importantes, pero que probablemente podrá conocer con la ayuda de la bibliografía que al final del capítulo se aporta.

2. LOS ACTORES Y LAS HERRAMIENTAS DE LA INGENIERÍA GENÉTICA

Para introducirse en el campo de la Ingeniería Genética y sus aplicaciones es importante estructurar la presentación, ya que de otra manera es muy fácil perderse a través de las distintas posibilidades que ofrece esta tecnología. Por ello, primero se analizarán los organismos susceptibles de ser modificados genéticamente que más se utilizan actualmente, para continuar con la descripción de algunas tecnologías básicas, y acabar con una panorámica de lo que se denomina ingeniería de los procesos biotecnológicos (Para una revisión de estas tecnologías ver Perera y col., 2002).

2.1. Los organismos

Hoy en día se puede afirmar que todos los seres vivos, desde los virus a los animales superiores pasando por las bacterias y las plantas, son susceptibles de modificación mediante Ingeniería Genética aunque no todos se utilizan con igual profusión en la industria farmacéutica.

a) Virus

Los virus bacterianos (bacteriófagos o fagos) se utilizaron mucho en los comienzos de la Ingeniería Genética como herramientas (vectores) de clonación y expresión, si bien su uso actual se ha reducido a medida que se han desarrollado nuevos vectores plasmídicos (ver más adelante). Sin embargo, los virus animales siguen teniendo un papel relevante para el desarrollo de sistemas de expresión en células superiores y son herramientas de gran valor para el desarrollo de vacunas y para implementar las tecnologías de terapia génica.

b) Bacterias

Las bacterias son los seres vivos más utilizados en los procesos biotecnológicos. Aunque son muchas las cepas bacterianas que se emplean en la actualidad, la enterobacteria *Escherichia coli* ocupa el primer lugar en la lista (Cornelis, 2000; Swartz, 2001). Prácticamente todos los procesos de Ingeniería Genética pasan por alguna etapa en la que interviene *E. coli*. Otros géneros bacterianos utilizados con cierta profusión son *Bacillus*, *Pseudomonas*, y los actinomicetos (*Streptomyces*, *Corynebacterium, Nocardia*).

c) Levaduras y hongos

Las levaduras y los hongos son junto con las bacterias los sistemas que más se utilizan en Ingeniería Genética. El sistema de *Saccharomyces cerevisiae* se utiliza casi tanto como el de *E. coli* y no en vano fue por algo el primer genoma eucariota secuenciado completamente. Otras levaduras interesantes son *Pichia pastoris, Kluyveromyces* y *Hansenula polymorpha*. La levadura *P. pastoris* se ha usado para producir grandes cantidades de proteínas, gracias a que es capaz de crecer en los reactores hasta alcanzar muy altas densidades celulares. Por ejemplo, se ha utilizado para producir quitinasa humana en cultivo continuo (0,3 g/L/día) o proinsulina humana en un sistema discontinuo (1,5 g/L) (Cereghino y col.,

2002). Entre los hongos es el *Aspergillus* en el que más se han desarrollado las herramientas genéticas aunque por su importancia en el campo de los antibióticos *Penicillium* ha recibido también mucha atención.

d) Plantas

Después de los microorganismos es en las plantas donde más desarrollos biotecnológicos aplicados se han llevado a cabo. En este caso el sistema modelo de trabajo es la *Arabidopsis thaliana*, una planta que no tiene interés agronómico ni industrial, y por eso los desarrollos productivos se realizan en plantas como tabaco, maíz, soja, algodón, arroz y muchas otras que producen beneficios agroindustriales de distintos tipos. Curiosamente aunque de las plantas se extraen numerosos principios activos casi todas las plantas transgénicas actuales se utilizan para obtener alimentos o productos de la industria manufacturera y son muy pocas las que se emplean como factorías para la producción de fármacos.

e) Animales

Aunque los animales transgénicos no se utilizan mucho como biofactorías, las células animales se cultivan en gran cantidad para la obtención de muchas proteínas de interés farmacéutico. El ratón, y la rata son los más utilizados como modelos transgénicos, si bien se han creado ovejas y cabras transgénicas para la producción en la leche de proteínas recombinantes. Las células de mamífero CHO (ovario de hámster chino) y las de mieloma murino SP2/0 y NS0 son las que más se utilizan para el cultivo, aunque también se emplean otras células animales como las BHK (células de riñón de hámster) y las FRhL-2 (células de mono), o humanas como las de origen linfoblastoide o fibroblastos diploides. Los sistemas bicistrónicos de expresión de genes acoplados a marcadores seleccionables y los sistemas de expresión regulados más o menos complejos combinados con los nuevos promotores que se están desarrollando para las células de mamífero ofrecen muchas posibilidades para la producción de proteínas que puedan resultar especialmente tóxicas para la célula productora. La posibilidad de clonar y sobreexpresar genes de glicosiltransferasas (*e. g.,* galactosiltransferasa, sialiltransferasa, *N*-acetilglucosaminiltransferasa III) es una opción interesante, y en muchos casos clave, para la correcta glicosilación de las proteínas de uso terapéutico. Las nuevas tecnologías de clonación de células animales abren muchas posibilidades no tanto para obtener animales transgénicos, para

lo que compiten con las opciones convencionales, sino para obtener células madre para uso terapéutico en transplantes. En el mismo sector de actividad se encuentran el desarrollo de tejidos *in vitro* y la producción de órganos animales humanizados para xenotransplantes.

2.2. Las herramientas y técnicas

Son muchas y muy variadas las técnicas y herramientas que se utilizan en la Ingeniería Genética y, por supuesto, será imposible describirlas todas aquí, pero el conocimiento de las más importantes puede ayudar a comprender mejor cómo se realiza el trabajo con esta tecnología.

a) Enzimas.

Las enzimas son las herramientas más utilizadas en Ingeniería Genética y, dentro de estas, las más empleadas son las enzimas de restricción (endonucleasas) que reconocen secuencias específicas de nucleótidos del ADN y producen la rotura de las dos cadenas. Tras la rotura del ADN en pequeños fragmentos, las ADN ligasas son las que catalizan la unión de estos fragmentos y propician así la recombinación genética *in vitro*. Otras enzimas como polimerasas, nucleasas, fosfatasas, etc., completan la gran colección de opciones que permiten al ingeniero manipular *in vitro* el ADN. La fuente de estas enzimas es muy diversa y alcanza a todos los seres vivos, si bien la mayoría proceden de microorganismos, muchos de ellos recombinantes.

b) Vectores.

Se denominan vectores a las cadenas de ADN o ARN extracromosómicas que se utilizan para transportar información genética. Los más utilizados son los plásmidos, moléculas de ADN generalmente circulares y de pequeño tamaño en torno a las 5 Kb (5000 pares de bases) de media. Como ya se ha comentado, los virus animales y bacterianos se utilizan también como vectores. Los vectores pueden ser de múltiples tipos en función de la utilidad que se les asigne. Algunos sólo sirven como portadores de la información (vectores de clonaje), pero los más interesantes son los denominados vectores de expresión, que portan secuencias promotoras, que permiten sintetizar grandes cantidades de proteínas a partir del gen o genes clonados en el vector. El número de vectores dispo-

nibles en el mercado es enorme y cada día son más lo que se venden en forma de «kits» listos para su uso con una simple receta o protocolo, lo que facilita enormemente el trabajo de clonación y expresión de genes.

c) Técnicas de transformación genética.

Una vez que se ha obtenido un vector que porta una molécula de ADN o ARN recombinante es necesario introducirlo en la célula huésped, que actuará como sistema de almacenamiento o expresión de la información. Para esto se han desarrollado múltiples sistemas de transformación genética. En los microorganismos y células aisladas, la transformación a veces se hace mediante procesos naturales como la infección viral, la conjugación o la competencia natural (capacidad natural de internalizar moléculas de ADN), pero lo habitual es hacerlo mediante procesos artificiales, ya sean químicos (sales, polímeros), bioquímicos (enzimas), físicos (electroporación), o mediante combinaciones de éstos. Las plantas se transforman generalmente mediante técnicas de infección (viral o bacteriana) o por sistemas biolísticos utilizando las denominadas pistolas o cañones de genes. Para la obtención de animales transgénicos, los embriones se transforman mediante microinyección o se crean mediante técnicas mucho más complejas embriones clónicos, como en el famoso caso de la oveja Dolly. Por último, hay que señalar que después del proceso de transformación se requiere un periodo de adaptación y crecimiento del organismo transformado que si bien en los microorganismos es por lo general muy sencillo, en las plantas y, por supuesto, en los animales es muy complejo.

d) Amplificación del ADN.

Si hubiera que poner la medalla de honor a una herramienta de la Ingeniería Genética tal vez ésta le correspondería a la técnica denominada PCR (*polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa). Esta herramienta permite copiar millones de veces (amplificar) el ADN o el ARN gracias a la acción conjunta de una polimerasa termoestable y dos oligonucleótidos (cebadores o *primers*) que se anillan en ambos extremos de un fragmento de ADN que se quiere copiar. Mediante esta herramienta es posible extraer la información genética del cromosoma de un ser vivo para colocarla después en un vector y poder así expresarla en cualquier célula huésped. Esta tecnología, entre otras muchas cosas, permite realizar con gran sencillez procesos de mutagénesis al azar o dirigi-

da, que son de una gran utilidad para el desarrollo de los procesos biotecnológicos. Para realizar la PCR existen en el mercado múltiples tipos de equipos automáticos denominados termocicladores y un gran número de polimerasas termoestables.

e) Secuenciación del ADN.

La secuenciación del ADN es un proceso clave en el desarrollo de la Ingeniería Genética, ya que permite conocer la estructura primaria de los genes y de ello deducir la secuencia de aminoácidos de las proteínas. Aunque no es imprescindible conocer la secuencia de un gen para poder obtener organismos recombinantes de interés industrial, hoy en día gracias a la facilidad que ofrecen los secuenciadores automáticos de ADN se trabaja siempre conociendo la secuencia del gen o del fragmento de ADN que se está manipulando. La secuenciación completa de muchos genomas, entre ellos los de *Saccharomyces, E. coli*, y sobre todo la secuenciación del genoma humano, ha abierto las puertas a numerosos desarrollos biotecnológicos.

f) Ingeniería de proteínas e ingeniería metabólica.

Cuando la Ingeniería Genética se aplica a la modificación de las proteínas se utiliza el término de ingeniería de proteínas (Ogawa y Shimizu, 1999). De la misma manera, cuando de lo que se trata es de modificar un proceso metabólico se emplea el término de ingeniería metabólica (Chartrain y col., 2000; Stafford y Stephanopoulos, 2001). Las herramientas de la ingeniería de proteínas y de la metabólica se han desarrollado no sólo para ampliar el conocimiento de la Bioquímica, sino que hoy en día mediante estas herramientas se optimizan muchos procesos biocatalíticos para producir compuestos de interés químico y sobre todo farmacéutico, como se verá más adelante (Nielsen, 1998). Junto con estas herramientas se han desarrollado nuevos conceptos y metodologías, como la evolución dirigida o la genética combinatorial en sus distintas versiones, que pretenden conseguir nuevas formas de proteínas o de sistemas metabólicos mediante la inclusión al azar en un organismo de distintos genes o librerías génicas (biblioteca o conjunto de genes clonados en un vector). La posterior selección del organismo recombinante mediante el empleo de sistemas robotizados de cribado masivo de muestras (*high-throughput screening*) permite obtener en poco tiempo la proteína o el organismo deseado.

g) Genómica y proteómica.

La secuenciación completa de algunos genomas ha permitido desarrollar una nueva herramienta para la Ingeniería Genética denominada ADN-chips (*microarrays*), que permite analizar en una sola etapa la expresión o la composición de un genoma. Aunque existen muchos dispositivos de ADN-chips y varias tecnologías para construirlos, básicamente lo que todos ellos contienen son fragmentos de ADN (oligonucleótidos o genes) ordenados en forma matricial, que representan a cada uno de los genes de un genoma. Mediante marcaje del ARN o del ADN extraído de un organismo y su posterior hibridación con el ADN-chip se puede saber qué genes están activos (transcriptoma) o qué genes están mutados en una determinada célula. Por otro lado, las técnicas de electroforesis bidimiensional de proteínas junto con los nuevos sistemas de espectrometría de masas aplicados a las proteínas permiten obtener una visión panorámica de la composición proteica de una célula en un determinado momento de su desarrollo (proteoma). El análisis del genoma, del transcriptoma, y del proteoma permiten conocer de una forma más precisa cómo se desarrolla el metabolismo celular y como consecuencia de ello aplicar la Ingeniería Genética de forma más racional para conseguir mejorar la producción de fármacos. Si a todo esto se unen las nuevas tecnologías para el análisis de metabolitos (metaboloma) es fácil hacerse una idea del gran futuro que se abre para el desarrollo farmacéutico.

2.3. Los biorreactores

Para que todos los sistemas desarrollados por Ingeniería Genética se puedan llevar a la práctica es necesario plasmarlos en procesos de producción y esto conlleva el desarrollo de biorreactores de uno u otro tipo (Chu y Robinson, 2001). Los biorreactores son equipos de distinta complejidad técnica, según su función, en los que se lleva a cabo un proceso biológico que puede ir desde el cultivo de un organismo hasta el desarrollo de una reacción de biotransformación (biocatálisis). El diseño del biorreactor se hace casi siempre a la carta puesto que el ingeniero trata de optimizar el proceso acoplándolo a las características del organismo o la enzima. Los reactores que se utilizan hoy en día se distribuyen en un rango de capacidad muy amplio, desde cientos de metros cúbicos para

los cultivos microbianos más grandes como son los sistemas de producción de antibióticos y aminoácidos, hasta botellas de no más de un litro de capacidad para la producción de proteínas en cultivos de células de mamífero.

Con ser importante el diseño del reactor para la producción de una sustancia farmacéutica no lo es menos el proceso de aislamiento y purificación del producto final. La combinación de técnicas físico-químicas y bioquímicas como la centrifugación, extracción, filtración, precipitación, cromatografía, cristalización, etc., permite la obtención de pequeñas moléculas como los antibióticos hasta grandes moléculas como las proteínas con un altísimo grado de pureza y sobre todo con un coste razonable para facilitar su posterior comercialización.

3. LAS PEQUEÑAS MOLÉCULAS

La industria farmacéutica se nutre fundamentalmente de pequeñas moléculas que en su mayoría sintetizan los químicos orgánicos. Sin embargo, cada vez son más las pequeñas moléculas que se obtienen mediante procesos biotecnológicos, ya sea por fermentación o por procesos de biotransformación (Demain, 2000; Dordick y cols., 1998).

3.1. Procesos fermentativos

Los procesos fermentativos han sido y son una fuente importante de obtención de fármacos. Aunque en general estos procesos son muy complejos y se dispone de una limitada información sobre las rutas metabólicas, poco a poco se van conociendo mejor gracias a las nuevas tecnologías de la Ingeniería Genética (Hashimoto y Ozaki, 1999).

3.1.1. *Antibióticos*

Los antibióticos se producen como metabolitos secundarios en muchos microorganismos, pero fundamentalmente en hongos (*Penicillium*, *Cephalosporium*), y bacterias (*Streptomyces, Bacillus*) (Allsop, 1998).

Actualmente, se conocen unos 12.000 antibióticos diferentes aunque sólo se usan en terapéutica unos 150, con un mercado que supera los 20.000 M€. Muchos de estos antibióticos se descubrieron en los últimos 20 años gracias a enormes programas de cribado (*screening*) de muestras de diferente origen, pero actualmente las nuevas tecnologías genómicas están permitiendo realizar una aproximación más racional al diseño de nuevos antibióticos. La genética o biosíntesis combinatorial y el ADN-*suffling* (barajado del ADN) se están utilizando para intercambiar genes del metabolismo secundario entre microorganismos productores de antibióticos o para crear genes híbridos de enzimas clave en el metabolismo que permitan la síntesis de nuevas moléculas antibióticas (Rodríguez y McDaniel, 2001). Especialmente significativos son los estudios de Biología Molecular realizados para conocer los procesos de síntesis de los antibióticos β-lactámicos (Martín y Demain, 2002; Peñalva y cols., 1998). En este sentido, también ha sido particularmente productiva la síntesis de nuevos antibióticos polikétidos a través de la creación de polikétido sintetasas híbridas y/o mutantes. Este proceso combinado con la posibilidad de modificar las rutas de biosíntesis de los azúcares ha permitido crear nuevas moléculas de antibióticos macrólidos de reconocida importancia clínica. Desde que en la década de 1980 se demostró que algunas rutas biosintéticas de antibióticos estaban organizadas en bloques de genes (*clusters*), y que era posible transferirlas de un organismo productor a otro no productor se han llevado a cabo muchos avances en la clonación y modificación de rutas de biosíntesis de antibióticos, tanto en bacterias como en hongos. Incluso hoy en día se han desarrollado métodos para extraer la información genética de microorganismos productores de antibióticos directamente de muestras de suelo, con objeto de clonar los genes de microorganismos que serían difíciles de aislar y cultivar.

Aunque la cefalosporina C se produce directamente por fermentación, muchas de las cefalosporinas del mercado derivadas de ella se producen a partir de la expansión química del anillo del ácido 6-aminopenicilánico (6APA) para convertirlo en ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico (7ADCA). Esto se debe a que los rendimientos en la fermentación de las penicilinas G y V en *Penicillium* son mayores que los rendimientos en cefalosporina C y a que el 7ADCA no se puede obtener fácilmente a partir de la cefalosporina C. Por ello se ha modificado el *Penicillium* para producir desacetoxicefalosporina C clonándole los genes de la epimera-

sa y la expandasa. Más aún, añadiendo ácido adípico al caldo de cultivo es posible producir adipil-7ADCA gracias a la acción concertada de la aciltransferasa del propio *Penicillium* que convierte la isopenicilina N en adipil-6APA y de la expandasa de *Streptomyces clavuligerus* clonada en *P. chrysogenum*. Por otro lado, cuando se expresan en *P. chrysogenum* la aciltransferasa y la expandasa/hidroxilasa de *Cefalosporium* lo que se obtiene es adipil-7aminocefalosporánico (adipil-7ACA). El adipil-7ADCA y el adipil-7ACA pueden utilizarse directamente para producir 7ADCA y 7ACA gracias a un proceso de biotransformación en una sola etapa utilizando una enzima con actividad adipilacilasa (ver más adelante).

3.1.2. *Vitaminas*

La producción de vitaminas y de precursores de vitaminas también se está beneficiando de los avances en ingeniería metabólica. Los microorganismos se emplean en la producción de biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, piridoxal, ß-caroteno (provitamina A), tiamina (B_1), riboflavina (B_2), vitamina B_6, vitamina B_{12}, y ergosterol (provitamina D_2). Como ejemplo del potencial de la tecnología recombinante se ha conseguido llevar a cabo la síntesis de licopeno, ß-caroteno, y astaxantina en la levadura *Candida utilis* tras la clonación de algunos genes de las bacterias *Erwinia uredova* y *Agrobacterium aurantiacum*. También mediante la aplicación de la Ingeniería Genética se pueden producir β-caroteno, zeaxantina, o astaxantina en células de *E. coli* recombinantes. En *B. subtilis* se ha maximizado la producción de riboflavina (vitamina B_2) hasta alcanzar los 30 g/L utilizando mutagénesis y sobreexpresión de algunos genes de la ruta biosintética. Ciertas cepas de *Serratia marcescens* obtenidas por mutagénesis, selección para resistencia a antimetabolitos de biotina, y clonación de genes específicos de la síntesis de biotina producen hasta 600 mg/L de esta vitamina en presencia de altas concentraciones de azufre y hierro. La conversión de sorbitol a ácido 2-ceto-L-gulónico, precursor de la vitamina C, se puede incrementar mediante la sobreexpresión en la bacteria *Gluconobacter oxydans* de la L-sorbosa deshidrogenasa y la L-sorbosona deshidrogenasa junto con la creación de una mutación que bloquea la degradación del ácido 2-ceto-L-gulónico (Hancock y Roberto, 2002).

3.1.3. *Aminoácidos*

El mercado mundial de los aminoácidos es enorme y de alguno de ellos se alcanzan cifras muy alevadas de venta (*e. g.*, 915 M€ para el L-glutamato, 450 M€ para la L-lisina, 198 M€ para la L-fenilalanina, y 43 M€ para el L-aspartato). Muchos aminoácidos y especialmente los que se utilizan en grandes cantidades en la industria agroalimentaria y farmacéutica se obtienen directamente mediante la fermentación de microorganismos. La combinación de las técnicas clásicas de mutagénesis con las de ingeniería metabólica están permitiendo aumentar mucho los niveles de producción de las cepas salvajes. Por ejemplo, el efecto de la amplificación génica junto con la desregulación de enzimas claves de las rutas biosintéticas ha servido para aumentar la producción del L-triptófano en cepas recombinantes de *Corynebacterium glutamicum.* Por otro lado, eliminando la homoserina deshidrogenasa, se puede convertir una cepa salvaje de *Corynebacterium,* productora de glutamato, en una cepa hiperproductora de L-lisina. Si además se incrementa la resistencia a la retroinhibición de dos enzimas claves de la ruta de biosíntesis de la L-lisina, como son la aspartato kinasa y la dihidrodipicolinato sintetasa, se consiguen producciones de hasta 120 g/L de L-lisina con un rendimiento de 0,25-0,35 moles de este aminoácido por cada mol de glucosa utilizada en la fermentación.

3.2. Procesos de biotrasformación

La necesidad de la industria farmacéutica de obtener moléculas quirales cada vez más complejas ha propiciado el desarrollo de nuevos procesos de biocatálisis o biotransformación combinados con nuevas tecnologías de ingeniería bioquímica (Tabla 1) (Huisman y Gray, 2002; Straathof y cols., 2002). Las enzimas son excelentes catalizadores en las reacciones regio- y estéreo-selectivas en condiciones suaves (Kirk y cols., 2002; Schmid y cols., 2002). Además, pueden aceptar como sustratos muchos compuestos artificiales. Aunque el uso de las enzimas en los procesos de síntesis asimétrica, o lo que es lo mismo, en procesos de biocatálisis se describió a finales del siglo XIX no fue hasta la década de 1970 cuando éstas comenzaron a utilizarse industrialmente coincidiendo con la posibilidad de obtenerlas mediante Ingeniería Genética en grandes cantidades y a bajo coste.

TABLA 1
Algunos productos que se obtienen por biotransformación

Producto	*Sustrato*	*Enzimas*
(*S*)-2-Cloropropiónico	2-Cloropropiónico racémico	Células enteras, deshalogenasa (*S*)- específica
Alcoholes enantiopuros	Alcoholes racémicos	Lipasas
Aminas quirales	Aminas racémicas	Lipasas
(R)-Mandélico	Cianhidrinas racémicas	Nitrilasa
(R)-2-(4-Hidroxifenoxi)-propiónico	(*R*)-2-fenoxipropiónico	Células enteras, oxidasa
L- o D-Aminoácidos	Lactamas, ésteres racémicos de aminoácidos racémicos N-protegidos	Lactamasas
D-Aminoácidos	Aminoácidos N-acilados racémicos	D-Aminoacilasa
L-Aminoácidos	Aminoácidos N-acetilados racémicos	N-Acetil-L-aminoácido amidohidrolasa (aminoacilasa)
4-Endo-hidroxi-2- oxabiciclo[3.3.0]- oct-7-en-3-ona	Éster de 4-Hidroxi-2-oxabiciclo[3.3.0]-oct-7-en-3-ona butirato	Triacilglicerol acilhidrolasa
(*S*)-Éster amidas	Aralactonas racémicas	Triacilglicerol acilhidrolasa inmovilizada (triacilglicerol lipasa)
L-Aminoácidos	Aminoácidos racémicos N-acetilados	L-Acilasas
D-Aminoácidos	Hidantoínas racémicas	Hidantoinasas, descarbamilasas, racemasa
L-Tert-leucina	Trimetil piruvato	Leucina deshidrogenasa
(2*R*,3*S*)-3-(*p*-Metoxifenil)glicidil metil-éster	Trans-3- (*p*-metoxifenil) glicidil metiléster racémico	Lipasa
L-Aminoácidos	Derivados de aminoácidos racémico	Amidasas, esterasas, proteasas
D-Aminoácidos	Hidantoínas racémicas	Hidantoínas, descarbamilasa
L-Aspártico	Fumárico	Amonioliasa
Aspartamo	L-aspártico N-Protegido, D/L-fenilalanina metil éster	Termolisina
Cianohidrinas enantioméricamente puras	Aldehídos	Hidroxinitriloliasa
6-APA, 7-ADCA	Penicilina G oV	Penicilinacilasa G o V
Antibióticos β-lactámicos	7-ADCA o 6-APA y ácidos derivados	Acilasas
Niacinamida	Nicotinonitrilo	Células enteras inmovilizadas, nitrilo hidratasa
2-Piridinamida, pirazinamida	Nitrilos	Células enteras, nitrilo hidratasa
(S)-Pipecólico, *(R)*- y *(S)*-piperazínico	Amidas racémicas	Células enteras, *(R)*- y *(S)*-amidasas
(S)-2-Fenil-propiónico	2- Fenilpropionitrilo racémico	Células enteras, nitrilo hidratasa, amidasa
L-Carnitina	4-Trimetilamino butirato	Células enteras, desaturasa, hidratasa
Derivados hidroxilados en el anillo de piridina y pirazina	Derivados de piridina y pirazina	Células enteras, nitrilasas, deshidrogenasas
5-Metil-pirazina-2-carboxílico	2,5-Dimetilpirazina	Células enteras, ruta de degradación de xileno
7-ACA	Cefalosporina C	D-Aminoácido oxidasa y glutarilacilasa
(S)-Epoxiestireno	Estireno	Células enteras, estireno hidroxilasa

Por biotransformación o biocatálisis se entiende todo proceso por el que una sustancia se transforma en otra mediante una reacción o conjunto de reacciones bioquímicas. Si bien la fermentación se puede considerar como un proceso de biotransformación complejo, en este apartado se van a tratar sólo aquellos procesos en los que intervienen un número pequeño de reacciones. Obviamente, en el extremo de la simplicidad se encuentran los procesos biocatalíticos en los que sólo interviene una enzima. Estos procesos pueden desarrollarse *in vivo* o *in vitro* con células o enzimas libres o inmovilizadas. A su vez, en los procesos *in vivo* pueden utilizarse células en crecimiento o células en reposo (*resting cells*). El que se utilicen enzimas purificadas o los organismos completos en el proceso de conversión depende en gran medida del requerimiento de cofactores enzimáticos que necesiten ser regenerados. La regeneración *in vitro* de los cofactores es cara y compleja y en esos casos se utilizan los organismos completos.

La hidrólisis estereoespecífica de un compuesto racémico es una de las herramientas que más se utilizan en procesos de biotransformación para obtener compuestos quirales puros. El rendimiento teórico de este proceso es del 50% pero mediante la combinación de racemasas e hidrolasas estereoespecíficas se pueden producir con altos rendimientos muchos compuestos quirales a partir de mezclas racémicas, ya que mediante la racemasa el enantiómero no hidrolizado es racemizado para volver a ser hidrolizado de nuevo. A veces, para conseguir estos fines se pueden también combinar la catálisis química y la biocatálisis. Por ejemplo, las lipasas catalizan la hidrólisis o síntesis enantioselectiva de ésteres racémicos y se utilizan para la obtención de alcoholes o ésteres quirales. El éster enantiomérico no hidrolizado o no utilizado en la síntesis puede ser racemizado mediante catálisis química con un catalizador de rutenio o paladio.

En el caso de los aminoácidos, en algunas ocasiones se pretende obtener la forma L pero otras veces interesa la forma D, e incluso puede ser necesario obtener aminoácidos no naturales para la síntesis de peptidomiméticos de interés clínico como los que se emplean para inhibir proteasas como la trombina, la proteasa del VIH, o la enzima convertidora de la angiotensina. Los D-aminoácidos, como D-alanina, D-glutámico, y D-prolina, utilizados en la síntesis de fármacos se producen a partir de

sus amidas racémicas utilizando amidasas estereoespecíficas. Mediante clonaje de los genes de tres enzimas de diferentes organismos (L-aminoácido desaminasa de *Proteus myxofaciens*, D-aminoácido aminotransferasa de *Bacillus sphaericus*, y alanina racemasa de *Salmonella typhimurium*) se ha producido en *Escherichia coli* D-fenilalanina, D-tirosina, D-triptofano, y D-leucina a partir de sus respectivos L-isomeros. Los L-aminoácidos además de por fermentación directa se pueden obtener por biotransformación, y un ejemplo de ello es el uso de la *Pseudomonas putida* para obtener L-cisteína a partir de D,L-amino-(2-tiazolina-4-carboxilato por acción de una tiazolina carboxilato racemasa y una hidrolasa L-específica. El ácido D-pantoténico (una vitamina utilizada como aditivo alimentario) se produce a partir de D,L-pantoteil-lactona mediante una hidrólisis estéreo-específica realizada con el hongo *Fusarium oxysporum*.

Ya se ha comentado que algunas de las enzimas que se utilizan en procesos biocatalíticos, como oxigenasas y reductasas, requieren cofactores (*e. g.,* NADH) que han de ser regenerados *in situ* porque tienen un alto coste y su consumo sin regeneración haría que el proceso no sea rentable. El reciclado del cofactor se suele hacer utilizando la ayuda de una enzima ya sea *in vivo* o *in vitro*. Los primeros procesos de biotransformación en los que se utilizaba la regeneración de cofactores se describieron en la década de 1980 para la aminación reductiva del 2-oxo-4-metilpentanoico a L-leucina con L-leucina deshidrogenasa. En este proceso el cofactor NAD unido a PEG se reciclaba con formiato y formiato deshidrogenasa de la levadura *Candida boidinii*. También se usa para este fin la glucosa deshidrogenasa. Un sistema alternativo para el reciclado de NADPH por fotorreducción se ha descrito para la síntesis de L-glutamato a partir del ácido 2-oxoglutárico y amoniaco.

Algunos de los ejemplos más interesantes de los procesos de biotransformación se encuentran en el campo de la producción de esteroides. Se ha conseguido clonando genes humanos, bovinos y de plantas producir en *Saccharomyces cerevisiae* pregnenolona y progesterona a partir de galactosa. Hasta entonces la síntesis de estos esteroides se hacía mediante una combinación de síntesis química y biotransformación empleando precursores como colesterol y fitosteroles.

Los oligosacáridos son productos de mucho interés farmacéutico pero difíciles de obtener por síntesis química. La polimerización de azúcares transcurre *in vivo* por la adición sucesiva de moléculas del tipo de la UDP-glu-

cosa o la UDP-galactosa. Se están desarrollando sistemas para la síntesis de UDP-glucosa a gran escala utilizando hexokinasa, fosfoglucomutasa y UDP-glucosa pirofosforilasa. A pequeña escala, se ha integrado la regeneración de UDP-galactosa con la síntesis de trisacáridos utilizando *Corynebacterium. ammoniagenes* y un recombinante de *E. coli*. Los productos de partida son ácido orótico, glucosa, fructosa y galactosa. El uridin-trifosfato (UTP) necesario en este proceso se sintetiza en *C. ammoniagenes* a partir del ácido orótico para que, posteriormente, sea transformado en UDP-galactosa por el recombinante de *E. coli* que expresa los genes *galT*, *galK* y *galU*. Cuando además en *E. coli* se expresa una 1,4-galactosiltransferasa, la UDP-galactosa se puede acoplar con la lactosa para producir el oligosacárido globotriosa. Éste es uno de los sistemas más complejos de biotransformación que puedan ser diseñados, ya que se requieren sistemas de regeneración de ATP y UDP y, además, hay que mantener las células permeabilizadas para facilitar la salida y entrada de los nucleótidos en el sistema.

La pravastatina, un fármaco utilizado para disminuir los niveles de colesterol, es uno de los más vendido en el mundo. La pravastatina se produce por oxidación microbiana de la compactina producida por fermentación mediante un proceso que implica el uso de dos microorganismos: *Penicillium citrinum* para la producción de compactina y *Streptomyces carbophilus* para la oxidación regio- y estéreo-específica de la compactina. Como este proceso no es muy eficiente se ha creado un recombinante de *Penicillium* en el que se ha clonado y expresado el gen de la citocromo P450 monooxigenasa de *Streptomyces* necesaria para la oxidación de la compactina, lo que permite la producción de pravastatina en un único paso.

Uno de los procesos más utilizados de biotransformación a escala industrial es la cascada enzimática formada por la hidantoinasa, la N-carbamoilasa y la hidantoína racemasa, que sirve para obtener D- y L-aminoácidos naturales y no naturales a partir de hidantoínas sintéticas (Figura 1) (Altenbuchner y cols. 2001). Teóricamente, se puede lograr el 100% de conversión en un 100% de aminoácido ópticamente puro a partir de una mezcla racémica. El empleo de las técnicas de evolución dirigida de proteínas, la elucidación de las estructuras de las enzimas, y el empleo de proteínas de fusión han permitido mejorar las enzimas de este proceso.

Las pencilinacilasas (también denominadas penicilinesterasas o penicilinamidasas) son una familia de enzimas que se encuentran ampliamente

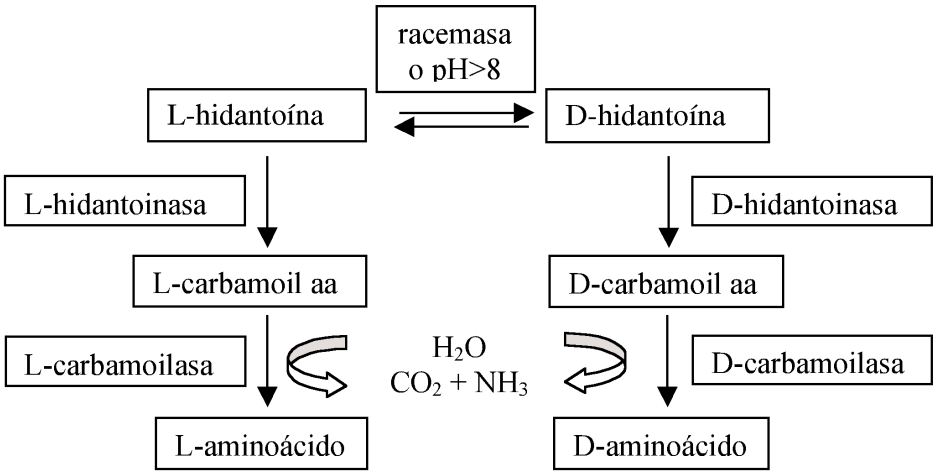


FIGURA 1. *Esquema de biotransformación de D,L-hidantoínas en D,L-aminoácidos.*

distribuidas en la naturaleza y se utilizan desde hace tiempo en la industria de los antibióticos β-lactámicos para obtener 6APA por hidrólisis de las penicilinas G o V. También se emplean para obtener 7ADCA por hidrólisis del producto que resulta después de expandir químicamente el anillo de la penicilina. Una combinación de D-aminoácido oxidasa y glutaril-acilasa se emplea para producir 7ACA a partir de la cefalosporina C. Recientemente, estas acilasas se han utilizado para sintetizar antibióticos, ya que en determinadas condiciones también las enzimas pueden catalizar la reacción inversa con buenos rendimientos. De esta forma se consiguen las penicilinas «verdes» o ecológicas, denominadas así porque en su producción ya no se emplean los procesos químicos más contaminantes. Desde hace tiempo, los genes de estas enzimas se han clonado y manipulado no sólo para mejorar su producción sino para obtener enzimas más eficaces tanto para la hidrólisis como para la síntesis.

4. LAS MACROMOLÉCULAS

Aunque en la actualidad se encuentran en uso clínico algo menos de un centenar de productos biofarmacéuticos, se calcula que más de 60 millones de personas se han beneficiado ya de estos productos, que alcan-

zan un mercado global de unos 12.000 M€ (Walsh, 2000). Ese mercado está en continuo crecimiento y se estima que aproximadamente 500 productos se encuentran en ensayos clínicos. La mayoría de ellos se destinan al cáncer y a las enfermedades cardiovasculares e infecciosas. Aunque en principio muchos de estos productos imitaban a los compuestos naturales, cada vez son más aquéllos en los que se introducen mutaciones por ingeniería de proteínas para mejorar su eficacia terapéutica. Casi todos los productos son proteínas aunque poco a poco van a empezar a comercializarse productos basados en ácidos nucleicos, como vacunas ADN, oligonucleótidos antisentido y ribozimas.

4.1. Proteínas

La Ingeniería Genética ha proporcionado al menos tres grandes ventajas en la producción de proteínas de interés farmacéutico, ya que no sólo ha supuesto una forma de solucionar los problemas de la disponibilidad y de la seguridad de la fuente sino que también ha facilitado la posibilidad de modificar el nuevo fármaco mediante ingeniería de proteínas (Andersen y Krummen, 2002). El tratamiento del enanismo mediante la administración de hormona de crecimiento humana extraída de pituitarias humanas sufrió un duro revés en 1985 cuando se descubrió que producía la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob debido a la contaminación con priones. El problema causado por la presencia de virus en los preparados de proteínas derivadas de la sangre fue otro de los factores que impulsaron el desarrollo de las proteínas a partir de organismos recombinantes.

4.1.1. *Hormonas y factores de crecimiento*

La insulina humana ha sido la primera proteína recombinante que se ha comercializado. En 1982 la compañía Eli Lilly produjo las dos cadenas α y β de la insulina humana en *E. coli* (Tabla 2). Cada cadena de la insulina se produjo en forma de producto de fusión con la β-galactosidasa de *E. coli* utilizando dos fragmentos de ADN sintéticos codificantes de ambas cadenas. Cada cadena de la insulina se separaba de la proteína de fusión mediante una hidrólisis con BrCN. La formación posterior de los puentes

TABLA 2
Hormonas y factores de crecimiento de origen recombinante

Proteína	*Utilidad Terapéutica*	*Nombre comercial (compañía)*	*Sistema de protección*	*Año*
Insulina	Diabetes	Humulin (Eli Lilly) Insuman (Hoechst AG)	*E. coli*	1982
Insulina	Diabetes	Novolin (Novo Nordisk)	*S. cerevisiae*	1991
Insulina Lispro	Diabetes	Humalog (Eli Lilly)	*E. coli*	1996
Insulina BioLysprol	Diabetes	Liprolog (Eli Lilly)	*E. coli*	1997
Insulina Aspart	Diabetes	NovoRapid (Novo Nordisk)	*S. cerevisiae*	1999
Insulina Glargine	Diabetes	Lantus (Aventis)	*E. coli*	2000
Hormona de crecimiento humana (hGH) (metionina N-terminal)	Deficiencia en niños	Protropin (Genentech)	*E. coli*	1985
Hormona de crecimiento humana (hGH)	Deficiencia en niños	Nutropin (Genentech)	*E. coli*	1994
		BioTropin (Biotechnology General)	Línea celular	
		Genotropin (Pharmacia & Upjohn)		
		Norditropin (Novo Nordisk)		
		Saizen (Serono Laboratories)		
		Serostim (Serono Laboratories)		
Glucagón	Hipoglicemia	Glucagen (Novo Nordisk)	*S. cerevisiae*	1998
Hormona estimulante del tiroides (TSH, tirotropina)	Detección/tratamiento del cáncer de tiroides	Thyrogen (Genzyme)	Células CHO	1998
Hormona folículo-estimulante (FSH)	Anovulación superovulación Infertilidad	Gonal F (Ares-Serono)	Células CHO	1995
		Puregon N.V. (Organon)		
		Follistim (Organon)		
Eritropoyetina (EPO)	Tratamiento de la anemia	Epogen (Amgen)	Células CHO	1989
		Procrit (Ortho Biotech)		
		Neorecormo (Boehringer-Mannheim)		
Darbepoyetina alfa	Tratamiento de la anemia inducida por quimioterapia	Aranesp (Amgen)	Células CHO	2002
Eritropoyetina delta	Anemia renal	Dynepo (Aventis S.A).	Línea celular humana	2002
Gonadotropina coriónica humana (hGC)	Tratamiento de la infertilidad	Ovidrel (Serono Laboratories)	Células CHO	2000
Calcitonina	Osteoporosis, enfermedad de Paget, hipercalcemia	Forcaltonin (Unigene UK Ltd.)	*E. coli*	1999
Hormona paratiroidea (PTH, Teriparatida)	Osteoporosis	Forteo (Eli Lilly)	*E. coli*	2002
Hormona luteinizante (LH)	Maduración de folículos	Lutropin alpha (Ares Serono)	Células CHO	2001
PDGF	Úlceras diabéticas neuropáticas de las extremidades inferiores	Regranex (Ortho-McNeil Pharmaceuticals, Janssen-Cilag)	*S. cerevisiae*	1997

disulfuro intra- e inter-catenarios de ambas cadenas generaba una insulina activa idéntica a la humana. Para competir con esta insulina recombinante, la compañía Novo Nordick comercializó el mismo año una insulina humana obtenida a partir de la de cerdo mediante un proceso biocatalítico, si bien esta misma compañía decidió más tarde abandonar este sistema para producir insulina recombinante humana en levaduras. Posteriormente, se han desarrollado otras insulinas modificadas buscando una mayor eficacia terapéutica y así por ejemplo, algunas insulinas modificadas pueden actuar de forma más rápida y otras, por el contrario, lo hacen más lentamente. Las moléculas de insulina tienden a dimerizar y hexamerizar cuando se almacenan a las dosis terapéuticas lo que retrasa el efecto de la insulina porque retarda su absorción en el torrente circulatorio por vía subcutánea o intramuscular. La oligomerización de la insulina se debe a las interacciones que se producen entre los aminoácidos de las posiciones B23-B28 de la cadena β y, por lo tanto, la modificación de estos aminoácidos puede reducir la oligomerización y modificar así la actividad de la insulina. Las insulinas Humalog y Liprolog de Eli Lilly tienen la Pro28 y la Lys29 de la cadena (invertidas en su posición con lo que se consigue una insulina de acción más rápida. De forma parecida la insulina NovoRapid de Novo Nordisk tiene sustituida la Pro28 por ácido aspártico para conseguir el mismo efecto que las anteriores insulinas de Eli Lilly. Por el contrario, la insulina Lantus de Aventis tiene sustituido el Asp21 de la cadena (por glicina y además tiene dos argininas adicionales en la posición C-terminal, con lo que se consigue una insulina de acción más lenta.

El segundo producto recombinante que entró en el mercado farmacéutico fue la hormona de crecimiento humana (hGH). Debido a un fallo de diseño la primera hGH fue sintetizada en 1985 por Genentech en *E. coli* con una metionina adicional en posición N-terminal, por lo que no era exactamente igual a la hormona natural, que comienza por una fenilalanina. Esto motivó que, con posterioridad, otras compañías farmacéuticas pudieran comercializar sin problemas de patentes la verdadera hGH que se producía en *E. coli* mediante un nuevo proceso que implicaba la secreción de la hormona al periplasma bacteriano y evitaba la presencia de la metionina N-terminal.

Otras hormonas y factores de crecimiento se producen actualmente tanto en microorganismos, como *E. coli* y *S. cerevisiae,* como en cultivos

de células de mamífero. De especial relevancia es el caso de la eritropoyetina (EPO), ya que es uno de los productos de mayor mercado gracias no a su uso farmacéutico para combatir anemias, sino por su empleo como dopante en el deporte de élite. En este caso, es importante señalar que la EPO recombinante ha de producirse en células de mamífero, ya que para ser activa tiene que estar adecuadamente glicosilada. En muchas ocasiones, la correcta glicosilación de una proteína es un proceso esencial para que pueda manifestar su actividad y por ello en estos casos se requiere seleccionar la célula recombinante más adecuada para la producción de la misma.

Algunas hormonas se obtienen aún a partir de fluídos humanos. Este es el caso de la hormona humana folículo-estimulante (FSH) que se obtiene a partir de la orina de mujeres posmenopáusicas. La producción de la FSH recombinante tiene ciertas ventajas, ya que entre otras cosas evita la contaminación con la hormona luteinizante (LH), que también se encuentra en la orina.

Cada vez son más las hormonas que se producen por tecnologías recombinantes con una alta eficiencia y a un coste razonable, pero lo que tal vez es más importante proporcionando una gran seguridad de uso (Tabla 2)

4.1.2. Anticuerpos

En 1975, Köhler y Milstein establecieron el método para producir anticuerpos monoclonales en ratón. Sin embargo, la utilidad de estos anticuerpos en terapéutica humana era muy limitada por su elevada inmunogenicidad. Por eso, desde entonces, se han realizado muchos esfuerzos para reducir esta inmunogenicidad, o lo que es lo mismo para humanizar los anticuerpos parcial o totalmente (Chadd y Chamow, 2001). A mediados de la década de 1990 se desarrollaron ratones transgénicos capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos. Esta tecnología permite obtener anticuerpos humanos utilizando las técnicas estándar de obtención de hibridomas. Gracias a estos avances tecnológicos los anticuerpos representan hoy en día una clase importante de fármacos para combatir enfermedades infecciosas, inflamatorias, cardiovasculares y cancerosas. Actualmente, el número de anticuerpos monoclonales en desarrollo es casi tan alto como el de las vacunas.

TABLA 3

Sistemas de expresión de anticuerpos

Sistema (fuente)	*Tipo*	*Uso*
Biorreactor		
Escherichia coli (citosol, periplasma)	Mu scFv	Diagnóstico, terapéutico
Pichia pastoris (medio de cultivo)	Mu scFv	Diagnóstico, terapéutico
Drosophila melanogaster (medio de cultivo)	Mu scFv	Diagnóstico
Células de mamífero (CHO/NS0) (medio de cultivo)	Ch IgG1	Terapéutico
	Ch Fab	
	Hz IgG1	
Hibridoma (medio de cultivo)	Mu IgG2	Terapéutico
	Mu IgM	
	Hu IgG2	
Animal transgénico		
Ratón (leche)	Ch IgG1	Investigación
Pollo (huevo)	No determinado	Terapéutico
Cabra (leche)	Ch IgG1	Terapéutico
	Hu IgG2	
Planta transgénica		
Tabaco (hoja)	SIgA/G: Ch	Terapéutico
Maíz (semilla)	Hz IgG	Terapéutico
Soja (vaina, semilla, tallo, hoja)	Hz IgG	Terapéutico
Arroz (semilla)	Mu scFv	Diagnóstico, terapéutico
Trigo (semilla)	Mu scFv	Diagnóstico, terapéutico

Ch, quimérico; Hu, humano; Hz, humanizado; Mu, murino; SIgA/G, IgA/G secretada.

Los anticuerpos se producen en organismos transgénicos y en biorreactores tanto con bacterias como con células de mamífero (Tablas 3 y 4). Los organismos transgénicos (ratón, cabra, pollo, plantas) y las células recombinantes de mamífero (CHO, NS0) son los más adecuados para producir anticuerpos completos. Las bacterias sólo permiten obtener de forma muy eficiente fragmentos de anticuerpos. Una alternativa para producir anticuerpos humanos completos es utilizar lo que se denomina presentación en bacteriófagos (*phage display*). El producto inicial es un fragmento Fv de cadena simple (scFv) en el que un pequeño polipéptido se utiliza para

TABLA 4
Anticuerpos comercializados

Proteína	*Unidad Terapéutica*	*Nombre comercial (compañía)*	*Año*
Muromomab CD3 (Mab murino contra CD3 de linfocito T)	Rechazo agudo de transplante de riñón	Orthoclone OKT3 (Ortho Biotech)	1986
Daclizumab (Mab humanizado contra la cadena (del receptor de IL-2)	Prevención del rechazo agudo de transplante de riñón	Zenapax (Hoffmann La-Roche)	1997
Basiliximab (Mab quimérico contra la cadena (del receptor de IL-2)	Profilaxis del rechazo agudo de transplante alogénico de riñón	Simulect (Novartis)	1998
Abciximab (Fragmento Fab derivado de un Mab quimérico, contra el receptor de plaquetas $GPII_b/III_a$)	Prevención de coágulos	ReoPro (Centocor)	1994
Rituximab (Mab quimérico contra CD20 de linfocitos B)	Linfomas distintos al de Hodgkin	Rituxan (Genentech/IDEC Pharmaceuticals)	1997
Infliximab (Mab quimérico contra TNF-()	Tratamiento de la enfermedad de Crohn	Remicade (Centocor)	1998
Trastuzumab (Mab humanizado contra receptor 2 del EGF humano, HER2)	Tratamiento contra metástasis de cáncer de mama si el tumor s obreexpresa HER2	Herceptin (Genentech)	1998
Palivizumab (Mab humanizado contra un epítopo de superficie del virus respiratorio)	Profilaxis de la enfermedad del tracto respiratorio bajo por virus sincitial en niños	Synagis (MedImmune, Abbott)	1998
Satumomab Pendetide (Mab murino contra TAG-72, glicoproteína de tumores)	Detección de cáncer colorectal y ovárico	OncoScint CR/OV (Cytogen)	1992
Igovomab (Fragmento de Mab murino (Fab2) contra antígeno tumoral CA 125)	Diagnóstico de adenocarcinoma ovárico	Indimacis 125 (CIS Bio)	1996
Arcitumomab (Fragmento de Mab murino (Fab) contra el antígeno carcinoembriónico humano, CEA)	Detección de metástasis de cáncer colorectal	CEA-scan (Immunomedics)	1996
Imiciromab-Pentetate (Fragmento de Mab murino contra miosina cardiaca humana)	Detección por imagen de infarto de miocardio	MyoScint (Centocor)	1996
Capromab Pentetate (Mab murino contra antígeno tumoral de superficie PSMA)	Detección de adenocarcinoma de próstata	ProstaScint (Cytogen)	1996
Fragmentos de Mab murino (Fab/Fab2 mezcla) contra HMW-MAA)	Diagnóstico de lesiones de melanoma cutáneo	Tecnemab KI (Sorin)	1996
Nofetumomab (Fragmento de Mab murino (Fab) contra antígeno de carcinoma)	Detección de cáncer de pulmón	Verluma (Boehringer Ingelheim/NeoRx)	1996
Sulesomab (Fragmento de Mab murino (Fab) contra NCA 90, un antígeno de superficie no específico de granulocito)	Diagnostico por imagen de infecciones /inflamaciones de huesos en pacientes con osteomielitis	LeukoScan (Immunomedics)	1997
Votumumab (Mab humano contra citoqueratina asociada a tumor)	Detección de carcinoma de colon o recto	Humaspect (Organon Teknika)	1998
Mab contra virus T-linfotróficos tipos I y II/Abbott HTLV-I/ HTLV-II	Para inmunoensayo de linfocitosT y B humanos infectados crónicos	Abbott Laboratories	1997
Adalimumab	Artritis reumatoide	HUMIRA (Cambridge Antibody Technologies y Abbott Laboratories)	2002
Ibritumomab tiuxetan	Linfomas distintos al de Hodgkin	Zevalin (IDEC Pharmaceuticals Corp.)	2002
Alemtuzumab (mAB anti CD52)	Leucemia linfocítica	Campath (Ilex Oncology Inc., Millennium Pharmceuticals Inc. y Berlex Laboratories Inc.	2001

unir las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo, o un fragmento Fab a partir de los cuales se debe reconstruir un anticuerpo completo y producirlo mediante un sistema de expresión idóneo.

Los fragmentos tipo scFv se utilizan para radioinmunodetección o para radioterapia *in situ*, ya que tienen una buena penetración en los tumores, una reducida antigenicidad y son rápidamente eliminados por el organismo, con lo que se disminuye su toxicidad. Por el contrario, los anticuerpos más grandes tienen una vida media mayor. La desventaja de la producción de los anticuerpos en bacterias es que no se pueden glicosilar en la posición Asn297, lo que es muy importante para mostrar su función efectora. De todas formas, hay que tener en cuenta que la glicosilación que se produce en el anticuerpo sintetizado por las células de mamífero depende del tipo de célula y por ello se han modificado por Ingeniería Genética las células CHO para simular una glicosilación más parecida a la humana.

4.1.3. Vacunas

La primera vacuna recombinante que se aprobó para su uso farmacéutico fue la vacuna contra el virus de la hepatitis B. Hasta entonces la vacunación contra esta enfermedad se hacía con virus atenuados (Tabla 5). La vacuna recombinante se produce en levaduras recombinantes que portan un gen que codifica una proteína de la cubierta del virus. Algunas toxinas que se utilizan para vacunas también se obtienen actualmente mediante Ingeniería Genética. La categoría más importante de los productos biofarmacéuticos que están actualmente en desarrollo es el de las vacunas, con casi 100 productos diferentes. La mayoría se están desarrollando para tratar o prevenir el cáncer. El resto se están desarrollando contra el SIDA y diferentes infecciones, fundamentalmente del aparato respiratorio.

4.1.4. Proteínas que intervienen en los procesos de coagulación

Cuando en el organismo se produce una hemorragia, un factor crítico para detenerla es la activación de la cascada de coagulación sanguínea. Este sistema esta compuesto por una docena de proteínas presentes

Tabla 5
Vacunas recombinantes

Proteína	*Utilidad terapéutica*	*Nombre comercial (Compañía)*	*Año*
HBsAg	Hepatitis B	Recombivax (Merck)	1986
Vacuna combinada entre hepatitis B recombinante y *H. influenza* B	Hepatitis B y *H. influenzae* tipo B	Comvax (Merck) Procomvax (Pasteur Merieux MSD)	1996
Vacuna combinada entre hepatitis B recombinante, toxina diftérica, toxina tetánica, y *B. pertussis*	Tétanos, *B. pertussis,* difteria y hepatitis B	Tritanrix-HB (GlaxoSmith-Kline)	1996
Vacuna combinada entre toxinas diftérica, tetánica y hepatitis B recombinante	Tétanos, difteria y hepatitis B	Primavax (Pasteur Merieux MSD)	1998
OspA (lipoproteína de *B. burgdorferi*)	Enfermedad de Lyme	Lymerix (SmithKline Beecham)	1998
Vacuna con tres toxinas recombinantes	Tétanos, *B. pertussis,* y difteria	Triacelluvax (Chiron)	1999
Antígenos S, pre-S1, pre-S2 de hepatitis-B	Hepatitis B	Medeva Pharma	2000
Vacuna de hepatitis A inactivada y hepatitis B recombinante	Hepatitis A y B	Twinrix (GlaxoSmith-Kline)	2001
Vacuna combinada de toxinas diftérica, tetánica, *B. pertussis,* hepatitis B recombinante y virus de la polio inactivado	Difteria, tétanos, *B. pertussis*, hepatitis B y polio	Pediarix (GlaxoSmithKline)	2002
Vacuna conjugada anti neumocócica 7-valente con la proteína diftérica CRM-197	Inmunización contra neumococo en niños y ancianos	Prevenar (Wyeth-Lederle)	2002

en el plasma, que actúan como un sistema de amplificación, de tal manera que un pequeño estímulo inicial da lugar a la formación final del coágulo de fibrina. La falta o deficiencia de una de las proteínas de alguno de los pasos intermedios de esta cascada de amplificación impide la formación de este coágulo y, por lo tanto, conduce a un problema grave para el organismo. En el centro de esta cascada se encuentran los factores VII, VIII y IX, cuya carencia genera los tipos más frecuentes de problemas hemofílicos que conducen a hemorragias prolongadas. La deficiencia del factor VIII genera la hemofilia A o hemofilia clásica, que supone un 80% de los casos de hemofilia en el mundo, en tanto que la deficiencia del factor IX conduce al otro tipo más frecuente, la hemofilia B. La hemofilia se combate mediante el aporte del factor deficitario y por ello antes de su producción por técnicas recombinantes era necesario extraerlo de la sangre de donantes. Al tratarse de un hemoderivado el riesgo de que

los pacientes hemofílicos contrajeran enfermedades virales (hepatitis, sida y otros virus) al administrarles el producto era muy alto y de hecho se registraron bastantes casos de infecciones virales en los pacientes tratados con estos productos. Por consiguiente, era prioritario el desarrollo de los factores VIII y IX recombinantes, y el primero de estos se puso en el mercado en 1992 (Tabla 6). Su producción ha de hacerse en células de mamífero CHO o BHK, ya que la correcta glicosilación de la proteína es fundamental para su actividad.

El Factor VIIa recombinante se puede utilizar para revertir el exceso de anticoagulación producido por los anticoagulantes orales, por lo que puede emplearse en personas con riesgo de sangrado. Actualmente, los pacientes con sobredosificación de anticoagulantes son tratados con plasma para revertir rápidamente el efecto secundario de sangrado que conlleva el uso de estos medicamentos. Sin embargo, el plasma no sólo supone una sobrecarga de volumen, que muchos pacientes no pueden tolerar, sino que además, este tratamiento no está exento de riesgos de transmisión de infecciones. Por esto el uso de proteínas de origen recombinante es más seguro.

Si tan problemática es la ausencia de una coagulación correcta también el exceso de formación de coágulos puede conducir a la aparición de trombos, que a su paso por el cerebro o el corazón suelen ser mortales. Para destruir estos coágulos, el organismo utiliza el sistema fibrinolítico empleando la plasmina que procede del plasminógeno activado por las denominadas proteínas activadoras de plasminógeno (*i. e.,* tPA, activador tisular del plasminógeno y uroquinasa, uPA, o activador de plasminógeno urinario), que se encuentran en distintos fluídos del organismo. Dado que el tPA es más específico que la uPA, se considera al tPA de primera elección y es por ello que el primer anticoagulante recombinante que se comercializó fue el tPA. Actualmente, también se utiliza para este fin la estreptoquinasa, que es una proteína de *Streptomyces*, que si bien es mucho menos específica que el tPA y conlleva el riesgo añadido de provocar alergias, resulta mucho más barata.

La hirudina es una proteína que se encuentra en la saliva de la sanguijuela (*H. medicinalis*), que se une de forma selectiva a la trombina y que, por lo tanto, impide la hidrólisis del fibrinógeno, o lo que es lo mismo su acción anticoagulante. La hirudina recombinante se puede utilizar

TABLA 6

Factores de coagulación de la sangre de origen recombinante

Proteína	*Utilidad Terapéutica*	*Nombre comercial (compañía)*	*Sistema de producción*	*Año*
Factor VIII	Hemofilia A	Recombinate (Baxter Healthcare/Genetics Institute) Bioclate (Centeon) Kogenate (Bayer) Helixate (Centeon)	Células CHO o BHK	1992
Factor VIII Moroctocog-alfa, (dominio B delecionado)	Hemofilia A	ReFacto (Genetics Institute)	Células CHO	1999
Factor IX	Hemofilia B	Benefix (Genetics Institute)	Células CHO	1997
Factor VIIa	Hemofilias	NovoSeven (Novo-Nordisk)	Células BHK	1995
Hirudin	Anticoagulante	Revasc (Ciba Novartis/Europharm) Refludan (Hoechst Marion Roussel, Behringwerke AG)	*S. cerevisiae*	1997
Hirudin sin sulfato en Tyr 65	Anticoagulante	Desirudine (Ciba Europharm Ltd)	*S. cerevisiae*	1997
tPA Alteplasa	Infarto agudo de miocardio	Activase (Genentech)	Células CHO	1987
tPA Reteplasa (3 de los 5 dominios delecionados)	Infarto agudo de miocardio	Ecokinase (Galenus Mannheim) Retavase (Boehringer Mannheim/Centocor) Rapilysin (Boehringer Mannheim)	*E. coli*	1996
Drotrecogin alfa activado (Proteína C humana activada)	Sepsis	Xigris (Eli Lilly and Co.)	Células humanas	2001

CHO: células de ovario de hámster chino. BHK: células de riñón de hámster.

como anticoagulante. La α1-antitripsina y la antitrombina III son proteínas del plasma cuya deficiencia es relativamente frecuente en la población. La primera se sintetiza en el hígado y su deficiencia es responsable de enfisemas pulmonares. La segunda regula la formación del coágulo y por ello su deficiencia conduce a un aumento de la formación de coágulos y a perturbaciones del sistema inmunitario. Actualmente, estas proteínas están siendo objeto de desarrollo mediante técnologías recombinantes.

La ingeniería de proteínas ha permitido sacar al mercado nuevas formas de proteínas coagulantes o anticoagulantes más eficaces. Así, se ha desarrollado un factor VIII que posee una deleción de su dominio B. También se ha desarrollado un tPA más rápido que tiene tres de sus cinco dominios delecionados [el domino N-terminal (*finger domain*), el dominio EGF, y el dominio Kringle 1].

4.1.5. Inmunomoduladores

Los interferones (IFNs) son un grupo de proteínas que se producen y secretan por diferentes tipos de células. Los más importantes se agrupan en tres familias, los IFNα de origen leucocitario, los IFNβ derivados de fibroblastos, y los IFNγ producidos por linfocitos T. Existen al menos trece tipos distintos de IFNα, cinco de IFNβ y un número no muy bien determinado de IFNγ. Cuando se descubrieron las propiedades antitumorales y antivirales del IFNα, las primeras producciones industriales se realizaban a partir de una línea linfoblastoide humana (Namalwa) en la que se generaba una mezcla de IFNs. Al poco tiempo, se pudieron clonar los genes de distintos interferones que se sintetizaron en *E. coli* con mayores rendimientos (Tabla 7). El IFNα fue uno de los primeros productos recombinantes en entrar en el mercado junto con la insulina y la hGH humanas. En la actualidad también se produce una forma de inteferón recombinante que podría clasificarse como un IFN sintético (Infergen), ya que se ha desarrollado creando un gen sintético que codifica en cada posición el aminoácido más frecuente encontrado al comparar los distintos subtipos de IFNs.

La interleukina 2 (IL2) es una glicoproteína producida por los linfocitos T en respuesta a agentes mitógenos y antígenos. La IL2 estimula las propiedades citotóxicas de los linfocitos T y las células NK (*natural ki-*

TABLA 7

Inmunomoduladores de origen recombinante

Proteína	*Unidad Terapéutica*	*Nombre comercial (compañía)*	*Sistema de producción*	*Año*
IFN-α2a	Leucemia	Roferon A (Hoffmann La-Roche)	*E. coli*	1986
IFN-α(IFN tipo I sintético)	Hepatitis C crónica	Infergen (Amgen Yamanouchi Europe)	*E. coli*	1997
IFN-α2b	Leucemia. Hepatitis B, C, y varios cánceres	Intron A (Schering Plough) Virtron (Schering Plough) Alfatronol (Schering Plough)	*E. coli*	1986
IFN-β1b (difiere en C17S)	Esclerosis múltiple	Betaferon (Schering AG) Betaseron (Berlex Laboratories and Chiron)	*E. coli*	1993
IFN-β1a	Esclerosis múltiple	Avonex (Biogen) Rebif (Ares Serono)	Células CHO	1996
IFN-γ1b	Granulomatosis crónica	Actimmune (Genentech)	*E. coli*	1990
PEG-IFN-α2a	Hepatitis C	Pegasys (Roche and Inhale Therapeutics Inc.)	*E. coli*	2002
IFN-α2b y ribavirina	Hepatitis C crónica	Rebetron (Schering Plough)	*E. coli*	1999
IL-2 (sin alanina N-terminal y con C125S)	Carcinoma renal	Proleukin (Chiron)	*E. coli*	1992
IL-11 (sin prolina N-terminal)	Prevención de trombocitopenia inducida por quimioterapia	Neumega (Genetics Institute)	*E. coli*	1997
Fusión IL-2-toxina diftérica	Linfoma cutaneo de células T	Ontak (Seragen/Ligand Pharmaceuticals)	*E. coli*	1999
Anakinra (antagonista no glicosilado del receptor de IL1)	Artritis reumatoide	Kineret (Amgen)	*E. coli*	2001
(metionina N-terminal)	Neutropenia	Filgrastim (Hoffmann-La Roche)	*E. coli*	1994
G-CSF	Neutropenia	Lenograstim (Rhône-Poulenc, Rorer GmbH, Chugai)	Células CHO	1993
G-CSF (glicosilado)	Neutropenia	Neupogen (Amgen)	*E. coli*	1991
G-CSF (metionina N-terminal) PEG-Filgrastim	Neutropenia	Neulasta (Amgen Europe)	*E. coli*	2002
GM-CSF (glicosilado)	Neutropenia	Molgramostim (Essex Pharma GmbH , Sandoz AG, Schering-Plough)	Línea celular	1993
GM-CSF (difiere en la Leu 23)	Transplante autólogo de médula ósea	Leukine (Immunex)	*E. coli*	1991

ller) y actualmente se produce mediante tecnología recombinante para combatir el cáncer y como antiviral. Otra interleukina con gran futuro farmacéutico es la IL11.

La generación de granulocitos y macrófagos a partir de células hematopoyéticas inmaduras depende de los factores estimuladores de colonias (CSF). Distintas formas recombinantes de estos factores se encuentran ya en el mercado para combatir la neutropenia en diversas patologías.

4.1.6. Otras proteínas

Son muchas las proteínas de interés terapéutico que se están produciendo por tecnologías recombinantes y que no son fáciles de clasificar entre los anteriores epígrafes (Tabla 8). Un caso típico es el TNF (factor de necrosis tumoral) que es una citotoxina producida de forma natural por macrófagos activados que es capaz de provocar la muerte de los tumores. Actualmente, se comercializa gracias a que se produce de forma recombinante en *E. coli* y se utiliza como anticancerígeno.

Por otro lado, para mejorar la recuperación de las fracturas de los huesos y combatir ciertas patologías de la médula espinal se comercializa desde hace poco tiempo la proteína BMP (*Bone morphogenetic protein*) que es una proteína que estimula la regeneración del tejido óseo.

Distintas enzimas producidas por Ingeniería Genética se utilizan para hidrolizar/eliminar productos tóxicos en el organismo (*e. g.,* DNasa, ureasa, asparaginasa, glucocerebrosidasa), o para sustituir alguna deficiencia (adenosina deaminasa). Algunas han sido modificadas genética o químicamente para aumentar su eficacia.

El caso de la albúmina humana es un tanto paradigmático ya que si bien desde hace tiempo se puede obtener por Ingeniería Genética, su comercialización no es muy competitiva frente a la extracción a partir de plasma humano donde es muy abundante. Además la albúmina se usa como expansor de plasma en grandes cantidades (g/l) con lo que por una parte su producción ya no disfruta del valor añadido de los productos recombinantes que se usan en la escala de micro o miligramos, y además tiene el problema de que requiere una mayor precisión en la purificación, porque al usarla en el

TABLA 8
Distintas proteínas de origen recombinante

Proteína	*Unidad Terapéutica*	*Nombre comercial (compañía)*	*Sistema de producción*	*Año*
Dornase-α (DNasa)	Fibrosis cística	Pulmozyme (Genentech)	Células CHO	1993
β-Glucocerebrosidasa (difiere en R495H y tiene un oligosacárido modificado)	Tratamiento de la enfermedad de Gaucher	Cerezyme (Genzyme)	*E. coli*.	1994
TNF-α	Antitumoral	Beromun (Boehringer Ingelheim)	*E. coli*	1999
Fusión TNFR- Framento IgG	Artritis reumatoide	Enbrel (Immunex Wyeth Europa)	Células CHO	1998
Uricasa	Ácido úrico en plasma	Rasburicase (Elitek Sanofi-Synthelabo)	*S. cerevisiae*	2002
Bone Graft/LT-CAGE (Proteína morfogenética de huesos humana [rhBMP-2])	Enfermedades espinales degenerativas. Fracturas de huesos	Infuse (Wyeth and Medtronic Sofamor Danek) Dibotermin alfa (Genetics Institute Europe B.V.)	Linea celular	2002
PEG-Adenosina deaminasa bovina	Inmunodeficiencia (SCID)	Adagen (Enzon, Inc.)	*E. coli*	1990
Albúmina humana	Hipovolemia, Hemodiálisis	Albutein (Alpha Therapeutic Corporation)	Plasma humano	1986
Albúmina humana recombinante	Hipovolemia, Hemodiálisis	Albagen (New Century Pharmaceutical) Recombumin (Delta Biotechnology)	*S. cerevisiae*	Desarrollo
PEG-L-asparaginasa	Leucemia linfoblastoide	Oncaspar (Enzon, Inc., Rhone- Poulenc Rorer)	*E. coli*	1994
α-Galactosidasa A humana	Enfermedad de Fabry	Agalsidase alfa (TKT Europe-5S AB) Fabrazyme, Agalsidase beta (Genzyme B.V.)	Células CHO	2001
Nesiritida (péptido natriurético B humano)	Fallo cardiaco	Natrecor (Scios Inc.)	Síntesis	2001
Fomivirsen (oligonucleótido antisentido)	Retinitis por CMV en casos de SIDA	Vitravene (ISIS pharmaceuticals)	Síntesis	1998

orden de gramos cualquier pequeña contaminación se hace más evidente y puede provocar alergias. Como ya se ha comentado para otras proteínas de la sangre el mayor valor que aporta la albúmina recombinante es que evita la posibilidad de contaminación por virus de la sangre.

4.2. Polinucleótidos

El vitravene es, por el momento, el único oligonucleótido aprobado para uso clínico, Este oligonucleótido inhibe la replicación del citomegalovirus humano (hCMV) por un mecanismo antisentido. Esta formado por 21 nucleótidos cuya secuencia es complementaria a una región del ARNm derivado del hCMV que codifica varias proteínas responsables de la regulación de la expresión del virus y que es esencial para su replicación. Actualmente, se encuentran en desarrollo cerca de una decena de oligonucleótidos antisentido fundamentalmente desarrollados para combatir el cáncer.

5. LAS EMPRESAS Y EL MERCADO FARMACÉUTICO DE LA BIOTECNOLOGÍA

Ya se ha comentado que en 1982 la compañía Eli Lilly puso en el mercado la insulina humana recombinante producida en *E. coli*. La insulina de cerdo tenía por entonces un mercado establecido y se pensó en la opción de sustituirla por la humana recombinante que poseía una secuencia idéntica a la humana nativa. Actualmente, el mercado de la insulina humana constituye un claro ejemplo de un mercado farmacéutico maduro con un precio de venta de 400 €/g de insulina, que combina el hecho de ser un producto que se necesita para tratar una enfermedad crónica en grandes cantidades junto con la propiedad de que se obtiene a un coste aceptable mediante un proceso muy eficaz y fácilmente escalable. Las insulinas que comercializa Ely Lilly con el nombre de Humulin o Humalog alcanzan actualmente unas ventas mundiales que rondan los 1000 M$ y 600 M$, respectivamente.

Para hacerse una idea de hasta dónde puede llegar el desarrollo de proteínas recombinantes de uso farmacéutico con un coste competitivo puede tomarse como ejemplo el caso de la hormona de crecimiento bo-

vino de uso veterinario y que produce Monsanto en *E. coli* a un precio de venta de 11,6 €/g, lo que supone un coste de producción de la hormona del orden de 5 €/g (Swartz 2001).

Cerca de un centenar de productos biofarmacéuticos se utilizan actualmente en clínica de los que se benefician alrededor de unos 60 millones de personas en el mundo dentro de un mercado global que supera los 20.000 M$. Se calcula que otros 500 productos biofarmaceúticos están en periodo de pruebas clínicas, sobre todo para combatir las enfermedades que más mortalidad causan en el mundo como el cáncer, los problemas cardiovasculares, los problemas neurológicos, y las infecciones. Los productos que más se están desarrollando son las vacunas y los anticuerpos monoclonales contra el cáncer. De esos 500 nuevos productos una treintena son fármacos basados en ácidos nucleicos que se pretenden aplicar con distintos fines (terapia génica, vacunas, sistemas antisentido y ribozimas).

Es importante destacar que en tanto que los primeros productos aprobados eran proteínas de reemplazamiento o sustitución con secuencias idénticas a las proteínas nativas cada vez son más los productos que contiene proteínas modificadas mediante diferentes tipos de ingeniería de proteínas o como también se ha mencionado, mediante modificación química que en muchos casos aumentan o dismunuyen su vida media o su actividad y de esta manera modifican a voluntad su eficacia terapéutica.

Resulta interesante que el medicamento recombinante más vendido actualmente en el mundo sea la eritropoyetina en sus distintas presentaciones, si bien como se ha comentado más arriba su principal uso dista mucho de ser estrictamente farmacéutico (Tabla 9). Le siguen a cierta distancia los interferones y las distintas presentaciones de insulina humana. También es importante el mercado de los anticuerpos.

De acuerdo con los datos de la consultora Ernst & Young's, en el 2001 existían unas 4.200 empresas de biotecnología en 25 países que daban trabajo a unos 188.000 empleados. De estas empresas 1.879 son europeas, destacando con más de 100 empresas Alemania (365), Inglaterra (309), Francia (239), Suecia (190), Suiza (113), y Finlandia (112). En España se contabilizaban según esta consultora 28 empresas biotecnológicas. En cualquier caso, sólo 622 de todas las empresas de biotecnología cotizan en bolsa y de ellas 342 son de Estados Unidos y 104 son Europeas.

Tabla 9
Los medicamentos biofarmacéuticos más vendidos

Producto	*Proteína*	*Empresa*	*Mercado mundial en 2002 en MS*
Procrit/ Eprex	Eritropoyetina alfa	J&J/ Ortho Biotech	4283
Epogen	Eritropoyetina	Amgen	2300
Intron	(PEG-INF(/ Ribavirin)	Schering-Plough	2700
Neupogen	G-CSF	Amgen	1400
Humulin	Insulina	Eli Lilly	1060 (2001)
Avonex	Interferon β-1a	Biogen	972 (2001)
Rituxan (en EU Mabthera)	Rituximab (anticuerpo humanizado)	Genentech/ Roche	1163
Enbrel	Etanercept (proteína de fusión de un anticuerpo-Fc y el receptor p75-TNF)	Immunex/Amgen	802
Humalog	Insulina	Eli Lilly	628 (2001)
Betaseron/Betaferon	IFNβ-1b	Schering AG	830
Cerezyme/Ceredase	Glucocerebrosidasa	Genzyme	619
Synagis	mAb humanizado	Abbott/ Medimmune	516 (2001)
NeRecormon	Eritropoyetina beta	Roche	1192
ReoPro	GBIIb/IIIa-anticuerpo	Eli Lilly/Centocor	431 (2001)
Gonal F	Hormona folículo-estimulante alfa (FSH)	Ares Serono	450
Rebif	IFNβ-1b	Ares Serono	549
Herceptin	Trastuzumab (anticuerpo anti-HER-2)	Genentech/ Roche	385
Humatrope	Somatotropina (HGH)	Eli Lilly	312 (2001)
Protropin/Nutropin	Somatotropina (HGH)	Genentech	297
Activase	tPA	Genentech	180
Remicade	Infliximab (anticuerpo quimérico)	Schering-Plough	337
Serostim	Somatotropina (HGH)	Ares Serono	95.1
Pulmozyme	ADNasa humana	Genentech	138
Leukine	GM-CSF	Immunex/Schering AG	108 (2001)
Saizen	Somatotropina (HGH)	Ares Serono	124
Proleukin	Interleukina 2	Chiron	114
Aranesp	Darbepoyeitina alfa	Amgen	400
Engerix-B	Proteína de la envuelta del virus de la hepatitis B	SmithKline Beecham	540 (1999)
Kogenate	Factor VIII	Bayer	424

6. EL FUTURO

La era de la genómica junto con las herramientas bioinformáticas han proporcionado un nuevo escenario de actuación para el desarrollo del binomio formado por los nuevos fármacos y las nuevas dianas terapéuticas. Se estima que el Proyecto Genoma Humano puede generar más de 10.000 dianas terapéuticas nuevas. Junto con ésto, las tecnologías genómicas y proteómicas contribuirán a detectar los genes y proteínas que se expresan y producen de forma diferencial en los distintos tejidos afectados por alguna patología, proporcionando una base científica para atacar de forma precisa la enfermedad (Reiss, 2001). Una vez que las dianas terapéuticas hayan sido identificadas, técnicas como el cribado robotizado de fármacos de alto rendimiento, la química y la biología combinatorial, la ingeniería de proteínas, y el modelado molecular contribuirán a diseñar nuevos fármacos de una forma más rápida y racional (Hutchinson, 1998).

Si bien las células microbianas y animales han sido hasta la fecha los sistemas de producción más empleados, poco a poco las plantas y los animales transgénicos comienzan a considerarse como posibles biorreactores para producir sustancias farmacéuticas. Compañias como Genzyme Transgenics (Framingham, USA), PPL Therapeutics (Edimburgo, UK), o Pharming (Leiden, Holanda) están estudiando la eficacia de productos obtenidos de animales transgénicos en ensayos clínicos (*i. e.,* α1-antitripsina, α-glucosidasa, y antitrombina III). Se estima que actualmente están en desarrollo unos 20 productos obtenidos en ovejas, cabras o terneros transgénicos. Más aún, la posibilidad de clonar animales para estos fines es una realidad y como ejemplo está el caso de la oveja clónica «Dolly» que produce Factor IX humano.

No se puede cerrar este capítulo sin mencionar que las plantas transgénicas tienen un gran futuro como biofactorías farmacéuticas. Dado que las plantas proporcionan sistemas masivos y muy baratos de producción se puede pensar en ellas para utilizarlas en el caso de que se necesiten grandes volúmenes de producción, como puede ser en el campo de los aminoácidos, o las vitaminas. Actualmente, se están desarrollando plantas transgénicas para producir vacunas orales, es decir vacunas que sean efectivas por vía digestiva. Estas vacunas tienen la ventaja de que podrían llegar más fácilmente a los habitan-

tes de las regiones más pobres del planeta donde una vacunación clásica que requiere para su administración de sistemas de conservación fiables y personal cualificado puede ser complicada. Estas vacunas orales también tienen interés en acuicultura para vacunar a los peces frente a distintas infecciones. De todas formas aún se ha de trabajar mucho en estas vacunas, pues la vía digestiva no las hace suficientemente eficaces.

Como conclusión final cabe decir que el futuro de la biotecnología farmacéutica es enorme y es evidente que, por el momento, sólo ha deparado pequeños anticipos de su potencialidad. Se puede ser muy optimista ante la gran mejora que ha de producirse en la calidad de vida durante los próximos años.

BIBLIOGRAFÍA

Allsop, A. E. (1998) New antibiotic discovery, novel screens, novel targets and impact of microbial genomics. Curr. Opin. Microbiol. 1: 530-534.

Altenbuchner, J., Herzberg, M. S., Syldatk, C. (2001) Hydantoinases and related enzymes as biocatalysts for the synthesis of unnatural chiral amino acids. Curr. Opin. Biotechnol. 12: 559-563.

Andersen, D. C., Krummen, L. (2002) Recombinant protein expression for therapeutic applications. Curr. Opin. Biotechnol. 13: 117-123.

Cereghino, G.P.L. Cereghino, J. L., Ilgen, C., *et al*. (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. Curr. Opin. Biotechnol. 13: 329-332.

Chadd, H. E., Chamow, S. M. (2001) Therapeutic antibody expression technology. Curr. Opin. Biotechnol. 12: 188-194.

Chartrain, M., Salmon, P. M., Robinson, D. K., *et al*. (2000) Metabolic engineering and directed evolution for the production of pharmaceuticals. Curr. Opin. Biotechnol. 11: 209-214.

Chu, L., Robinson, D. K. (2001) Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. Curr. Opin. Biotechnol. 12: 180-187.

Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., *et al*. (1973) Construction of biologically functional plasmids *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 3240-3244.

Cornelis, P. (2000) Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. Curr. Opin. Biotechnol. 11: 450-454.

Demain, A. L. (2000) Microbial biotechnology. TIBTECH 18: 26-31.

Dordick, J. S., Khmelnitsky, Y. L., Sergeeva, M. V. (1998). The evolution of biotransformation technologies. Curr. Opin. Microbiol. 1: 311-318.

Hancock R. D., Roberto, V. (2002) Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production. Trends Biotechnol. 20: 299-305.

Hashimoto, S., Ozaki, A. (1999) Whole microbial cell processes for manufacturing amino acids, vitamins or ribonucleotides. Curr. Opin. Biotechnol. 10: 604-608.

Hashimoto, S., Ozaki, A. (1999) Whole microbial cell processes for manufacturing amino acids, vitamins or ribonucleotides. Curr. Opin. Biotechnol. 10: 604-608.

Huisman, G. W., Gray, D. (2002) Towards novel processes for the fine-chemical and pharmaceutical industries. Curr. Opin. Biotechnol. 13: 352-358.

Hutchinson, C. R. (1998) Combinatorial biosynthesis for new drug discovery. Curr. Opin. Microbiol. 1: 319-329.

Kirk, O., Borchert, T. V., Fuglsang, C. C. (2002) Industrial enzyme applications. Curr. Opin. Biotechnol. 13: 345-351.

Martín, J. F., Demain A. L. (2002) Unraveling the methionine-cephalosporin puzzle in *Acremonium chrysogenum*. Trends Biotechnol. 20: 502-507.

Nielsen, J. (1998) The role of metabolic engineering in the production of secondary metabolites. Curr. Opin. Microbiol. 1: 330-336.

Ogawa, J., Shimizu, S. (1999) Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. TIBTECH 17: 13-20.

Peñalva, M. A., Rowlands, R. T., Turner, G. (1998) The optimization of penicillin biosynthesis in fungi. TIBTECH 16: 483-489.

Perera, J., Tormo, A., García, J.L. (2002) Ingeniería Genética. Editorial Síntesis S.A. Madrid.

Reiss, T. (2001) Drug discovery of the future: the implications of the human genome project. Trends Biotechnol. 19: 496-499.

Rodríguez, E., McDaniel, R. (2001) Combinatorial biosynthesis of antimicrobials and other natural products. Curr. Opin. Microbiol. 4: 526-534.

Schmid, A., Hollmann, F., Park, J. B., *et al*. (2002) The use of enzymes in the chemical industry in Europe. Curr. Opin. Biotechnol. 13: 359-366.

Stafford, D. E., Stephanopoulos, G. (2001) Metabolic engineering as an integrating platform for strain development. Curr. Opin. Microbiol. 4: 336-340.

Straathof, A. J. J., Panke, S., Schmid, A. (2002) The production of fine chemicals by biotransformations. Curr. Opin. Biotechnol. 13: 548-556.

Swartz, J. R. (2001) Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. Curr. Opin. Biotechnol. 12: 195-201.

Walsh, G. (2000) Biopharmaceutical benchmarks. Nature Biotechnol. 18: 831-833.

Páginas web de interés

http://www.fda.gov

http://www.eudra.org/en_home.htm

http://www.phrma.org

http://www.fda.gov/cber/

Bases farmacológicas y tratamiento de la inflamación

D. ESPINÓS PÉREZ *
Catedrático de Patología y Clínica Médicas. Facultad de Medicina. UCM

A. LÓPEZ BUENADICHA *
Profesor Asociado de Patología Quirúrgica. Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá

E. CALVO MANUEL *
Profesor Titular de Patología y Clínica Médicas. Facultad de Medicina. UCM

COMENTARIO INICIAL

Es bien sabido que el sentido último de la Medicina es alcanzar la curación del enfermo, por esto una parte importantísima de la actividad médica es la indicación y control del tratamiento. Profundizar en el conocimiento del mismo es una obligación ineludible de nuestro quehacer.

Este escrito está orientado al tratamiento de la inflamación, pero, antes de entrar en su descripción, hacemos una breve exposición de las bases farmacológicas del complejo proceso de la misma. Es sobre estas bases donde se apoya el tratamiento. De no hacerlo así sería como construir castillos en el aire.

En la descripción del tratamiento hacemos referencia, al igual que en las bases farmacológicas, a hechos y datos muy conocidos y experimentados, pero también nos referiremos a otros cuyo conocimiento es de adquisición más reciente y de los que no se tiene una dilatada experiencia.

* Agradecemos a la Srta. Margarita García toda su ayuda durante la elaboración de este trabajo.

Es por esto por lo que las pautas de aplicación terapéutica aún no están consolidadas, como es el caso de los antileucotrienos y especialmente el de las anticitocinas. También hacemos una breve referencia a otros tratamientos aún en fase de desarrollo experimental y clínico, pero que se muestran altamente prometedores, como ocurre con el bloqueo del NF-κB y de la HMG-1.

No hacemos referencia en el tratamiento a las primeras moléculas conocidas de la inflamación, porque el incidir sobre ellas creemos que tiene escasa repercusión terapéutica. Solamente hacemos un brevísimo comentario de la histamina al tratar la terapia anti-PAF (factor de agregación plaquetaria), ya que los antihistamínicos los consideramos fuera del campo de este escrito, así como a los fármacos contra la gota.

GENERALIDADES SOBRE LA INFLAMACIÓN

La inflamación es uno de los temas de mayor interés en la clínica. Por un lado la inflamación en mayor o menor grado es el substrato patogenético y, en cierta medida, morfopatológico de las enfermedades. Por otro lado, la inflamación es un importante sector en el campo de la investigación farmacológica y no se debe olvidar que el gasto del tratamiento de los procesos inflamatorios es de los más elevados.

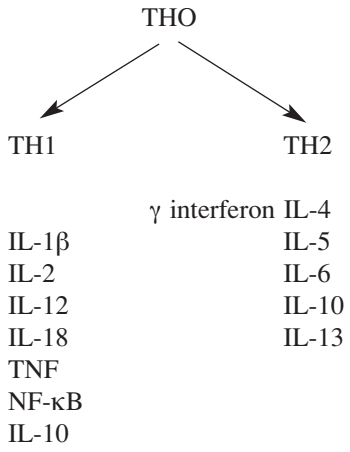
El concepto clásico de la inflamación, como incremento de la vascularización, de la permeabilidad vascular con acumulo de plasma y de células procedentes de la sangre, responsables del rubor, calor, dolor y tumor, debe ser ampliado a muchos procesos en los que estas manifestaciones clínicas no están tan manifiestas. Sirva de ejemplo el asma bronquial, la ateroesclerosis, las vasculitis, la enfermedad inflamatoria intestinal e incluso la enfermedad de Alzheimer y el cáncer (1).

En la inflamación intervienen elementos celulares, cuyo estudio ya despertó el interés de los histólogos de finales del siglo XIX. Ramón y Cajal, en el año 1880, investigó sobre estas células (2).

Las células de la inflamación están representadas por los monocitos-macrófagos, los neutrófilos, los basófilos-mastocitos, los eosinófilos y también los linfocitos, especialmente los T, con su doble familia —TH1

y TH2— (Esquema 1). Estos tienen capacidad de activar a las restantes células de la inflamación. Los macrófagos son células básicas de la inflamación. Su distribución universal en el organismo hace que sean elementos centrales de la misma (Tabla I). Los basófilos-mastocitos juegan un papel importante en las inflamaciones de base alérgica, al igual que los eosinófilos y la inmunoglobulina IgE.

Junto a las células de la inflamación se ha ido conociendo, cada vez más, un amplio número de moléculas, moléculas de la inflamación, producidas en gran medida por las propias células inflamatorias, pudiendo alguna de ellas activar la producción de otras. Las moléculas de la inflamación son responsables del atrapamiento y activación celular, así como de las manifestaciones locales y generales de la inflamación, tal como malestar, fiebre, hipotensión… El descubrimiento, año tras año, de nuevas moléculas ha hecho, en cierta medida, obsoletas a las anteriores. Es sobre estas moléculas, frenando su producción o bloqueando su acción, hacia donde se orienta la terapia antiinflamatoria.



El tráfico de linfocitos hacia los TH1 favorece la inflamación.

ESQUEMA 1. *Poder activador de las diferentes subpoblaciones de Linfocitos T*

Tabla I

Células pertenecientes al Sistema Mononuclear Fagocítico

Médula ósea
— Monoblastos
— Promonocitos
— Monocitos

Sangre
— Monocitos

Tejidos (los macrófagos están entre los siguientes)
— Tejido conectivo (histiocitos)
— Piel (histiocitos, células de Langerhans)
— Hígado (células de Kupffer)
— Bazo (macrófagos de la pulpa roja)
— Ganglios linfáticos (macrófagos libres y fijos)
— Timo
— Médula ósea (macrófagos residentes)
— Hueso (osteoclastos)
— Sinovial (célula tipo A)
— Pulmón (macrófagos alveolares y del tejido)
— Sistema linfático asociado a mucosas (MALT)
— Tracto gastrointestinal
— Tracto genitourinario
— Órganos endocrinos
— Sistema nervioso central (macrófagos, microglia, macrófagos del líquido cefalorraquídeo).

Cavidades corporales
— Macrófagos pleurales
— Macrófagos peritoneales

HISTAMINA, MOLÉCULAS DERIVADAS DEL COMPLEMENTO —ANAFILAXIS Y QUIMIOTAXIS—, LAS QUININAS

La histamina, derivada de la histidina, regula el tono vasomotor, produce vasodilatación, edema e incremento de la permeabilidad vascular. Desencadena broncoconstricción, rinitis, urticaria y anafilaxis. Favorece la producción de prostaciclina y de óxido nítrico (NO).

Las anafilactoxinas proceden del complemento y están representadas por C3a, C4a, C5a. Se forman por acción enzimática sobre los fragmentos C3, C4, C5. Son péptidos de bajo peso molecular con gran actividad biológica. Actúan sobre los pequeños vasos. Activan los leucocitos y los macrófagos-monocitos. Gran parte de su acción biológica se debe a que activan la producción de prostaglandinas y leucotrienos.

Por su parte los fragmentos C5, C6 y C7 tienen gran actividad quimiotáctica sobre basófilos, eosinófilos y neutrófilos. Esta actividad la realizan fijándose sobre receptores en la superficie celular.

Las quininas, especialmente la bradiquinina, aumentan la permeabilidad vascular, la contracción de los músculos lisos, reducen las resistencias arteriales con hipotensión y marginación de los leucocitos. También incrementan la motilidad intestinal y activan la fosfolipasa A2 con liberación de ácido araquidónico (AA).

LAS PROSTAGLANDINAS

Como señala Moncada (3), son moléculas que por su variadísima acción han despertado en los últimos años, un grandísimo interés en la investigación biológica. Son los autacoides mas abundantes, encontrándose en todos los tejidos y fluidos del organismo. Su producción está desencadenada por una gran variedad de estímulos.

La molécula base de las prostaglandinas es un ácido graso, de 20 átomos de carbono, unido a un anillo de ciclopentano. El ácido graso, que se encuentra formando parte de los fosfolípidos de la membrana celular —fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina— puede tener 2, 3 o 5 dobles enlaces, de los que derivan respectivamente los compuestos eicosatrienoico —PG1—, eicosatetraenoico —PG2— y eicosapentaenoico —PG3—. El sufijo 1, 2, 3 indica el número de dobles enlaces. Las prostaglandinas de los mamíferos son PG2 y derivan del AA. La liberación del AA es fundamental en la inflamación. Se produce por acción de la fosfolipasa A2 que es el factor limitante de la formación de prostaglandinas. Son muchos los estímulos de activación de la fosfolipasa A2, físicos, químicos, hormonales y neurohormonales. Del AA, por acción de la ciclooxigenasa derivan las prostaglandinas, por acción primero de la ciclooxigenasa (COX) y después de la trom-

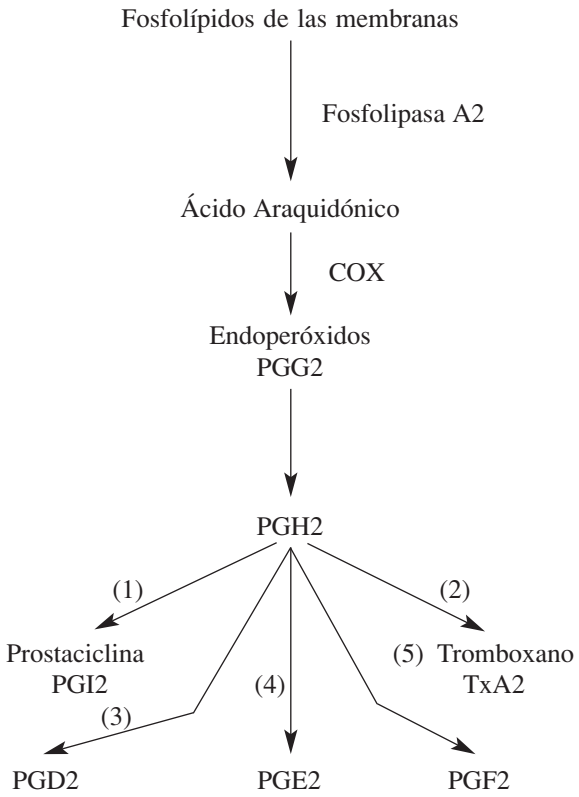
boxano sintetasa el tromboxano A2 (TxA2), por acción de la 5-lipooxigenasa (5LPO) los leucotrienos y por acción de la enzima acetiltransferasa el PAF. El diferente perfil metabólico derivado del AA depende de la maquinaria bioquímica de cada grupo celular.

La COX es una proteína integrante de las membranas microsomales y de la membrana nuclear. La síntesis de las prostaglandinas, dependiendo del tipo de célula, puede ser explosiva, pero de corta duración, o menos intensa pero de mayor duración. Esta diferencia de comportamiento depende del tiempo de acción de la actividad de la enzima y muy especialmente de la capacidad de resíntesis de la misma. En las plaquetas, los neutrófilos y las células cebadas es corto e intenso, por carecer de la capacidad de resíntesis de la misma. Por el contrario es de larga duración en las células endoteliales, musculares lisas y macrófagos.

La COX favorece la oxidación del AA con la formación de un endoperóxido cíclico, el PGG2, del que deriva el otro endoperóxido, el PGH2. Éste, por acción de la protaciclinsintetasa, pasa a prostaciclina —PGI2—, que es un poderoso antiagregante y vasodilatador. Por acción de la tromboxanosintetasa pasa a TxA2, que es un poderoso agregante plaquetario y vasoconstrictor. Finalmente, la PGH2 por la acción de la PGDsintetasa, PGEsintetasa y PGFsintetasa da origen a las prostaglandinas PGE2, PGD2 y PGF2 (4) (Esquema 2).

Inicialmente se pensó que sólo había una COX, pero Needleman (5), en el año 1989, caracterizó una segunda COX, que fue denominada COX-2 y a la primera COX-1. La COX-1 es una enzima «constitutiva», con actividad permanente en todas las células del organismo, salvo en los hematíes. La COX-2 es una enzima «inducida» por estímulos inflamatorios. La COX-1, que es la enzima constitutiva, es responsable de la producción continua de prostaciclina que mantiene la integridad vascular, muy especialmente en la mucosa del tracto digestivo y es un poderoso antiagregante plaquetario. Por intermedio de la PGE2 mantiene el flujo renal. La PGD2 inhibe la agregación de las plaquetas y la degranulación de los polimorfonucleares, pero origina broncoconstricción y aumenta la vascularización en la mucosa nasal con la producción de rinitis. La PGE2 activa los leucocitos y las plaquetas produciendo fiebre, edema y eritema. Actúa de modo sinérgico con la bradiquinina, la interleucina 1 (IL-1) y la histamina, produciendo broncoconstricción. Es una prostaglandina con gran actividad inflamatoria (6).

PROSTAGLANDINAS

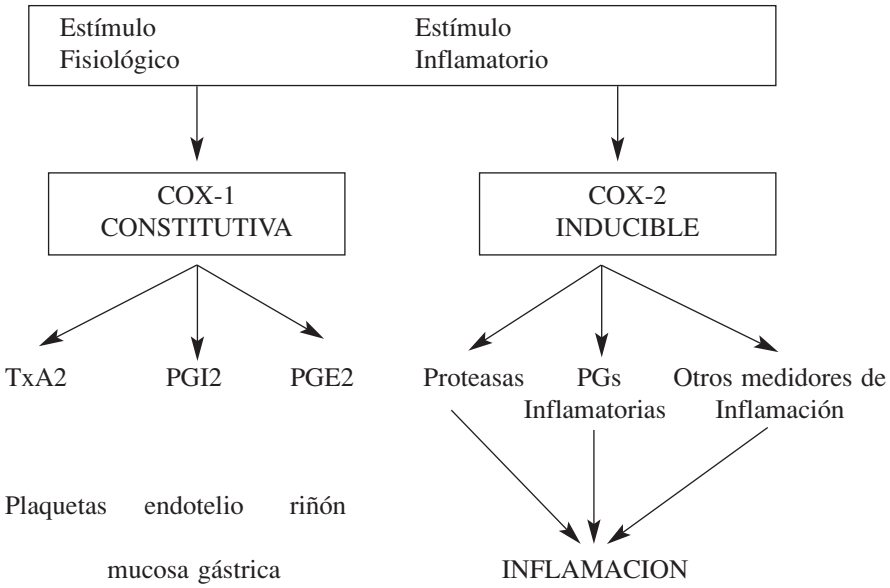


(1) Prostaciclinsintetasa
(2) Tromboxanosintetasa
Prostaglandina sintetasa (3) D, (4) E, (5) F.

ESQUEMA 2

El gen de la COX-1 está en el cromosoma 9q32-q33.3, origina un ARNm de 2,8-kb y una proteína de unos 68 kDa. El de la COX-2 está en el cromosoma 1q25.2-q25.3 (7), su ARNm es de 4,1-4,5 kb y sintetiza una proteína de 68 kDa. Las moléculas proinflamatorias IL-1, IL-6, TNFα, los lipopolisacáridos, los factores de crecimiento TGF-β, EGF, PGDF, y FGF, inducen la expresión de la COX-2. Las IL-4, IL-10 e IL-13, junto con los esteroides, disminuyen la expresión de la COX-2 (Esquema 3).

COMPORTAMIENTO DIFERENTE DE LAS DOS ISOENZIMAS COX-1 y COX-2



La COX-1 interviene en el mantenimiento funcional y citoprotector. La COX-2 responde ante estímulos inflamatorios y genera moléculas inflamatorias.

Esquema 3

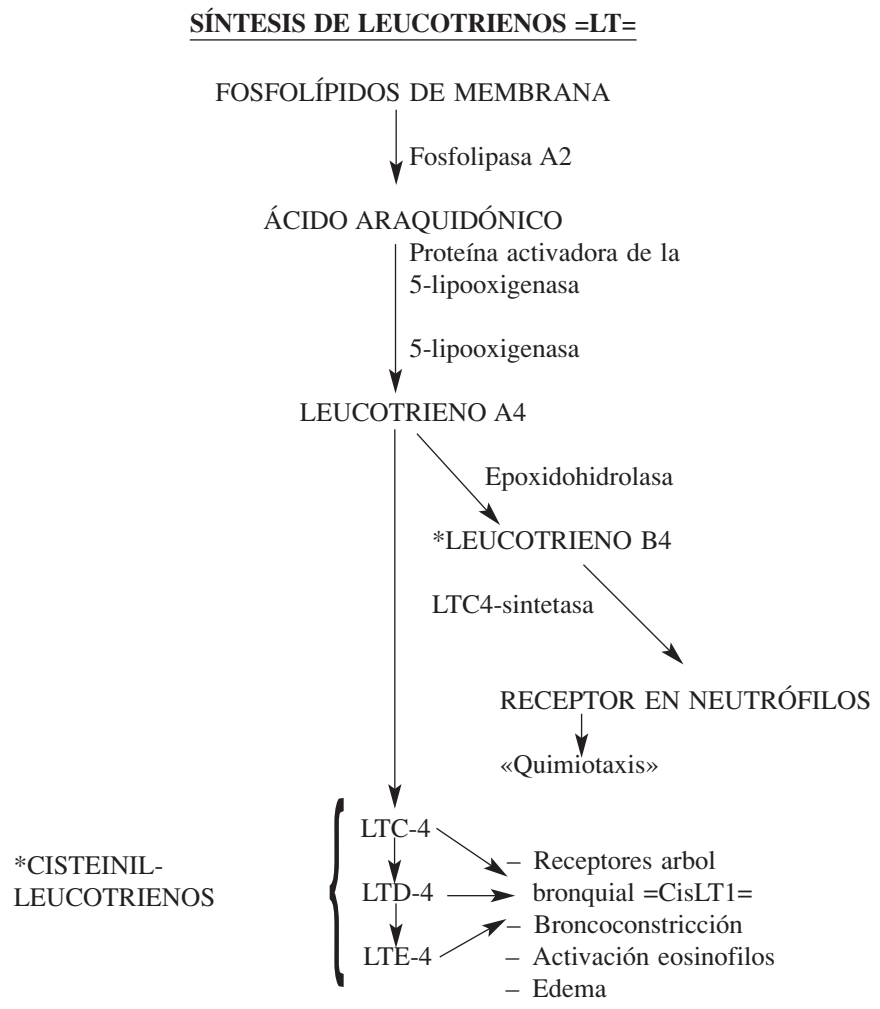
LEUCOTRIENOS

Se llaman leucotrienos porque se forman preferentemente en los leucocitos. Se corresponden con la clásica Sustancia de Acción Lenta de la Anafilaxis (SRSA). Proceden del AA por acción enzimática de la 5-LPO. Se han caracterizado dos grupos mayores de leucotrienos, los sulfidopépticos o cisteinil-leucotrienos representados por LTC4, LTD4, LTE4 y el grupo LTB4, con actividad quimiotáctica, especialmente para los neutrófilos que tienen mas de 25.000 receptores específicos (8).

La 5-LPO, que no se encuentra en todas las células del organismo, es para los leucotrienos lo mismo que la ciclooxigenasa para las prostaglandinas. Introduce un oxígeno en la posición C5 del AA formándose el 5-hidroxi-peroxi-eicosatetrainoico (5-HPETE). Éste, por peroxidación, enzimática o no, pasa a 5-hidroxieicosa-tetraenoico (5-HETE) o leuco-

trieno A4 (LTA4), del que derivan el LTB4 y los cisteinil-leucotrienos LTC4, LTD4, LTE4 (Esquema 4).

Los cisteinil-leucotrienos tienen acción vasoconstrictora, favorecen la permeabilidad vascular y la formación de edema, pero principalmente desencadenan broncoconstricción. El LTB4 atrae a los neutrófilos y favorece su degranulación.



* La síntesis intracelular

ESQUEMA 4

PAF

El PAF, es una molécula poderosamente inflamatoria. Se genera por la acción de la enzima acetilhidrolasa al actuar sobre el AA. Los complejos antígeno anticuerpo, actuando sobre neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células endoteliales estimulan la formación de PAF. Las células endoteliales expresan PAF por acción de la histamina y la trombina.

El PAF es un poderoso agregante de las plaquetas a las que activa (9), estimula a los neutrófilo, eosinófilos y basófilos, aumenta la contractilidad de la musculatura lisa con broncoconstricción y produce edema y aumento de la permeabilidad. Favorece la quimiotaxis de los leucocitos, con degranulación de los mismos, la generación de radicales libres y liberación de enzimas lisosomales. En los pacientes asmáticos, es capaz de activar a los eosinófilos con incremento de la concentración de ILC4. El PAF se encuentra elevado en el árbol bronquial de los asmáticos. Es capaz de acelerar la reabsorción ósea, fijándose sobre los receptores de los osteoclastos.

El PAF es rapidísimamente degradado por la enzima acetilhidrolasa. Si esto no fuese así, por su gran poder proinflamatorio, las consecuencias serían funestas para el organismo.

LAS CITOCINAS

El descubrimiento y caracterización de las citocinas ha representado, en el campo de la inflamación, un hallazgo del máximo interés. Las citocinas son moléculas de comunicación química intercelular, pudiendo actuar de manera autocrina, paracrina y a distancia. El término interleucina fue acuñado para moléculas exclusivamente de comunicación interleucocitaria, pero en la actualidad este término está asimilado al de citocinas, ya que éste no indica dependencia de ningún tipo celular (10).

Se denominan por números, en atención al momento de su descripción. Las mas significativas, en el campo de la inflamación son, la IL-1, la IL-4, la IL-5, la IL-6, la IL-8, la IL-10, la IL-12, la IL-13 y la IL-18, además del TNFα, al que se considera otra citocina. Son citocinas muy proinflamatorias la IL-1, IL-6 y el TNFα. Las IL-4, IL-5 e IL-13 son es-

pecialmente activas en el territorio broncopulmonar. La IL-12 y la IL-18, con la estrecha intervención del interferón gamma (ING-γ), favorecen el tráfico de linfocitos del TH0 a TH1 y con esto la inflamación (11).

Las citocinas se unen a receptores específicos y su expresión requiere la activación celular. Están constituidas por cadenas polipeptídicas formando heterodímeros (IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12), homodímeros y otros heterotrímeros (IL-2, IL-3, IL-13). Es de gran interés el que haya, en el torrente circulatorio, receptores solubles con capacidad de unión a la citocina correspondiente e impidiendo, de este modo, que ésta actúe sobre su receptor. Estos receptores libres son la parte extracelular del receptor de membrana y se liberan por proteolisis.

En los últimos años, el conocimiento de las citocinas, y de sus receptores específicos, está abriendo un campo importante en la terapéutica antiinflamatoria. Se buscan fármacos capaces de inhibir la producción de las citocinas o de bloquear su acción antireceptor. A continuación, se exponen algunos comentarios de las mismas.

IL-1.–Se corresponde con el pirógeno endógeno, habiendo despertado gran interés como mediador de la respuesta inflamatoria aguda. Se produce fundamentalmente en los macrófagos activados. Hay dos tipos, la IL-1α y la IL-1β, que tienen la misma acción pese a tener genes distintos en el cromosoma 2. Sus propiedades proinflamatorias son muy amplias (Tabla II). Este gran número de actividades proinflamatorias se

TABLA II

Propiedades proinflamatorias de la IL-1

– Fiebre, anorexia, somnolencia, hipotensión, shock
– Liberación de neuropéptidos
– Supresión de la síntesis del citocromo P-450
– Estimula la formación de complemento
– Activa las células endoteliales
– Neutrofilia
– Aumentan las moléculas de adhesión
– Degranulación de eosinófilos
– Infiltración leucocitaria (IL-8)
– Aumenta el turnover de aminoácidos
– Activa los osteoclastos

comprende fácilmente por el número de genes a los que activa (Tabla III). La IL-1α y la β actúan sobre el mismo receptor y la respuesta de las diferentes células depende del número de receptores que expresen. El gen del receptor de la IL-1rα está localizado en el brazo largo del cromosoma 2. El receptor de IL-1 (IL-1rα) que se encuentra en la sangre circulante tiene una importante función antiinflamatoria. Normalmente existe un equilibrio entre la IL-1 y su receptor soluble IL-1rα. (12).

Tabla III

Inducción de la expresión de genes producida por la IL-1

- IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8
- TNF α y β. INFβ
- GM-CSF, G-CSF, M-CSF
- COX-2, COX-1. Fosfolipasa A_2
- Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
- Moléculas de Adhesión
- Oncogenes (c-fos, c-myc, c-jun)
- PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno
- Proendotelina
- Proteína amiloide
- Colagenasa
- Factor liberador de corticotrofina

IL-6.–Es una citocina con una gran variedad de efectos biológicos. Se corresponde con el Factor Estimulante de los Hepatocitos, siendo responsable de la elevación en sangre de varias proteínas durante la inflamación. Son los reactantes de fase aguda como fibrinógeno, proteína C reactiva, haptoglobina y proteína sérica A del amiloide.

La IL-6 consta de 216 aminoácidos y su gen codificador está en el cromosoma 7. Es sintetizada por los linfocitos T y B, monocitos, fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales. Activan la síntesis de IL-6 antígenos, mitógenos, lipopolisacáridos —endotoxina—, IL-1, TNFα, PAF, virus. Actúa sobre receptores celulares, incluso de células inmaduras, como las hematopoyéticas CD-34. Las células CD-4 y CD-8 poseen también receptores para esta citocina. Las acciones de la IL-6 son muy parecidas a las de la IL-1 y el TNFα. (Tabla IV).

TABLA IV

Acciones compartidas de la IL-1. IL-6 y TNF

	IL-1	*IL-6*	*TNF*
Fiebre	+	+	+
Somnolencia	+	–	+
Reactantes de fase aguda (síntesis)		+	
Activación linfocitos T y B.	+	+	+
Activación síntesis de Ig	–	+	–
Proliferación de fibroblastos	+	–	+
Activación St*em cell* hematopoyéticas	+	+	–
Inducción COX1-COX2	+	–	+
Activación célula endotelial	+	–	+
Inducción IL-1, IL-6, TNF, IL-8	+	–	+

Factor de Necrosis Tumoral (TNF).—Se corresponde con la clásica «caquectina», llamada así por el cuadro de caquexia que produce su administración crónica a los ratones. El TNF tiene capacidad de producir necrosis de células de algunos tumores, propiedad que da origen a su actual denominación (13).

Se produce en monocitos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales. El TNFβ, sintetizado por los linfocitos, se corresponde con la linfotoxina, mientras que el TNFα lo es por los macrófagos. Presentan una acción biológica similar pero tienen genes codificadores diferentes situados en el cromosoma 6. El TNF se une a dos receptores, el p75 y el p55, anclados sobre la superficie celular. La parte extracelular se libera en forma «soluble» y al igual que ocurre con otros receptores circula por el torrente circulatorio. Este receptor se fija sobre el TNF e inutiliza la actividad inflamatoria del TNFα.

En la sangre, en el líquido sinovial, en los sinoviocitos y en los macrófagos sinoviales de los enfermos con artritis reumatoide hay elevación del TNFα, habiendo una buena relación entre los niveles del mismo y la expresión de la enfermedad. Experimentalmente, se ha visto que la inyección de TNFα en la cavidad articular produce un infiltrado rico en linfocitos, macrófagos, neutrófilos, mientras que el bloqueo del mismo va asociado a una

mejoría clínica. También se encuentra elevada en la mucosa intestinal de enfermos con enfermedad inflamatoria, colitis ulcerosa y Crohn.

El TNFα es responsable de los efectos sistémicos producidos por la endotoxina, habiéndose encontrado estrecha relación con el pronóstico de la sepsis. En los últimos años, se está estudiando el diferente potencial inflamatorio de los polimorfismos del TNFα, situados en la zona promotora del gen. El alelo TNF-1 tiene guanina en la posición 308, mientras que el TNF-2 tiene adenina. El alelo TNF-2 genera mayor riesgo en los cuadros sépticos y se considera responsable de la meningitis fulminante (14). También la respuesta terapéutica al antiTNFα es diferente según los alelos.

IL-8.—Pertenece al grupo de las quimiocinas y al igual que los fragmentos C5, C6, C7 tiene poder quimiotáctico, especialmente para los neutrófilos. La IL-8 deriva de un precursor de 99 aminoácidos, rico en cisteína, que se hidroliza a 79 y 72 aminoácidos. Las dos primeras moléculas de cisteína en el péptido IL-8 están separadas por un sólo aminoácido, por esto se encuadra en el subgrupo de quimiocinas alfa —CXC— frente a las CC, en las que no existe separación entre las cisteínas. El gen codificador se encuentra en el cromosoma 4. Es sintetizada por células endoteliales, macrófagos, fibroblastos, hepatocitos, astrocitos, células sinoviales, condrocitos y queratinocitos. Estimula su formación la IL-1, el TNFα y la endotoxina.

Los neutrófilos tienen un receptor para la IL-8, habiendo de 20.000 a 70.000 por célula. La IL-8 unida a su receptor, además de activar la motilidad de los neutrófilos, favorece la exocitosis y su adhesión a las células endoteliales.

La inyección intradérmica de IL-8 produce exudación y acúmulo de neutrófilos durante varias horas, cosa que no ocurre con el C5, C6, C7 ni con el PAF.

Citocinas IL-4, IL-5, IL-13.- Los comentarios a estas tres citocinas se realizan conjuntamente por la estrecha relación que tienen en procesos inflamatorios de base inmune, muy especialmente en el territorio broncopulmonar como es el caso del asma.

En la mucosa bronquial de los asmáticos hay incremento de IgE y de eosinófilos regulados por la IL-4 y la IL-5 (15,16). La inhalación de IL-4 y de IL-5 incrementa el número de eosinófilos en el esputo así como también la hiperreactividad bronquial. La administración por aerosol de un anticuer-

po neutralizante de IL-4 inhibe la infiltración por eosinófilos. La IL-4 aumenta la expresión de moléculas de adhesión VCAM-1 y activa la 5-LPO (15). Animales knockout para la IL-4 no pueden desarrollar una respuesta alérgica específica IgE. Se reduce la expresión de IL-5, la eosinofilia bronquial y la hiperreactividad bronquial.

La IL-4 interacciona con receptores IL-4r de alta afinidad formados por heterodímeros. Éstos presentan una parte extracelular que se libera de la célula e interacciona con la IL-4 circulante, bloqueando su acción activadora. Como veremos, el receptor IL-4r soluble tiene actividad terapeútica, al igual que el bloqueo de la IL-5. La IL-4 puede ser antiinflamatoria al dificultar la diferenciación de los linfocitos TH0 a TH1; además, activa la producción del receptor libre de la IL-1.

La IL-13 guarda una estrecha relación funcional con la IL-4. Se une a la cadena alfa del receptor de la misma. Tanto el gen de la IL-4 como el de la IL-13 se encuentran en el cromosoma 5 (16). La IL-13 está elevada tanto en el asma alérgico como en el no alérgico. La administración de IL-13 recombinante es capaz, por si sola, de desencadenar respuesta broncoconstrictora, al tiempo que se incrementan los eosinófilos en la mucosa bronquial y se eleva la IgE (17).

IL-10.–Es el «Factor Inhibidor de la Síntesis de Citocinas». Inhibe la formación de IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y TNFα y disminuye también la expresión de las moléculas de adhesión en los monocitos. Es un homodímero de 160 aminoácidos y su gen está en el cromosoma 1. Es sintetizada por células mononucleadas, CD-4, CD-8, LB, queratinocitos, células mesangiales y también por algunas células tumorales. Su nivel se eleva por acción de los glucocorticoides y está considerada como una citocina antiinflamatoria.

La IL-10 estimula la producción del antagonista natural del receptor de la IL-1 y del TNFα (18). Reduce el número de receptores de superficie del TNF y también la activación de la sintetasa del NO, la producción de prostaglandinas, la de radicales oxidativos, de metaloproteinasas, así como la formación de actividades procoagulantes producidas por monocitos-macrófagos.

En la artritis reumatoide murina, provocada por la inyección de colágeno, la supresión de la IL-10 aumenta la expresión clínico-morfológica de la enfermedad, mientras que la administración de IL-10 la suprime.

IL-12, IL-18.- Estas citocinas intervienen favoreciendo el tránsito de linfocitos TH0 a TH1, por lo que favorecen la inflamación.

FACTOR DE ACTIVACIÓN NUCLEAR (NF-κB)

El conocimiento en los últimos años de la biología celular a nivel molecular, ha permitido conocer la intervención del Factor de Activación Nuclear en el complejo proceso de la inflamación.

El NF-κB desencadena la expresión de muchos genes proinflamatorios, como el TNFα, IL-1, PAF, óxido nítrico —NO—, prostaglandinas, leucotrienos, IL-8. Es Inhibidor del Activador Tisular del Plasminógeno —PAI-1— y también activa la expresión del Factor Tisular de la Coagulación en las células endoteliales y en los monocitos. Activa la aparición de moléculas de adhesión como la P-selectina, E-selectina, ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular), VCAM-1 en el endotelio. Se considera que el NF-κB es responsable en gran medida de la hipotensión, hiporeactividad cardiovascular, coagulación intravascular diseminada y del fallo multiorgánico que se produce en la sepsis grave, que es el proceso de inflamación sistémica mas representativo. También se ha encontrado NF-κB activado en situaciones tan dispares como en la placa de ateroma y en la mucosa bronquial del enfermo asmático (19).

El NF-κB es un homodímero, p50-p50 o heterodímero p50-p65. Se encuentra en el citoplasma celular inactivado por su unión a la molécula de inactivación, la IL-κB. La fosforilización de ésta, tirosina quinasa dependiente, libera el NF-κB, que se desplaza al núcleo, lo que le permite activar genes de la inflamación. La endotoxina, al igual que otros factores de inducción, desencadena una rápida fosforilización tirosina quinasa dependiente de un gran número de proteínas, entre ellas al I-κB de los monocitos, macrófagos y linfocitos T. Estos hechos permiten comprender la transcendencia terapéutica que puede tener el bloqueo de la activación del NF-κB, en la inflamación, posiblemente inhibiendo la fosforilización del I-κB.

PROTEÍNA DE MOVILIDAD RÁPIDA (HMG1)

En la patogenia del shock séptico y también del hemorrágico, en la pancreatitis aguda y en el fallo multiorgánico, interviene con toda clari-

dad la inflamación. El shock séptico es la expresión clínica de un proceso de inflamación general, por ésto ha sido muy adecuadamente denominado, tras la conferencia de consenso entre el American College of Chest Phisicians y la Society of Critical Care Medicine como Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS).

En los últimos años, en la producción del SRIS, se ha dado un papel preponderante al TNFα y a la IL-1. No obstante el tratamiento de la inflamación sistémica con anticuerpos anti-TNFα o anti-IL-1 ha dado resultados poco exitosos, tanto en la clínica como en el campo experimental.

Se ha especulado que la escasa respuesta a este tratamiento podría deberse al retraso en la administración del mismo, ya que en la cascada de citocinas al desencadenarse la inflamación, la IL1 y el TNFα aparecen precozmente, entre las dos y seis horas, tiempo en el que en muchas ocasiones no se ha realizado aún el diagnóstico de SRIS. Por otro lado, la muerte de los enfermos con sepsis se produce pasados 4 ó 5 días de iniciada la misma. Estos hechos han estimulado la búsqueda de otras moléculas que pudiesen ser responsables de la peculiar evolución de la inflamación sistémica en la sepsis.

Investigaciones en este sentido han permitido el hallazgo de una molécula de comportamiento similar a las citocinas proinflamatorias, de aparición más tardía que la IL1 y el TNFα. Esta molécula de activación tardía se produce en los macrófagos estimulados por endotoxina, TNFα e IL1. Se encuentran niveles elevados en sangre, en los animales de experimentación, entre la 8 y 10 horas de la exposición a endotoxina y está muy elevada en los enfermos con sepsis grave, especialmente en los que mueren por este proceso.

Se trata de una molécula que tiene una movilidad electroforética rápida, en electroforesis sobre gel de agar (20). Ha sido caracterizada como miembro de las proteínas no histónicas de la cromatina. Tiene 214 aminoácidos y es, después de su traslación glicosilada, acilada, metilada y fosforilada.

Durante la evolución de las especies ha demostrado tener una estructura muy conservada. En el hombre, el 99% de los aminoacidos son coincidentes con los roedores. Tiene dos estructuras básicas, los dos dominios, y tiene una terminación acídica —COOH— y una cola de 30 ami-

noácidos constituidos por glutámico y aspártico. Es un factor de transcripción general del ARN. Tiene 30 kD.

Su administración experimental en animales de laboratorio produce fiebre, pelos erizados, escalofríos, pérdida de peso y formación de microtrombos en los pulmones y en el hígado. El efecto es similar al del TNF y al de la IL-1. HMG-1 se considera como factor tardío de la acción de la endotoxina y su potencial para estimular a los macrófagos es similar al de los lipopolisacáridos (21).

TERAPÉUTICA DE LA INFLAMACIÓN

Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)

La historia de los antiinflamatorios no esteroideos —AINES- empieza antes de Cristo. En el papiro de Ebers se habla de la acción analgésica de las hojas de mirto. Hipócrates recomendó el uso de la corteza de álamo y de sauce para la fiebre. Tanto el mirto, como el sauce y el álamo, contienen salicilatos. Celso, al que se debe la descripción de los signos cardinales de la inflamación, indicó que determinadas plantas, además del sauce, eran antirreumáticas y antiinflamatorias. En el año 1827 Leroux aisló del sauce el «salicin», del que por hidrólisis se obtuvo glucosa y alcohol salicílico, llamado «saligenin». Éste tenía actividad antipirética. Años mas tarde, Piria obtuvo del salicin el acido salicílico y a finales del siglo XIX Colbet y Lautenann obtuvieron por síntesis, partiendo del ácido fenólico, el acetilsalicílico. En el año 1899, se introdujo en la farmacopea el ácido acetil salicílico, posteriormente llamado ASPIRINA (22).

En el año 1971, se conocía la presencia de las prostaglandinas, su acción inflamatoria y la existencia de la enzima «prostaglandin sintetasa» —COX-, pero no se sabía por qué el acetilsalicílico —aspirina- tenía acción antiprostaglandina. JR Vane aisló la COX y demostró que esta enzima era inhibida por la aspirina, propiedad compartida por otros antiinflamatorios del grupo no esteroideo como la indometacina, el diclofenaco, el piroxicam (23). Por este hallazgo, JR Vane obtuvo el Premio Nobel de Medicina en el año 1982, junto a Samuelson y Bergström, investigadores en el campo de las prostaglandinas.

La aspirina, al igual que otros AINES, es activa frente a la COX-1 y la COX-2, siéndolo más sobre la primera. Los efectos secundarios de los AINES se deben fundamentalmente a la inhibición de la COX-1. El IC_{50} expresa la concentración requerida para inhibir la acción de la COX. El índice IC_{50} COX-2/COX-1 expresa la relación del grado de inhibición que ejerce un AINES frente a las dos ciclooxigenasas. Cuanto mayor sea este índice los efectos secundarios serán mayores (24) (Tabla V). La investigación farmacológica ha tratado de obtener moléculas antiinflamatorias cada vez con más capacidad de inhibir la COX-2 y menos la COX-1. Esta investigación ya ha dado su fruto.

La COX-1 forma un canal que permite la entrada del AA y con ello llegar al lugar donde está su actividad enzimática. Los AINES impiden, por uno u otro mecanismo, que este contacto se realice. El ácido acetilsalicílico acetila la COX-1 sobre la serina 530 e impide así la entrada del AA. Sobre la COX-2 la aspirina acetila a la serina 516. El flurbiprofeno impide la acción enzimática, formando una unión entre la arginina 120 y la tirosina 385.

TABLA V

Antiinflamatorios no esteroideos. Índice del valor IC_{50} COX-2 / COX-1

AINEs	*COX-2/COX-1*
PIROXICAM	250
TOLMETÍN	175
ASPIRINA	166
SULINDACO	100
INDOMETACINA	60
TOLFENÁMICO	16,7
IBUPROFENO	15
PARACETAMOL	7,4
SALICILATO	2,8
FLURBIPROFENO	1,3
CARPROFENO	1
DICLOFENACO	0,7
NAPROXENO	0,6
MELOXICAM	0,33

El bloqueo por acetilación de la COX-1, que produce la aspirina, es irreversible. Las plaquetas no pueden sintetizar de novo la COX-1, por esto el efecto de la aspirina se mantiene durante la vida de éstas, de 7 a 8 días, y así el test del «tiempo de hemorragia» no se normalizará hasta la renovación de las plaquetas. Esto no ocurre con los otros AINES que no acetilan. Por esto ante una cirugía programada la toma de aspirina debe interrumpirse unos 7-8 días antes.

Los AINES se clasifican en atención al grupo químico al que pertenecen (Tabla VI) (25). La industria farmacéutica ha multiplicado mucho el arsenal de AINES, buscando siempre aumentar la eficacia terapéutica, incrementando el tiempo de acción y principalmente reducir los efectos secundarios.

Tabla VI

Principales AINES utilizados (25) ANTI-COX

ANTI COX-1	**DERIVADOS DEL ÁCIDO ACÉTICO Y ACETAMIDA**
Fármaco	Dosis
Aciclofenaco	100 mg/12 h. - v.oral
Acemetacina	60 mg/8-24 h - v.oral
Diclofenaco	50 mg/8-12 h - v.oral
	Retard: 75-150/24 h - v.oral
	Rectal: 100 mg/24 h
Fenoprofeno	300-600 mg/6-8 h – v.oral
Fentiazaco	100-200 mg/12-24 h – v.oral
Indometacina	25 mg/8-12 h (máximo 200 mg/día
	Rectal: 100 mg/24 h
	Retard: 75 mg/12-24 h – v.oral
Ketorolaco	10 mg/4-6 h – v.oral (máximo 7 días)
	10-30 mg/4-6 h – v.IV (máximo 2 días)
Proglumetacina	150-300 mg/24 h – v.oral
Sulindaco	200 mg/12 h
Tolmetina	400 mg/8-12 h – v.oral
	FENAMATOS (ÁCIDOS ANTRANÍLICOS)
Ácido Meclofenámico	100 mg/6-12 h - v.oral
Ácido Mefenámico	250-500 mg/8 h – v.oral
	Rectal: 500 mg/8-12 h.
Ácido Niflúmico	250 mg/8 h – v.oral
	DERIVADOS DEL ÁCIDO PROPIÓNICO (ARIL PROPIÓNICO)
Butibufen	500 mg/12 h – v.oral
Dexibuprofeno	300 mg/8-12 h – v.oral
Dexketoprofeno	12,5 mg/4-6 h – v.oral
	25 mg/8 h (dosis máxima

TABLA VI *(Continuación)*
Principales AINEs utilizados (26) ANTI-COX

Fenbufen	300 mg mañana-600 mg noche – v.oral
Flurbiprofeno	50-100 mg/8-12 h – v. oral
	Retard: 200 mg/24 h.
	Rectal: 100 mg/24 h.
Ibuprofeno	200-400 mg/6 h – v.oral
	Rectal: 500 mg/6 h.
	Retard: 600 mg/24 h.
Ketoprofeno	50 mg/6-12 h – v.oral
	Rectal: 100 mg/12-24 h.
	IM: 100 mg/12-24 h.
Naproxeno	250-500 mg/12 h – v.oral
OXICAMAS (ÁCIDOS ENÓLICOS)	
Lorxicam	8 mg/12 h – v.oral
Meloxicam	7,5 mg/24 h
	15 mg/24 h
Piroxicam	20 mg/24 h – v.oral
	Rectal: 20 mg/24 h
	I.M. : 20 mg/24 h.
Tenoxicam	20 mg/24 h.
	Rectal: 20 mg/24 h.
ARIL-BUTANONAS (ALCANONAS)	
Nabumetona	1000 mg/24h – v.oral (Profármaco)
BUTILPIRAZOLONA	
Fenilbutazona	200-600 mg/día – v. oral
	(dosis repartida)
Oxipizona	125-300 mg/12-24 h – v.oral
Fenprazona	Rectal: 300 mg/12 h.
Dipirona (metamizol)	
No sobrepasar 7-10 días	
ANTI-COX-2	
Furanona con sustitución del diaril	
ROFECOXID	
Furazoles con sustitución del diaril	
CELECOXIB	
Sulfonanilidas	
NIMELULIDA	100 mg/12 h. – v. oral
Ácidos indolacéticos	
ETODOLAC	200-400 mg/8 h.
OTROS ANTIINFLAMATORIOS	
Isonixina	400 mg/8-12 h – v.oral
	Rectal: 400 mg/8-12 h.
Morniflumato	Rectal: 70 mg/12 h

En general, todos los enfermos responden favorablemente a todos los AINES, pero en algún caso puede haber diferencias entre un preparado y otro. Se aconseja que los cambios de un preparado a otro, no deben realizarse hasta pasados unos días.

Breves comentarios a algunos anti-COX (25,26)

El grupo inicial de AINEs es el de los salicilatos, no incluido en la tabla VI, y es el más representativo de ellos.

— El ácido acetilsalicílico, con mas de 100 años en la terapia antiinflamatoria, sigue siendo posiblemente el antiinflamatorio más eficaz y de mayor poder de acción. Sus efectos secundarios a la dosis de 3-5 g día, tal como se recomienda en las enfermedades reumáticas, son intensos. Por esto se utiliza a dosis más bajas prácticamente en la totalidad de los procesos inflamatorios, además de su amplia administración para el control de la fiebre y la analgesia (cefalea,…). Entre sus derivados, el acetilsalicilato de lisina es el mejor tolerado. Lo mismo ocurre con el benerilato y esterlosato, ésteres de aspirina con paracetamol.

Conviene advertir que hay preparados que tienen aspirina y alcalino para minimizar la acción lesiva sobre el estómago, pero éstos no están exentos de riesgos. No olvidar que la aspirina, asociada a otras moléculas, es parte integrante de muchos preparados analgésicos, antigripales, antipiréticos, y esto encierra el peligro de producir efectos secundarios.

— El diflunisal es el difluorofenil del ácido salicílico. No se transforma en acido salicílico. Es más potente que la aspirina y tiene menos efectos secundarios. No tiene acción antipirética, pero es un buen analgésico, superior tres o cuatro veces a la aspirina. Dosis: 500 a 1000 mg de ataque. 250-500 mg cada 8 ó 12 h. Mantenimiento: no superar 1500 mg/día.

— El paraminofenol también llamado acetaminofeno o paracetamol es un excelente analgésico y antipirético, pero tiene escasa acción antiinflamatoria. Su actividad antiinflamatoria es inhibida por el peróxido que se produce en los focos inflamatorios, pero en el centro termorregulador no existe peroxido. No tiene acción antiagregante. La dosis es de 500-1000 mg/8-12 h, no debiendo pasar de 4 g al día.

El efecto secundario más grave es sobre el hígado. Su metabolización produce N-acetil-para-benzoquinonimina de gran poder electrofílico. Una dosis de 10-15 g de paracetamol al día produce importante necrosis hepática centrolobulillar, y 20-25 g pueden ser letales. A las 24 h de la toma del preparado aparecen náuseas, anorexia, sudoración, dolor abdominal y a los 4-5 días los síntomas y signos de fallo hepático. En estos casos, se aconseja la monitorización de los niveles del fármaco en sangre. Niveles de 300 mcg/ml a las 4 horas de tomar el fármaco son de mal pronóstico. Igualmente si a las 15 h estos niveles son de 45 mcg/ml. Como antídoto se administran compuestos sulfidrílicos que elevan el nivel de glutatión hepáticos. La N-acetil-cisteína es eficaz por vía oral y endovenosa. Por vía oral se recomiendan 140 mg/kg como dosis de ataque y 70 mg/kg de peso cada 4 h, en un total de unas 20 dosis.

— La indometacina, del grupo derivado del ácido acético y acetamida, es un poderoso AINE. Su acción antiinflamatoria es 10 a 40 veces superior a la de los salicilatos, pero sus efectos secundarios limitan su empleo, ya que el 35-50% de los enfermos los manifiestan y un 20% tienen que abandonar el tratamiento. Además de ser anti-COX es inhibidor de la activación de los neutrófilos. A altas dosis, casi tóxicas, produce desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Se metaboliza a metabolitos inactivos. El probenecid alarga su vida media unas 2 h por reducir la secreción tubular del mismo, por el contrario la indometacina no inhibe la actividad uricosúrica del probenecid. Contrarresta el efecto natriurético e hipotensor de la furosemida, así como el efecto de los diuréticos tiazídicos. También disminuye la acción de los IECAS y de los β-bloqueantes.

La dosis es de 25 mg 2 ó 3 veces al día. Una toma única diaria de 75-100 mg por la noche reduce mucho los efectos secundarios. Tiene actividad antipirética frente a la fiebre del Hodgkin.

— El sulindac es un profármaco con escasa actividad antiinflamatoria, pero su metabolización produce un compuesto sulfurado que si la tiene. Por esto tiene menos efecto lesivo sobre el tubo digestivo y sobre la producción de prostaglandinas en el riñón. Su acción analgésica y antiinflamatoria, a la dosis de 400 mg/día es similar a 4 g de aspirina y a 1200 mg de ibuprofeno. La dosis inicial es de 150-200 mg/día. Se ha señalado su acción antitumoral frente a los adenomas de colon, en especial en la poliposis familiar, como ocurre con otros AINES, incluso los antiCOX-2.

— El ácido mefenámico, junto con el meclofenálico y flufenálico, constituyen el grupo de los fenamatos. Su acción antiinflamatoria no es superior a la de otros AINES. Entre sus efectos secundarios produce diarreas intensas, llegando a ser esteatorréicas y en algunos casos con componente inflamatorio de la mucosa intestinal. Raramente puede producir anemia hemolítica autoinmune.

— El tolmetin, el ketorolac y el diclofenaco son derivados del acido heteroarilacético, poderosos analgésicos y antipiréticos al tiempo que antiinflamatorios. El tolmetin puede permanecer en el líquido sinovial de 8 a 10 horas, tiempo que sobrepasa su vida media. La dosis es de 800-1600 mg/día, no debiendo sobrepasar los 2 g/día. Es un buen sustituto de la indometacina, si bien sus efectos secundarios, en ocasiones, no son menores que los de ésta. El ketorolac es un poderoso analgésico. Puede administrarse por vía intramuscular, intravenosa y oral, siendo también útil en colirios. La dosis oral es de 5-30 mg 2-3 veces/día, la IM 30-60 mg/día y la IV 15-30 mg día. A la dosis de 100-200 mg/día, repartidos en 3 tomas, es muy útil como analgésico en la dismenorrea y es eficaz en forma de colirios. En los tratamientos prolongados hay que monitorizar los niveles de aminotransferasa, ya que puede elevarse de manera transitoria.

— El ibuprofeno, derivado del ácido propiónico, está indicado como analgésico especialmente en el periodo posquirúrgico. Es muy útil en la dismenorrea, a la dosis de 400 mg. Los efectos tóxicos se dan en el 15-20% de los pacientes.

— El meloxicam está entre los ácidos enólicos. Es inhibidor bastante selectivo de la COX-2. Su tolerancia es buena sin sobrepasar la dosis de 15 mg/día. En el grupo de los oxicamas, el lorxicam es más potente, hasta 100 veces más que el tenoxicam y 50 que el piroxicam.

— La nabumetona es un profármaco. Se transforma en un metabolito activo anti-COX, no siendo inhibidor selectivo de la COX-2. Tiene una mejor tolerancia que otros AINES.

— La fenilbutazona, oxifenbutazona, antipirina y aminopirina son pirazolonas. Han sido en gran medida proscritos por su acción tóxica sobre la medula hematopoyética. La dipirona o metamizol puede recomendarse ante el fracaso de otros AINES, especialmente indicado como analgésico y antipirético.

Los anti-COX-2 selectivos. (26,27)

La aparición en la terapéutica de los fármacos anti-COX2, los COXiBs, representa un avance espectacular en el tratamiento de la inflamación. Se incluyen a los siguientes:

— El rofecoxib es una furanona con sustitución de diaril y es anti COX-2 selectivo. A dosis habituales no inhibe la COX-1, por lo que no tiene efectos secundarios importantes sobre el estómago, riñón y plaquetas (27). Se ha señalado que las hemorragias ocultas pueden ser positivas en un número no despreciable de enfermos. También puede producir edemas, hipertensión y alteración renal en los nefrópatas. La dosis es de 12,5-25 mg al día. Presenta interacción farmacológica con rifampicina, metrotrexato y warfarina, pero no con los anticonceptivos orales, digoxina, ketoconazol, prednisona, prednisolona.

— El celecoxib es un pirazol con sustitución de diaril. Es selectivo antiCOX-2. La dosis habitual de 200 mg en una o dos tomas, puede elevarse a 100-200 mg dos veces al día

— La nimesulida, inhibidor selectivo de la anti-COX-2, inhibe también la activación de los neutrófilos y tiene poder antioxidante. Es antiinflamatorio, analgésico, antipirético.

— El etodolac tiene una capacidad elevada anti COX-2, lo que permite comprender su menor efecto secundario. Se utiliza más como analgésico que como antiinflamatorio a la dosis de 200-400 mg/8h. Existe un preparado «retard» que puede administrarse una sola vez al día.

— La apazona (azapropafona) no es una auténtica antiprostaglandina, pero tiene actividad antiinflamatoria, siendo mas activa como analgésico y antipirético. Su acción antiinflamatoria probablemente se deba a su capacidad de inhibir la migración, la degranulación, y la producción de radicales oxidativos en los neutrófilos.

Algunos AINES se utilizan en forma tópica, estando especialmente indicados en tenosinovitis, bursitis, esguinces, luxación, distensiones musculares, contusiones, tortícolis, lumbago. Se presentan en forma de crema, gel o pomada y algunos en spray. En muy raras ocasiones hay efectos sistémicos por absorción transcutánea. Los más representativos son: diclofenaco, descotoprofeno, etofenamato, ibuprofeno (spray), indo-

metacina, nabuprofeno (spray), quetoprofeno, piquetoprofeno (spray), piroxicam y susibuzona. Alguno de éstos se asocian a lidocaína.

Otras indicaciones no antiinflamatorias de los AINES

Los AINES son también antipiréticos y analgésicos, ya que las prostaglandinas sensibilizan los receptores del dolor. Algunos son más analgésicos que antiinflamatorios, como el ibuprofeno el ketorolaco. También son útiles en el ataque agudo de gota, administrados a dosis altas.

Los AINES por su propiedad tocolítica, al inhibir la producción de prostaglandinas en el endometrio, están indicados para el control del dolor de la dismenorrea. Se aconseja tomar dosis elevadas del antiinflamatorio en los dos primeros días de la menstruación. También, por esta propiedad, están indicados para retrasar el parto prematuro. En neonatología se utilizan para acelerar el cierre del conducto arterioso. Gran experiencia se tiene con la indometacina.

Especialmente la aspirina está indicada como antiagregante-antitrombótico. Su acción inhibidora de la COX-1 por acetilación impide la producción de TxA2 en las plaquetas, y, como esta inhibición no es reversible y las plaquetas no resintetizan COX-1, su acción se prolonga durante la vida de éstas. Una dosis de 70 mg es suficiente para bloquear la formación de TxA2 y no de prostaciclina por la célula endotelial. Las dosis habituales como antiagregante son 100 ó 200 mg/día.

Los enfermos que de modo crónico han tomado AINES, se ha señalado que tienen un 50% menos de riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer. Señalamos aquí que las citocinas IL-1 e IL-6 participan en la etiopatogenia del Alzheimer.

Efectos secundarios de los AINES

Las propiedades antitérmicas, analgésicas y especialmente antiinflamatorias de los AINEs hacen que su prescripción sea de las más frecuentes. En España se calcula que un 14% de la población es reumática y un 30% ha tenido dolor días antes de tomar AINES. El ibuprofeno, la

aspirina y el naproxeno son los fármacos más prescritos. La cuantía de aspirina administrada por prescripción médica en el mundo es de 17.000 toneladas. No se contabilizan las que se toman sin prescripción. El gasto por el consumo de AINES es elevadísimo. A esta cuantía hay que sumarle los gastos producidos por la atención médica y manejo de los enfermos con efectos secundarios importantes. En España los gastos por efectos secundarios alcanzan los 325 millones de euros (28).

La administración de los AINES debe ser cuidadosamente valorada, ya que producen una gran variedad de efectos secundarios (Tabla VII). Hay que destacar, por su frecuencia y por su transcendencia clínica, la patología digestiva y más concretamente la que incide sobre la mucosa gastroduodenal. Es evidente que la hemorragia digestiva cuanto mas intensa sea, obliga a transfusiones más importantes y más días de ingreso. No existe una dosis segura que evite el efecto secundario.

TABLA VII

Efectos secundarios de los AINES

- Anorexia, náauseas, vómitos
- Pirosis, distensión abdominal
- Dolor abdominal
- Ulceraciones en tracto digestivo
- Hemorragia oculta o masiva
- Perforación
- Diarrea, esteatorrea
- Antiagregación plaquetaria
- Ictericia
- Cefalea, mareos, vértigo, tinnitus.
- Obnubilación, confusión mental, angustia, ansiedad, depresión, insomnio.
- Alucinaciones, psicosis
- Erupciones cutáneas
- Neutropenia, trombopenia, anemia aplástica, anemia autoinmune
- Inhibición de la excreción de litio
- Retención de agua y sodio
- Disminución de los efectos hipotensores de los β-bloqueantes y diuréticos.
- Hipertensión

La aspirina, y los AINES, tienen una acción local sobre la mucosa gástrica. Son ácidos con constante de disociación baja, se encuentran no ionizados y son liposolubles, ésto les permite una fácil entrada en las células de la mucosa donde el pH neutro favorece su ionización y su concentración en las mismas, a las que altera con incremento de su permeabilidad y favoreciendo la retrodifusión de hidrogeniones. En mayor o menor grado produce cariolisis, erosiones, necrosis, hemorragias.

Conocer el grado de lesión de la mucosa gástrica sólo es posible por endoscopia. En general, no hay paralelismo entre los síntomas y la intensidad de la lesión. En un 70% de casos con lesión endoscópica ésta no va acompañada de clínica y el 30% tiene lesiones graves. Los grados de lesión endoscópica de menos a más son: normal-petequias aisladas (0), petequias múltiples (I), erosiones (II), úlceras (III), hemorragia-perforación (IV) (29). Conviene señalar que la magnitud de problemas es grande. En Gran Bretaña, situación similar a la nuestra, el número de ingresos hospitalarios en el último año relacionados con la toma de AINES, fue de 12.000, de los que fallecieron 2.600 pacientes.

La dispepsia se presenta en un porcentaje alto, pero parecido a la que se da en la población general. En algunos casos, el estreñimiento puede ser importante. Se calcula que un tercio de los enfermos que toman AINES acuden a la consulta médica por presentar molestias digestivas.

En general, cuanto más tiempo se toma el antiinflamatorio, mayor es la frecuencia con que aparecen lesiones. Un 1% presenta patología grave antes de los seis meses y en un 9% recidivan úlceras antiguas.

Son factores de riesgo la edad, la historia de ulcus péptico o ser portador de enfermedad grave. El alcohol y el tabaco favorecen la lesión digestiva. Los anticoagulantes orales y el cortisol potencian los fenómenos hemorrágicos. Cuando éste se toma de manera aislada produce alteraciones gástricas en menos de un 1%. La presencia de *Helicobacter pylori* también favorece los efectos lesivos de los AINES sobre el estómago.

El tratamiento preventivo trata de frenar la acción clorhidropéptica y mejorar la calidad funcional de la mucosa. Se aconseja tomar los AINES con alimento.

En las lesiones de la mucosa gástrica, el misoprostol, que es una prostaciclina sintética, es más eficaz que los anti H2 e inhibidores de la bomba de protones. Dosis eficaces de misoprostol son 600-800 mcg/día. Tiene el inconveniente de provocar con frecuencia diarreas y dolor abdominal. En estos casos, el pantoprazol es eficaz y mejor que el misoprostol a dosis bajas. La famotidina a 40 mg/día es más eficaz que la ranitidina (30).

El acexamato de zinc reduce la producción de ClH en el estómago y mejora el trofismo de la mucosa, habiéndose demostrado su eficacia frente a las lesiones gástricas por AINES. El sucalfrato, sin embargo, no ha demostrado ser eficaz, mientras que el dosmalfato sí lo es.

La administración de dosis bajas de aspirina, tal como se indica en la patología cardiovascular, no están exentas de efectos secundarios gastroduodenales. En estos casos, debe valorarse la presencia de factores de riesgo asociado. No existe una dosis segura que evite los efectos secundarios sobre la mucosa gastroduodenal. Es conveniente señalar que, en España, el tratamiento preventivo de la gastropatía por AINES fue incorrecto en el 80% de los casos, lo que equivale a un gasto de 155 millones de euros (28).

Los anti-COX2 se han demostrado, realmente, menos agresivos frente a la lesión gástrica. No producen reducción de la filtración glomerular en los sanos, pero en los casos de insuficiencia renal pueden agravarla. Los abandonos por efectos secundarios no son superiores al 7% y los debidos a molestias digestivas como dispepsia, dolor abdominal, diarrea y úlceras gástricas alcanzan la cifra del 5%, muy inferior a los de los otros AINES. La elevación de las transaminasas, 3 veces su valor normal, no supera el 6% de los pacientes.

ESTEROIDES

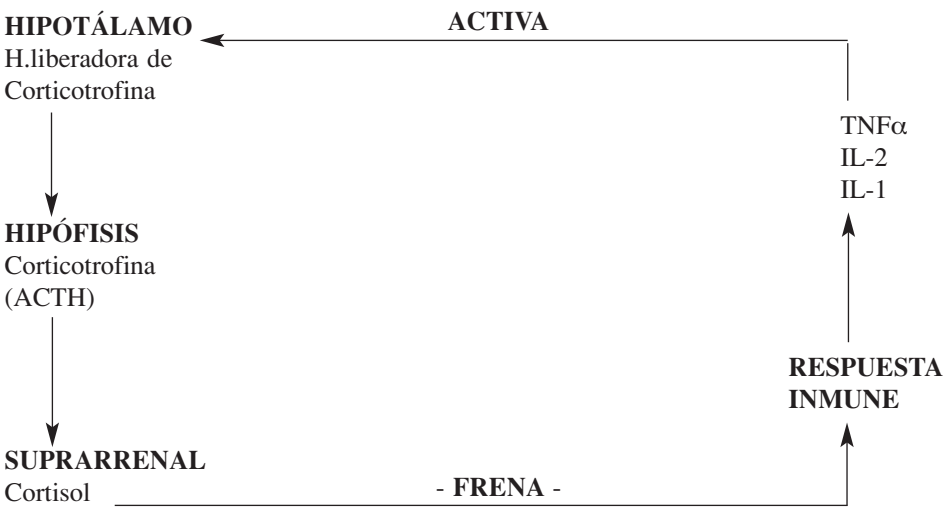
El representante natural es el cortisol, hormona glucocorticoidea. Por su directa intervención en el metabolismo hidrocarbonado, es el antiinflamatorio natural, cuya actividad no ha sido superada por ningún otro fármaco. Se produce en la zona interior de la cápsula de la corteza suprarrenal, junto con los andrógenos. La producción diaria de cortisol es

de unos 10 mg. Guarda un ritmo día/noche, siendo su nivel plasmático a las 8 h. de 16 mcg /100 ml y a las 18 de 4 mcg/100 ml. Las situaciones de estrés aumentan mucho su producción.

El control de la secreción de cortisol descansa sobre un circuito en el que intervienen potenciales de estimulación y otros de freno. El eje hipotalámo (factor liberador de corticotrofina —CRH—), hipófisis (corticotrofina-ACTH-), cápsula suprarrenal (glucocorticoides-cortisol), está acoplado a otro eje constituido por células y moléculas de la inflamación (esquema 5). El cortisol frena la producción de corticotrofina y de las moléculas mediadoras de la inflamación —IL-1, IL-6, TNFα—, mientras que éstas estimulan la producción del cortisol, actuando sobre el hipotálamo. Esta visión, de la regulación en la producción de cortisol, encaja perfectamente en la patología de la inflamación (31).

Los esteroides inhiben la producción de moléculas proinflamatorias, derivadas del ácido araquidónico, por inhibir la fosfolipasa A2 por medio de la lipocortina. Igualmente impide la activación de moléculas de adhesión, ICAM-1, ELAM-1, citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNFα,

ACTIVACION DEL CORTISOL Y FRENO DE LA RESPUESTA INMUNE



Esquema 5

γ-interferón, Factor Estimulante de Colonias, GM-CSF. Los esteroides tienen una excelente absorción intestinal y pueden hacerlo también por vía transcutánea y aérea. Las formas de esteroides hidrosolubles pueden administrarse por vía parenteral. La administración IM produce un efecto más prolongado que la endovenosa. El transporte de los esteroides se realiza, en un 90%, en unión reversible a proteínas, globlulina α —transcortina— y albúmina. Puede administrarse por vía tópica.

Los glucocorticoides se fijan a un receptor citoplasmático unido a una proteína de gran tamaño, formada por dos subunidades proteicas —proteínas del shock calórico—. Esta unión determina que el receptor se libere de las proteínas estabilizadoras, lo que permite que el complejo esteroide-receptor se desplace al núcleo y se una al ADN, sobre las zonas llamadas de «respuesta glucocorticoidea». Esto permite inhibir la transcripción de citocinas proinflamatorias, actuando sobre zonas de represión de los respectivos genes. También inhiben la formación de receptores de citocinas y de moléculas de adhesión ICAM-1, E-selectina (32). Al mismo tiempo desarrollan un efecto inmunosupresor con disminución del número y activación de los linfocitos T.

Junto a estos efectos beneficiosos, los esteroides provocan un gran número de efectos secundarios que hay que tener presente, en especial, si se administran dosis elevadas o continuas. Entre estos está la hiperglucemia, el incremento en la liberación de glucosa, la hiperinsulinemia con aumento de la resistencia a la misma y la elevación, por aumento de síntesis hepática, de las lipoproteinas VLDL, HDL, LDL y triglicéridos. Hay tendencia a la hipocalcemia por reducción en la absorción intestinal y menor reabsorción tubular renal de calcio. Los esteroides frenan la actividad de la hormona antidiurética con incremento de la eliminación de agua, pero por su acción mineralocorticoide producen retención de sodio y eliminación de potasio, con tendencia a la hipertensión arterial.

Ejercen un efecto catabólico con pérdida proteica, especialmente en los músculos, tendones, piel. Se altera la masa corporal con incremento del tejido adiposo y reducción de la masa muscular estriada, llegando a producirse la «miopatía esteroidea» inicialmente expresada por debilidad de los músculos de la cintura pélvica. Hay freno de la actividad osteoblástica. En los tratamientos de larga duración o sobredosis puede aparecer ansiedad, depresión, obnubilación. Importa conocer las contraindicaciones (Tabla VIII) y las interacciones farmacológicas (Tabla IX).

Tabla VIII

*Contraindicaciones de los esteroides**

– INSUFICIENCIA CARDIACA CONGESTIVA. FORMACIÓN DE EDEMAS.
  Reducir la ingesta de sodio, administrar diuréticos.
– HIPERTENSIÓN ARTERIAL.
  Ajustar la dosis del hipotensor, diuréticos.
– HIPOPOTASEMIA
  Suplementos de potasio.
– ESOFAGITIS, GASTRITIS, ÚLCERA PÉPTICA.
  Alcalinos, bloqueadores de la supresión clorhidropéptica.
– DIABETES, ENFERMEDAD DE CUSHING.
  Regular los antidiabéticos.
– INFECCIÓN BACTERIANA GRAVE O FÚNGICA.
  Asegurar antibióticos eficaces.
– TUBERCULOSIS ACTIVA Y PELIGRO DE ACTIVACIÓN DE TB.
  Tratamiento antituberculoso. Quimioprofilaxis.
– OSTEOPOROSIS.
  Tomar el esteroide a días alternos y a primera hora de la mañana.
  Además, la terapia específica
– INSUFICIENCIA HEPÁTICA O RENAL.
  Mucha precaución
– GLAUCOMA, HERPES OCULAR.
  Mucha precaución
– ENFERMEDAD PSÍQUICA. POSIBLE AGRAVACIÓN.
  Mucha precaución
– EMBARAZO, ESPECIALMENTE EN LOS PRIMEROS MESES.
  Evitar su administración si es posible
– LACTANCIA
  La prednisona y prednisolona son los esteroides que se excretan menos por la leche.
– NIÑOS Y ANCIANOS.
  Llevar un cuidado especial.

* Las medidas preventivas que hay que tomar.

TABLA IX

Interacciones farmacológicas de los esteroides

- Reduce los niveles del acetil salicílico y de isoniazida.
- Potencia los efectos secundarios de los AINES, teofilina, anfotericina B, ciclosporina.
- Reduce la acción de los antidiabéticos orales.
- Obliga a modificar la dosis de anticoagulantes orales.
- Incrementa la acción de los estrógenos por reducir su metabolismo.
- Los inductores enzimáticos, fenitoína, fenobarbital, rifampicina, reducen los niveles de los esteroides.

Uno de los efectos secundarios más importantes es el bloqueo en la producción de corticotrofina y, secundariamente, de esteroides, lo que provoca con mayor o menor grado atrofia corticosuprarrenal. Por esto hay que tener presente, cuando se suspende el tratamiento, la aparición de una crisis aguda de insuficiencia corticosuprarrenal, caracterizada por malestar general, anorexia, náuseas, vómitos, fiebre, disnea, hipotensión e hipoglucemia. Todo ello con independencia del posible agravamiento de la enfermedad de base por la que se estaba administrando el esteroide. Por esto si la supresión del esteroide está indicada ésta debe realizarse con una reducción lenta y progresiva. Puede aparecer «seudotumor cerebral». Hay gran variación individual en el grado de supresión suprarrenal que producen los esteroides, pero hay que tener presente que, después de un tratamiento con esteroides de varias semanas de duración, queda siempre un estado de insuficiencia corticosuprarrenal latente (32).

La investigación farmacológica ha procurado obtener moléculas cada vez con mayor potencial de acción y menores efectos secundarios. El primer objetivo ha sido alcanzado, pero no es posible decir lo mismo del segundo. El deflazacort tiene una mejor tolerancia. Si es posible se recomienda tomar el esteroide a días alternos a las 8 a.m. para reducir los efectos secundarios especialmente de supresión de la suprarrenal y la osteoporosis. Para la elección del preparado esteroideo hay que tener en cuenta la duración del efecto más que su potencia, ya que las equivalencias en las dosis permite adecuarlas para que el efecto sea similar (Tabla X).

Tabla X
Principales corticoides sistémicos

Fármaco	*Poder Antiinflamatorio**	*Duración-Efecto*	*Actividad Mineralo-corticoide*	*Dosis*
Cortisol	1	C	Nula	
Cortisona**	0,8	C	Nula	20-300
Prednisona	4	I	Baja	5-60
Prednisolona	4	L	Baja	4-48
Metil-Prednisolona	5	I	Nula	5-60
Triamicinolona	5	I	Nula	4-60
Betametasona	25	L	Nula	0,6-7,2
Dexametasona	25	L	Nula	0,75-9
Deflazacort	5-10	L	Nula	6-90
Hidrocortisona	1	C	Media	20-240
Parametasona	10	L	Nula	2-24

C: corta : 8-12 h.
I: Intermedia : 12-33 h.
L: Larga : 36-72 h.

* Comparado con hidrocortisona
** Primer esteroide sintetizado

Los esteroides pueden tener aplicación tópica. En este caso, el excipiente tiene importancia, ya que cuanto más graso sea mejor es la cesión del esteroide. Por esta vía, los efectos secundarios pueden ocurrir cuando se han administrado más de 30 g semanales, dosis referida a su equivalencia con el cortisol. Se aconseja que la aplicación tópica de los esteroides en las zonas vellosas, y en la piel en general, sea en forma de solución, pomadas, ungüento, gel. Para zonas infectadas se utilizan las cremas y para las palmas de las manos y las plantas de los pies, la crema, la loción ó la solución.

GLUCOCORTICOIDES INHALADOS

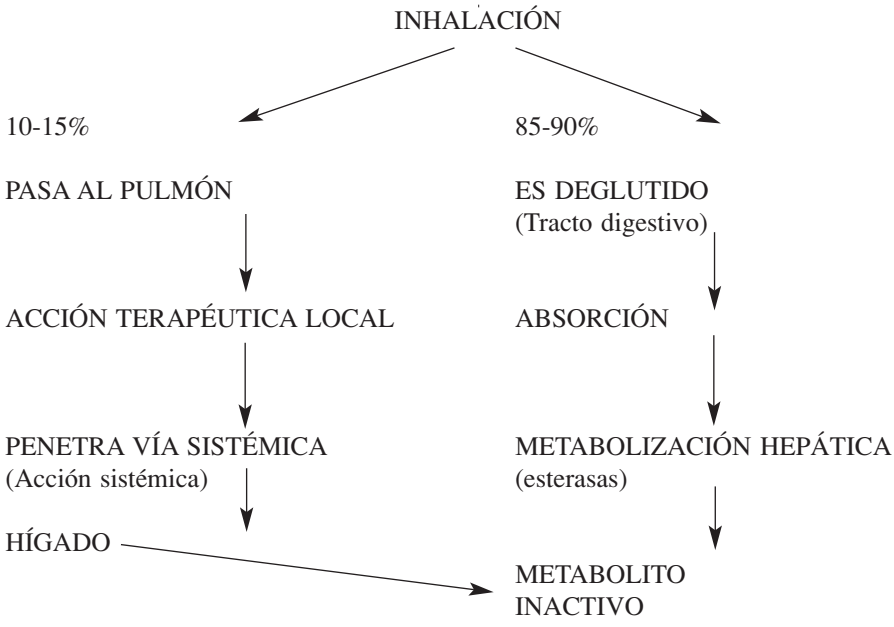
Bloquean la respuesta inflamatoria, disminuyen la hiperreactividad bronquial y el número de células de la inflamación, eosinófilos y macrófagos. La administración prolongada reduce la respuesta inmediata a los alergenos y previene el asma inducido por el ejercicio. Reduce el grado de tolerancia a los agonistas β-adrenérgicos. La acción beneficiosa puede retrasarse varios días, hasta una semana, y el efecto terapéutico máximo se obtiene entre la primera y la cuarta semana.

Cerca del 90% de los esteroides inhalados se degluten y pasan al tracto digestivo. Tras su absorción, en su primer paso hepático, son metabolizados a metabolitos inactivos (esquema 6) (32). La pequeña porción de esteroide que pasa a la circulación desde las vías respiratorias, se une a las proteínas plasmáticas en un 87% y tiene una semivida aproximada de 15 horas.

En el ataque de asma no deben administrarse esteroides inhalados, pero sí los sistémicos. Su indicación es preventiva y de mantenimiento para evitar exacerbaciones. Pueden asociarse a otros fármacos antiasmáticos, tanto por vía sistémica como por vía broncopulmonar.

Los efectos secundarios sistémicos son escasos y sólo se presentan con tratamientos prolongados. Estos son: hipofunción suprarrenal, retraso del crecimiento en los niños, disminución de la densidad mineral ósea, cataratas y glaucoma. Como efectos secundarios locales hay que señalar la tendencia a la micosis en boca y garganta por Candida y más raramente

DISTRIBUCIÓN DE LOS ESTEROIDES INHALADOS



ESQUEMA 6

por Aspergillus niger, siendo eficaz para su prevención el enjuague con agua después de cada inhalación. Puede alterarse la sensación olfatoria y gustativa, así como producir ronquera transitoria y sequedad nasal. En algunos casos aparece broncoespasmo paradójico que se resuelve con la supresión del preparado y la administración inmediata de un agonista del receptor β-adrenérgico.

En las embarazadas hay que tener las mismas precauciones que con los esteroides por vía sistémica. En la mujer lactante es recomendable suspender el tratamiento durante las primeras semanas.

— Beclometasona.–Es un glucocorticoide halogenado, que contiene un átomo de cloro. La dosis inicial en casos leves, es de 200 a 400 mcg cada 24 h., pudiendo aumentarse a 800 mcg. En los casos graves, la dosis puede alcanzar entre 800 y 1600 mcg/24 h. y rara vez 2000 mcg. La dosis de mantenimiento debe ajustarse según el efecto terapéutico, que suele estar entre 200-400 mcg cada 12 h., pudiendo aumentarse si es necesario.

— Budenosida.–Las dosis son similares a las del preparado anterior. Puede administrarse, además de en aerosol, en forma de polvo mediante el dispositivo «turbohaler», que reduce la cuantía del paso del preparado al tracto digestivo.

— Fluticasonapropionato.–Tiene dos átomos de flúor en su molécula. Se administra en forma de aerosol. En el asma leve, las dosis son de 100 a 200 mcg/12h., en el moderado de 250 a 500 mcg/12 h. y en el grave de 500 a 1000 mcg/12 h. En los niños de entre 1 y 4 años es de 100 mcg/12 h.

En los últimos años, las dosis de los preparados esteroideos por vía inhalatoria se han ido incrementando. Todos los esteroides comercializados tienen una actividad terapéutica equivalente. Hay una buena relación dosis-efecto (33). Es útil dividir las dosis en dos o tres aplicaciones diarias. Se recomienda, en algunas ocasiones y para favorecer la penetración del preparado en la vía bronquial, inhalar 10 ó 15 minutos antes un agonista del receptor β-adrenérgico. Cuando las dosis son elevadas, o se trata de ancianos o niños, es conveniente el empleo de un espaciador que permite la entrada en las vías respiratorias de partículas finas y evita el riesgo de afonía o de candidiasis.

LOS ANTILEUCOTRIENOS EN EL CONTROL DE LA INFLAMACIÓN

En el desencadenamiento del asma bronquial, la inflamación de base inmunoalérgica —eosinófilos, mastocitos, IgE—, es muy importante. Está considerada, en gran medida, responsable de la disrregulación bronquial y de los remodelamientos bronquial y pulmonar, con aumento de fibroblastos, fibrosis, células musculares lisas, vasos y también de células mucosas, responsables del incremento de la producción de moco (34). Conviene señalar que, en un individuo alérgico, la inhalación de un alergeno produce a los pocos minutos una respuesta de broncoconstricción que desaparece en unas 2-3 horas. En los verdaderos enfermos asmáticos, se produce hacia las 4 horas una onda de broncoconstricción, de mayor o menor intensidad, que puede durar uno o varios días. Esta segunda fase, reacción asmática tardía, tiene un importante componente de inflamación bronquial con infiltrado de eosinófilos, mastocitos y linfocitos.

Es indudable que los eosinófilos tienen una intervención muy importante en la producción del asma bronquial y la rinitis alérgica. Tienen receptores para los leucotrienos, LTC-4, LTD-4, LTE-4. La inhalación de éstos aumenta la cuantía de eosinófilos en la mucosa bronquial y en el esputo, así como también la producción de moco. También los eosinófilos están modulados por la IL-4, IL-5, IL-13.

Los cisteinil leucotrienos tienen un poder importante de contracción de la fibra lisa de los bronquios, siendo también un factor desencadenante de inflamación. El poder broncoconstrictor del LTD4 es mil veces superior al de la histamina. Los tres cis-leucotrienos tienen un receptor común —LT1—, siendo la actividad del LTD4 la más potente, seguida por el LTC4 y el LTE4.

La Industria Farmacéutica ha buscado la obtención de moléculas capaces de inhibir la acción de los cis-LT, bloqueando el receptor o impidiendo la síntesis de éstos por inhibición de la 5-LPO.

En la actualidad, hay más de doce moléculas antireceptor, pero no todas están comercializadas. Todas las moléculas antireceptor sintetizadas llevan el sufijo «lukast» (34). Hasta el momento se ha demostrado la eficacia del zafirlukast, montelukast y pranlukast (Tabla XI). El inhibidor de la enzima 5-LPO es el zileutón. Es un inhibidor potente, que impide

Tabla XI
Antileucotrienos

Fármaco	*Dosis oral*	*Recomendaciones*
Inhibidor de la 5-lipooxigenasa		
ZILEUTON	600 mg/día	– Repartirlo en cuatro tomas. – Valorar periódicamente la GPT (alanina aminotransferasa) – Sólo comercializado en EE.UU
Antagonistas del receptor LT		
MONTELUKAST	10 mg adultos 5 mg niños (6-12 años)	– Tomarlo por la noche
	20 mg (x2)	– Dos tomas al día – Tomar 1 hora antes de la comida o 2 horas después.
PRANLUKAST	225 mg(x2)	– No comercializado en EE.UU ni en UE, sí en Japón.
THOMELUKAST		– Primer fármaco utilizado. (No comercializado).

la formación de los cisteinil-leucotrienos y también de LTB-4. La eficacia terapéutica, en teoría, debería ser superior a los antirreceptores, pero esto no es así.

El zafirlukast y el zileutón potencian la acción de los anticoagulantes orales, obligando a ajustar la dosis de estos. El zileuton eleva, en un 4% de casos, la cifra de transaminasas de manera transitoria y produce con escasa frecuencia eosinofilia. Se ha señalado la aparición de una vasculitis sistémica, similar al síndrome de Churg-Strauss, pero de dudosa relación causa-efecto.

La acción terapéutica de los antileucotrienos es eficaz en el asma moderado. La frecuecia de las exacerbaciones se reduce así como la dependencia de los agonistas β-2 adrenérgicos. Los fármacos antirreceptores pueden administrarse junto a otros antiasmáticos, hecho de gran trascendencia clínica.

El asma desencadenado por el esfuerzo físico, especialmente en ambientes fríos y secos, es de corta duración y no va acompañado de reacción inflamatoria. En su patogenia intervienen los leucotrienos, encontrándose elevación de los mismos en la orina. Por esto, los antileucotrienos son eficaces, tomados antes de la práctica deportiva, para prevenir este tipo de asma.

Cada vez se tiene mas la convicción de que el tratamiento del asma requiere la utilización de más de un fármaco y no todos los enfermos reaccionan igual a los mismos. No hay duda de que, mantener al enfermo asmático el máximo tiempo posible sin crisis de broncoconstriccion y con el mínimo componente inflamatorio, es una medida muy eficaz. Las exacerbaciones asmáticas aumentan la morbilidad y la mortalidad y reducen la calidad de vida. Por esto, es de gran interés poder disponer de medicamentos que tomados de manera continua sean capaces de mantener lo más estable posible el territorio bronquial, aunque su eficacia sea menor ante las crisis asmáticas. Los antileucotrienos y los esteroides inhalados cumplen perfectamente esta función, siendo su administración conjunta muy eficaz. Tal es el caso de la asociación de budesonida «turbohaler» —400-1600 mcg/día— a 10 mg de montelukast (35).

ANTIPAF

Hasta la fecha, los anti-PAF no han sido antiinflamatorios muy eficaces, como ha ocurrido con el Ablott 87648 y el WEB 2086. Investigaciones recientes se orientan hacia la rinitis-asma. A nivel del árbol respiratorio, el PAF está muy relacionado con la histamina, ya que desarrolla gran actividad frente a los mastocitos y eosinófilos. Hay gran sintonía entre las acciones de la histamina y del PAF. Muchas de las manifestaciones de estornudo, lagrimeo, picores, rinorrea, propias de la rinitis alérgica están producidas por la histamina preformada en las células cebadas. El haber obtenido una molécula capaz de bloquear a los receptores H1 y al PAF, como es el caso de la rupatadina, ha permitido disponer de un potente antihistamínico y antiinflamatorio con especial acción sobre el tracto respiratorio superior (36). Este anti PAF frena la quimiotaxis que sobre los eosinófilos produce la eotaxina y frena la actividad agregante de plaquetas que desarrolla el PAF.

EL BLOQUEO DE LAS CITOCINAS

En los últimos años, la biotecnología, y más concretamente la ingeniería genética, han permitido obtener proteínas con gran capacidad funcional, tal es el caso de las hormonas, así como diseñar y aplicar protocolos terapéuticos basados en la obtención de anticuerpos específicos capaces de anular o bloquear los efectos de moléculas —proteínas— lesivas para el organismo. Es bien seguro que en los años próximos el número de éstos aumentará significativamente. Los ensayos cooperativos, apoyados por la poderosa Industria Farmacéutica, están permitiendo estos avances. De este planteamiento se está beneficiando mucho la terapia antiinflamatoria, siendo el máximo exponente los tratamientos anticitocinas.

Esta línea terapéutica, que se encuadra en la de la terapia biológica, conlleva, por un lado, el encarecimiento del tratamiento antiinflamatorio y, por otro, el riesgo de los efectos secundarios. No podemos olvidar que la inflamación es un mecanismo de defensa del organismo frente a las infecciones y que el freno, o reducción de su actividad, genera el no despreciable peligro de infección y de respuestas inmunes no deseables.

MODULACIÓN DEL TRÁFICO DE LINFOCITOS TH0 A TH1 FAVORECEDORES DE LA INFLAMACIÓN

— La IL-2, que activa la multiplicación de los linfocitos, ha sido objeto de su modulación en el control de la inflamación, especialmente en la enfermedad inflamatoria intestinal (37). El daclizumab es un anticuerpo frente al receptor de IL-2 y el basilixmab es un anticuerpo quimérico también frente al receptor IL-2. Se está aún en fase experimental.

— La IL-12, que se une a un receptor heterodimérico formado por las cadena β1 y β2, activa la transcripción del gen del interferón gamma —IFN-γ—. Ya se están ensayando protocolos terapéuticos con el empleo de anticuerpos anti IL-12r, habiéndose obtenido mediante modificaciones genéticas en la región variable un anticuerpo con gran poder de fijación al receptor (38).

— La IL-18, que aparece en los macrófagos activados y en células epiteliales, favorece el paso de LTH0 a LTH1, posiblemente al activar la

formación de IFN-γ. Ya se ha elaborado un anticuerpo monoclonal humano frente a la IL-18. Está en fase de ensayo en animales de experimentación y en la clínica humana en la enfermedad inflamatoria intestinal.

— El interferón gamma —IFNγ—. Activa el tránsito de TH0 a TH1. Para su inactivación se ha obtenido un anticuerpo monoclonal. Con una dosis de 12 millones UI diarias IV o 45000 U/Kg vía subcutánea 2-3 veces semanales se han reportado resultados esperanzadores en la enfermedad de Crohn.

IL-1

En la artritis reumatoide, que es una enfermedad inflamatoria articular de evolución crónica, pasados dos años de evolución aparecen los fenómenos de destrucción articular, las erosiones. Poca eficacia, para detener este proceso, han tenido los tratamientos llamados modificadores de la enfermedad. La eficacia de los esteroides está contrarrestada por sus efectos secundarios a largo plazo. Últimamente, el metotrexato ha demostrado tener una mínima capacidad de retrasar la evolución del proceso destructivo. El importante papel de las citocinas inflamatorias, en la patogenia de esta enfermedad, ha impulsado a utilizar el bloqueo de las mismas, especialmente de la IL-1 y el TNF, para su tratamiento (39).

El antagonista del IL-1ra es un inhibidor natural de la activación de la IL-1, que se une a los dos receptores I y II. Por ingeniería genética se ha obtenido un antagonista recombinante, el anakinra (39). Éste administrado por vía subcutánea, a la dosis diaria de 1-2 mg/kg durante 12 semanas, ha resultado altamente eficaz para detener la inflamación y la progresión de las lesiones destructivas. Este efecto beneficioso se mantiene durante más de 12 semanas desde la supresión del tratamiento. Como efectos secundarios hay que señalar la reacción local que puede darse en un 50% de los casos que reciben la dosis máxima de 2 mg/Kg. Esto sólamente ha obligado a la suspensión del tratamiento en el 7% de los casos. La cefalea y la infección en vías respiratorias altas, sinusitis en especial, se da en el 15%. Dolor abdominal o torácico y leucopenia se presentan con muy escasa frecuencia. Para que sea eficaz el anakinra tiene que bloquear más del 95% de los receptores. Antagonistas del IL-1ra también se han utilizado para el control de la inflamación sistémica de la sepsis. Los resultados han sido poco satisfactorios (40).

IL-4, IL-5, IL-13.- Por ingeniería genética, utilizando células de ovario de hámster chino, se ha obtenido el receptor soluble —IL-4r—. Una inhalación de éste conduce a su elevación en sangre y a un bloqueo sistémico de la IL-4 de unas 8 horas de duración. También hay reducción del NO exhalado, que es expresión de inflamación bronquial. La administración del IL-4r permite reducir, e incluso suprimir, la administración de esteroides inhalados (41).

Ya se ha utilizado el anti-IL-5. El primero, el mepolizumat no ha sido suficientemente eficaz, pero sí el SB-240563 y el SCH55700. Son dos anticuerpos humanizados, el primero IgGk y el segundo IgG2a. El SCH55700 se ha mostrado eficaz frente a la hiperreactividad bronquial y para la reducción de la eosinofilia, pero para esto el IL-5 debe ser intensamente inhibido (42). La eficacia aumenta si se inhibe también la eotaxina, molécula quimiotáctica para los eosinófilos. Hay que señalar que la acción terapéutica de los anti IL-4 e IL-5 es eficaz fundamentalmente en las fases del desarrollo del fenotipo asmático, siendo esta eficacia menor cuando ya está desarrollado el broncoespasmo.

El bloqueo de la IL-13, mediante el receptor soluble de la misma, la proteína de fusión sIL-13ra2-IgGFc, administrada por vía subcutánea, inhibe la respuesta broncoconstrictora desencadenada por la acetilcolina y reduce la cuantía de moco. Su eficacia es esperanzadora, ya que este efecto se produce en el animal de experimentación que ya ha desarrollado el fenotipo asmático alérgico.

FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF)

El bloqueo funcional del TNF-α es una importante diana en la terapia de la inflamación. Mucho se está logrando en el campo de la terapia biológica. Los dos caminos de terapia biológica frente al TNF son, un anticuerpo quimérico antiTNF-α y dos proteínas de fusión de los receptores p75 y p55. No obstante, hay otros caminos terapéuticos no biológicos.

El anticuerpo IgG1 anti TNF llamado infliximab, es una proteína quimérica 75% humana y 25% murina. Ejerce su actividad frente al TNF soluble y transmembrana, produce lisis celular por fijación del complemento en las células productoras de TNF y provoca apoptosis de linfocitos T

por la fracción IgG1Fc del anticuerpo. La respuesta terapéutica no es bimodal (43,44). El infliximab se administra por vía intravenosa.

En la artritis reumatoide, la administración de infliximab, a dosis de 3 mg/Kg IV y al ritmo de una inyección semanal (0, 3, 6,14, 22 y 30 semanas), reduce en los monocitos circulantes el nivel intracelular de IL-1, IL-6, IL-12, TNF y frena el flujo de linfocitos TH0 hacia TH1. La relación LTH2/TH1 se eleva así como también los niveles de IL-10. Produce mejoría clínica y radiológica. También, con pautas de administración semejante, tras una inducción de 5 mg/Kg las semanas 0, 2, 6 y después cada 6 semanas, es eficaz en la espondiloartrosis anquilopoyética, en la policondritis recidivante, en la uveítis posterior y especialmente en la enfermedad de Crohn. Se ha comprobado que, en la artritis reumatoide, el polimorfismo en el gen del TNFα, en la posición 308, el G/G, responde mejor que el A/G, o el A/A.

La infusión de anti-TNFα no está exenta de fenómenos secundarios. Puede desencadenar en un 20% de los casos, urticaria, disnea e hipotensión. También en un tercio de los casos produce hipersensibilidad retardada con mialgias, artralgias, fiebre, rash, prurito, edemas en labios, cara, manos, cefalea, disfagia. Aparecen anticuerpos antinucleares —ANA— y anti-ADN nativo hasta en un 10% de los casos. No se ha descrito la aparición de linfomas no hodgkinianos. Además, hay tendencia a las infecciones, habiéndose producido activación de la tuberculosis, lo que requiere tratamiento oportuno.

Por ingeniería genética se ha obtenido el *etarnecept* que es una proteína de fusión formada con dos péptidos iguales que el receptor p75, unidos al dominio Fc de la IgG1. El *onercept* está igualmente constituido que el etanercept, pero con el receptor p55. Las dos proteínas de fusión se administran por vía subcutánea y se han mostrado eficaces.

El etanercept está comercializado y es menos activo que el onercept y que el infliximab en el tratamiento de la enfermedad de Crohn. A la dosis de 25 mg subcutáneo, 2 veces por semana, durante 24 semanas, se ha mostrado eficaz en la artritis reumatoide, incluso frente a los procesos destructivos. El etarnecept no provoca apoptosis en los linfocitos de la lámina propia de la mucosa intestinal en la enfermedad de Crohn, tal como lo hace el infliximab.

El CDP-571 es fruto de ingeniería genética. Es una molécula de IgG4 humana, a la que se la ha incrustado la región determinante complementaria de un anticuerpo anti-TNF humano obtenido en el ratón. Se trata de un anticuerpo humanizado, 95% de proteína humana y el resto murino. Actúa frente al TNF soluble y transmembrana. Hay que administrar una dosis de ataque y después tratamiento de mantenimiento cada 8-12 semanas. En la enfermedad de Crohn, ha sido eficaz mejorando incluso las fístulas. Las manifestaciones secundarias, de respuesta inmune, son muy inferiores a las que aparecen con el anticuerpo quimérico (46).

El CNI-1493 es la guanilhydrazona, compuesto capaz de inhibir la activación translacional del gen del TNF dependiente de proteinquinasas. A la dosis de 8 mg/m^2 ó 25 mg/m^2 IV diaria, durante unos doce días, ha demostrado ser eficaz en la enfermedad de Crohn.

La *talidomida* bloquea la síntesis del TNF en los macrófagos por degradación del ARNm TNF. Además inhibe la activación de la IL-12. A la dosis de 50-100 mg/día, e incluso 200-300 mg/día, durante varias semanas, ha sido de eficacia terapéutica en la enfermedad inflamatoria intestinal (45).

IL-10.–Es la citocina antiinflamatoria. La obtención por ingeniería genética de IL-10 —rHuIL-10— ha permitido su administración en procesos inflamatorios crónicos como enfermedad inflamatoria intestinal y artritis reumatoide. A la dosis de 5 ó 25 mcg/kg/día IV, los resultados han sido de eficacia moderada (45). Por el contrario, la administración de enemas con suspensión de bacterias lactococcus, transfectadas con el gen de IL-10 sí han dado inicialmente resultados satisfactorios (47).

TERAPIAS FUTURAS ANTI NF-κB

Al hablar del Factor de Transcripción Nuclear se indicó su importancia en el mecanismo de la inflamación y la ventaja terapéutica que implicaría el poder bloquear su activación. Son varios los intentos por encontrar fármacos con estas características.

El pirrolidinditiocarbamato (48) —PDTC— inhibe «in vivo» la activación del NF-κB, al impedir la fosforilización de su inhibidor, el I-κB, desencadenando una acción antiinflamatoria. Este importante efecto terapéutico ha sido demostrado en la sepsis.

Otro compuesto, la ginesteína, inhibidor específico de proteinquinasa, impide la activación del NF-κB con reducción en el atrapamiento de neutrófilos y descenso de metaloproteinasa desencadenados por la endotoxina. Esta importante acción terapéutica se ha demostrado experimentalmente en la inflamación del distress respiratorio producido por endotoxina. La brillantez de este resultado obliga a seguir estos estudios (49).

La sulfasalacina, combinación de sulfapiridina y acido 5-aminosalicílico, es un eficaz activo en la terapia de la colitis ulcerosa y de la enfermedad de Crohn. Se ha llegado a conocer el mecanismo de su acción antiinflamatoria fundamentado en su capacidad para inhibir la traslocación del NF-κB al núcleo, al impedir la degradación del inhibidor I-κB. Esta importantísima actividad no la tienen ni la sulfapiridina ni el ácido 5-aminosalicílico por separado. Es evidente que la sulfasalacina tiene un lugar en la terapéutica de las inflamaciones crónicas (50).

Se sabe que los macrófagos, junto a otras células inflamatorias, en la pared de las arterias con ateromatosis, y muy especialmente en la placa de ateroma, liberan moléculas proinflamatorias así como metaloproteinasas, que debilitan la estructura fibrosa de la placa y favorecen su ruptura. Por esto es importante señalar que el NF-κB, con su gran potencial proinflamatorio, se encuentra activado en la placa de ateroma (19,51).

En los últimos años, se ha venido señalando que la dieta hipocolesterimiante y especialmente las estatinas, reducen el proceso inflamatorio en la pared de las arterias con ateromatosis. Las estatinas disminuyen la inflamación, el poder trombogénico del endotelio disfuncional, el espesor de la íntima y la cuantía de metaloproteinasas —MMP3—. Paralelamente, se reduce la expresión de NF-κB en la placa de ateroma, en los macrófagos y en las células musculares. Esta importante acción antiinflamatoria de las estatinas se debe a la reducción en la formación de derivados isoprenoides que aparecen en la vía metabólica del colesterol. Consecuencia de esto es el descenso del «pool» intracelular de proteínas isopreniladas, lo que conlleva un bloqueo de la activación del NF-κB.

Se ha demostrado que el estímulo colinérgico desarrolla una marcada actividad anticitocinas y, en especial, anti NF-κB. Moléculas proin-

flamatorias como IL-1, TNF, endotoxina, activan vías aferentes vagales que estimulan la secreción de corticotrofina y de cortisol. Junto a este efecto antiinflamatorio central, el vago, mediante su neurotransmisor, la acetilcolina, actuando sobre receptores específicos en los macrófagos activados, inhibe la formación de citocinas y, especialmente, de NF-κB. Estos conocimientos están abriendo un nuevo camino terapéutico en el control de la inflamación y, sobre todo, de la inflamación sistémica. Ya se está utilizando, por su acción antiinflamatoria de la guanilhydrozona tetravalente, el CNI-1493, un potente activador colinérgico, en la sepsis experimental (52). Los resultados son muy esperanzadores. Seguro que en los próximos años existirán protocolos terapéuticos de utilización en la clínica.

CONTROL DE LA PROTEÍNA DE MOVILIDAD RÁPIDA —HMG1—

Poder bloquear la molécula HMG1 dada su gran participación en la inflamación sistémica es del máximo interés. La obtención de un anticuerpo frente al HMGB1 y su administración ha permitido demostrar su gran eficacia terapéutica en el control de la sepsis grave, aunque la infusión de éste se realice pasadas las 24 horas después de iniciado el proceso. Estos logros experimentales están abriendo nuevos e interesantes caminos terapéuticos en la inflamación.

El etilpiruvato, que es una forma estable y lipofílica del piruvato, es antioxidante y barredor de radicales libres, inhibe la producción de citocinas inflamatorias, de NF-κB y de HMGB1. Esta propiedad ha permitido demostrar que la administración, por vía IV, de etilpiruvato tiene eficacia antiinflamatoria, como se ha demostrado experimentalmente en la severa inflamación sistémica de la sepsis y del shock hemorrágico (53).

Terminamos aquí este escrito sobre BASES FARMACOLÓGICAS Y TRATAMIENTO DE LA INFLAMACIÓN. Hemos procurado cumplir con lo expuesto en el COMENTARIO INICIAL. Hemos procurado que quede clara la transcendencia clínica de la inflamación, sus bases farmacológicas y, en especial, su esperanzador futuro terapéutico, pero esto indudablemente elevará los costes del tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Coussens, L.M., Zena W. (2002) Inflammation and cancer. Nature 420: 860-867.

(2) Ramón y Cajal, S. (1924) Investigaciones experimentales sobre la génesis de la inflamación y especialmente sobre la emigración de los leucocitos. 1880. Trabajos escogidos. Publicaciones de la Junta para el Homenaje a Cajal.

(3) Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., *et al*. (1976) An enzime isolated from arteries transform prostaglandin endoperoxide to an instable substance that inhibit platelet agregation. Nature 263: 663-665.

(4) Samuelsson, B. (1972) Biosynthesis of prostaglandins. Fed Proc 31: 1442-1450.

(5) Needleman, P., Isakson, P. (1997) The discovery and function of COX-2. J. Rheumatol. 24: 6-8.

(6) Espinós Pérez, D. (1999) Farmacología de la Inflamación. Discurso inaugural del curso. Real Academia Nacional de Medicina.

(7) Kosaka, T., Miyata, A., Ihara, H., *et al*. (1994) Characterization of the human gene (PTGS-2) enconding prostaglandin-endoperoxide synthase-2. Eur. J. Biochem. 221: 889-897.

(8) Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M.V., *et al*. (1980) Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. Nature 286: 264-265.

(9) Chung, K.F. (1997) Platelet activating factor revisited. Thorax 52: 1019-1020.

(10) Gutiérrez Martín, M.C. (2000) Interleucinas, quimiocinas y otras citocinas que intervienen en la respuesta inmunitaria e inflamación. En: Farreras Rozman. Medicina Interna. 14.ª ed. Vol II. Cap 370. Editorial Harcourt. Pg. 3113-3123.

(11) Kopf, M., Le Gros, G., Coyce, A., *et al*. (1995) Immune responses of IL-4, IL-5, IL-6 deficients mice. Immunol. Rev. 148: 45-69.

(12) Dinarello, C.A. (1991) Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. Blood 77: 1627-1652.

(13) Asher, A., Mule, J.J., Reichert, C.M., *et al*. (1987) Studies on the anti-tumor efficacy of systemically administered recombinant tumor necrosis factor against several murine tumors in vivo. J. Immunol. 138: 963-974.

(14) Nadel, S. (1996) Variation in the tumor necrosis factor-α gene promotor region may be associated with death from meningococcoe disease. J. Infect. Dis. 174: 878-880.

(15) Schleimer, R.P., Sterbinsky, S.A., Kaiser, J., *et al*. (1992) IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. J. Immunol. 148: 1086-1092.

(16) Kay, A.B., Menzies-Gow, A. (2003) Eosinophils and interleukin-5. The debate continues. Am. J. Resp. Crit. Care Med. 167: 1586-1587.

(17) Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, *et al*. (1998) Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. Science 282: 2258-2261.

(18) Keystone, E., Wherry, J., Grint, P. (1998) OL-10 as a therapeutic strategy in the treatment of rheumatoid arthritis. Rheum. Dis. Clin. North Am. 24: 629-639.

(19) Hernández-Presa, M.A., Ortego, M., Tuñón, J., *et al*. (2003) Simvastatin reduces NF-kB activity in peripheral mononuclear and in plaque cells of rabbit atheroma more markedly than lipid lowering diet. Cardiovasc. Res. 57: 168-177.

(20) Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., *et al*. (1999) HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Science 285: 248-251.

(21) Wang, H., Yang, H., Czura, C.J. (2001) HMGB-1 as a late mediator of lethal systemic inflamation. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164: 1768-1773.

(22) Insel, P.A. (1990) Analgesic-antipyretics and antiinflamatory agents. En: Goodman and Gilman's. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8.ª ed. Capítulo 26. Editorial Pergamon Press. Pg. 638-664.

(23) Vane, R.J. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin like drugs. Nat. New Biol. 231: 232-235.

(24) Lizasoaín, I., Leza, J.C., Moro, M.A., *et al*. (1997) Los fármacos en el control de la inflamación. Nuevas perspectivas de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos. En: Inflamación y Enfermedad. Espinós, D., Díaz-Rubio, M. (ed). Editorial Médica Panamericana. Pg. 171-183.

(25) Antiinflamatorios y antirreumáticos no esteroideos. (2002) Catálogo de especialidades farmacéuticas del Consejo General de Colegios Farmacéuticos. Pág. 1594.

(26) Roberts, I.I., Morrow, J.D. (2001) Analgésicos-antipiréticos y antiinflamatorios y fármacos antigotosos. En: Goodman and Gilman's. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10.ª ed. Capítulo 27. Editorial McGraw Hill. Pg. 697-742.

(27) Phillip, T. (2000) Effects of celecoxib, a novel cyclooxigenasa-2 inhibitor on platelets funtori in healthy adults. A randomized controlled trial. J. Clin. Pharmacol. 40: 124.

(28) Lanas, A. (2000) Impacto económico de los efectos secundarios gastrointestinales asociados a antiinflamatorios no esteroideos en el Servicio Nacional de Salud. Med. Clin. 114: 46-53.

(29) Lanas, A., Hirschowitz, B.I. (1993) Antiinflamatorios no esteroideos y lesiones de tubo digestivo. Rev. Esp. Enf. Dig. 5: 326-329.

(30) Hawkey, C.J., Karrasch, J.A., Szczepanski, L., *et al*. (1998) Omeprazol vs Misoprostal for NSAID-induced older managment (OMNIUM). Study group ome-

prazol compared with misoprostal for ulcers associated with non-steroideal anti-inflamatory drugs. N. Eng. J. Med. 338: 727-734.

(31) Chrousos, G.P. (1995) The hypotalmo-pituitary-adrenal axis and inmune mediated inflamation. N. Eng. J. Med. 332: 1351-1362.

(32) Shimmer, B.P., Parker, K.L. (2001) Corticotropina. Esteroides de la corteza suprarrenal y sus análogos sintéticos. En: Goodman and Gilman's. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10.ª ed. Capítulo 60. Editorial McGraw Hill. Pg. 1667-1696.

(33) Undem, B.J., Lichtenstein, L.M. (2001) Fármacos utilizados para el tratamiento del asma. En: Goodman y Gilman's. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10.ª ed. Capítulo 28. Editorial Mc Graw Hill. Pg. 743-764.

(34) Henderson, W.R. Jr., Tang, L.O., Chu, S.J., *et al*. (2002) A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 165: 108-116.

(35) Vaquerizo, M.J., Casan, P., Castillo, J., *et al*. (2003) Efecto de la adición de montelukast a budesonida inhalada en el control del asma leve o moderada Thorax 58: 204-210.

(36) Izquierdo, I., Merlos, M., García-Rafanell, J. (2003) Rupatadina: Un nuevo antagonista selectivo del receptor de la histamina H1 y del factor activador de plaquetas. Drugs Today 39: 451-468.

(37) Vam Assche, G., Dalle, I., Norman, M., *et al*. (2001) The use of humanized antiinterleukin-2 receptor antibodies (zenopax Roche) in refractory ulcerative colitis. Gastroenterology 120: A-279.

(38) Neurath, M.F., Fuss, I., Kalsall, B.L., *et al*. (1995) Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. J. Exp. Med. 182: 1281-1290.

(39) Cohen, S., Hurd, E., Cush, J., *et al*. (2002) Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, as a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate. Arthritis Rheum. 46: 614-624.

(40) Fisher, C.J., Dhainatu, J.F., Opal, S.M., *et al*. (1994) Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. JAMA 271: 1836-1843.

(41) Borish, L.C., Nelson, H.S., Lanz, M.J., *et al*. (1999) Interleukin-4 receptor in moderate atopic asthma. A phase I/II randomized, placebo-controlled trial. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 160: 1816-1823.

(42) Kips, J.C., O'Connor, B.J., Langley, S.J., *et al*. (2003) Effect of SCH55700, a humanized anti-human interleukin-5 antibody, in severe persistent asthma. Pilot study. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 167: 1655-1659.

(43) Van Vollenhoven, R.F., Klareskog, L. (2003) Clinical responses to tumor necrosis factor a antagonists do not show a bimodal distribution. Arthritis Rheum. 48: 1500-1503.

(44) Schuerwegh, A.J., Van Offfel J.F., Stevens, W.J., *et al*. (2003) Influence of therapy with chimeric monoclonal tumour necrosis factor-α antibodies on intracellular cytokine profiles to T lymphocytes and monocytes in rheumatoid arthritis patients. Rheumatology 42: 541-548.

(45) Sandborn, W.J., Targan, S.R. (2002) Biologic therapy of inflammatory bowel disease. Gastroenterology 122: 1592-1608.

(46) Sandborn, W.J., Feagan, B.J., Hanauer, S.B., *et al*. (2001) An engineered human antibody to TNF (CDP571) for active Crohn's disease: a randomized double-blind placebo-controlled trial. Gastroenterology 120: 1330-1338.

(47) Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., *et al*. (2000) Treatment of murine colitis by lactococcus lactis secreting interleukin-10. Science 289: 1352-1355.

(48) Liu, S.F., Ye, X., Malik, A.B. (1999) Inhibition of NF-kB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents in vivo expression of proinflammatory genes. Circulation 100: 1330-1337.

(49) Kang, J.L., Lee, H.W., Lee, H.S., *et al*. (2001) Genistein prevents nuclear factor-Kappa B activation and acute lung injury induced by lipopolysaccharide. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164: 2206-2212.

(50) Wahl, C., Liptay, S., Adler, G., *et al*. (1998) Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. J. Clin. Invest. 101: 1163-1174.

(51) Zingarelli, B., Sheehan, M., Wong, H. (2003) Nuclear factor-kB as a therapeutic target in critical care medicine. Crit. Care Med. 31: S105-S111.

(52) Bernik, T.R., Friedman, S., Ochani, M., *et al*. (2002) Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. J Exp Med 195: 781-788.

(53) Fink, M.P. (2003) Ethyl pyruvate: a novel anti-inflammatory agent. Crit. Care Med. 31: S51-S56.

Nuevas dianas terapéuticas contra el cáncer

EDUARDO DÍAZ RUBIO
Catedrático y Jefe del Servicio de Oncología Médica
Hospital Universitario San Carlos (Madrid)

El progreso que la Oncología Médica ha realizado en los últimos años se ha debido fundamentalmente al campo del desarrollo de fármacos antineoplásicos, especialmente en la esfera de la quimioterapia y la hormonoterapia. Estos fármacos están diseñados para producir una máxima destrucción tumoral, aunque en muchos casos su mecanismo íntimo de acción no se ha conocido sino muy recientemente. Por lo tanto fueron investigados como fármacos antitumorales, en base la mayoría de las veces, a estudios experimentales empíricos y no diseñados *ad hoc*. Pero es que, además, en los últimos años se ha podido demostrar que tales fármacos actúan como poderosos anti-apoptóticos o como inductores del gen p53. Por lo tanto, sin saberlo, se estaban logrando fármacos que tenían potencial no sólo destructor sino además capaces de alterar el fenotipo y el genotipo tumoral.

Hoy se entiende el cáncer como un conjunto de enfermedades con capacidad ilimitada de proliferación y con profundos errores en los mecanismos de división, y específicamente en la entrada y salida en el ciclo celular. Es decir que los fenómenos de señalización (factores de crecimiento, receptores, proteínas citoplasmáticas), división celular (ciclinas, genes supresores), control de apoptosis, etc, están íntimamente implicados en el desarrollo del cáncer. Aún más los tumores una vez establecidos necesitan de una formación de vasos nuevos (neo-angiogénesis) que les asegurarán su supervivencia.

En base a todo ello el tratamiento médico del cáncer del futuro debe asentarse sobre unas bases racionales del conocimiento de la proliferación, diferenciación, y apoptosis, y los fármacos deben ser diseñados de

entrada de acuerdo a su mecanismo de acción y conociendo al detalle las funciones que pueden llegar a controlar **(figuras 1 y 2)**. Serán por tanto

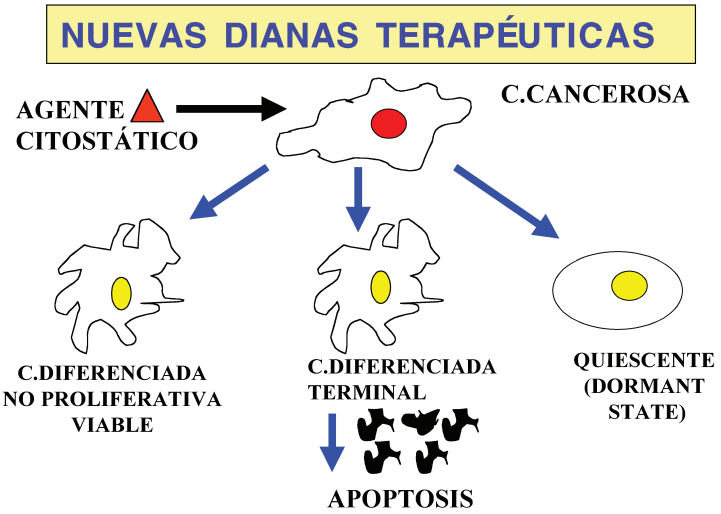


FIGURA 1. *Los nuevos agentes terapéuticos basados en nuevas dianas moleculares o citostáticos, son capaces, al menos en teoría de transformar las células cancerosas en células diferenciadas no proliferativas pero viables, en células diferenciadas terminales que acaban en apoptosis y en células en estado quiescente o dormido.*

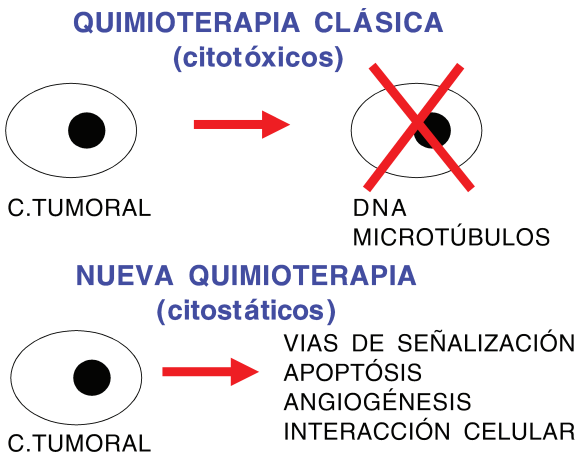


FIGURA 2. *Mientras los citotóxicos tienen como fin último la destrucción de la célula tumoral al producir importantes alteraciones en el ADN o en los microtúbulos; los fármacos citostáticos actúan sobre las vías de señalización intracelular, la inducción de apoptosis, la alteración de la angiogénesis o por interacción celular.*

fundamentalmente inhibidores de señales, ya que el diseño de fármacos activadores es mucho más complicado**.**

A continuación se analizan las más importantes áreas de desarrollo en el campo del tratamiento de los tumores sólidos:

FÁRMACOS FRENTE A LOS RECEPTORES DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICOS (EGFR)

La división y proliferación celulares están controladas por vías de señalización que se inician con la unión de los factores de crecimiento a los receptores correspondientes. En la transformación cancerosa los receptores de los factores de crecimiento de tipo epidérmico juegan un papel de gran relevancia y corresponden a 4 grupos, el ErB-1 o Her1 (EGFR propiamente dicho), el ErbB-2 (Her2-neu), el ErB-3 (Her3) y el ErbB-4(Her4). Los ligandos de estos receptores son el EGF, TGF-α, HB-EGF, AR, epiregulina y VGF para el EGFR; las herregulinas para el Her-3; y NRG2, NRG3, heregulinas y B-celulina para el ErbB-4. El Her-2 es un receptor huérfano. Todos los receptores constan de dominios extracitoplasmáticos ricos en cisteína que tras la unión con los ligandos son dimerizados, e incluso heterodimerizados, y que dan lugar a la fosforilización posterior del dominio catalítico intracitoplasmático rico en tirosina quinasa (TK), iniciándose de esta manera todo el proceso de señalización intracelular (**figura 3**). Estos receptores se encuentran muy comúnmente sobreexpresados e incluso transactivados. Concretamente, el EGFR se encuentra sobreexpresado en el 40-80% de los casos de cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCL), 40-80% de los cánceres de próstata, 33-74% de los gástricos, 14-91% de mama, 25-77% en colon, 30-50% de páncreas y 35-70% de los cánceres de ovario. Los motivos por los que el EGFR puede estar sobreactivado en el los tumores sólidos son variados: sobreexpressión, aumento del ligando, heterodimerización, mutación del receptor, o disminución de fosfatasas. Lo anterior se relaciona con la invasión, metástasis, estadios avanzados de la enfermedad, resistencia a la quimioterapia, y pobre respuesta a la hormonoterapia, etc. Se trata por tanto de un punto crítico de activación que define la posterior proliferación, apoptosis, angiogenésis y, en definitiva, la presencia de metástasis (**figura 4**). Por lo tanto no es de extrañar que dentro de las nuevas dia-

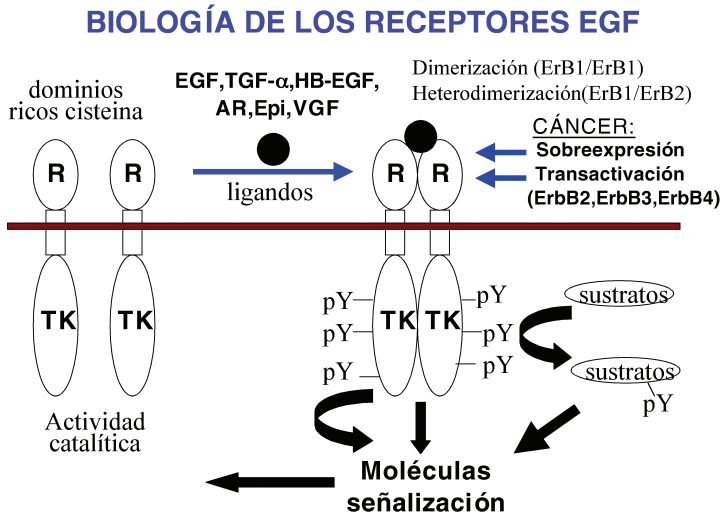


FIGURA 3.

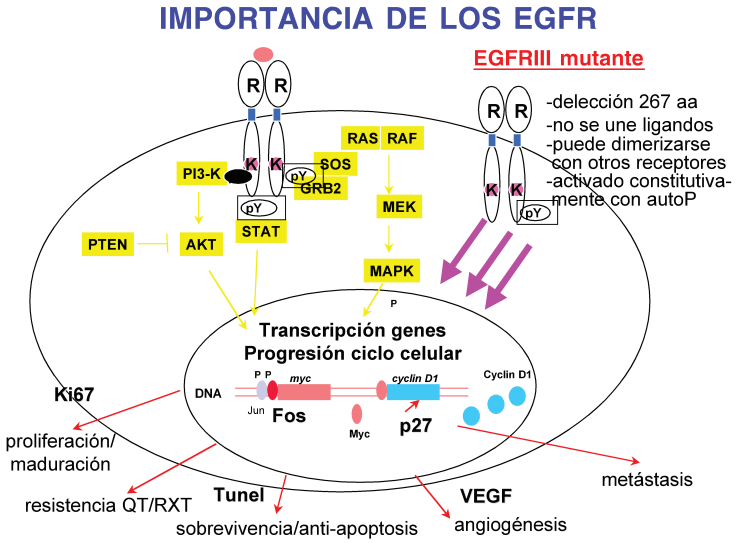


FIGURA 4. *(Modificada de Baselga). La señalización intracelular mediada por los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) implica la participación en cascada de numerosos genes, bien vía RAS y, por tanto, las MAK quinasas, o a través de PI3-K y AKT. De esa manera, se transmite la señal al núcleo donde se produce la transcripción de genes y la progresión en el ciclo celular. En las células cancerosas los EGFR pueden estar mutados y por tanto activados constitutivamente. De esa manera la señal es permanente y se induce proliferación, resistencia a quimioterapia y radioterapia, fenómenos anti-apoptóticos, angiogenésis y los fenómenos de invasión y metástasis.*

nas terapéuticas un gran foco de atención han sido dichos receptores. Teóricamente pueden desarrollarse anticuerpos monoclonales que impidan la unión de los factores de crecimiento con los receptores correspondientes, inhibidores específicos de tirosina quinasas, conjugados de toxinas e incluso moléculas antisentido **(figura 5).**

El éxito de los anticuerpos monoclonales ya ha quedado demostrado con el desarrollo del Trastuzumab, un anticuerpo monoclonal dirigido frente a una proteína de 185 kDa que actúa como receptor transmembrana de tirosina quinasa, el receptor Her-2 (c-erbB-2 neu). Los anticuerpos dirigidos contra esta proteína han demostrado inhibir el crecimiento de tumores xenógrafos y de las células de cáncer de mama transformadas que sobreexpresan Her-2. Específicamente los anticuerpos murinos (MAB) 4D5 dirigidos contra el dominio extracelular son un potente inhibidor de células de cáncer de mama humanas que sobreexpresan Her-2. El anticuerpo murino ha sido humanizado insertando regiones de complementariedad en una IgG, con la idea de hacerlo menos inmunogénico. El nombre de este anticuerpo MAB humanizado es trastuzumab y ha sido comercializado para su utilización en los casos de cáncer de mama que sobreexpresan dicho receptor. Una sobreexpresión de la proteína HER-2

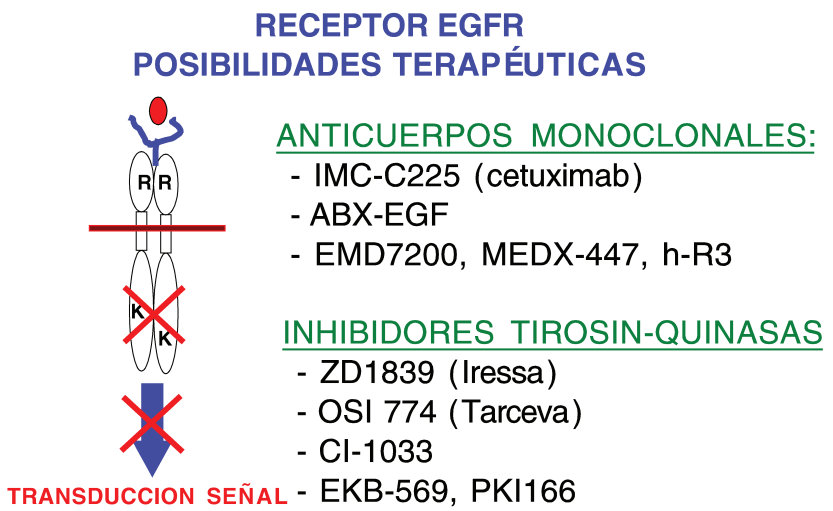


FIGURA 5. *Las posibilidades terapéuticas orientadas a bloquear la señal por la vía de los EGFR se puede realizar con anticuerpos monoclonales, inhibidores de tirosina quinasas y oligonucleótidos antisentido.*

ha sido señalada en aproximadamente el 30% de los cánceres de mama invasivos y de ellos el 90% presentaban amplificación del gen. La función exacta de la porción extracelular del receptor no es bien conocida, pero se especula con su papel como estimulante de la proliferación celular o los mecanismos de motilidad. Además diversos estudios han demostrado el papel pronóstico de la expresión del gen Her-2, de modo que su sobreexpresión se asocia con un peor pronóstico y se correlaciona con otros factores pronóstico adversos, como la negatividad de los receptores de estrógeno, la alta fracción de la fase S, ganglios axilares positivos, mutaciones de p53 y grado nuclear alto. En resumen la sobreexpresión de Her-2 se presenta como un factor pronóstico de mayor importancia en la decisión del tratamiento adyuvante, y la utilización terapéutica del Herceptin tiene una indicación formal en la enfermedad avanzada en pacientes que sobreexpresen Her-2, teniendo su máxima actividad cuando se combina con taxanos, si bien el régimen idóneo está por establecer. Para un futuro será, además, prioritario establecer su eficacia en los tratamientos de adyuvancia.

Otro ejemplo de alto interés es lo que está ocurriendo con el cáncer colorrectal. En este tumor las posibilidades de las nuevas dianas terapéuticas se han centrado en el EGFR bien mediante el desarrollo de anticuerpos monoclonales (AM) o con inhibidores de la TK. De entre los AM destacan el IMC-C225 o cetuximab, el ABX-EGF, EMD7200, MEDX-447, h-R3 etc. El más desarrollado es el anticuerpo quimérico IMC-225 (cetuximab), que ha mostrado en tumores xenógrafos humanos de células cancerosas epidermoides, sinergismo con la radioterapia y la quimioterapia. Los estudios en fase I han mostrado su extraordinaria tolerancia, lo que ha dado lugar a estudios fase II y III. El estudio en fase II de Saltz (ASCO 2001) se desarrolló sobre 121 pacientes que presentaban positividad por inmunohistoquímica para el EGFR (80% de los casos) y eran refractarios a CPT-11 y 5-FU. En este estudio se utilizó una dosis de carga (para saturar el receptor) de 400 mg/m^2 de cetuximab seguido de 250 mg/m^2 a la semana, combinado con CPT-11 a la misma dosis y esquema que el paciente venía recibiendo. En este ensayo, el porcentaje de respuesta de esta segunda línea fue del 17%, con un 31% de estabilizaciones. Las reacciones adversas más llamativas fueron reacciones alérgicas (G4:1%), rash tipo acné (G3:8%), diarreas (G3-4: 22%) y neutropenia (G3-4: 14%). Curiosamente, los pacientes que respondieron

presentaron más rash cutáneo que los que no lo hicieron, sugiriendo que dicha toxicidad puede ser un marcador biológico de actividad. Más recientemente, en el ASCO 2002, el propio Saltz presentó los resultados de segunda línea con cetuximab en monoterapia, tras fallo al CPT-11 con un 11% de actividad. En este situación, adquiere una gran relevancia el denominado estudio BOND, que sobre 577 pacientes (en fallo a CPT-11) compara la asociación cetuximab + CPT-11 (combinación) vs cetuximab sólo (monoterapia). Los resultados de este estudio (que está finalizado) han sido presentados en el ASCO 2003 (Cunningham). El 82% de los pacientes estudiados presentaban positividad para el EGFR. Una respuesta parcial fue obtenida en el 23% de los casos con la combinación y en el 11% con la monoterapia, con un control de la enfermedad (sin progresión) en el 55% y 32% de los pacientes, respectivamente. En cuanto al tiempo de la progresión fue de 4.1 meses y 1.5 meses y la supervivencia global de 8.6 meses y 6.9 meses. El fármaco fue muy bien tolerado y la mayoría de las reacciones adversas aparecidas en la rama de combinación estaban asociadas a la administración conjunta del CPT-11. Pueden considerarse reacciones adversas específicas del cetuximab el acné tipo rash que apareció en modo G3/G4 en el 9.4% de los pacientes en el estudio de combinación y en el 5.2% en el de monoterapia y las reacciones de hipersensibilidad que aparecieron en el 0.9%. En definitiva, que cetuximab en segunda línea de tratamiento ofrece una actividad clínica significativa con un perfil de tolerancia muy adecuado. Estos datos van a ser sometidos a las agencias reguladoras como la FDA y la EMEA en los próximos meses.

En primera línea de quimioterapia existen algunos datos de estudios en fase II que tienen interés. En uno de ellos se utiliza la combinación ILF + Cetuximab (Saltz, ASCO 2002) con un 44% de respuestas, y en otro el esquema de 5-FU en infusión continua tipo AIO + CPT-11 y Cetuximab (Shoffski ASCO 2002) con un 67% de respuestas. Obviamente, es necesario realizar estudios de primera línea de fase III para establecer la actividad definitiva de este interesantísimo fármaco, que con toda seguridad formará parte en un principio de la segunda línea del cáncer colorrectal al fallar el CPT-11.

Sin duda, en el futuro se hace necesario establecer posibles marcadores biológicos que establezcan que el efecto biológico deseado se está

consiguiendo. La **tabla I** muestra los posibles marcadores biológicos y el proceso celular en el que intervienen.

En cuanto a los inhibidores específicos de la tirosina quinasa los hay de tipos: reversibles (quinazolinas), como el ZD1839 (Zeneca) y el OSI 358,774 (Roche), e irreversibles, como el CI-1033 (pan-erb inhibitor) y el EKB 569 (erb1 y erb2). Las quinazolinas son administradas por vía oral y ejercen una inhibición selectiva de los receptores del EGFR a nivel de la porción catalítica intracitoplasmática. Todo lo anterior produce una acumulación de p27/Kip1 y de la proteina Rb hipofosforilada con la consiguiente parada del ciclo celular en G1. El Iressa (ZD1839) es, sin duda, el inhibidor más desarrollado. Su toxicidad es limitada (rash cutáneo, y escasas diarreas) y presenta una actividad prometedora en el cáncer de pulmón, tumor en el que ha sido más investigado.

Los estudios en fase II en cáncer de pulmón tras fallo a tratamiento previo y que han evaluado la eficacia del Iressa se denominan IDEAL-1 e IDEAL-2. Ambos estudios se llevaron a cabo en 2.ª, 3.ª e incluso 4.ª línea de tratamiento en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico. Estos estudios eran de tipo fase II y comparaban dos niveles de dosis de Iressa: 250 mg/día frente a 500 mg/día. En el primer caso (estudio Europeo y Japonés) los pacientes habían recibido previamente platino, y en el

Posibles marcadores: agentes con diana EGFR
EFECTO DE LA PRUEBA BIOLÓGICA

MARCADOR	PROCESO CELULAR
Citoqueratina	Maduración
Ki67	Proliferación
p27KIP1/p21Cip/waf1	Progresión ciclo celular
CDKs	Progresión ciclo celular
Factor VIII	Angiogénesis
DNA fragmentado	Apoptósis
STAT-3	Señalización
P-AKT	Señalización
MAPK	Señalización
p-EGFR	Señalización
p-ERK	Señalización
c-fos	Señalización

TABLA I. *Posibles marcadores biológicos que pueden, al menos teóricamente, ser utilizados como efecto de la prueba biológica de fármacos con diana EGFR.*

segundo estudio (USA) platino y docetaxel. Para el IDEAL I, el porcentaje de respuestas fue para las dosis de 250 y 500 respectivamente del 18.4% y 19%, llegando al 54% y 51.4% si se incluían las estabilizaciones. La tolerancia fue excelente, pues tan sólo el 3% de los pacientes abandonaron el tratamiento. El rash de tipo G1-2 se presentó en el 45% de los casos y el de tipo G3/4 tan sólo en el 1%. Las diarreas G1/2 aparecían en el 40% y las G3/4 en el 0%. En el estudio IDEAL-2, los porcentajes de respuesta (RR y RR+EE) según los niveles de dosis (250 y 500 mg/día) rondaron el 11.8%-8.8%, y 42%-36%, respectivamente. Estos datos demostraron el alto interés del Iressa en pacientes en los que han fracasado otros tratamientos, siendo similar la actividad de 250 o 500 mg/día. Por otro lado, la mejoría sintomática de los pacientes fue muy llamativa y los efectos secundarios muy tolerables. En base a estos datos, en septiembre de 2002 la FDA aprobó su comercialización. Sin embargo, los estudios posteriores con Iressa, en los que se utilizó como primera línea de tratamiento combinado con quimioterapia (estudios INTACT-1 e INTACT-2) fueron negativos. En el INTACT-1, los pacientes fueron randomizados a recibir como primera línea de tratamiento Gemcitabina+Taxol+Iressa frente a Gemcitabina+Taxol, y en el INTACT-2 Carboplatino+Taxol+Iressa frente a Carboplatino+Taxol. No se encontró ventaja adicional en la supervivencia ni en otros criterios de valoración. Los motivos de este fracaso hay que buscarlos en que posiblemente el Iressa y la quimioterapia actúen sobre la misma población celular, por lo que la respuesta a la quimioterapia enmascararía la respuesta al Iressa, o bien que la quimioterapia afecta, directa o indirectamente, a la función y expresión del EGFR, lo que reduce o suprime los efectos del Iressa. Por el momento, por tanto, el Iressa se presenta como una buena segunda o tercera línea de tratamiento, pero siempre administrado de forma exclusiva sin asociarlo a la quimioterapia.

Otros inhibidores de tirosina quinasa, como el OSI 358,774 o Tarceva, se está explorando, solos o combinados, con los nuevos fármacos.

El ejemplo del STI: El desarrollo del fármaco STI571 (Glivec-Imanitib) es el paradigma para el desarrollo clínico de fármacos basados en las nuevas dianas moleculares. El STI571 fue diseñado como un inhibidor del receptor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF-R, y pronto se observó que, además, es un potente inhibidor de todas las quinasas ABL, incluidas p210Bcr-

Abl, p185Bcr-Abl, c-Abl y tirosina quinasa c-kit. Los primeros resultados han sido demostrados en leucemia mieloide crónica (LMC). El motivo es que en LMC existe una translocación del gen ABL (9q34) del cromosoma 9 al cromosoma 22, y también del gen BCR (22q11) del cromosoma 22 al 9. Esta translación recíproca determina la fusión de BCR y ABL y da lugar a una proteína tirosina quinasa quimérica P210 cuya función es inhibida por el STI571. Los resultados en la LMC han sido espectaculares, de modo que tras el fallo del interferón-alfa se produce el 96% de respuestas completas, de las cuales el 33% son de tipo citogenético. Incluso en las crisis blásticas es posible obtener un 39% de respuestas completas. Obviamente, se precisa tiempo para conocer la verdadera dimensión de estas respuestas en lo que se refiere a la duración. Pero, además, de la LMC el STI571 puede tener interés en muchos otros tumores que sobreexpresen PDGF o c-kit, como el cáncer de pulmón microcítico, el cáncer de próstata, sarcomas, gliomas, neuroblastomas, y tumores de células germinales. Concretamente los resultados presentados en la última reunión de ASCO en San Francisco en la primavera de 2001 son altamente interesantes. Los pacientes con tumores estromales gastrointestinales que expresaban el oncogen c-kit en el 100% fueron sometidos en dos estudios (uno denominado internacional y otro de la EORTC) al tratamiento con STI571. En el estudio internacional se encontró una respuesta parcial en el 54% (19/34), con una estabilización en el 34% (12/34); y en el estudio de la EORTC se produjo una respuesta parcial en el 26% de RP (4/15), y estabilización en el 53% (8/15) de los pacientes.

En suma, que el STI571 ha puesto de manifiesto que el desarrollo de fármacos a través de las nuevas dianas moleculares no sólo es posible sino efectivo, y abre la puerta a otras muchas posibilidades.

TRATAMIENTO FRENTE AL ONCOGEN RAS

Los genes ras (H,K,N) están mutados en nada menos que el 30% de los tumores humanos y actúan como puntos clave en la transmisión de señalización intracelular como verdaderos interruptores. Así se pasa de una forma inactiva (off) en la que tiene un GDP fijado a otra activa (on) que tiene GTP. El proceso de activación está regulado por los factores GEFs (GDP/GTP exchange factors) y el de inactivación por los GAP (GTPase activating protein). En muchos modelos experimentales se pro-

duce una eliminación de la actividad GTPásica, y así permanece continuamente activa la proteína Ras. Un hecho fundamental es que Ras, al igual que otras proteínas, para anclarse a la membrana debe isoprenilarse, lo que se lleva a cabo a través de ciertas enzimas que le añaden un grupo farnesilo o un grupo geranil-geranilo. La farnesilación corre a cargo de la enzima farnesil-transferasa, por lo que su inhibición podría acarrear la inactivación de Ras (**figura 6**). Para ello se están utilizando péptidos miméticos que tanto en el oncorratón como en tumores humanos transplantados han mostrado una gran eficacia**.**

Entre los inhibidores de la farnesil transferasa en fase de desarrollo clínico destacan los fármacos de Janssen-Cilag (R115777), el de Bristol-Myers Squibb (BMS214662) y el de Schering-Plough (SCH 66336). En el momento actual, se están llevando a cabo estudios fase I, fase II e incluso fase III. Concretamente con el R115777 existe un estudio randomizado en pacientes con cáncer colorrectal avanzado que tras una o dos líneas de tratamiento quimioterápico los pacientes son randomizados a recibir dicho fármaco o tan sólo tratamiento de soporte. En el estudio se

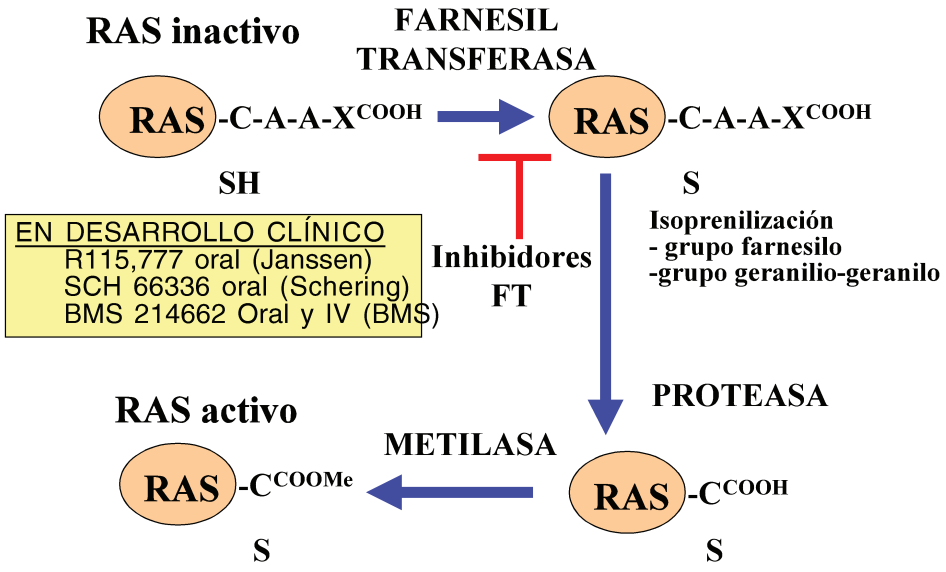


FIGURA 6. *Los fármacos utilizados para bloquear la vía RAS actúan principalmente inhibiendo la farnesil-transferasa, enzima que a través de un fenómeno de isoprenilización ancla la proteína RAS a la membrana, lo que es necesario para transmitir la señalización intracelular.*

han incluido 345 pacientes y los resultados están pendientes. El objetivo primario es la supervivencia global y los secundarios la calidad de vida, el tiempo de progresión y la respuesta objetiva.

LAS QUINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS COMO DIANA DEL TRATAMIENTO

En la biología moderna es posible decir que el cáncer es la consecuencia de alteraciones en los procesos de señalización, que en definitiva generan el control del crecimiento celular. En este aspecto es de suma importancia el ciclo celular, proceso que permite finalmente a la célula dividirse y donde intervienen decisivamente tanto señales de actividad positiva como son las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y sus subunidades reguladoras, las ciclinas, como proteínas inhibidoras de las anteriores CDKs (familias INK y CIP7KIP) **(figura 7, figura 8)**.

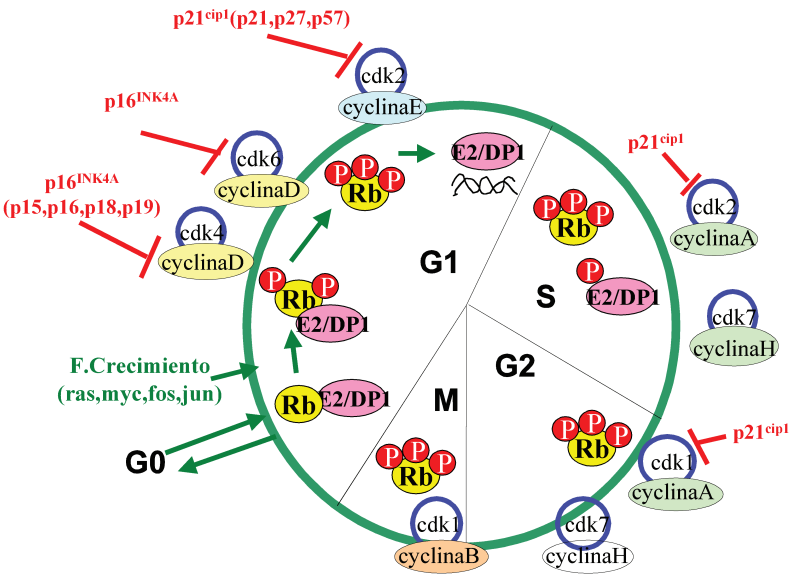


FIGURA 7. *La entrada en el ciclo celular es compleja y se inicia con la fosforilación de la proteína retinoblastoma, lo que permite liberar al factor de transcripción E2/DP1. Este fenómeno se encuentra catalizado por la acción de la ciclina D, que a su vez necesita acoplarse a la quinasa dependiente de ciclina CDK4/6. Este complejo ciclina D/CDK4/6, se encuentra regulado por genes supresores del grupo p16INK4A y p21cip1. Posteriormente entran en acción en el resto del ciclo celular las ciclinas E, A y B.*

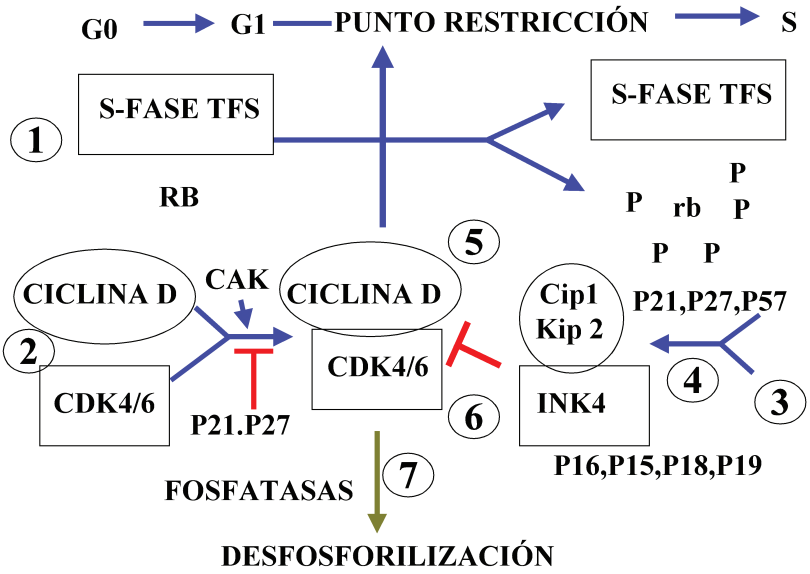


FIGURA 8. *Puntos críticos en la entrada en el ciclo celular (numerados de 1 a 7) donde al menos, en teoría, se pueden desarrollar agentes con objetivos enormemente específicos.*

Los fármacos que actúan sobre el ciclo celular se han dividido en dos grandes grupos: 1) moduladores directos que inhiben la función catalítica de las CDK adecuadamente activadas, y 2) moduladores indirectos que alteran el estado activado de las CDK. Entre los moduladores directos se incluyen los siguientes subgrupos: 1) purinas y análogos de las purinas (6 dimetilaminopurina, isopenteniladenina, olomucina y roscoviotina), 2) productos sintéticos naturales (butirolactona, flavopiridol, saturospina, UCN-10, 9 hidroxi-elipticina, toyocamicina y suramina), 3) productos miméticos (p16, p21). A su vez, entre los moduladores indirectos cabe destacar los siguientes: 1) los que actúan reduciendo los niveles de ciclina D (rapamicina, ansamicinas benzoquinoides, tirfostinas, inhibidores metabólicos), 2) los que aumentan los inhibidores endógenos de CDK (butiratos, retinoides, y otros agentes diferenciadores), y 3) los que alteran los puntos de control (checkpoints): inhibidores de fosfatasas (ácido okadáico), UCN-01 y la misma cafeína. Muchos de ellos se encuentran en fase I y fase II, siendo muy pocos los que están evaluándose en fase III.

ONCOGEN SUPRESOR DE TUMORES p53

El P53 es el guardián del genoma celular, y como gen supresor controla la división celular. Cuando el p53 está activo detecta la aparición de daño celular y para la división de ésta para que se lleven a cabo los reglajes necesarios. De ser los daños sumamente intensos, la célula gobernada por p53 entra en apoptósis. Ya se comprende que la pérdida de su función acarrea errores demasiado grandes y por tanto está directamente involucrado en el desarrollo de los tumores.

La introducción del p53 en las células con mutación del gen, mediante procedimientos de terapia génica es una posibilidad que está siendo analizada. Por el momento los estudios se limitan a tumores con crecimiento locorregional, y la única conclusión válida es que se trata de una excelente vía de experimentación, sin que los estudios en fase I y II hayan mostrado una mayor relevancia.

FÁRMACOS ANTIANGIOGÉNICOS

Una de las áreas más excitantes de desarrollo terapéutico se refiere a los inhibidores de la angiogénesis tumoral así como inhibidores de varios receptores de factores de crecimiento. En la angiogénesis maligna existen varios componentes que incluyen la destrucción local, la retracción de células endoteliales, mitosis células endoteliales, la migración de células endoteliales, las interacciones matriz-células, la estructura tridimensional, etc. Esta angiogénesis está regulada por el balance entre los denominados factores de crecimiento endoteliales y los inhibidores endógenos de la angiogénesis. Los factores de crecimiento endoteliales son: 1) el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), 2) el receptor VEGF-1 (flt-1), 3) el receptor VGEF-2 (KDR) y 4) las angiopoyetinas: angiopyetina-1, receptor angiopoyetina-1. En cuanto a los Factores inhibidores endógenos de la angiogénesis los más destacados son: 1) la trombospondina-1, 2) la angiostatina, 3) la endostatina, 4) la vasostatina y 5) el interferón alfa2a y 2b.

Los principios básicos de este enfoque terapéutico son que los tumores mayores de 2 mm precisan la formación de nuevos vasos, que las células endoteliales de los vasos tumorales son diferentes de las de los va-

sos normales, y que los fármacos antiangiogénicos inducen la aparición de células dormidas y disminuyen el tamaño de los tumores.

El desarrollo de estos fármacos no ha hecho sino empezar, si bien los estudios realizados en modelos animales son altamente esperanzadores, habrá que esperar a los resultados de los ensayos clínicos para conocer su verdadera eficacia y su mejor indicación que quizás podría ser en el tratamiento adyuvante y no tanto en la enfermedad avanzada.

Los fármacos antiangiogénicos pueden ser de varios tipos: 1) fármacos frente a los factores angiogénicos, 2) fármacos inductores de inhibidores endógenos de la angiogénesis (IEA), y 3) terapia génica con los IEA. En la angiogénesis tumoral hay varios pasos decisivos que pueden ser utilizados para el desarrollo de fármacos antineoplásicos. Los factores de crecimiento de tipo angiogénico, como el factor fibroblástico (FGF), el de transformación (TGF-() y el vascular endotelial (VEGF), actúan como ligandos de los receptores de estos factores de crecimiento lo que da lugar a la fosforilación de los residuos intracitoplasmáticos de tirosina quinasa (actividad catalítica) iniciándose el proceso de señalización intracelular. Los receptores deben dimerizarse para su activación, y un hecho importante es que en los tumores existe sobreexpresión y transactivación de los mismos. Finalmente la angiogénesis requiere la rotura de la matriz extracelular por colagenasas, fibronectina, laminina y glicoproteínas de membrana. La participación de las metaloproteinasas (constituida por enzimas degradativas) es esencial y en su producción colaboran estrechamente con las células tumorales, células estromales y endoteliales.

De los más de 20 fármacos antiangiogénicos actualmente en estudio quizás el más interesante es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido frente al VEGF (Bevacizumab o Avastin). Terminada la fase I actualmente se ha completado la fase II y parte de la fase III. Los resultados de un estudio randomizado comparando 5-FU/LV con 5-FU/LV más el anti-VEGF han sido publicados recientemente (JCO 2003). En este estudio se compara el regimen de 5-FU+LV (Roswell Park) utilizado sólo o combinado con dos dosis del anti-VEGF (5 y 10 mg/kg durante 2 semanas). Los resultados demuestran que la dosis más baja induce una mayor tasa de respuestas (40% vs 17%) que el 5-FU+LV solo (p=0.03), mayor tiempo a la progresión (9 meses vs 5.2, p=0.005) y mayor supervivencia (17,3 m vs

13.8, p=ns). En cuanto a la toxicidad el efecto más llamativo fue la aparición de trombosis.

Más recientemente en ASCO del 2003 se han presentado los resultados de un estudio fase III randomizado comparando la asociación de Bevacizumab con IFL (irinotecán, 5-fluorouracilo y leucovorin) frente a IFL+placebo como primera línea de tratamiento en pacientes con cáncer colorrectal avanzado. El estudio es muy sólido con más de 800 pacientes incluidos. El índice de respuesta fue del 45% frente al 35% (p=0.002), la duración de la respuesta de 10.4 meses frente a 7.1 meses (p=0.001) y la supervivencia media de 20.3 meses frente a 15.6 meses (p=0.00003). El efecto secundario más llamativo asociado al Bevacizumab fue la hipertensión grado 3 que apareció en el 11% de los casos. Este estudio de gran trascendencia muestra el papel que pueden jugar los fármacos antiangiogénicos asociados a la quimioterapia. Como muestra sirva que Avastin ha sido sometido a aprobación por la FDA por el procedimiento de urgencia.

En cuanto a los inhibidores de tirosina quinasa del VEGF, el más sobresaliente es el SU5416 que al bloquear la fosforilación de la parte catalítica del receptor bloquea la señal de trasducción. Terminada la fase I y II están planificados los ensayos fase III en combinación con Irinotecán.

Por último, es preciso decir que además de los fármacos diseñados a propósito con el fin antiangiogénico, existen otros que pueden también tener esta propiedad como son los inhibidores de señales de transducción (Ras) y las propias hormonas.

En definitiva, que la biología molecular ha abierto unas puertas impensables hasta hace bien poco, que permitirán en primer lugar un mejor conocimiento del proceso tumoral, en segundo lugar llevar a cabo análisis de mutaciones hereditarias que impliquen el oportuno consejo genético, tercero un diagnóstico más ajustado desde un punto de vista patológico y molecular que nos ayudará a conocer con más detalles los factores pronóstico de la enfermedad y los factores predictivos individuales del paciente, y por último un enorme desarrollo terapéutico con aproximaciones a fármacos con mecanismo de acción y objetivos diferentes que obligan a un desarrollo clínico singular. Por lo tanto, en lo que aquí concierne a esta revisión, el desarrollo de nuevos fármacos y la aplicación individualizada a cada paciente son los retos establecidos. El camino está abierto a todas estas posibilidades y es hora de ponerse en marcha.

NUEVOS CONCEPTOS EN LOS ENSAYOS CLÍNICOS

Es importante recalcar que los nuevos fármacos tienen como objetivo fundamental el control de la división o la proliferación celulares y que en principio no están destinados (posteriormente podrían serlo) a destruir las células tumorales. Por lo tanto los parámetros de eficacia antitumoral deben ser revisados con estos fármacos y en su virtud los ensayos clínicos que se realicen deben ir dirigidos a obtener la eficacia buscada, lo que implica que la investigación clínica pueda ser de naturaleza y fondo diferente. No debe olvidarse que los citostáticos probablemente deban ser administrados de forma crónica, es decir quizás durante gran parte de la vida de un paciente, y que por ello su perfil de toxicidad debe ajustarse para que esta situación de administración crónica sea posible. Estos fármacos en definitiva son considerados como citostáticos y no como citotóxicos, ya que sus bases son la existencia de moléculas específicas (proteínas) que son responsables de la iniciación y progresión del crecimiento de los tumores y, por tanto, que la inhibición de la actividad anormal del producto de un gen o la restauración de su función normal, podría ser un tratamiento efectivo contra el cáncer. En suma, los citostáticos son fármacos dirigidos frente a una diana molecular que actúa en una vía específica de los procesos biológicos moleculares: señalización, medio ambiente tumoral e interacciones celulares.

Un hecho que no debe olvidarse es que los fármacos citostáticos son seleccionados de manera diferente a los citotóxicos, ya que mientras los segundos se basan en el *screening* de líneas celulares, en los primeros la base radica en la definición y análisis de las dianas terapéuticas previamente establecidas, ya sea en la regulación de la división celular, la inmunoestimulación, o la interacción entre las células tumorales y el microambiente **(figuras 9 y 10)**. Esa preclínica basada en dianas moleculares tiene sus ventajas, como: 1) la posibilidad de realizar un gran volumen de estudio de fármacos, 2) existencia de bases racionales para el desarrollo farmacológico, 3) agentes activos en puntos críticos y 4) actividad antitumoral selectiva. Pero, a la vez, lo anterior presenta ciertas desventajas como son las derivadas de ser una tecnología muy reciente y por tanto poco asentada con muchos puntos aun conflictivos, y la no existencia de garantías respectos a que los fármacos diseñados entren de manera consistente en el interior de la célula (a veces no será preciso), la

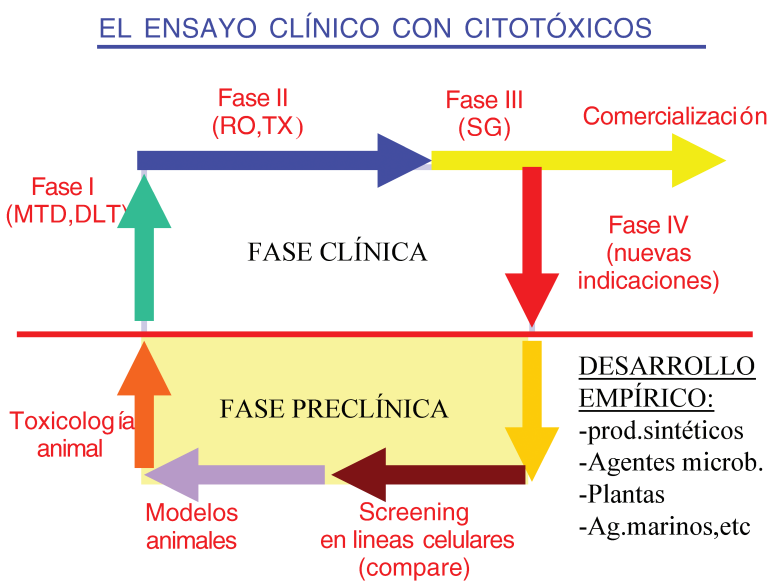


FIGURA 9. *El ensayo clínico con citotóxicos. Su desarrollo es empírico y está basado en productos de origen sintético, provenientes de agentes microbianos, de plantas y de agentes marinos. El screening en la fase preclínica se realiza en líneas celulares con un sistema computarizado denominado compare. Posteriormente, se pasa a los modelos animales donde se analiza la actividad antitumoral y la toxicología animal. Finalmente se pasa al desarrollo clínico. En la fase clínica, los objetivos de la fase I son el conocimiento de la máxima dosis tolerable (MTD) y la toxicidad limitante de dosis (DLT). En el fase II el objetivo es conocer el porcentaje de respuestas y ampliar datos de toxicidad. Finalmente, la fase III establece la verdadera eficacia al analizar la supervivencia comparándola con respecto al tratamiento considerado como estándar.*

resistencia al medio intracelular, y su selectividad. Además no debe olvidarse que raramente existe una sola diana responsable del desarrollo y progresión de los tumores y que habitualmente hay varias que están involucradas (receptores de tirosina quinasas, Ras, apoptosis, transcripción, etc), por lo que quizás sea necesario utilizar varios agentes para conseguir la esperada regulación tumoral y ello implica la obligatoriedad de realizar numerosos ensayos clínicos y sin duda incluir un importante número de pacientes, y en definitiva una gran inversión económica. En este punto conviene recalcar que si la inversión económica realizada por la industria farmacéutica ha sido en el pasado muy relevante, en el futuro tendrá que implementarse con creces para poder desarrollar con garantías estas nuevas moléculas. Por otro lado, será preciso un renovado esfuerzo de los oncólogos médicos que deberán dar respuesta a la deman-

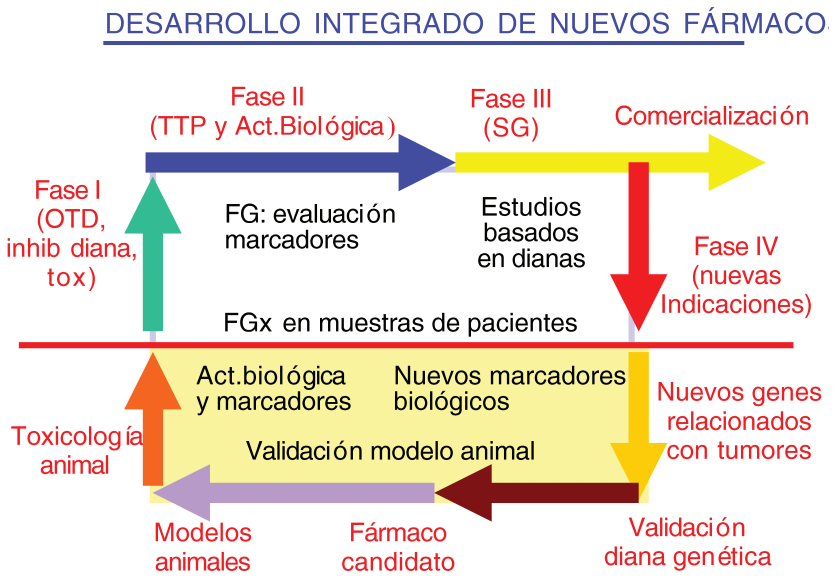


FIGURA 10. *Desarrollo de fármacos citostáticos (nuevas dianas moleculares). Los fármacos son desarrollados en base a las vías moleculares en la que se encuentran involucrados los genes y sus proteínas. Debe establecerse una validación de la diana genética y sólo en ese momento se debería pasar al modelo animal. Son, por tanto, fármacos de diseño basados en los conocimientos moleculares del cáncer. En la fase clínica el objetivo de la fase I es establecer la dosis terapéutica óptima (aquélla que tiene actividad biológica), por lo que es necesario realizar estudios farmacogenómicos en muestras de tejidos para conocer si efectivamente se está consiguiendo la inhibición de la diana. Además la fase I servirá para conocer el perfil de toxicidad. En la fase II los objetivos son determinar la actividad biológica y el tiempo a la progresión, ya que estos fármacos no tienen como meta las respuestas clínicas. Finalmente, los estudios en fase III determinarán el beneficio en la supervivencia.*

da existente. Lo anterior implica dar entrada a un mayor número de investigadores y en general a un reciclaje de todos para estar preparadas para esta nueva investigación clínica.

Para una correcta valoración de la eficacia de estos nuevos fármacos (citostáticos) sería deseable tener parámetros que midieran tanto el principio de la prueba (inhibición de la diana) como la eficacia clínica en el paciente. La inhibición de la diana probablemente precisará de la necesidad de disponer de muestras de tejidos suficiente, y quizás de realizar biopsias múltiples. Esta inhibición de la diana puede en teoría llevarse a cabo a través de la utilización de marcadores, de la expresión de proteínas, de la expresión de receptores y del estudio de la apoptosis. En cuanto a la medida de la eficacia clínica en el paciente será preciso redefinir

claramente parámetros como el tiempo a la progresión y la estabilización de la enfermedad, además de utilizar los clásicos de supervivencia global y calidad de vida.

Estudios fase I: El objetivo principal de los estudios fase I es conocer la dosis recomendada para los estudios fases II y III. En los estudios fase I con fármacos clásicos (citotóxicos) el objetivo fundamental radica en establecer la máxima dosis tolerable (MTD) y la toxicidad limitante de dosis (TLD), lo que es absolutamente prioritario ya que con estos fármacos la máxima actividad terapéutica se alcanza con las dosis cercanas a la MTD. Existe por tanto una clara curva de relación dosis/respuesta. En cambio en los fármacos citostáticos el objetivo es establecer la dosis terapéutica óptima con la menor toxicidad (OTD) teniendo presente que serán administrados de forma crónica. Por otro lado, no es un objetivo establecer una relación dosis/respuesta cuya curva pueda ser menos pronunciada y la escalada de dosis establecida de manera más rápida. Un dato de suma importancia es poder conocer la relación existente entre la MTD y la OTD, y por tanto conocer la relación entre la eficacia biológica y la MTD, ya que probablemente pueda conseguirse la actividad deseada sin necesidad de establecer la MTD. En realidad la mayoría de los citostáticos no precisan ser tóxicos. De ello se desprende, aunque no sea fácil, la importancia de incorporar en los estudios fase I un objetivo de eficacia biológica. El uso de estos objetivos biológicos debe estar basado en los ensayos preclínicos y quizás requiera una muestra de tejido, si bien el punto crítico es que la hipótesis de principio puede no cumplirse, al estar implicados diversos mecanismos en el control de un tumor que se encuentra en fase avanzada y que pueden ser diferentes de los establecidos en los modelos iniciales más conocidos, además de la variabilidad biológica individual. Para conocer con detalle la toxicidad que defina la dosis es posible que se precisen muestras sanguíneas adicionales para realizar determinaciones enzimáticas e incluso estudios de farmacocinética que quizás nos ayuden (especialmente en fármacos orales) a conocer la saturación de la absorción para evitar administrar dosis innecesarias. Finalmente, es preciso añadir que los estudios fase I no permitirán conocer las posibles reacciones adversas que estos fármacos pudieran producir durante tratamientos crónicas.

Estudios fase II: Con los agentes citotóxicos clásicos los estudios fase II pretenden determinar la eficacia antitumoral midiendo las res-

puestas obtenidas en varios ciclos de quimioterapia y deben permitir además añadir datos de toxicidad. Habitualmente estos estudios fase II se realizan separadamente en los diversos procesos tumorales, y no suelen precisar de muchos pacientes. Sin embargo, en el caso de los citostáticos, ya hemos comentado que la respuesta tumoral no es en general el objetivo principal, y por lo tanto algunos autores se preguntan si no convendría pasar de la fase I a la fase III de manera directa. Este desarrollo rápido tendría numerosas ventajas pero también algunos inconvenientes. Efectivamente, los estudios fase II permiten limitar el número de fármacos que pasan a una fase III y, por tanto, seleccionarlos. Lo contrario obligaría a inversiones muy costosas (los estudios fase III precisan claramente más pacientes), además de someter a muchos pacientes a tratamientos que pueden tener toxicidad y carecer de actividad. Por último, los estudios fase II tienen una flexibilidad para por ejemplo modificar la dosis o el esquema de administración de la que carecen los de fase III.

Los estudios fase II pueden ser realizados con un solo brazo de tratamiento o con varios (randomizado). En todos los casos el objetivo que debe establecerse de manera primordial para los citostáticos es el tiempo a la progresión (TTP). En los estudios de un solo brazo terapéutico los resultados pueden ser comparados con los históricos disponibles, lo que sin duda plantea dudas metodológicas de suma importancia. En el caso de los citotóxicos generalmente se establecen dos fases, de modo que sólo si la primera alcanza su objetivo (previamente definido por el número de éxitos que debe tener en una población de estudio) se pasa a la segunda, en la que se incluyen más pacientes. Pero en estos casos el paso de una etapa a otra se hace casi ininterrumpidamente, ya que la valoración de la respuesta se realiza cada poco tiempo. En el caso del tiempo a la progresión puede pasar demasiado tiempo, quizás 6 meses o 1 año, por lo que resulta recomendable establecer criterios adicionales, incluso de respuesta, y en cualquier caso la toxicidad debe ser mínima. Un problema añadido es que algunos pacientes pueden tener TTP más largos de los previstos y que pueden no estar relacionados con la administración del fármaco. Por el contrario, en el caso de la respuesta esto no sucede, ya que un paciente no tiene una respuesta si no se le administra un citotóxico. Debe resaltarse que por tanto la utilización de criterios históricos para evaluar el TTP conlleva diversos riesgos ya que en su valoración influyen diversas variables como: 1) la intensidad de la evaluación de las

pruebas, 2) la frecuencia de la evaluación, y 3) la heterogeneidad pacientes-enfermedad tumoral (tratamiento previo, volumen tumoral y extensión, órganos afectados, co-morbilidad, PS, edad, etc). Una alternativa podría ser que el paciente fuera su propio control, pero ello precisaría conocer la curva de crecimiento tumoral con detalle en cada caso, y aún así sabemos que los tumores según su fase de desarrollo y evolución presentan TTP variables al ir interviniendo nuevos factores clínicos y moleculares que se van añadiendo en la historia natural de los tumores. Dado todo lo anterior y para evitar posibles desviaciones en la interpretación de resultados, lo mas recomendable es incluir un mayor número de pacientes en los estudios con citostáticos. También es preciso añadir que en estos estudios puede ser de interés manejar criterios como el beneficio clínico (desaparición de la sintomatología, dolor, calidad de vida, etc). Finalmente, una alternativa de gran valor puede ser el desarrollo de estudios fase II randomizados de modo que hubiera varios brazos de tratamiento con diferentes agentes citostáticos, en cuyo caso el número de pacientes por brazo es relativamente pequeño (30-50 pacientes) y permitiría seleccionar el mejor agente que posteriormente debe ser evaluado en los ensayos fase III.

Un hecho fundamental es que estos estudios fase II sirvan para evaluar la actividad biológica (expresión) sobre la molécula diana (principio de la prueba biológico), si bien los inconvenientes radican en que la expresión de la diana no es uniforme en todos los pacientes.

Estudios fase III. Los estudios fase III tienen habitualmente los mismos objetivos para los agentes citotóxicos y los citostáticos: la supervivencia global (SG) y/o la supervivencia libre de enfermedad (SLE), además de poder valorar como objetivos secundarios otros como el TTP, la seguridad y la calidad de vida. Para las fases avanzadas (enfermos metastáticos) se utiliza la SG y para los tratamientos adyuvantes tanto la SG como la SLE. El número de pacientes a incluir puede ser el mismo en ambos tipos de fármacos, si bien el tiempo del tratamiento será diferente, ya que los citostáticos serán administrados de forma crónica. En general estos estudios permiten: 1) comparar la actividad del fármaco frente a un placebo directamente, 2) la comparación (más frecuente) de la combinación quimioterapia más citostático frente a quimioterapia sola y 3) la comparación de quimioterapia frente a un agente citostatico. Los es-

tudios de combinación se pueden realizar de manera que ambos tratamientos sean administrados simultáneamente o de manera cíclica si se prevé interacciones farmacológicas entre ellos. Habitualmente el número de pacientes que se requiere en la fase III está entre los 200 y 300. Dado que estos estudios son muy costosos y necesitan un elevado número de meses para su desarrollo, su selección es absolutamente crítica. Piénsese en la importancia capital de rechazar fármacos que podrían ser activos simplemente porque en ese momento no se dispone de la oportunidad de realizarlos al no haber suficientes recursos, que quizás se estén utilizando en fármacos carentes de interés.

En definitiva, que la biología molecular ha abierto unas puertas impensables hasta hace bien poco, que permitirá en primer lugar un mejor conocimiento del proceso tumoral, en segundo lugar llevar a cabo análisis de mutaciones hereditarias que impliquen el oportuno consejo genético, tercero un diagnóstico más ajustado desde un punto de vista patológico y molecular que nos ayudará a conocer con más detalles los factores pronóstico de la enfermedad y los factores predictivos individuales del paciente y, por último, un enorme desarrollo terapéutico con aproximaciones a fármacos con mecanismo de acción y objetivos diferentes que obligan a un desarrollo clínico singular. Por lo tanto, en lo que aquí concierne a esta ponencia desarrollo de nuevos fármacos y aplicación individualizada a cada paciente son los retos establecidos. El camino está abierto a todas estas posibilidades y es hora de ponerse en marcha.

BIBLIOGRAFÍA

(1) ASCO Educational Book 2001. New agentes with new mechanism of action. Pag. 419-440.

(2) Baselga, J. (2001) The EGFR as a target for anticancer therapy-focus on cetuximab. Eur. J. Cancer 37 (suppl. 4): S16-S22.

(3) Baselga, J. (2001) Targeting the epidermal growth factor receptor: a clinical reality. J. Clin. Oncol. 19 (18 suppl.) 41S-44S.

(4) Carter, S.K. (2000) Clinical strategy for the development of angiogenesis inhibitors. The Oncologist 5 (suppl. 1): 51-54.

(5) Denis, L.J., Verwij, J. (1997) Matrix metalloproteinase inhibitors: present achievements and future prospects. Invest. New Drugs 15: 175-185.

(6) Diasio, R.B., Johnson, M.R. (2000) The role of pharmacogenetics and pharmacogenomics in cancer chemotherapy with 5-fluorouracil. Pharmacology 61: 199-203.

(7) Eisenhauer, R.A. (1998) Phase I and II trials of novel anti-cancer agents: Endpoints, efficacy and existentialism. Ann. Oncol. 9: 1047-1052.

(8) Friend, S.H., Oliff, A. (1998) Emerging uses for genomic information in drug discovery. N. Engl. J. Med. 338: 125-126.

(9) Gelmon, K.A., Eisenhauer, E.A., Harris, A.L., *et al.* (1999) Anticancer agents targeting signalling molecules and cancer cell environment: challenges for drug development?. J. Natl. Cancer Inst. 91: 1281-1287.

(10) Gibbs, J.B. (2000) Mechanism based targer identification and drug discovery in cancer research. Science 287: 1969-1972.

(11) Hwang, J., Sinicrope, F., Safran, H., *et al.* (2001) A phase II trial of Irinotecan and Trastuzumab (Herceptin) in patients overexpressing HER-2/neu in metastatic colorectal cancer. Proc ASCO 22: 565.

(12) Korn, E.L., Arbuck, S.G., Pluda, J.M., *et al.* (2001) Clinical trial designs for cytostatic agents: Are new approaches hended?. J. Clin. Oncol. 19: 265-272.

(13) Meropol, N.J. (2000) Novel targets in colorectal cancer. ASCO Educational Book. Pag. 631-638.

(14) Miller, L.L., Elfring, G.L., Hannah, A.L., *et al.* (2001) Efficacy results of a phase I/II study of SU5416, 5-Fluorouracil (F) /leucovorin (L) relative to results in random subsets of similar patients from a phase III study of Irinotecan F/L or F/L alone in the therapy of previously untreated metastatic colorectal cancer. Proc. ASCO 22: 571.

(15) Senderowicz, A.M., Sausville, E.A. (2000) Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. J. Nat. Cancer Inst. 92: 376-387.

(16) Mendelsohn, J., Baselga, J. (2001) The EGFR receptor family as targets for cancer therapy. Oncogene 19: 6550-6565.

(17) Shawver, L.K. (1999) Tyrosine kinase inhibitors: from the emergence of targets to their clinical development. ASCO Educational Book. Pg. 29-44.

(18) Saltz, L., Rubin, M., Hochster, H., *et al.* (2001) Cetuximab (IMC-225) plus Irinotecan (CPT-11) is active in CPT-11 refractory colorectal cancer that expresses epidermal growth factor receptor (EGFR). Proc. ASCO 22: 7.

(19) Stoehlmacher, J., Brabender, J., Shirota, Y., *et al.* (2001) Association between mRNA expression level of epidermal growth factor receptor (EGFR), immunohistochemistry and response to the EGFR-inhibitor C225 in advanced colorectal carcinoma. Proc. ASCO 22: 593.

(20) Von Hoff, D.D. (1999) New agents with new mechanism of action and clinical activity. ASCO Fall Educational Conference Book. Pg. 122-126.

(21) Workman, P. (2000) Towards genomic cancer pharmacology: Innovative drugs for the new millennium. Curr. Opin. Oncol. Endocr. Metab. Invest. Drugs 2: 21-25.

(22) Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S.W., *et al*. (2003) Cetuximab (C225) alone ori in combination with irinotecan (CPT-11) in patients wuth epidermal growth factor receptor (EGFR)-positive, irinotecan-refractory metastatic colorecal cancer (MCRC). Proc. ASCO 22: 1012.

(23) Giantonio, B.J., Levy, D., O´Dwyer, J., *et al*. (2002) Bevacizumab (anti-VEGF) plus IFL (irinotecan, fluorouracil, leucovorin) as front-line therapy for advanced colorectal cancer: Results from the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Study E2200. Proc. ASCO 22: 1024.

(24) Kabbinavar, F., Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., *et al*. (2003) Phase II, Randomized Trial Comparing Bevacizumab Plus Fluorouracil (FU)/Leucovorin (LV) With FU/LV Alone in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. J. Clin. Oncol. 21: 60-65.

(25) Kris, M., Natale, R.B., Herbst, R.S. (2002) A phase II trial of ZD1839 ('Iressa') in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients who had failed platinum- and docetaxel-based regimens (IDEAL 2). Proc. ASCO 21: 1166.

(26) Fukuoka, M., Yano, S., Giaccone, G., *et al*. (2002) Final results from a phase II trial of ZD1839 ('Iressa') for patients with advanced non-small-cell lung cancer (IDEAL 1). Proc. ASCO 21: 1188.

(27) Johnson, D.H., Herbst, R., Giaccone, G., *et al*. (2002) ZD1839 «Iressa» in combination with paclitaxel & carboplatin in chemotherapy-naive patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): Results from a phase III clinical trial (INTACT 2). 27th European Society for Medical Oncology. Nice, October 2002. Ann. Oncol. 13 (suppl. 5): 127.

Nuevos avances en medicamentos: Avances en el tratamiento de las enfermedades pulmonares

JULIO CORTIJO Y ESTEBAN J. MORCILLO

Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina y Odontología
Universidad de Valencia

Para entender el interés que tiene el descubrimiento de nuevos fármacos activos en el aparato respiratorio debe advertirse:

a) Que las enfermedades respiratorias, globalmente consideradas, constituyen el principal motivo de primeras consultas en medicina primaria y suponen la tercera causa de mortalidad en Europa.

b) Que los estudios sobre utilización de medicamentos demuestran que los productos activos sobre el aparato respiratorio ocupan uno de los primeros puestos, en cuanto a consumo. Así el 'grupo terapéutico' correspondiente al aparato respiratorio representa por sí sólo el 14,4% del total de unidades (tercer puesto en este *ranking*) con una contribución al gasto del 10,7% (cuarto lugar) según datos de ventas del mercado farmacéutico español para el año 2000.

c) Que desde el punto de vista de la investigación farmacológica, el interés predominante radica en el sector de 'antiasmáticos y broncodilatadores', y es por ello que dedicaremos nuestros esfuerzos a este apartado de modo casi exclusivo. El tratamiento de las infecciones respiratorias, las neoplasias pulmonares, o la hipertensión pulmonar suelen considerarse más bien como un apartado de las correspondientes especialidades, es decir, de los antitumorales, los antiinfecciosos y del aparato cardiovascular, respectivamente.

Así pues, en este capítulo se examinarán los fármacos utilizados en el tratamiento del asma, de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), de la tos (antitusígenos) y en la regulación de la secreción bronquial (mucolíticos).

1. FÁRMACOS ANTIASMÁTICOS

Aproximadamente el 5% de la población adulta y el 10-12% de la pediátrica padece asma bronquial, en los países desarrollados. A diferencia de otras patologías prevalentes, la morbimortalidad por asma aumenta, a pesar del uso cada vez mayor de los fármacos antiasmáticos.

Los tres aspectos característicos de esta enfermedad son:

- *Obstrucción bronquial reversible,* con manifestación clínica como episodios de disnea y tos. El término reversible indica que responde bien a la medicación broncodilatadora. Se considera aceptable una respuesta de VEMS (volumen espiratorio máximo en el primer segundo de la espirometría forzada) superior al 15%.
- *Inflamación:* Hasta hace poco se contaba con escasa información sobre las características del proceso inflamatorio de la mucosa bronquial en el asma, sin embargo la utilización del fibroscopio y la posibilidad de obtener biopsias bronquiales ha permitido indicar que las alteraciones histológicas consisten básicamente en: (i) infiltración de la mucosa por eosinófilos activados que segregan diversos productos citotóxicos (radical superóxido, proteína básica mayor, proteína catiónica, peroxidasa y neurotoxina), linfocitos T-*helper* (CD4+) y mastocitos; (ii) descamación de células epiteliales; y (iii) engrosamiento de la membrana basal por incremento de los depósitos de colágeno de los tipos I, III y V, junto con fibronectina.
- *Hiperreactividad bronquial:* La descamación y daño del epitelio de las vías aéreas permite la exposición directa a agentes irritantes de las terminaciones nerviosas subepiteliales, lo cual provoca reflejos axónicos locales y vagales que pueden producir broncoconstricción, hipersecreción de moco, tos y vasodilatación con extravasación, lo que ocasiona edema e infiltración de células inflamatorias. El grado de hiperreactividad frente a estímulos farmacológicos (metacolina e his-

tamina) se correlaciona con la gravedad clínica del asma. La hiperreactividad bronquial se ha atribuido a distintas causas, entre otras, a anormalidades de la inervación adrenérgica, a alteraciones en los niveles de catecolaminas circulantes, a defectos de los receptores β-adrenérgicos y/o al aumento del tono vagal. Aunque estas diferentes hipótesis continúan siendo discutidas, se ha podido comprobar que en el asma la disminución de la inflamación bronquial se acompaña de una reducción del grado de hiperreactividad bronquial.

En resumen, el énfasis en el asma ha pasado de ser considerado una reacción de hipersensibilidad tipo I, donde lo importante era el episodio de broncoespasmo desencadenado por la liberación de mediadores, tras la desgranulación del mastocito al producirse la reacción alergeno-IgE específica, a ser interpretado en la actualidad como un proceso inflamatorio crónico de las vías aéreas, puesto en marcha por una serie de factores desencadenantes. De acuerdo con estos avances en el conocimiento de los mecanismos patogénicos del asma, esta patología necesita un tratamiento global contra el broncoespasmo y la inflamación de las vías aéreas.

El actual tratamiento del asma no es enteramente satisfactorio. Frente a otras patologías como la hipertensión esencial o el *ulcus* gástrico, en las que se han ido introduciendo medicamentos con 'nuevos' mecanismos de acción y en primera línea de tratamiento (inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina y de la bomba de protones, respectivamente), en el asma bronquial esto no ha sucedido todavía, a pesar de la muy reciente incorporación de los antagonistas de receptores de leucotrienos $CysLT_1$ (montelukast, zafirlukast, y pranlukast, ya comercializados) y de los inhibidores de la 5-lipoxigenasa (zileutón, comercializado en E.E.U.U.), que se añaden pero no desplazan al tratamiento convencional con agonistas β_2-adrenérgicos y esteroides. Puede, por tanto, afirmarse que, desafortunadamente, ha habido pocas innovaciones en los fármacos antiasmáticos durante los últimos 30 años.

A continuación comentaremos algunos de los posibles fármacos que pueden aparecer en los próximos años:

- ***Inhibidores de fosfodiesterasa 4***

En concreto los inhibidores selectivos PDE4 denominados de «segunda generación» como «cilomilast» y «roflumilast».

Las fosfodiesterasas (PDE) integran una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis de de la función diéster fosfato de los segundos mensajeros AMPc y GMPc para dar lugar al 5´-AMPc y 5´-GMPc que son inactivos.

Los isoenzimas de la PDE contienen en su estructura tres dominios funcionales:

1) *Lugar catalítico* (estable): en la secuencia de las regiones catalíticas de las diferentes familias de PDEs existe una considerable similitud (identidad (50% a nivel de aminoácidos).

2) *Extremo N-terminal* (variable): tiene un papel regulador en varias familias de PDEs, ya que posee un dominio de unión a calmodulina en la PDE I, sitios de unión a GMPc en la PDE II, lugares de fosforilación para varias proteína quinasas en PDEs I, III, IV y V, un dominio de unión a la transducina en la PDE VI y en algunas PDEs existe, además, un dominio dirigido a la membrana que es importante ya que determina la compartimentación celular y funcional.

3) *Extremo C-terminal* (variable): su papel funcional específico no está claro todavía, aunque se sugiere que este dominio es importante para la dimerización de PDE IVD1. Al igual que para los extremos *N*-terminal, las secuencias de aminoácidos de estas regiones entre las diferentes familias de PDEs son muy heterogéneas.

Estos tres dominios están conectados por regiones «bisagra» cuya flexibilidad permite que los dominios *N*- o *C*-terminales se plieguen sobre la región catalítica modulando, de este modo, el acceso del sustrato a esta porción. Esta circunstancia permite que los reguladores alostéricos puedan incrementar o disminuir la actividad enzimática alterando la estructura terciaria de la enzima.

En la actualidad, se han descrito hasta once clases de isoenzimas (PDE1 a PDE11), cada una codificada por genes independientes, aunque existen isoformas dentro de cada una de las familias derivadas de los correspondientes isogenes. Frente a la nomenclatura inicial en números romanos, en la actualidad se ha impuesto la utilización de números arábigos.

ISOENZIMAS DE LA PDE

Familia (Inhibidores)	*Mecanismos de regulación* *Moleculares*	*Hormonales*	*Km (μM)*	*Subtipos*
PDE 1 Ca^{2+}/CaM activada (Vinpocetina)	Ca^{2+}/calmodulina Fosforilación	Agonistas muscarínicos colinérgicos	AMPc ≥ GMPc (1-30) (3)	3
PDE 2 GMPc estimuladas (EHNA)	GMPc	ANF Óxido nítrico	GMPc < AMPc (50) (50)	1
PDE 3 GMPc inhibida (Milrinona) Fosforilación	GMPc	Insulina Glucagón Dexametasona	GMPc ~ AMPc (0.3) (0.3)	2
PDE 4 AMPc específica (Rolipram, RO 20-1724)	AMPc (expresión génica) Fosforilación	TSH FSH Agonistas ß-adrenérgicos	GMPc >> AMPc (>3000) (4)	4
PDE 5 GMPc específica (Zaprinast, Sildenafilo)	GMPc Fosforilación	ANF	AMPc >> GMPc (150) (1)	1
PDE 6 GMPc específica	Transducina (proteína G)	Luz	AMPc >> GMPc (2000) (60)	4
PDE 7 AMPc específica no inhibidapor rolipram (IBMX)	Mg-independiente	No se conocen	GMPc >> AMPc (>1000) (0.2)	1
PDE 8 AMPc específica (Dipiridamol)	No se conocen	No se conocen	AMPc >> GMPc (0.05) (>1000)	1
PDE 9 GMPc específica (SCH1866)	No GMPc Fosforilación	No se conocen	GMPc >> AMPc (0.1) (>1000)	1

Clase 1

Esta clase se denomina también PDE Ca^{2+}/calmodulina estimulada porque su actividad hidrolítica sobre los nucleótidos cíclicos se estimula por el Ca^{2+} y la calmodulina. Estos reguladores aumentan la V_{max} (velocidad máxima de reacción en reacciones enzima-sustrato, que en cinética enzimática, es la velocidad de reacción obtenida en condiciones de saturación de la enzima por el sustrato para unas condiciones determinadas de pH, temperatura y fuerza iónica) de hidrólisis de los nucleótidos cíclicos o reducen el valor K_m (constante de Michaelis-Menten: concentración de sustrato para la que la velocidad de una reacción enzimática es la mitad de la máxima. Es una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato) o simultáneamente incrementan la V_{max} y reducen el valor $K_{m,}$ determinando diferencias cinéticas entre las distintas isoformas. La actividad de la PDE 1 también está modulada por la fosforilación proteín quinasa-inducida AMPc-dependiente (PDE 1A) y por la calmodulin quinasa II (PDE 1B), lo cual disminuye la afinidad de la PDE 1 por la Ca^{2+}/calmodulina y, consecuentemente, atenúa la actividad enzimática.

Clase 2

Se caracteriza porque su actividad hidrolítica de los nucleótidos cíclicos. Se estimula alostéricamente por la presencia de otros nucleótidos cíclicos, así la hidrólisis del GMPc por la isoenzima PDE 2 se incrementa en la presencia de AMPc y, recíprocamente, la hidrólisis de AMPc aumenta en la presencia de GMPc. A concentraciones fisiológicas, estas isoenzimas de PDE 2 parece que actúan más como PDE AMPc-estimuladas por GMPc. Esta estimulación de la hidrólisis del AMPc es consecuencia de un incremento en la afinidad por el sustrato con pequeños cambios en la V_{max} .

Clase 3

La característica principal de las isoenzimas de la PDE 3 es la de poseer una alta afinidad ($\downarrow K_m$) tanto para el AMPc como para el GMPc y que el GMPc actúa a concentraciones muy bajas como un inhibidor competitivo, uniéndose al centro activo de la enzima. Tanto el AMPc como el GMPc son sustratos para estas isoenzimas pero, la V_{max} para la hidrólisis del AMPc es mucho mayor que la del GMPc. El GMPc actúa como sustrato en la hidrólisis mediada por PDE III y como un inhibidor de la disminución del AMPc.

La actividad fosfodiesterasa está también regulada por la fosforilación por las proteína quinasas. Los dos subtipos de PDE 3 son substratos para la proteína quinasa-A (PKA), siendo además PDE 3B substrato de las proteína quinasas sensibles a la insulina. La fosforilización de estas isoenzimas por estas quinasas aumenta su actividad enzimática.

Clase 4

Esta clase posee una elevada actividad para la hidrólisis del AMPc. El GMPc ni modula la hidrólisis del AMPc ni es un sustrato de estas isoenzimas y solamente algunos subtipos de PDE 4D que contienen un lugar consensuado para la fosforilación por PKA dentro del dominio *N*-terminal, son activados a través de la vía de la PKA.

Clase 5

Esta clase hidroliza específicamente el GMPc, aunque no todas las isoenzimas de esta familia tienen una elevada afinidad por este nucleótido cíclico, pero todas tienen baja actividad hidrolítica para el AMPc. Estas isoenzimas se fosforilan tanto por la PKA como por la proteína quinasa GMPc-dependiente (PKG), siendo la PDE V el primer sustrato fisiológico descrito para la GMPc-quinasa; aunque la relevancia funcional de esta fosforilación es desconocida, podría conducir a incrementar su actividad enzimática.

Clase 6

Las isoenzimas de esta clase hidrolizan selectivamente el GMPc. En un principio los tipos PDE 5 y 6 se agruparon en una única familia, pero tras el esclarecimiento de la estructura primaria de la PDE V en pulmón se puso de manifiesto que la PDE 5 y la PDE 6, que se expresa fundamentalmente en la retina, son estructuralmente distintas y, por lo tanto, se separaron en dos familias diferentes.

Clase 7

Estas enzimas hidrolizan el AMPc específicamente y, como en el caso de la PDE 4, el GMPc no tiene ningún efecto. Todavía no se han iden-

tificado inhibidores selectivos de esta isoenzima, siendo resistente a todos los inhibidores estándar de las PDE, como la milrinona o el rolipram, que son inhibidores específicos de la PDE 3 y PDE 4, respectivamente, o como la 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), que es un inhibidor no selectivo. Se expresa abundantemente en el músculo esquelético, lo cual sugiere una posible implicación en el control de la contracción.

Clase 8

Estas enzimas hidrolizan el AMPc específicamente y, como en el caso de la PDE 4, no presentan ningún activador/inhibidor bioquímico. Se han identificado inhibidores selectivos de esta isoenzima, como el dipiridamol, siendo resistente a la IBMX.

Clase 9

Son enzimas que hidrolizan el GMPc específicamente pero, al contrario que la PDE 5, no presentan ningún lugar de unión al cGMP. Se han identificado inhibidores selectivos de esta isoenzima, como el SCH1866.

En estas nueve familias de isoenzimas de la PDE se reconocen más de 25 isoformas distintas, muchas de las cuales se encuentran distribuidas de forma diversa en diferentes tipos celulares.

Es importante tener presente esta distribución tisular de las isoenzimas de la PDE a la hora de ensayar fármacos inhibidores, selectivos o no selectivos de la PDE, tanto en la búsqueda de acciones terapéuticas sobre enfermedades específicas como en la posible aparición de efectos secundarios o colaterales. Así, hay numerosos estudios que documentan la presencia de isoenzimas de la PDE 1 en corazón y SNC; de la PDE 2 en hígado, corazón, SNC, plaquetas, piel, etc; de la PDE 3 en corazón, músculo liso, hígado, adipocitos, etc; de la PDE 4 en SNC, células inflamatorias, sistema reproductivo, piel, etc y de la PDE 5 en retina, tejido pulmonar, músculo liso vascular, etc. La clase PDE 6 se expresa fundamentalmente en retina y la PDE 7 abundantemente en músculo esquelético.

Isoenzima PDE	*Distribución tisular*
1	Corazón, SNC, hígado, riñón, adipocitos.
2	SNC, corazón, hígado, músculo liso vía aérea, riñón, etc.
3	Corazón, plaquetas, músculo liso, riñón hígado, etc.
4	Músculo liso, células inflamatorias, cerebro, hígado, etc.
5	Retina, músculo liso, plaquetas,etc.
6	Retina
7	Músculo esquelético

Los incrementos en el contenido de AMPc y GMPc que producen los inhibidores de PDE conllevan la relajación del músculo liso de las vías aéreas por dos mecanismos generales:

1) El aumento de las concentraciones del AMPc conduce a una disminución del Ca^{2+} libre citosólico, por disminuir la movilización del Ca^{2+} desde depósitos intracelulares, inhibir la entrada de Ca^{2+} extracelular y estimular la salida de Ca^{2+} y el secuestro de Ca^{2+} dentro de los lugares de depósito intracelulares.

2) La activación por AMPc y GMPc de las cascadas de fosforilación de proteínas puede inhibir directamente la activación de las proteínas contráctiles.

Varias de estas vías bioquímicas parecen ser activadas simultáneamente y actúan de una forma coordinada para reducir el tono del músculo liso de la vía aérea.

Además, hay datos recientes que sugieren que el AMPc puede relajar el músculo liso vía activación de la PKG. Todavía no se sabe claramente la relativa importancia de los diferentes mecanismos de acción del AMPc sobre la maquinaria contráctil y el mecanismo por el cual el GMPc atenúa la contracción en el músculo liso de las vías aéreas todavía no está bien definido.

Podemos producir un aumento en el contenido intracelular de los nucleótidos cíclicos bien incrementando su velocidad de formación o bien disminuyendo su velocidad de degradación. Los agonistas β-adrenérgicos y las prostaglandinas PGE_2 y PGI_2, tras unirse a sus receptores específicos en la membrana celular activan proteínas G que enlazan GTP, las cua-

les activan la adenilato ciclasa incrementando los niveles celulares de AMPc. Otros fármacos, como los nitrovasodilatadores, y el factor relajante derivado del endotelio, activan directamente la enzima guanilato ciclasa sin interaccionar con ningún receptor de superficie celular.

Por otra parte, los inhibidores de la PDE actuarían disminuyendo la actividad de estas isoenzimas y, por tanto, la hidrólisis de AMPc y GMPc queda inhibida. Los nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc, actúan sobre sus enzimas diana intracelulares (PKA y PKG) las cuales, una vez activadas, fosforilan y cambian la actividad de sus sustratos. Entre éstos se encuentran determinadas enzimas y sistemas de transporte de iones, que están implicados en la regulación del tono del músculo liso.

La presencia y distribución de las diferentes *isoenzimas de la PDE* en el músculo liso de las vías aéreas humanas varía ligeramente según el tejido considerado: en el *tejido bronquial* encontramos isoenzimas de la PDE tipo 1, 3, 4 y 5, mientras que en el *tejido traqueal* se han encontrado las isoenzimas 1_{α}, 1_{β}, 2, 3, 4 y 5.

Las células inflamatorias más claramente asociadas con el asma son los mastocitos (en los primeros estadíos del ataque asmático); los neutrófilos, los macrófagos y los eosinófilos (en las fases tardías del ataque asmático) y los linfocitos-T (en el asma crónico). También hay evidencia de que los basófilos, los monocitos, las plaquetas y las células endoteliales, juegan un papel en la inflamación asmática.

Isoenzima PDE predominante	*Célula humana*
4	EOSINÓFILO, NEUTRÓFILO
4	MONOCITO
4 = 3 = 1	MACRÓFAGO LAVADO BRONCOALVEOLAR
4 = 3	MASTOCITO
4 = 3	LINFOCITO T
4	LINFOCITO B
1 = 4	CÉLULAS EPITELIALES
5	PLAQUETAS
3 = 4 = 5	MÚSCULO LISO BRONQUIAL

El AMPc actúa como un mensajero que inhibe la producción y liberación del mediador inflamatorio, además de inhibir otras funciones como la quimiotaxis, la citotoxicidad y la agregación celular. Aunque hay poca información acerca del mecanismo específico que media este efecto, parece ser debido a mecanismos múltiples. Al igual que en el músculo liso, uno de los mecanismos implicados aquí sería un efecto inhibitorio del aumento de los niveles celulares de Ca^{2+}, el cual es un disparador para algunas actividades celulares, incluyendo la producción y liberación de mediadores. Sin embargo, también hay evidencias de que el AMPc puede inhibir la liberación del mediador inflamatorio sin grandes cambios en las concentraciones citosólicas de Ca^{2+}. En el caso de la biosíntesis de eicosanoides, se ha sugerido que la activación de la cascada del AMPc puede causar directamente inhibición de una o más enzimas en la vía biosintética -*v.g.* fosfolipasa A_2.

Todavía se conoce mucho menos del papel que juega el GMPc en la regulación de la célula inflamatoria y su efecto parece ser modesto en comparación con el profundo efecto inhibitorio del AMPc .

En resumen, al menos dos efectos terapéuticamente beneficiosos podrían, potencialmente, resultar de la inhibición de la actividad fosfodiesterasa y la consecuente elevación en las concentraciones intracelulares de AMPc o GMPc en células clave implicadas en la patología del asma: el efecto broncodilatador y el antiinflamatorio.

Se han desarrollado un gran número de inhibidores de isoenzimas de la PDE con diferente grado de selectividad por las mismas:

1) Los **inhibidores no selectivos** son fármacos análogos a la teofilina que continúan utilizándose en el tratamiento tanto del asma como de la EPOC.

2) Los **inhibidores selectivos de PDE 4, ahora conocidos como de primera generación**, son análogos del 'rolipram'. Estos fármacos están bien caracterizados farmacológicamente pero presentan inconvenientes derivados de sus efectos adversos en humanos (principalmente náuseas y emesis), por lo que han sido ya abandonados desde el punto de vista de su desarrollo clínico. Estos fármacos se caracterizan por su elevada potencia en el denominado 'sitio de alta afinidad para rolipram' en cortex cerebral de rata.

3) Los **inhibidores selectivos de PDE 4, de segunda generación** mantienen una elevada potencia en el sitio catalítico de la enzima PDE IV, pero en cambio exhiben menor potencia relativa en el sitio de alta afinidad para rolipram. Esta característica disminuye o elimina los efectos adversos gastrointestinales producidos por los inhibidores de la PDE IV de primera generación y, en consecuencia, han logrado alcanzar fases avanzadas de desarrollo clínico (fase 3 para cilomilast y roflumilast).

A título de muestra recogemos en la siguiente tabla algunos de los fármacos más interesantes

Fármaco	*Industria farmacéutica*	*Estado de desarrollo*
Cilomilast (SB207499)	SmithKline Beecham	Fase II(asma)/fase III (EPOC)
Piclamilast (RP73401)	Rhone Poulenc Rorer	Discontinuado (toxicidad)
Roflumilast	Byk Gulden	Fase III asma/EPOC
CDP840	Celltech (UK)	Fase II (asma)
AWD12-281	Asta Medica	Pre-clínico
UCB 29936	UCB Pharma, Bélgica	Pre-clínico (toxicidad?)
V-11294A	Purdue/NAPP Pharma UK	Fase I
D4418	Chiroscience	Fase I
L-826141	Merck Frosst	Pre-clínico

4) Los **inhibidores de 'tercera generación' (?).** Aunque esta denominación no está acuñada en la literatura, la podríamos utilizar eventualmente aquí para referirnos a compuestos que presentan selectividad para subfamilias e isoformas de PDE4, y podrían representar un avance adicional en el campo de los antiasmáticos . Su importancia dependerá de la relevancia funcional de las isoformas expresadas en cada tejido. Así, por ejemplo, se ha demostrado recientemente que la isoforma predominante en neutrófilos humanos es la **PDE 4B2**. Si se dispusiera de un inhibidor selectivo de este subtipo de fosfodiesterasa, se podría actuar de forma muy selectiva sobre esta célula inflamatoria relevante en asma y EPOC sin afectar a otras células. En la actualidad, no se ha descrito aún ningún fármaco con estas características.

Investigaciones recientes han demostrado la existencia de PDE 4 en bronquio humano y en células pro-inflamatorias (mastocitos, monocitos/macrófagos, linfocitos T, eosinófilos y neutrófilos), así como la capacidad de los inhibidores selectivos de la PDE 4 para producir la relajación del bronquio humano aislado y para interferir la transducción de señales en células inflamatorias. La extensión de la capacidad inhibidora de un compuesto a otras isoenzimas de la PDE, principalmente los tipos 3 y/o 5, constituye un tema interesante pero polémico, al no existir consenso sobre la presencia y/o relevancia de estas isoenzimas en bronquio humano y células inflamatorias.

Aunque desde los primeros estudios experimentales se advirtió claramente la capacidad de los inhibidores selectivos de la PDE 4 para interferir los procesos de tráfico celular (v.g. la entrada de eosinófilos en el lavado broncoalveolar), ha sido recientemente cuando se han iniciado los estudios más concretos *in vitro* e *in vivo* para conocer mejor cuáles son las moléculas de adhesión que se interfieren por estos fármacos. Se sabe que los fármacos que aumentan los niveles de AMPc son capaces de inhibir la inducción por citoquinas de E-selectina, integrinas β2 y VCAM-1 en diversos tipos celulares. En concreto, el rolipram (inhibidor PDE4 arquetipo), suprime la expresión y liberación de E-selectina en células endoteliales umbilicales humanas activadas por TNF-α. La inhibición de PDE 4 también inhibe la inducción de la expresión de E-selectina en células endoteliales de la microvasculatura pulmonar humana, y la inhibición de PDE III/PDE 4 inhibe VCAM-1 pero no ICAM-1 (Figura 1).

A la hora de valorar el efecto de estos inhibidores selectivos, hay una serie de factores a tener en cuenta: muchos de estos agentes poseen sitios de acción adicionales, de forma que un determinado inhibidor selectivo puede incidir, al aumentar los niveles de un nucleótido cíclico, sobre la actividad de isoenzimas de la PDE distintos al primitivamente inhibido. *In vivo,* la velocidad de recambio de los nucleótidos cíclicos está aumentada y los efectos de los inhibidores de isoenzimas de la PDE son mucho mayores sobre sus niveles que en los experimentos realizados *in vitro*.

En conclusión, los fármacos inhibidores selectivos de segunda generación de la PDE 4 representan un nuevo grupo farmacológico de interés potencial como agentes terapéuticos no sólo en el asma, sino también en otras patologías pulmonares (v.g. EPOC) y extrapulmonares (v.g. artritis,

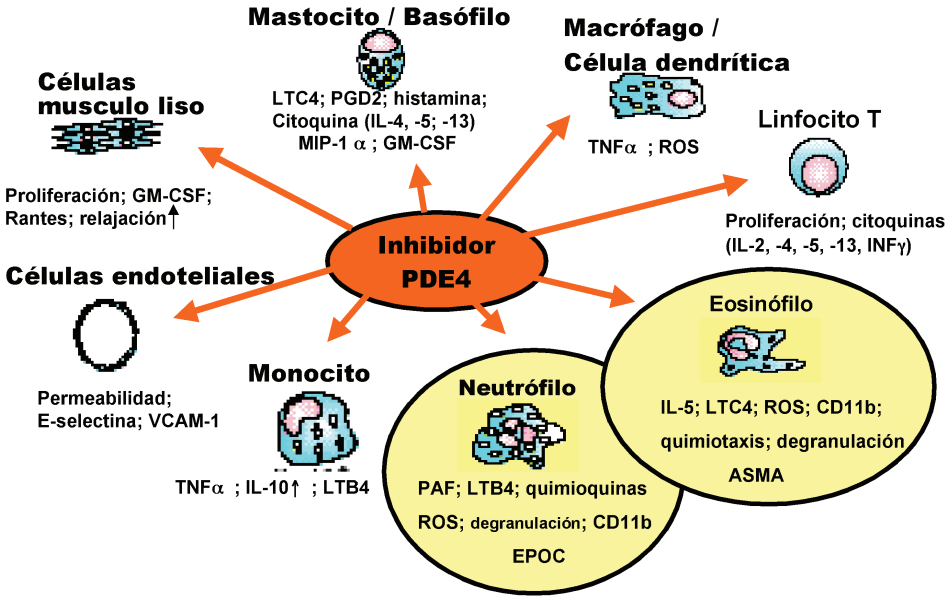


FIGURA 1

SNC, etc.) e incluso podrían tener otras aplicaciones, por ej. como tocolíticos. Los inhibidores selectivos de PDE4 producen broncodilatación en una diversidad de especies animales, e interfieren la liberación de mediadores por células inflamatorias. Este perfil, es decir, una combinación de actividad broncodilatadora y anti-inflamatoria, confiere a estos agentes un atractivo especial como antiasmáticos (Figura 2). Para esta indicación (antiasmáticos) se encuentran ya algunos de estos fármacos en fases 2 y fase 3 de desarrollo clínico. Resulta interesante que también están demostrando actividad clínica (fase 3) para el tratamiento de la EPOC (Figura 3), como indicaremos más adelante.

- ***Nuevos corticoides de uso local y sus isómeros activos***

Dada la importancia capital de la corticoterapia inhalada en el tratamiento del asma, la posible mejora de los esteroides inhalados es importante. Una posibilidad es la utilización de enantiómeros puros en lugar de la forma racémica. Así, el isómero 22*R* de budesonida tiene una actividad antiinflamatoria superior y presenta un mayor grado de biotransformación que el isómero 22*S*. Otra posibilidad interesante es el diseño de esteroides

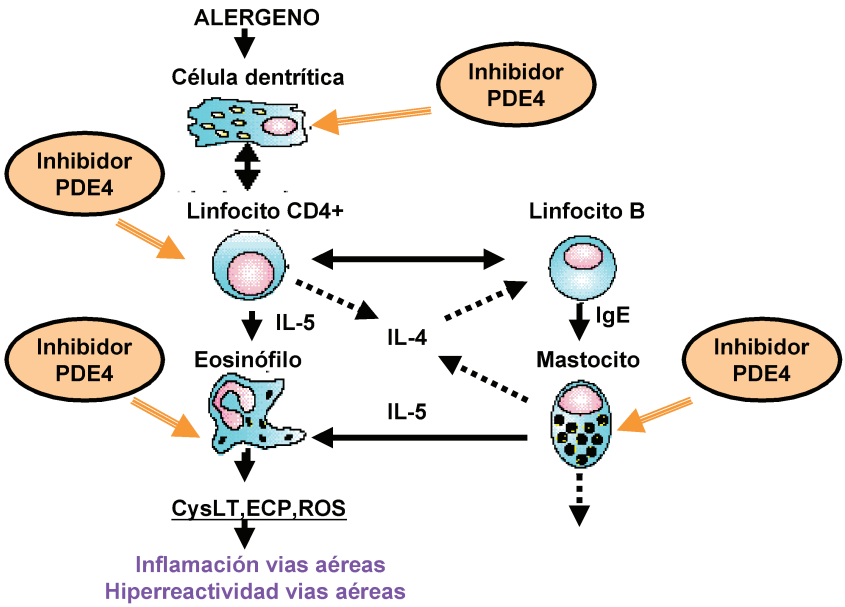


FIGURA 2

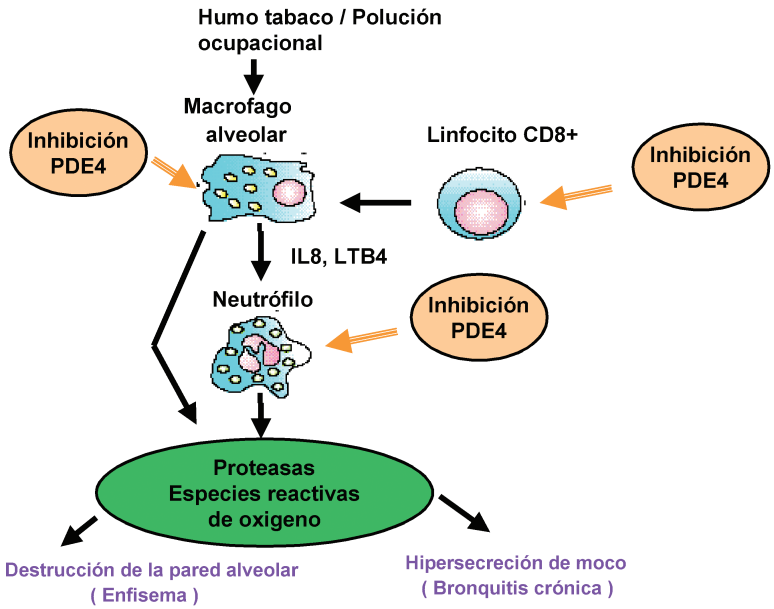


FIGURA 3

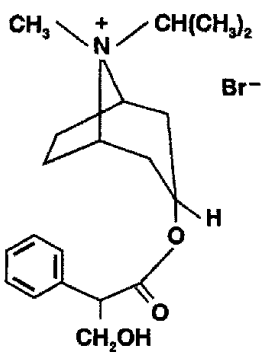
con actividad preferente 'trans-represora» sobre la 'trans-activadora', como ocurre en el compuesto RU24858, cuya actividad terapéutica sería consecuencia de la inactivación de determinados genes, mientras que los efectos adversos estarían producidos por la activación de otros genes.

- ***Agonistas de canales de potasio (K_{ATP}) broncoselectivos***

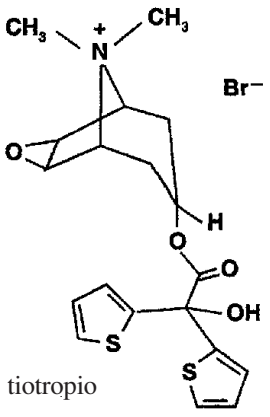
Estos fármacos han demostrado actividad anti-hiperreactividad de las vías aéreas en diversos modelos experimentales. Se trabaja en una nueva generación de fármacos broncoselectivos y, por tanto, con mayor ventana terapéutica (v.g. SDZ217-744) pero su efectividad clínica está por demostrar.

- ***Antimuscarínicos selectivos (M_3)***

Aunque la actividad de los antimuscarínicos es más valorada en el contexto de la EPOC, su papel en asma es también reconocido. Actualmente, se utilizan antagonistas no selectivos (anti-M_1,M_2,M_3), lo cual, al menos teóricamente se presta a algún tipo de interacción indeseada con los autorreceptores prejuncionales. Sin embargo, el uso clínico no parece favorecer totalmente esta hipótesis. Se trabaja en antagonistas de larga duración de acción como tiotropio (actividad mantenida durante 24 h, lo que resulta muy atractivo para asma nocturno). El tiotropio no es un antagonista selectivo pero se disocia rápidamente de los receptores M_2 y lentamente de los M_1/M_3 (selectividad cinética más que farmacodinámica). Se está diseñando la posible incorporación de antagonistas selectivos M_3.



ipratropio



tiotropio

- ***Fármacos que actúan sobre receptores de adenosina***

Se ha demostrado un papel diverso para receptores A_{2B} y A_3 en la patofisiología del asma, y en consecuencia, los antagonistas selectivos A_{2B} y agonistas A_3 podrían constituir alternativas potenciales al uso de teofilina.

- ***Estrategias inhibidoras de citoquicinas***

Las células y mediadores que están implicados en la patogenia del asma y la EPOC son excelentes dianas para los anticuerpos monoclonales. En realidad, los anticuerpos monoclonales tienen varias ventajas sobre las moléculas farmacológicas tradicionales. Así, son muy selectivos para sus dianas y por ello producen principalmente los efectos buscados sin apenas reacciones adversas y no compiten con los demás fármacos en los procesos de biotransformación y distribución, lo cual descarta la aparición de interacciones farmacocinéticas. Adicionalmente, presentan una farmacocinética predecible y prolongada (en el caso de la IgG la vida media es de semanas). La vía de administración para los anticuerpos monoclonales es la parenteral. Aunque en un primer momento se pensó que era menos adecuada que la oral, en la actualidad se ha indicado que esta vía mejora el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente y, además, como requiere la supervisón del personal sanitario, permite un mejor control del mismo. De todas formas, hay que señalar que se están diseñando equipamientos para la administración de los anticuerpos por vía inhalatoria. Como última ventaja, hay que resaltar que el tiempo de descubrimiento de anticuerpos monoclonales específicos, con altas probabilidades de éxito, es mas corto que el necesario para el descubrimiento de una nueva molécula química activa.

El asma como enfermedad inflamatoria pulmonar crónica esta regulada por los linfocitos T, subpoblación CD4, subtipo Th2 (produciendo IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 y IL-13). Por ello, actuando directamente sobre los linfocitos T o los productos liberados por ellos se puede obtener un control del asma. Las siguientes aproximaciones han sido propuestas y estudiadas:

1. Depleción de los linfocitos T activados a través de sus marcadores específicos. Esta aproximación consigue, con unos mínimos efectos inmunosupresores, un efecto clínico beneficio. El Kelximab es un anticuerpo mococlonal anti-CD4 que ha sido evaluado en pacientes asmáticos con una reducción importante del número total de CD^{4+}.

2. Inhibición de la respuesta de los linfocitos T activados por bloqueo de su maquinaria de activación.
3. Activación de linfocitos T reguladores que supriman a los linfocitos T patogénicos.

DIANAS PARA LA TERAPEUTICA CON ANTICUERPOS MONOCLONALES EN EL ASMA Y LA EPOC

Categoría	*Asma*	*EPOC*
IgE Y RECEPTOR IgE	IgE	———
RECEPTOR LIFOCITOS T Y MOLÉCULAS ESTIMULADORAS	CD3	CD3
	CD4	CD8
	CD28-B7	
	CD40L-CD40	
	OX40-OX40L	
CITOQUINAS DE LINFOCITOS T	IL-4	IFNγ
	IL-5	IL-1
	IL-9	IL-16
	IL-13	
CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS	TNFα	TNFα
	IL-1	TGFβ
	IL-16	IL-1
		IL-6
		IL-11
		IL-18
QUIMIOQUINAS Y SUS RECEPTORES	EOTAXINA.CCR3	IL-8-CXCR1
	MCPs-CCR2	CXCR2
	TARC-CCR4	MCPs-CCR2
	MDC-CCR8	RANTES-CCR1,3,5
	RANTES	
MOLÉCULAS DE ADHESIÓN	VLA-4	ICAM-1
	VCAM-1	CD18
	ICAM-1	E-SELECTINA
	MMPS	
PROTEASAS	———	ELASTASA
		CATEPEPSINAS
		MMPs

4. Neutralización de las citoquinas producidas por los linfocitos T patogénicos.

Por otro lado, hay que indicar que el asma en ocasiones tiene como patogenia un proceso alérgico, estando entonces asociados directamente con la inmonuglobulina E, la cual mediaría la degranulación de los mastocitos y el acumuló de eosinófilos y linfocitos Th2. Es en este caso cuando aparece una nueva diana para los anticuerpos monoclonales: la IgE.

Todos estos planteamientos han dado como resultado que sean varios los anticuerpos monoclonales que se encuentran en desarrollo clínico.

Anticuerpos monoclonales con potencial utilización en el asma

Fármaco	*Industria*	*Mecanismo*	*Indicación*	*Estado*
RhuMAb-E-25 Omalizumab	Genentech	AntiI-IgE	Asma, alergia, rinitis	Pre-registro
CGP 56901	Tanox	Anti-IgE	Asma, alergia, rinitis	FASE II
MAb, CD23	INDEC	Anti-CD23	Asma, alergia, rinitis	FASE II
Clenoliximab	INDEC	Anti-CD4	Artritis reumatoide, soriasis, asma	FASE II
SB 240683	GlaxoSmithKline	Anti-IL-4	Asma	FASE I
Nuvance	Inmunes	Receptor soluble IL-4	Asma, alergia, transplantes	FASE II
SB 240563	GlaxoSmithKline	Anti-IL-5	Asma	FASE II
SCH 55700	Schering-Ploug	Anti-IL-5	Asma, alergia	FASE II

La EPOC es una inflamación crónica caracterizada por la infiltración de neutrófilos, macrófagos y linfocitos T CD8+ en los pulmones. Estas células son activadas por citoquinas y quimioquinas liberadas del pulmón como respuesta a factores externos. Obviamente estas citoquinas son presuntas dianas de los anticuerpos monoclonales, siendo IL-1, IL-8 y TNFα, las principales candidatas.

Anticuerpos monoclonales con potencial utilización en la EPOC

Fármaco	*Industria*	*Mecanismo*	*Indicación*	*Estado*
Cytolin	CytoDyn	Anti-CD8	Junto con anti-SIDA	FASE II
LDP-01	Millenium	Anti-CD18	Neuroprotección	FASE II

Anticuerpos monoclonales con potencial utilización en la EPOC *(Continuación)*

Fármaco	*Industria*	*Mecanismo*	*Indicación*	*Estado*
INSERM	Anti-IL-6	Cáncer	FASE I	
ABX-IL-8	Abgenix	Anti-IL-8	Soriasis, EPOC	FASE II
Cetuzimab	ImClone	Anti-EGF-receptor	Cáncer	FASE III
Infliximab	Centocor	Anti-TNF(	Artritis reumatoide	Comercial
Kineret	Amgen	Antagonista receptor IL-1	Artritis reumatoide	Comercial

- ***Interferencia con moléculas de adhesión***

El notable influjo de células inflamatorias es importante en la fisiopatología del asma y la EPOC y, por tanto, modular la expresión secuencial de las moléculas de adhesión intercelular es una diana atractiva para nuevos antiasmáticos. Se puede modular la expresión en la superficie celular de estas moléculas mediante oligonucleótidos antisentido (v.g. ISIS 2302), inhibidores de fucosiltransferasa y de metaloproteinasa, así como también a través de la manipulación de determinas citoquinas. Alternativamente, se puede bloquear la función de las moléculas de adhesión utilizando anticuerpos monoclonales (BIRRI y CDP850), oligosacáridos (CG69669A), glicomiméticos (TBC1269), e inhibidores selectivos que están en vías de desarrollo. Algunos fármacos como los inhibidores selectivos PDE4, también actúan modulando la expresión de moléculas de adhesión.

- ***Oligonucleotidos antisentido***

Están considerados como los fármacos del futuro. En esencia tienen como diana una secuencia especifica del ARNm y presentan una serie de ventajas sobre los agentes farmacoterepéuticos clásicos.

1. Actúan sobre la causa de la enfermedad y no sobre el síntoma
2. Aumentan su especificidad, ya que los oligonucleótidos antisentido se hibridan con la diana en el ARN con mucha mas especificidad que un fármaco normal. Igualmente poseen una gran afinidad como consecuencia de que la suma de los puentes de hidrógeno formados entre el oligonucleótido y la secuencia de ARN supera en varios órdenes de magnitud a las fuerzas de Van der Waals que generan los fármacos clásicos en su unión con proteínas.

3. Se puede comprobar fácilmente su unión a puntos diferentes de sus dianas, ya que los oligonucleótidos anti-sentido tienen como diana una secuencia específica y unidemensional. Por ello, es posible generar secuencias de genes conocidos y comprobar la hibridación de estos oligonucleótidos. Todo ello era imposible con los fármacos clásicos, dada su interacción con estructuras proteicas tridimensionales de difícil síntesis.
4. Efectos más duraderos. La inhibición de una determinada secuencia del ARNm se produce en periodos de tiempo muchos más largos que la inhibición de la proteína que este último codificada.
5. Rápido desarrollo. Los oligonucleótidos antisentido pueden diseñarse y ensayarse mucho mas rápidamente. Así, se calcula que que utilizando librerías de compuestos químicos las posibilidades de encontrar un fármaco que se una a la diana proteica son del 0,02 %, mientras que en el caso de las librerías de oligonucleótidos, el éxito es del 10 %.

Por todo ello, hay poderosas razones para pensar que estos agentes biológicos pueden dar lugar a la aparición de futuros fármacos, aunque no hay que olvidar que determinadas preguntas como ¿Qué dosis?, ¿Cuál es la vida media ¿o ¿Cuál es la eficacia?, deben ser respondidas antes de aceptar su eficacia terapéutica.

Las aplicaciones prácticas de los oligonucleótidos antisentido, han estado limitadas por una serie de razones que no se pueden obviar, aunque algunas de ellas han sido ya solucionadas.

1. La presencia de nucleasas que pueden degradarlos rápidamente. Esto ha sido resuelto con la síntesis de compuestos con modificaciones químicas que los hacen resistentes.
2. La dificultad de hacer llegar el oligonucleótido al tejido diana en cantidades suficientes para ser beneficioso. Esta puede ser evitada mediante su aplicación local; de hecho, los oligonucleótidos antisentido inhalados (RASONs) representan una forma muy atractiva de dosificación.
3. Otro aspecto que puede limitar la obtención de olinonucleótidos antisentido, es el hecho de la especificidad de especie. Los modelos animales no son útiles para comprobar la eficacia de los

oligonucleótidos, ya que solo los primates tienen altos niveles de homología con el ADN humano.

- ***Antihistamínicos***

Los antihistamínicos son fármacos de primera elección en el tratamiento de las patologías alérgicas como la rinoconjuntivitis y la urticaria; sin embargo su papel en el tratamiento de los síntomas del asma es dudoso. Basados en los múltiples estudios de la literatura, se puede decir que los que están actualmente disponibles no son alternativa a ninguna de la terapias antiasmáticas clásicas.

Sin embargo, hay que indicar que algunas nuevas moléculas (terfenadina, fexofenadina, certirizina o loratadina) tienen propiedades antialérgicas que les permiten inhibir la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1), así como disminuir la supervivencia de eosinófilos y la liberación de radicales libres y leucotrienos.

- Existen por supuesto otras muchas posibilidades en distintos grados de desarrollo. Así, por ejemplo, se ha estudiado la actividad de los isómeros activos de agonistas ($_2$. También se ha avanzado en el desarrollo como antiasmáticos de algunos antihistamínicos de segunda generación. Los antagonistas del PAF, a pesar de la aparente implicación de este mediador lipídico en la inflamación, han dado resultados muy decepcionantes en clínica. Los inhibidores de la proteína quinasa C (PKC) tendrán que esperar hasta que se consiga un mejor conocimiento de las isoenzimas implicadas en el asma y al desarrollo de inhibidores selectivos de estas isoenzimas.
- Nos gustaría hacer referencia por último al ***conjunto de fármacos usados en el asma de difícil manejo.*** Este grupo heterogéneo constituye una alternativa para el tratamiento con corticoides en aquellos pacientes que reciben la terapia estándar y quizás puedan orientarnos sobre nuevos mecanismos de futuras terapias antiasmáticas:
  - ✓ Metotrexato: Se han propuesto diferentes razones para explicar su efecto antiinflamatorio, pero su mecanismo de acción exacto es desconocido. Tiene capacidad para inhibir la quimiotaxis de los neutrófilos y eosinófilos *in vitro*, es un inhibidor de la expresión de Ia (marcador de la activación de los macrófagos) y de la producción de IL-6, Il-8.

- ✓ Troleandomicina: Antibiótico macrólido con un efecto sinérgico al de los corticoides orales. *In vitro* ha demostrado reducir un 44 % la dosis necesaria de metilprednisolona para inhibir en un 50% la proliferación linfocitaria. El mecanismo no está claro, pero se postula que actúa a nivel farmacocinético, por una reducción del metabolismo hepático y la excreción, lo cual conllevaría un aumento de la biodisponibilidad del corticoide.
- ✓ Sales de oro: Aunque su mecanismo de acción es desconocido se han utilizado para diferentes procesos inflamatorios y autoinmunes. Se ha demostrado que disminuyen la fagocitosis de neutrófilos y macrófagos, inactivan C1, disminuyen la producción de leucotrienos, prostaglandinas y la liberación de histamina de basófilos y mastocitos. Tienen un efecto apoptótico sobre los eosinófilos cuya supervivencia ha sido aumentada con IL-5.
- ✓ Ciclosporina: Fármaco reconocido como inmunomodulador y antiinflamatorio que ha sido usado ampliamente en el asma corticoide-resistente. Tiene capacidad para reducir la síntesis y la liberación de mediadores de la inflamación de mastocitos y basófilos y de Huye por los linfocitos B. La ciclosporina reduce la síntesis de IL-1, TNFα, súperóxido y agua oxigenada, la quimiotaxis, y el receptor de la IL-2. Tiene un efecto apoptótico sobre los eosinófilos cuya supervivencia ha sido aumentada.
- ✓ IVIG: Ha demostrado disminuir la cantidad de IgE total en sangre, la activación y proliferación de linfocitos y la producción de IL-2 e IL-4.
- ✓ Heparina: Inhibe diferentes mediadores de la inflamación y sustancias citotóxicas como la proteína catiónica eosinofílica y las peroxidasas. También aumenta la producción del inhibidor de proteasa por parte del neutrófilo y disminuye la activación linfocitaria, la quimiotaxis neutrofílica y el crecimiento del músculo liso.
- ✓ Furosemida: Es un diurético que no actúa sobre el asma de forma sistémica y es necesario administrarla por vía inhalatoria a altas dosis para observar el efecto antiasmático. *In vitro* se ha sugerido que atenúa la bronconstricción por la reducción de la actividad del canal de cloro apical de las células epiteliales. Esta misma acción

sería la responsable de la inhibición de la liberación de mediadores por parte de los eosinófilos y del efecto modulador sobre la liberación de neoropéptidos en la terminaciones no adrenérgicas y no colinérgicas de tipo sensitivo. El efecto de la furosemida sobre la síntesis de prostaglandinas permanece en controversia. Así, se ha propuesto que furosemida produce una estimulación de la síntesis de prostaglandinas inhibitorias en el epitelio de vías aéreas. Otros datos sugieren que lo que produce es la inhibición de la síntesis de prostaglandinas broncoconstrictoras.

2. FÁRMACOS ANTI EPOC

El término «enfermedad pulmonar obstructiva crónica» (EPOC) fue acuñado para designar el espacio común correspondiente a diversas patologías respiratorias crónicas caracterizado por una disminución progresiva y frecuentemente irreversible del VEMS. Este aspecto le diferencia marcadamente del asma, donde la obstrucción aérea es reversible. La limitación u obstrucción del flujo aéreo se acompaña de tos, producción de esputo (hipersecreción de moco), disnea, y empeoramiento del intercambio gaseoso. A esta situación clínica común abocan patologías tan diversas como la bronquitis crónica, el enfisema, o el mismo asma, que *strictu sensu* no deben ser confundidas con la EPOC propiamente dicha. La definición de **bronquitis crónica** es puramente clínica y consiste en la presencia de tos y expectoración durante más de tres meses al año, al menos dos años consecutivos.

Desde el punto de vista epidemiológico, la prevalencia de EPOC es, en pacientes comprendidos entre 40-69 años, de aproximadamente el 11%. Existe una tendencia alcista evidente en su prevalencia, y también en las tasas de morbimortalidad. En España, la EPOC representa la cuarta causa de mortalidad, con una tasa global de 33/100.000 habitantes que aumenta a 176/100.000 habitantes en poblaciones de más de 75 años. De hecho, según datos de la OMS, se ha calculado que la EPOC será la tercera causa de mortalidad mundial para el 2020, y ocupará el 5.º lugar en causas de morbilidad. Nos encontramos por tanto frente a un problema clínico relevante, con importantes repercusiones socioeconómicas, que merece todo el interés de profesionales y autoridades sanitarias.

Prácticamente todos los casos de EPOC están asociados al consumo de tabaco, si bien sólo el 15-20% de los fumadores desarrollan esta patología debido a diferencias en susceptibilidad de naturaleza aún desconocida. Otros factores de riesgo son: contaminación atmosférica, exposición laboral a determinados agentes pulverulentos, factores genéticos (déficit de α_1-antitripsina; enfisema familiar), antecedentes de neumopatías pediátricas, hiperreactividad bronquial y atopia.

Una vez establecido el diagnóstico de EPOC, el pronóstico de estos pacientes dependerá sobre todo del grado de obstrucción al flujo aéreo y del abandono del consumo de tabaco. La evolución o historia natural de la EPOC sigue un curso lento, pero inexorable, en el que pueden sobrevenir episodios de exacerbación, con desarrollo de insuficiencia respiratoria e hipercapnia, potencialmente graves, incluso mortales, que constituyen por tanto una emergencia médica potencial.

Desde el punto de vista funcional, la EPOC se define por un aumento de la resistencia al flujo aéreo al que contribuyen: (1) disminución de la luz bronquial por engrosamiento de la pared; (2) contracción de la musculatura lisa de las vías aéreas; y (3) pérdida de elasticidad del parénquima pulmonar. Se considera plausible que el proceso de deterioro se inicia por el daño epitelial e inflamación bronquiolar causados por el humo del tabaco como sugieren los estudios anatomopatológicos. La liberación de mediadores a partir de células epiteliales, así como la inflamación neurogénica causada por la exposición de terminaciones nerviosas aferentes, desencadena un círculo vicioso que conduce a la inflamación crónica con hipertrofia/hiperplasia del músculo liso, fibrosis de la pared de las vías aéreas, y destrucción de los tabiques alveolares (enfisema centrolobulillar). En la actualidad se hace énfasis en la importancia patogénica del daño causado por radicales libres de oxígeno presentes en el humo del tabaco o liberados por macrófagos activados y otras células inflamatorias. Estas especies reactivas de oxígeno inactivan la α_1-antitripsina (favorecen así el daño tisular por elastasa), causan peroxidación lipídica, daño a proteínas y el ADN, activación del factor nuclear-$\kappa\beta$, y comprometen diversos mecanismos de defensa. En este sentido, en la EPOC existiría un imbalance entre el estrés oxidativo celular y las defensas antioxidantes endógenas. A diferencia del asma, las células inflamatorias que parecen ejercer un papel dominante en la EPOC son los neutrófilos, los linfocitos CD8+, los macrófagos y las células epiteliales de las vías aéreas.

La patogenia y fisiopatología de la EPOC sólo son parcialmente conocidas. En la actualidad se hace énfasis en la importancia del estrés oxidativo en la EPOC. El arsenal terapéutico empleado para su tratamiento es compartido casi en su totalidad con el utilizado para el tratamiento del asma con matizaciones bien conocidas, como el menor papel de los corticoides. Sin embargo, como indicamos antes, la investigación farmacológica en EPOC tiene ahora una gran actualidad como demuestra la serie de revisiones recientemente aparecidas. A título de sumario podríamos resaltar algunas posibilidades de futuro, sin pretensiones de exhaustividad:

- ***Inhibidores del PDE4 (ver el apartado correspondiente)***

Los inhibidores de PDE4 tienen un efecto inhibidor sobre varias células inflamatorias implicadas en la EPOC: neutrófilos, macrófagos, linfocitos T CD8+ y células epiteliales. El cilomilast y roflumilast han demostrado que mejoran la función pulmonar y los síntomas en pacientes con EPOC, aunque su uso en clínica puede estar limitado por la aparición de nauseas o dolor de cabeza. Intentos de encontrar nuevos PED IV con menos efectos adversos están siendo realizados por diferentes compañías farmacéuticas.

- ***Antioxidantes (N-acetilcisteína, análogos de glutatión, vitaminas E y C, nitronas)***

El estrés oxidativo es un componente muy importante de la EPOC y se ha podido determinar la existencia de altos niveles de marcadores de estrés oxidativo en el aire exhalado de los pacientes con EPOC.

- ***Antagonistas de leucotrieno B_4 (SB 201146, LY 29311 y otros)***
- ***Inhibidores de IL-8 (inhibidores de síntesis de IL-8 y antagonistas del receptor CXC) e IL-10***
- ***Inhibidores del factor de transcripción NFκB***
- ***Inhibidores de TNFα (anticuerpos monoclonales, inhibidores de TNF-convertasa)***
- ***Antibióticos macrólidos (eritromicina, claritromicina, roxitromicina). En concreto, resultaría atractivo la síntesis de nuevos macrólidos que disocien la actividad anti-inflamatoria de la antimicrobiana.***

2. FÁRMACOS ANTITUSÍGENOS

La tos es un acto reflejo con una función protectora tendente a evitar el bloqueo mecánico de las vías respiratorias. El reflejo de la tos genera altos flujos espiratorios (como 'espiración explosiva' ha sido calificada la tos en algunos textos clínicos) y, por tanto, facilita el aclaramiento de patógenos inhalados, aeroalérgenos, irritantes y materia particulada (humo, polvo o contaminantes atmosféricos), secreciones mucosas respiratorias, material aspirado (v.g. de contenido gástrico), y cuerpos extraños, protegiendo así las vías aéreas del daño mucosal. Un reflejo tusígeno insuficiente favorece la infección pulmonar. Por tanto, la tos juega un papel integral en la defensa inmunitaria, ayuda a mantener la vía aérea patente y preserva el intercambio gaseoso. Sin embargo, la ausencia de teleonomía de esta función se hace evidente cuanto la tos excede la mera necesidad de expulsar partículas o secreciones, convirtiéndose por su frecuencia, severidad o duración en una fuente de patología (trastorno del estado general, insomnio, dolor, e incluso neumotórax y problemas cardiovasculares) que exige tratamiento.

No existe un estímulo tusígeno específico, ni un tipo específico de receptor cuya activación esté vinculada o sea desencadenante de la tos. El reflejo de la tos se inicia por estímulos irritantes de fibras nerviosas sensoriales con terminales sobre todo en la mucosa de laringe, tráquea, y bronquios extrapulmonares, siendo estos estímulos aferentes vehiculados principalmente por el nervio neumogástrico, también denominado nervio vago (décimo par craneal). La contribución de otros nervios (trigémino, glosofaríngeo, y laríngeo superior) como portadores de estímulos aferentes también se ha demostrado. Al menos dos tipos distintos de fibras sensoriales vagales pueden iniciar el reflejo tusígeno. Un tipo de fibra se caracteriza por su bajo umbral mecanosensor que se adapta rápidamente a un estímulo mecánico supraumbral constituyendo así los 'receptores de adaptación rápida'. Estas fibras mielinizadas conducen potenciales de acción en el rango Aδ. Probablemente se trate de los 'receptores de la tos' primarios. Los otros tipos de fibras son las capsaicina-sensibles, difíciles de estimular mecánicamente pero sensibles a algunos mediadores inflamatorios y a los agonistas de los receptores vaniloides tipo 1 (VR1) como la mencionada capsaicina. Estas fibras son análogas a las somatosensoriales, caracterizadas como nociceptivas. Aunque algunas de estas fibras

conducen potenciales de acción en el rango Aδ, otras no son mielinizadas y conducen potenciales de acción en el rango C (< 1 m s^{-1}). Aunque se ha discutido el papel de las fibras C aferentes broncopulmonares para evocar el reflejo tusígeno, su estimulación produce broncoconstricción e hipersecreción de moco, y por tanto se encuentran directa o indirectamente implicadas en el reflejo de la tos. Estas aferencias se integran en un centro nervioso, el centro de la tos, situado en el bulbo raquídeo, de identidad aún no bien definida, pero al parecer independiente del centro respiratorio. Una diversidad de vías eferentes (nervio laríngeo recurrente, nervios espinales) articulan una compleja respuesta muscular (músculos espiratorios torácicos y abdominales, glotis, broncoconstricción) que constituye el acto de la tos, así como la posibilidad de su reiteración inmediata, el «acceso de tos» o tos paroxística. Por tanto, la tos consta de tres fases en secuencia o consecutivas: 1) inspiración profunda, 2) compresión con aumento de presión intratorácia (contracción de músculos espiratorios contra glotis cerrada y relajación diafragmática) y 3) expulsión dinámica con glotis abierta y alto flujo espiratorio (>12 L s^{-1}).

Atendiendo a su patocronia, la tos puede dividirse en aguda y crónica. La tos aguda se debe generalmente a infecciones virales del tracto respiratorio (especialmente el resfriado común) y también a sinusitis bacteriana aguda y pertusis, aunque puede también deberse a patologías más graves (neumonía, embolia pulmonar, e insuficiencia cardíaca congestiva). La tos aguda es generalmente benigna y autolimitada y, con frecuencia, no precisa o no se busca atención o ayuda médica, pero su importancia se manifiesta en el importante consumo de automedicación que asciende a cifras económicas muy elevadas en los países desarrollados.

La tos crónica es la que dura más de diez días, más de tres semanas o más de ocho semanas, según diferentes autores. Las tres causas más comunes de tos crónica son: (i) la patología asmática y la EPOC, (ii) la enfermedad gastroesofágica incluido el reflujo, y (iii) el síndrome de rinitis y goteo postnasal (tos asociada a rinitis y sinusitis). Debe también recordarse la tos postviral que puede persistir durante meses tras una infección aguda del tracto respiratorio superior. Asímismo, las neoplasias infiltrantes de la pared bronquial (v.g. carcinoma broncogénico) o el tumor carcinoide, la infiltración granulomatosa de las vías aéreas (sarcoidosis endobronquial, tuberculosis), la compresión de las vías aéreas por nodos

linfáticos, tumores mediastínicos o aneurisma de aorta, las neumopatías intersticiales, la neumonía, y los abscesos pulmonares son también causantes de tos, así como la insuficiencia cardiaca congestiva. Finalmente, existe una tos crónica que aparece en el 5 a 20% de los pacientes entre una semana y seis meses de recibir tratamiento antihipertensivo con inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina II (no ocurre con los antagonistas del receptor de angiotensina II), relacionada con la elevación de péptidos bioactivos como sustancia P y bradiquinina, que son también sustratos de la enzima conversora de angiotensina.

De hecho la tos es uno de los síntomas más comunes por los que el paciente busca atención médica (su prevalencia oscila entre el 5 y el 40%), y los antitusígenos son una de las clases terapéuticas más ampliamente utilizadas en clínica.

Finalmente, es importante recordar que además de su característica de acto reflejo, la tos puede tener también el carácter de acto voluntario. Existe efectivamente un control voluntario o consciente de la tos que se ejerce mediante la influencia superior del cortex cerebral sobre el acto reflejo articulado a nivel del tronco cerebral.

Los fármacos antitusígenos han sido objeto de revisiones exhaustivas siendo escasas las aportaciones recientes. Clásicamente, los fármacos antitusígenos se clasifican como de *acción central* (depresión del centro de la tos) y de *acción periférica* (extra-SNC). Sin embargo, los denominados antitusígenos periféricos o al menos algunos de ellos, están dotados de actividad anestésica local y tienen un componente central en su mecanismo de acción antitusiva.

El mecanismo de acción de los fármacos antitusígenos dista de ser conocido con precisión. Así, continúa ignorándose el mecanismo exacto de la acción antitusígena de la codeína, fármaco prototipo, ampliamente estudiado y usado durante más de un siglo. El hecho de que la naloxona bloquee la actividad antitusígena de la codeína sugiere la participación de receptores opioides. Por otro lado, se ha demostrado, mediante estudios de fijación, la existencia de sitios de unión de alta afinidad para dextrometorfano en varias regiones del cerebro, sitios de unión que no se bloquean con naloxona. Estos sitios de unión no parecen estar relacionados con la actividad antagonista de receptores NMDA descrita para dextrometrofano. Otros antitusivos como carbetapentano y caramifeno, se unen

también a este sitio, mientras que codeína y otros opioides antitusivos como levopropoxifeno, no se fijan en este mismo sitio de unión. También la noscapina parece disponer de sitios de fijación distintos. En consecuencia, la acción central antitusígena de codeína y dextrometorfano, así como la de otros antitusígenos centrales, podría tener mecanismos diferentes aún no esclarecidos.

Los estudios en animales de laboratorio y la investigación clínica con tos provocada han proporcionado un número elevado de fármacos de interés potencial, aunque la capacidad de estas técnicas para predecir la eficacia terapéutica de un producto es cuestionable. Por otro lado, los ensayos clínicos deben tener en cuenta el componente subjetivo de la tos y su difícil cuantificación. No es pues extraño que nos encontremos con una diversidad de fármacos etiquetados y comercializados como antitusígenos, de los que pocos han demostrado su eficacia en ensayos clínicos controlados.

No parece que se puedan incorporar al arsenal terapéutico nuevos antitusígenos basados en mecanismos de acción innovadores en un plazo de tiempo corto. Los fármacos antagonistas de los receptores opioides de tipo δ (subtipo δ_1) producen un efecto antitusivo potente en pruebas experimentales, al parecer relacionado con la modulación intracelular de calcio y debido a su acción central, aunque no hay productos en desarrollo clínico.

La nociceptina (orfanina FQ) es un péptido ligando endógeno del receptor 'tipo-opioide' NOP_1 (previamente denominado ORL_1). Estos receptores NOP_1 se localizan en vías aéreas pulmonares y están relacionados con la inhibición de liberación de taquicininas por fibras C en el pulmón y con una menor respuesta a estímulos tusígenos. Su acción antitusiva potencial sería, por tanto, de tipo periférico aunque podría añadirse un componente central. También es posible que se desarrollen antagonistas de neuroquininas con actividad antitusígena.

4. FÁRMACOS MUCOLÍTICOS

El moco de las vías respiratorias parece mayoritariamente el producto de dos genes de mucina el MUC5AC y el MUC5B. Estos genes codifican apoproteínas que luego son intensamente glicosiladas dando lugar a las glicoproteínas maduras o mucinas, de alto peso molecular, que otor-

gan al moco sus características propiedades tipo gel. Estas mucinas se encuentran almacenadas en gránulos de células caliciformes (*goblet cells*) listos para su rápida secreción para proteger al epitelio de agresiones externas. Las células caliciformes secretan principalmente MUC5AC y las células mucosas de las glándulas submucosas secretan principalmente MUC5B. Las células caliciformes y las glándulas submucosas se encuentran localizadas sobre todo en las vías aéreas centrales y se hacen cada vez menos frecuentes al disminuir el diámetro de estas vías hasta desaparecer. En patologías respiratorias crónicas puede darse una hipertrofia de glándulas submucosas y una hiperplasia de células caliciformes detectadas además en las vías aéreas más periféricas, con aparición de metaplasia de células epitaliales hacia células caliciformes.

La hipersecreción crónica de moco es una característica importante de algunas enfermedades respiratorias crónicas como la EPOC, incluyendo la bronquitis crónica y la bronquiectasia, la fibrosis quística y el mismo asma bronquial. Además, estos estados hipersecretorios pueden incrementar la frecuencia y duración de infecciones respiratorias, exacerbaciones que pueden requerir la hospitalización, y en consecuencia un incremento de la morbimortalidad.

La mayor parte de la obstrucción de vías aéreas en bronquitis crónica y asma sucede en aquéllas aéreas pequeñas donde se encuentran células caliciformes pero no glándulas submucosas. En el ser humano, a diferencia de otras especies animales, la secreción de células caliciformes está regulada por factores no neuronales quedando la regulación neuronal limitada a las glándulas submucosas. La presencia de infecciones o de factores inflamatorios en las vías aéreas que den lugar a la entrada de células inflamatorias y a fenónemos de daño y destrucción celular también pueden ocasionar un aumento en la viscosidad del moco por la presencia de cantidades elevadas de ADN. Por tanto, estrategias terapéuticas que reduzcan la infiltración y activación de las células inflamatorias darán como resultado una disminución de la secreción de moco y eventualmente también de su viscosidad.

Recientemente se han realizado varios intentos de clasificaciones sistemáticas de los fármacos activos sobre el moco respiratorio, aunque en la práctica es suficiente referimos a ellos como expectorantes y mucolíticos. Los *expectorantes* debieran estimular los mecanismos de expulsión del moco, bien incrementando el movimiento ciliar que traslada la secreción

hacia la faringe donde es eliminado por la expectoración o deglutido, o aumentando el reflejo tusígeno. También para algunos, los expectorantes son los fármacos que provocan un aumento de la secreción, sobre todo del volumen hídrico de la misma, facilitando así su expulsión, ya que el contenido de agua es determinante de la viscoelasticidad del moco. Los *mucolíticos* afectan a las características físico-químicas del moco (v.g. disminuyen su viscosidad), de modo que se facilita la expectoración. Sin embargo, un fármaco puede disminuir la viscosidad del moco *in vitro* y resultar de escasa utilidad *in vivo,* porque no aumenta el aclaramiento ni mejora la función pulmonar. Otros términos como fluidificantes, balsámicos, mucorreguladores, mucocinéticos, etc., son prescindibles o bien carecen de una base farmacológica inequívoca. En la práctica, la distinción entre estos fármacos es difícil y por ello suelen ser estudiados en conjunto.

El número de fármacos a los que se atribuye actividad enmarcable dentro de este objetivo terapéutico es muy elevado. Existen grandes dificultades metodológicas para la evaluación clínica de estos fármacos, y de hecho su eficacia, aunque puede existir, no es fácil de demostrar de manera categórica.

Al menos tres estrategias nuevas se encuentran en desarrollo clínico, la modulación de los receptores $P2Y_2$, el uso de anticolinérgicos, y el de agonistas de receptores dopaminérgicos D_2. Los nucleótido-trifosfato ATP y UTP estimulan la secreción de moco por activación de receptores $P2Y_2$. No se dispone de antagonistas selectivos para demostrar su papel, ni tampoco sabemos si se modifican los niveles de estos nucleótidos en la enfermedad. Quizá la elevada concentración de ATP en el interior celular pueda hacer que se libere por irritación o necrosis y aumente notablemente en el líquido extracelular, produciendo así una mayor secreción de moco. Los fármacos agonistas de este receptor pueden, en consecuencia, resultar beneficiosos en bronquitis moderada a pesar de que aumentaría la secreción de moco, lo que no está claro. Sin embargo es un receptor con potencial pro-inflamatorio ya que estimula la liberación de elastasa de los neutrófilos y favorece la generación de especies reactivas de oxígeno. Alternativamente, se podría estudiar la actividad de fármacos antagonistas o moduladores de este receptor.

La reciente introducción del antimuscarínico de larga duración de acción, tiotropio, con selectividad cinética por receptores M_3, permitirá conocer su posible incidencia en la secreción de moco, como un valor añadido a su actividad broncodilatadora.

Finalmente, se han estudiado en clínica, agonistas duales de receptores dopaminérgicos D_2 y de β_2-adrenérgicos. La activación de los receptores D_2 puede inhibir a nivel presináptico la liberación de neurotransmisores secretores (v.g. acetilcolina) inhibiendo así la secreción de moco. Algunos datos de ensayos clínicos en fase II son alentadores en el sentido de reducir la secreción de moco, pero el fármaco mejor estudiado, viozan, ha sido abandonado recientemente a pesar de haber alcanzado la fase III para su aplicación en la EPOC.

5. TERAPIA INHALADA

En la terapéutica de las enfermedades pulmonares caracterizadas por la obstrucción del flujo aéreo (asma y EPOC) es muy importante la vía de administración del fármaco. La preferencia de la terapia inhalada frente a otras vías de administración, es fácil de comprender cuando recordamos que la administración sistémica requiere altas dosis que afectan a todo el sistema, para conseguir una concentración moderada de fármaco en los órganos diana. Ésto lleva consigo la aparición de efectos secundarios en otros órganos y la eliminación de gran parte de la dosis empleada. Sin embargo, la administración local de un fármaco, en este caso por vía inhalada, consigue con menores dosis una mayor concentración de fármaco en los órganos diana, pasando menos cantidad de fármaco a la circulación sistémica y produciéndose menos efectos secundarios y eliminación de fármaco.

El acceso del fármaco a la vía aérea se ve afectado por distintos aspectos:

1. **Características del propio fármaco**: Partículas entre 2 y 6 micras son capaces de alcanzar las vías aéreas intrapulmonares; las de mayor tamaño se depositan en la orofaringe y la vía aérea superior, mientras que las menores de 1 micra son exhaladas con el aire expirado.
2. **El flujo aéreo**: Un flujo inspiratorio lento y constante es la condición para mantener las partículas de fármacos en suspensión en la corriente aérea y, por tanto, facilitar su depósito pulmonar. Un flujo alto provoca turbulencias que facilitan la impactación de las partículas en las ramificaciones de la vía aérea. La llegada de par-

tículas a las vías aéreas periféricas es mayor a mayor volumen inspirado y con inspiración más lenta. La realización de una apnea postinspiratoria (10 segundos) favorece el depósito del fármaco en las vías aérea periféricas.

3. **Calibre de la vía aérea**: Cuanto mayor es el grado de obstrucción bronquial, mayor es el deposito en las vías aéreas centrales que en las periféricas.

Sin embargo hay que recordar que la cantidad de fármaco que llega a la vía aérea es pequeña, ya que el depósito pulmonar es menor del 20 % de la dosis administrada y el otro 80 % se deposita en la faringe y la laringe, se absorbe por vía digestiva y produce efectos sistémicos. Dependiendo del dispositivo empleado: nebulizadores, cartuchos presurizados de dosis controlada, dispositivos espaciadores e inhaladores de polvo seco y de la correcta cumplimentación por el paciente de las instrucciones de manejo del equipo.

Todo esto hace necesario asegurar la máxima eficacia en el diseño y sencillez en las instrucciones de uso de los equipos de administración de fármacos por vía inhalatoria. Por ello, hemos considerado necesario hacer una sucinta referencia a estos dispositivos galénicos.

Desde su introducción en 1956, el cartucho presurizado de dosis controlada ha sido el sistema de elección para la terapia inhalada. En este dispositivo el fármaco micronizado está acompañado de propelentes como los clorofluorocarbonos (CFC) presurizados a 2 ó 3 atmósferas. Una vez mezclados, por agitación previa, ambos componentes forman una suspensión que se libera de forma uniforme y dosificada al actuar una válvula dosificadora colocada en la salida. En la actualidad existe el convencimiento de la necesidad de reemplazar los CFC como consecuencia del daño causado a la capa de ozono de la estratosfera, siendo el año 2005 la fecha límite aceptada por un acuerdo internacional.

Existe una alternativa para los CFC y es que es posible reformular los cartuchos presurizados con gases propelentes de tipo hidrofluoroalacanos (HFA) [HFA-134.ª; HFA-227]. Estos compuestos no dañan la capa de ozono, pero sí que participan en la génesis del cambio climático al impedir la disipación del calor producido por la vida en el mundo [1.5-5.8 ºC para el 2100]. Aunque estos compuestos son menos potentes que el

dióxido de carbono para producir este efecto impermeabilizante al calor, tienen una permanencia en la atmósfera 2000 veces mayor. En suma, estos gases no van a representar una solución segura y segura y deberán someterse a legislaciones restrictivas en los próximos años.

A pesar de esta «mala situación» para los cartuchos presurizados con gases CFC o HFA, se han ofertado al mercado farmacéutico nuevos dispositivos como el *Autohaler*® (3M Pharmaceuticals) y el *Easi-Brethle*®, en un intento de minimizar una de las principales dificultades observadas en el uso de estos equipos «la coordinación entre la inspiración y la apertura da la válvula de dosificación«.

La mejor alternativa a estos cartuchos presurizados la constituyen los inhaladores de polvo seco Estos dispositivos se activan con la inspiración del paciente al hacer pasar el aire a través del fármaco disponible en polvo seco, con ello se evita la necesidad de coordinación del cartucho presurizado y la destrucción de la capa de ozono por los clorofluorocarbonos usados hasta el momento. El tamaño de partícula suele ser de 1 a 2 micras y la inspiración puede repetirse las veces que se quiera, pues solo se dispone de una dosis, asegurándose con ello la completa inhalación del fármaco. El principal inconveniente de estos equipos es que para inhalar estas partículas se necesitan flujos inspiratorios altos, lo cual es difícil en situaciones como son los ataques agudos de asma y EPOC, donde el paciente es incapaz de obtener suficiente fármaco de estos inhaladores.

El primer equipo utilizado fue el *Spinhaler*® (1967) de Fisons, mas tarde apareció el *Rotahaler*® de GlaxoSmithKline y el *Aerohaler* de Boehringer Ingelgheim. Tienen como principal problema el tener que cargar cada vez, que se quiere aplicar el fármaco, una cápsula de polvo seco y que su estabilidad está comprometida por las altas temperaturas y la humedad.

En la actualidad se han ido introduciendo en el mercado farmacéutico nuevos dispositivos. De ellos destacaremos las características del *Turbuhaler*® y el *Accuhaler*®**,** recomendando al lector interesado en el tema una revisión de I.J. Smith y M. Parry Billings.

- *Turbuhaler*®*:* Se utiliza para fármacos como budesonida o terbutalina. El sistema dispone de 200 dosis, que se cargan con un solo giro de la base del aparato. Para su correcto uso se requiere un flujo inspiratorio alto, superior a 1 litro/seg. Con él se provoca una

impactación orofaríngea similar a la obtenida con los cartuchos presurizados (80 %).

- *Accuhaler*®**:** El sistema dispone de 60 dosis y de un marcador de dosis utilizadas. Requiere un flujo inspiratorio algo menor que el anterior. El salmeterol es uno de los fármacos que se administra por en este sistema.

BIBLIOGRAFÍA

Barnes, P.J. (1998) Chronic obstructive pulmonary disease: New opportunities for drug development. Trends Pharmacol. Sci. 19: 415-423.

Barnes, P.J. (1999) Strategies for novel COPD therapies. Pulm. Pharmacol. Ther. 12: 67-71.

Barnes, P.J. (2002) New treatments for COPD. Nature Rev. Drug Discov. 1: 437-446.

Barnes, P.J. (2000) The pharmacological properties of tiotropium. Chest 117: 63S-66S.

Barnes, P.J. (2002) New treatments for COPD. Nature Rev. Drug Discov. 1: 437-446.

Barnes, P.J. (2003) Therapy of chronic obstructive pulmonary disease. Pharmacol. Ther. 97: 87-94.

Cortijo, J., Bou, J., Beleta, J., *et al*. (1993) Investigation into the role of phosphodiesterase IV in bronchorelaxation, including studies with human bronchus. Br. J. Pharmacol. 108: 562-568.

Cortijo, J., Marti-Cabrera, M., Berto, L., *et al*. (1997) Pharmacological activity of PF-904 in guinea pig in vivo, and on human bronchus and neutrophils in vitro. Eur. J. Pharmacol. 333: 69-78.

Cortijo, J., Naline, E., Ortiz, J.L., *et al*. (1998) Effects of fenspiride on human bronchial cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes: functional and biochemical study. Eur. J. Pharmacol. 341: 79-86.

Cortijo, J., Pons, R., Dasi, F., *et al*. (1997) Bronchodilator and anti-inflammatory activities of SCA40: studies in human isolated bronchus, human eosinophils, and in the guinea-pig in vivo. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 356: 806-814.

Cortijo, J., Villagrasa, V., Navarrete, C., *et al*. (1996) Effects of SCA40 on human isolated bronchus and human polymorphonuclear leukocytes: comparison with rolipram, SKF94120 and levcromakalim. Br. J. Pharmacol. 119: 99-106.

Cortijo, J., Villagrasa, V., Pons, R., *et al*. (1999) Bronchodilator and anti-inflammatory activities of glaucine: In vitro studies in human airway smooth muscle and polymorphonuclear leukocytes. Br. J. Pharmacol. 127: 1641-1651.

Cortijo, J., Morcillo, E.J. (2004) Broncodilatadores y anti-inflamatorios en asma y EPOC. En: Farmacología y su Proyección a la Clínica. Lorenzo, P., Moreno, A., Leza, J.C., Lizasoain, I., Moro, M.A. (17.ª Ed). Madrid: Editorial Panamericana. (En prensa).

Davis, C.W., Abdullah, L.H. (1997) In vitro models for airways mucin secretion. Pulm. Pharmacol. Ther. 10: 145-155.

Fozard JA, Rabe KF, Schudt C, and several authors. (1998) New drugs for asthma, 4th International Conference in Konstanz, Germany, 23-25 July, 1998. Pulm. Pharmacol. Ther. 12: 61-144.

Grandjean, E.M., Berthet, P., Ruffmann, R., *et al*. (2000) Efficacy of oral long-term N-acetylcysteine in chronic bronchopulmonary disease: a meta-analysis of published double-blind, placebo-controlled clinical trials. Clin. Ther. 22: 209-221.

Karlsson, J.A., Fuller, R.W. (1999) Pharmacological Regulation of the Cough Reflex —from experimental models to antitussive effects in man. Pulm. Pharmacol. Ther. 12: 215-228.

Li, L., Das, A.M., Torphy, T.J., *et al*. (2002) What´s in the pipeline? Prospects for monoclonal antibodies (mAbs) as the therapies for lung diseases. Pulm. Pharmacol. Ther. 15: 409-416.

Jackson, A.D. (2001) Airway goblet-cell mucus secretion. Trends Pharmacol. Sci. 22: 39-45.

Jarvis, B., Markham. A. (2000) Montelukast: a review of its therapeutic potential in persistent asthma. Drugs 59: 891-298.

Miyata, T., Kai, H., Isohama, Y., *et al*. (1998) Current opinion of muco-active drug research: strategies and problems. Eur. Respir. J. 11: 480-491.

Morcillo, E.J., Estrela, J., Cortijo, J. (1999) Oxidative stress and pulmonary inflammation: pharmacological intervention with antioxidants (review). Pharmacol. Res. 40: 393-404.

Morcillo, E.J., Cortijo, J. (2004) Antitusígenos, expectorantes y mucolíticos. En: Farmacología y su proyección a la clínica. Lorenzo, P., Moreno, A., Leza, J.C., Lizasoain, I., Moro, M.A. (17.ª Ed). Madrid: Editorial Panamericana (En prensa).

Morcillo, E.J., Cortijo, J. (2000) Antiasmáticos y broncodilatadores. 7 Días Médicos N.º Especial/50-56 (21 de enero).

Niven, A.S., Argyros, G. (2003) Alternate treatments in asthma. Chest 123: 1254-1265.

Ortiz, J.L., Cortijo, J., Valles, J.M., *et al*. (1992) Rolipram inhibits PAF-induced airway microvascular leakage in guinea-pig: a comparison with milrinone and theophylline. Fund. Clin. Pharmacol. 6: 247-249.

Ortiz, J.L., Valles, J.M., Marti-Cabrera, M., *et al*. (1996) Effects of selective phosphodiesterase inhibitors on platelet-activating factor- and antigen-induced airway hyperreactivity, eosinophil accumulation, and microvascular leakage in guinea pigs. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 353: 200-206.

Owen, C.E. (2002) Anti-immunoglobulin E. Therapy for asma. Pulm. Pharmacol. Ther. 15: 417-424.

Page, C.P. (1999) Recent advances in our understanding of the use of theophylline in the treatment of asthma. J. Clin. Pharmacol. 39: 237-240.

Poole, P.J., Black, P.N. (2001) Oral mucolytic drugs for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: systematic review. Br. Med. J. 322: 1-6.

Ríos-Santamarina, I., García-Doménech, R., Gálvez, J., *et al*. (1998) New bronchodilators selected by molecular topology. Bioorg. Med. Chem. Letter 8: 477-482.

Rogers, D.F. (1997) *In vivo* preclinical tests models for studying airway mucus secretion. Pulm. Pharmacol. Ther. 10: 121-128.

Rogers, D.F., Barnes, P.J. (1999) COPD: new developments and therapeutic opportunities. Trends Pharmacol. Sci. 20: 352-354.

Rubin, B.K. (2002) The pharmacologic approach to airway clearance: mucoactive agents. Respir. Care 47: 818-822.

Schudt, C., Gantner, F., Tenors, H., *et al*. (1999) Therapeutic potential of selective PDE inhibitors in asthma. Pulm. Pharmacol. Ther. 12: 123-9.

Smith IJ, Parry M. (2003) *The inhalers of the future? As review of dry powder devices on the market today». Pulm. Pharmacol. Ther.* 16: 79-95.

Tanaka, M., Nyce, J.W. (2001) Respirable antisense oligonucleotides : a new drug class for respiratory disease. Respir. Res. 2: 5-9.

Torphy, T.J. (1998)Phosphodiesterase isozymes. Molecular targets for novel antiasthma agents (State of the art) Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157: 351-370

Torphy, T.J., Barnette, M.S., Underwood, D.C., *et al*. (1999) Ariflo™ (SB 207499), a second generation phosphodiesterase 4 inhibitor for the treatment of asthma and COPD: from concept to clinic. Pulm. Pharmacol. Ther. 12: 131-5.

Widdicombe, J. (Guest Editor) (2002) Cough: Pharmacology and Therapy. Special Issue (2nd Intl Symposium on Cough, London, 25-27 October 2001). Pulm. Pharmacol. Ther. 15: 185-338.

Wills, P.J., Cole, P.J. (1996) Mucolytic and mucokinetic therapy. Pulm. Pharmacol. 9: 197-204.

Avances en Psicofarmacología y perspectivas de futuro

CECILIO ÁLAMO, EDUARDO CUENCA
y FRANCISCO LÓPEZ-MUÑOZ

Departamento de Farmacología.
Universidad de Alcalá (Madrid)

INTRODUCCIÓN

A finales de la década de los cuarenta del pasado siglo comienza lo que muchos autores consideran la era de la psicofarmacología moderna, en la que se empieza a tratar a los pacientes psiquiátricos desde una base científica y terapéutica racional. En 1949, John Cade publicó la eficacia antimaníaca de las sales de litio y en la década de los cincuenta tuvo lugar la introducción de los fármacos prototipos de los tres grandes grupos psicofarmacológicos, aún hoy vigentes; la clorpromazina, progenitor de los neurolépticos o antipsicóticos, la imipramina y la iproniazida, representantes de los antidepresivos tricíclicos (ADTs) e inhibidores de la monoaminooxidasa (IMAOs), respectivamente, y el clordiazepóxido, primer ansiolítico del grupo de las benzodiazepinas. Así pues, con estos fármacos asistimos al nacimiento de la denominada **«revolución psicofarmacológica»**, que influyó, de forma sustancial, en la asistencia clínica a los pacientes psiquiátricos, así como en su afrontamiento vital.

Los por entonces nuevos psicofármacos modificaron el curso de las psicosis, permitieron tratar con medicamentos las «formas menores» (neurosis) de los trastornos mentales, ampliaron la calidad de la metodología científica en investigación clínica, sobre todo en lo referente a instrumentos objetivos de medida, plantearon la necesidad de una nueva nosología, e hicieron posible el desarrollo de nuevas teorías etiopatogénicas de las patologías psiquiá-

tricas desde planteamientos neurobioquímicos. Pero, además, la «revolución psicofarmacológica» posibilitó una nueva organización asistencial, disminuyendo el número de pacientes ingresados en instituciones sanitarias y los días de hospitalización, y, como señala el profesor López-Ibor, cambió el destino de muchos enfermos, antes confinados tras los muros de manicomios. Asimismo, gracias a los psicofármacos se ha conseguido una mejor utilización y aceptación de las medidas psicoterapéuticas. Pese a que, desde entonces, se sigue haciendo una terapéutica fundamentalmente empírica, ésta ha permitido, en gran medida, ir conociendo algunas bases de las enfermedades mentales y de su tratamiento, por lo que muchas enfermedades mentales se están investigando hoy al mismo nivel que otras patologías médicas. En este sentido, en contra de lo que muchos puedan pensar, los trastornos mentales son tratables, y en la actualidad poseemos un arsenal de psicofármacos capaces de mejorar la sintomatología de múltiples cuadros psiquiátricos. De hecho, para muchos cuadros mentales poseemos un abanico de tratamientos de probada eficacia. Además, podemos considerar que un avance real aportado por los nuevos agentes farmacológicos se ha basado, más que en una diferenciación importante desde el punto de vista de eficacia terapéutica, en una mejor aceptación de la medicación por parte de los pacientes, lo que facilita la cumplimentación de la terapéutica, evita las recaídas y, además, proporciona una mejoría en su calidad de vida. Sin embargo, todos sabemos que siguen existiendo problemas en el tratamiento de estos pacientes y que las perspectivas de futuro en el campo de la psicofarmacología se encaminan al desarrollo de fármacos más eficaces, que mejoren la clínica en un mayor porcentaje de pacientes, que actúen frente a patologías resistentes a la terapéutica y que lo realicen con mayor rapidez, con mayor especificidad en sus acciones y que estén libres de efectos indeseables. Además, debemos de ser conscientes de que la eficacia psicofarmacológica se incrementa cuando la aplicamos de forma conjunta con tratamientos psicoterapéuticos y medidas sociales.

Todo lo expuesto ha hecho que la Psiquiatría haya cambiado en los últimos años y, pese a que las enfermedades mentales son reconocidas como una de las principales cargas para la sociedad, se luche contra la **estigmatización de los trastornos psiquiátricos**. Por otra parte, en los últimos años se ha realizado un enorme esfuerzo por desarrollar un lenguaje común para la psiquiatría, a través del consenso DSM (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Diseases*, de la Asociación Americana de Psiquiatría) y de la CIE (Clasificación Internacional de Enfermedades

de la Organización Mundial de la Salud-OMS), lo cual ha contribuido al progreso científico y asistencial en este campo. A continuación pasaremos a referirnos a los avances obtenidos en psicofarmacología con cada uno de los grandes grupos terapéuticos y a las perspectivas en Investigación y Desarrollo que dentro de los mismos atisbamos.

ANTIPSICÓTICOS

La **esquizofrenia**, enfermedad prototipo por excelencia de los trastornos psiquiátricos, es un trastorno mental que, según la OMS, afecta a 52 millones de personas en todo el mundo, estimándose en unos 300.000 el número de pacientes en España. Desde la perspectiva asistencial, los pacientes esquizofrénicos utilizan un 40% del tiempo hospitalario dedicado a enfermos crónicos y consumen entre un 20 a un 30% de los recursos sanitarios en salud mental de los países industrializados.

La etiopatogenia de este trastorno psiquiátrico, pese a ser desconocida, se basa en un desorden cerebral provocado, en individuos genéticamente vulnerables, por factores variables: alteraciones bioquímicas y morfofuncionales cerebrales, antecedentes de alteraciones (víricas, traumáticas, anóxicas, etc.) durante el embarazo y nacimiento, etc. Desde la perspectiva clínica, la esquizofrenia es una enfermedad crónica cuya sintomatología se suele dividir en **síntomas positivos** (alucinaciones, delirios, conductas extravagantes, etc.) y **síntomas negativos** (alogia, falta de emotividad y afectos, etc.), que configuran cuadros altamente variables entre pacientes, que suelen presentar problemas en la estructuración del pensamiento, deterioro en la capacidad para tomar decisiones y control de su emotividad y déficits en su relación con otras personas.

EFICACIA CLÍNICA DE LOS ANTIPSICÓTICOS Y PERFIL DE TOLERABILIDAD

Ventajas y limitaciones de los neurolépticos clásicos

La introducción en terapéutica de la clorpromazina en el año 1952 inauguró una nueva era en el manejo del paciente psicótico, que continuó con

la síntesis e introducción en terapéutica de una gran cantidad de agentes **neurolépticos o antipsicóticos clásicos** de diferentes familias químicas, de los que son prototipo la propia clorpromazina y el haloperidol (Tabla I). Pese al importante avance que suponen los antipsicóticos clásicos, previniendo y reduciendo la sintomatología psicótica, las ideas delirantes y paranoides, las alucinaciones, la agitación, hostilidad y agresividad, así como las conductas impulsivas y desorganizadas y mejorando la coherencia, or-

TABLA I

Clasificación y propiedades de los antipsicóticos. Dentro de los antipsicóticos clásicos, se refleja el agente prototípico

Agentes y familias	*Equivalencia*	*Sedación*	*E.E.P.*	*Hipotensión*
CLASICOS o TIPICOS				
Fenotiazinas alifáticas				
Clorpromazina	100	+++	++	+++
Fenotiazinas piperidínicas				
Tioridazina	95-108	+++	+	+++
Fenotiazinas piperazínicas				
Flufenazina	1,2-2,5	+	++++	+
Tioxantenos				
Clorprotixeno	35-75	+++	++	++
Butirofenonas				
Haloperidol	1,6-2,5	+	++++	+
Difenilbutilpiperidinas				
Pimozida	1,5	+	+++	+
Dibenzoxazepinas				
Loxapina	10-15	+	++	+
ATIPICOS				
Clozapina	60-150	+++	0	+++
Risperidona	1-2	+	0/+	+
Olanzapina	2-3	++	0/+	++
Quetiapina	50-100	++	0	++
Ziprasidona		+	0	+

La equivalencia hace referencia al efecto antipsicótico comparativo frente a clorpromazina.
EEP: síntomas extrapiramidales.

ganización del pensamiento, cooperación, decaimiento, deterioro del cuidado personal y capacidad de comunicación, éstos distan mucho de ser perfectos, y presentan una serie de **limitaciones**. En efecto, los neurolépticos clásicos poseen una eficacia parcial, más manifiesta sobre la sintomatología positiva de la esquizofrenia y en mucha menor medida sobre la sintomatología negativa, ya que entre el 20 y el 40% de los pacientes no exhiben una respuesta adecuada. Por otra parte, el 35% de los pacientes tratados con estos fármacos recae cada año, pese a no abandonar la medicación. Además, un porcentaje muy elevado de pacientes abandona la medicación debido a la presencia de efectos adversos producidos por estos agentes.

La actividad antipsicótica de los neurolépticos suele acompañarse de acciones colaterales negativas que se engloban bajo la denominación de **síndrome deficitario de los neurolépticos**, caracterizado por una afectación cognitiva, disminución de la velocidad del pensamiento, dificultad de concentración y, en casos extremos, por una alogia y pobreza del lenguaje, lo que se acompaña de un estado de apatía, de pérdida de energía, con una sensación importante de cansancio, un aplanamiento del estado de ánimo y una indiferencia afectiva, con disminución importante del rango emotivo, que se suele interpretar como una carencia de sentimientos. Asimismo, la disforia subjetiva, la anhedonia, junto con una reducción de la iniciativa y, en casos más intensos, falta de sociabilidad y disminución de la curiosidad, son síntomas que acompañan a este cuadro. Igualmente, es muy característica de los agentes clásicos la presencia de una serie de efectos neurológicos, entre los que hay que destacar, por su gran incidencia y por la relevancia terapéutica y asistencial que conllevan, los **efectos motores extrapiramidales**. Estos efectos se han considerado tradicionalmente como necesarios e inseparables de las acciones terapéuticas de los neurolépticos, pero también como un serio problema a resolver. En líneas generales, podemos dividir las reacciones extrapiramidales producidas por los antipsicóticos en reacciones agudas y reacciones producidas a largo plazo. En ambos casos, se producen síntomas motores objetivos y síntomas mentales subjetivos. Estos efectos constituyen la causa de abandono de la medicación más frecuente, lo que suele acompañarse de una recaída del paciente psicótico.

Entre las **reacciones agudas**, la ***acatisia***, que puede iniciarse a las pocas horas o a los pocos días del comienzo del tratamiento y está relaciona-

da con las concentraciones sanguíneas y cerebrales del fármaco, tiene una prevalencia aproximada de un 25%. Este cuadro presenta un componente primordial subjetivo, caracterizado por una intranquilidad motora que se acompaña de un intenso nivel de ansiedad, con la que a veces se confunde, ausencia de calma interna, incapacidad de relajarse y dificultad para concentrarse. La ***distonía aguda*** es un cuadro caracterizado por contracciones involuntarias de músculos opuestos, en el paciente consciente, que producen posturas anormales en músculos del cuello y de la cara, crisis oculogiras, protrusión de la lengua, espasmo de la mandíbula, trismus, contracciones laringo-faríngeas y tortícolis. La presentación de síntomas característicos de la enfermedad de ***Parkinson***, como el temblor, la rigidez, la bradicinesia, así como trastornos de la marcha, del lenguaje y de la escritura, se presenta en el 50% de los pacientes que reciben antipsicóticos clásicos. Pese a que los síntomas motores son los más importantes del parkinsonismo, los aspectos mentales (disminución de la actividad mental, enlentecimiento del pensamiento, bradifrenia, y alteraciones cognitivas) tienen igual importancia y pueden impedir las actividades cotidianas del sujeto.

Entre las ***reacciones extrapiramidales tardías*** que ocasionan los antipsicóticos clásicos, la más importante es la **discinesia tardía**, que es un cuadro tiempo y dosis-dependiente, que aparece después de meses o años de tratamiento neuroléptico e interfiere en la vida social del paciente y contribuye al estigma social que supone la esquizofrenia. Este cuadro se caracteriza por una discinesia bucofacial, con movimientos estereotipados, repetitivos, indoloros e involuntarios, en forma de tics en la cara, los párpados y la lengua, que pueden alterar los procesos de masticación, deglución y respiración, pudiendo haber alteraciones motoras en las extremidades o en el tronco. Estos movimientos desaparecen durante el sueño y dependen del nivel de excitación o de tensión emocional. Aproximadamente, entre el 5% y el 10% de los pacientes con más de 40 años tratados con neurolépticos clásicos acaban desarrollando una discinesia tardía, mientras que, en el caso de pacientes ancianos, este porcentaje asciende al 50-70%. La presencia de alteraciones mentales como consecuencia del cuadro son frecuentes. Todos los agentes antipsicóticos clásicos comportan un riesgo relativamente similar de producir discinesia tardía. Además, existen otros síntomas asociados con el tratamiento crónico con neurolépticos, como son la **distonía tardía** y la **acatisia tardía**, que son cuadros que recuerdan sintomatológicamente a los agudos.

Antipsicóticos atípicos: criterios de atipicidad

Habida cuenta de las limitaciones terapéuticas y la mala tolerabilidad de los neurolépticos, se ha intentado encontrar antipsicóticos con un mejor perfil clínico. En este sentido, es importante destacar que tras la reintroducción en 1990 por Kane en Estados Unidos de la clozapina, se produjo un gran interés por el descubrimiento de nuevos antipsicóticos, dotados, al menos, de la misma eficacia que los agentes clásicos, pero con una mejor tolerabilidad y una menor incidencia de extrapiramidalismos. A estos nuevos fármacos, cuyo prototipo es la clozapina, se les ha denominado **antipsicóticos atípicos**. Varios de estos agentes han sido ya introducidos en nuestro medio, como la risperidona, la olanzapina, la quetiapina y la ziprasidona (Tabla I). El principal **criterio clínico de atipicidad** se basa en una menor incidencia de efectos extrapiramidales. Además, un antipsicótico atípico debe tener mayor eficacia en la sintomatología positiva o negativa o en pacientes resistentes a los clásicos. Por último, los antipsicóticos atípicos deben poseer, respecto a los clásicos, al menos dos de los siguientes criterios clínicos: no provocar disforia subjetiva ni excesiva sedación, exhibir menos efectos cardíacos y vegetativos, no incrementar los niveles de prolactina ni alterar otras constantes endocrinológicas, no aumentar el peso ni inducir disfunción sexual. Obviamente, no existe ningún antipsicótico atípico que cubra todos estos criterios, por lo que podemos considerar que atípico no es sinónimo de idóneo y, por tanto, debemos seguir en la investigación para conseguir mejores antipsicóticos.

En relación con los nuevos antipsicóticos atípicos, hemos de señalar que reducen la confusión y la agitación en los pacientes psicóticos y mejoran la actividad psicomotora y la afectación conductual y cognitiva. Además, de acuerdo con el criterio principal de atipicidad, la menor **incidencia de extrapiramidalismos**, es el argumento diferencial más importante entre neurolépticos y agentes atípicos. En este sentido, en un reciente metaanálisis entre neurolépticos (haloperidol o clorpromazina) frente a antipsicóticos atípicos, se comprobó que éstos producen menos extrapiramidalismos que los agentes clásicos, siendo la diferencia menor cuando el haloperidol se administró a dosis inferiores a 12 mg/día. Los autores señalan que los agentes atípicos deben reservarse sólo para pacientes con riesgo de efectos extrapiramidales. Sin embargo, esta con-

clusión no es compartida por otros autores, ya que cuando se estudian ensayos clínicos a largo plazo, hasta 12 semanas o más prolongados, se observa que la necesidad de medicación antiparkinsoniana, la frecuencia de extrapiramidalismos y el abandono de la medicación por esta causa es mayor para el haloperidol, incluso a dosis bajas, que para los antipsicóticos atípicos.

Con respecto a la **eficacia**, segundo criterio de atipicidad, los agentes atípicos, como olanzapina o risperidona, sobre todo en los estudios realizados a medio-largo plazo, muestran diferencias significativas en la reducción del riesgo de recaídas, la necesidad de hospitalización, la reducción de síntomas positivos y de ansiedad y en la tolerancia, respecto al haloperidol. La eficacia en la sintomatología negativa, si bien es difícil de demostrar por la dificultades de metodología clínica específica para evaluarla, es aceptada para clozapina y se ha puesto de manifiesto, de forma modesta, en estudios con risperidona u olanzapina frente a haloperidol, el cual parece empeorarla, especialmente cuando se emplean dosis elevadas. Por otra parte, parece demostrado que los antipsicóticos atípicos, fundamentalmente la risperidona y la olanzapina, que han sido los mejor estudiados en este sentido, mejoran la depresión ansiosa presente en algunos pacientes con esquizofrenia. Algo similar ha sido observado en los pacientes tratados con clozapina, olanzapina o risperidona, en lo referente a una mejoría de la capacidad cognitiva.

MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS

Antipsicóticos clásicos y atípicos: perfil receptorial y farmacología clínica

El término atípico no es sinónimo de idóneo y algunos de estos agentes tras un uso clínico amplio han empezado a mostrar un perfil de efectos adversos diferencial. Los antipsicóticos son agentes capaces de actuar sobre múltiples receptores (Tabla II), por lo que se les ha considerado como fármacos bioquímicamente poco limpios, lo que está relacionado con sus propiedades terapéuticas y efectos adversos (Tabla III).

TABLA II

Afinidad receptorial de distintos antipsicóticos (10^{-7} x $1/K_d$)

	D_2	$5HT_{2A}$	α_1	α_2	M_1	H_1
Haloperidol	25	2,8	16	0,026	0,02	0,053
Clorpromazina	5,3	71	38	0,13	4	11
cis-Tiotixeno	222	0,77	9,1	0,5	0,039	17
Flufenazina	125	5,3	11	0,065		4,8
Tioridazina	3,8	4,5	20	0,12	37	6,2
Loxapina	1,4	59	3,6	0,042	1,6	20
Molindona	0,8	0,02	0,04	0,16		0,00081
Clozapina	0,56	63	11	0,62	32	36
Risperidona	33	170	50	1,8	0,009	1,7
Olanzapina	9,1	25	2,1	0,21	53	14
Sertindol	220	260	130	0,06		0,2
Quetiapina	0,625	0,34	1,6	0,04	0,83	9,1

Modificada de Richelson (1996).

En la línea de lo comentado, hemos de señalar que el bloqueo de **receptores dopaminérgicos D_2** se relaciona tanto con la eficacia antipsicótica, de hecho no existe en clínica ningún antipsicótico que no bloquee estos receptores en mayor o menor medida, como con algunos de los efectos adversos de los neurolépticos (Tabla III). Los ya comentados efectos extrapiramidales exhibidos por los antipsicóticos, así como los endocrinológicos (modificaciones en la liberación de prolactina, hormona del crecimiento, gonadotropinas, hormona tirotropa y hormona adrenocorticotropa) se relacionan con este bloqueo a nivel de los núcleos grises basales y tuberoinfundibular, respectivamente. Desde el punto de vista endocrinológico, la acción más constante e intensa de los neurolépticos es la ***elevación de los niveles de prolactina***, que puede traducirse por galactorrea, anomalías en el ciclo menstrual, incluyendo amenorrea, disfunción ovárica, disminución de la libido, hirsutismo y osteoporosis en tratamiento prolongado. En el hombre puede aparecer impotencia, pérdida de libido hipoespermiogénesis e hipogonadismo. Estas frecuentes disfunciones sexuales influyen negativamente en la cumplimentación terapéutica. Con los nuevos agentes atípicos, en especial con quetiapina y clozapina, y en menor medida con olanzapina, no se producen incrementos de liberación

TABLA III

Consecuencias clínicas del bloqueo receptorial por antipsicóticos

Receptor	*Efecto terapéutico*	*Efecto adverso*	*Fármacos implicados, en orden de potencia **
D_2	Mejoría sintomatología positiva psicótica	extrapiramidalismos efectos endocrinológicos	tiotixeno (222) > sertindol (220) > risperidona (33) > haloperidol (25) > olanzapina (9) > clozapina (0,5)
M	Disminución síntomas extrapiramidales	visión borrosa, aumento tensión intraocular, sequedad de boca, taquicardia sinusal, estreñimiento, retención urinaria, trastorno de memoria.	olanzapina (53) > clozapina (32) > clorpromazina (4) > haloperidol (0,02) > risperidona (0,009)
$5HT_2$	Mejoría sintomatología negativa Disminución extrapiramidalismos	**??**	sertindol (260) > risperidona (170) > clorpromazina (71) > clozapina (63) > olanzapina (25) > haloperidol (3)
H_1	Sedación	Sedación-somnolencia, aumento peso, efectos depresores centrales	clozapina (36) > tiotixeno (17) > olanzapina (14) > risperidona (1,7) > haloperidol (0,05)
α_1	Ansiolisis ?	hipotensión ortostática, taquicardia refleja	sertindol (130) > risperidona (50) > haloperidol (16) > clozapina (11) > olanzapina (2,1)

* $1/K_d \times 10^{-7}$

Tomada de Alamo y cols. (2002).

de prolactina. La excepción viene dada por la risperidona, que da lugar a un aumento de los niveles de prolactina. No obstante, los efectos adversos comentados, incluidos trastornos eyaculatorios, son prácticamente inexistentes con los agentes atípicos, incluyendo la risperidona.

El bloqueo de receptores dopaminérgicos de tipo D_2 en los ganglios basales es primordial en la génesis de los ***efectos extrapiramidales***. De hecho, cuando aproximadamente el 80% de los receptores del tipo D_2 del núcleo es-

triado se encuentran bloqueados, como suelen hacerlo la mayoría de los antipsicóticos clásicos a las dosis terapéuticas, aparecen extrapiramidalismos. La menor incidencia de extrapiramidalismos con los antipsicóticos atípicos se ha intentado explicar mediante diversas hipótesis. Así, se ha postulado que, más que el porcentaje de receptores ocupados, tiene importancia la capacidad que exhiben para unirse y disociarse de los receptores D_2, de acuerdo con las constantes de disociación (Fig. 1). Los antipsicóticos clásicos se unirían de manera más estrecha y permanente al receptor D_2. Por el contrario, los atípicos (quetiapina < clozapina < olanzapina < sertindol < ziprasidona) provocarían menos extrapiramidalismos, ya que, debido a su débil unión, serían desplazados por la dopamina endógena. Se ha pasado, por tanto, de considerar los efectos extrapiramidales como la consecuencia de un porcentaje de receptores bloqueados (habitualmente superior al 80%), al concepto de intensidad, alta o débil, de unión del antipsicótico al receptor. La risperidona no goza de esta labilidad de fijarse al receptor D_2 por lo que su atipicidad se debe a otros mecanismos. En este sentido, los efectos de los antipsicóticos

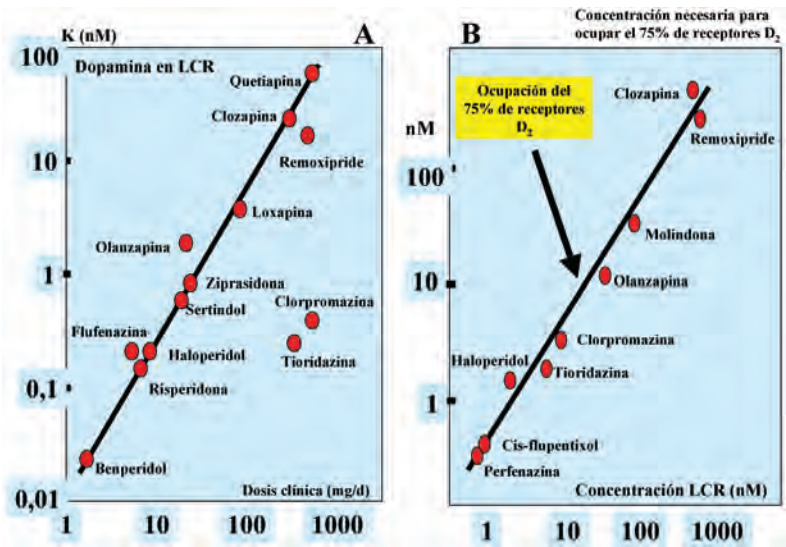


FIGURA 1. *Correlación entre la dosis antipsicótica en clínica (mg/día) y la constante de disociación (K=nM) de distintos antipsicóticos para el receptor D_2, independiente del radioligando empleado, medida por la concentración de dopamina en LCR (Fig. 4A). La desviación de clorpromazina y tioridazina desaparece cuando se correlaciona las concentraciones terapéuticas de antipsicóticos encontrados en LCR o plasma de los pacientes con la concentración necesaria para ocupar el 75% de los receptores D_2 (Fig. 4B). Modificada de Seeman y Tallerico (1998).*

sobre ***la actividad eléctrica de las neuronas dopaminérgicas*** pueden explicar la presencia o ausencia de extrapiramidalismos. Es conocido que el grupo de neuronas denominado A9, que se encuentra en la zona compacta de la sustancia nigra, está implicado en los efectos extrapiramidales de los neurolépticos, mientras que el grupo de neuronas dopaminérgicas denominado A10, localizado en el área tegmental ventral, está relacionado con los efectos terapéuticos de estos agentes. Se sabe que algunos antipsicóticos atípicos, en contra de lo que sucede con los clásicos, afectan sólo a las neuronas A10, exhibiendo actividad antipsicótica sin provocar efectos extrapiramidales, mientras que los neurolépticos clásicos disminuyen las descargas espontáneamente tanto a nivel mesolímbico como nigroestriatal. Por el contrario, los agentes atípicos ejercen este efecto a nivel mesolímbico exclusivamente.

Un mecanismo muy estudiado y que puede explicar las diferencias de comportamiento entre antipsicóticos viene dado por la capacidad que tienen los atípicos de bloquear **receptores serotoninérgicos tipo 5-HT_2**, que aumentarían la liberación de dopamina. Así, una relación de bloqueo 5-HT_2 superior a la de bloqueo D_2 es una constante en la mayoría de los antipsicóticos atípicos (Fig. 2). Las hipótesis comentadas pueden congeniar, ya que una mayor liberación de dopamina, secundaria al bloqueo 5-

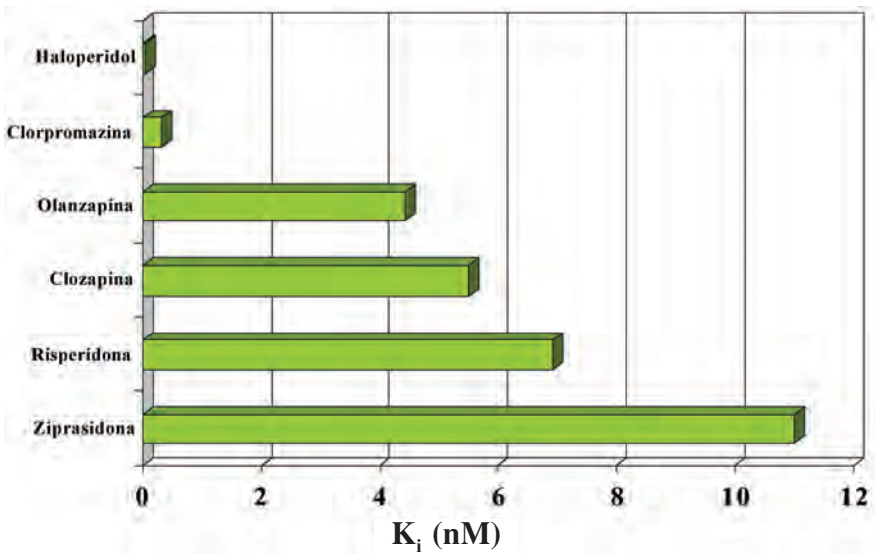


FIGURA 2. *Indice 5HT_{2A}/D_2 de diferentes antipsicóticos, según estudios in vitro con radioligandos. Modificada de Alamo y cols. (2002).*

HT_2, desplazaría con mayor facilidad a los antipsicóticos que estuvieran unidos al receptor dopaminérgico más labilmente, como sucede con algunos atípicos, y por ende provocar menos extrapiramidalismos. Asimismo, estas teorías pueden explicar la atipicidad de risperidona que, pese a la alta ocupación de receptores D_2, produce menos efectos extrapiramidales que los neurolépticos clásicos y sólo los llega a producir a dosis elevadas. Por una parte, el potente antagonismo de receptores 5-HT_2 que posee este antipsicótico y, por otra, su alta capacidad bloqueante α_2 facilitan la liberación de dopamina en el núcleo estriado, lo que podría contrarrestar, por competencia con el antipsicótico, los efectos adversos secundarios al bloqueo D_2 en esta zona.

Por otro lado, es bien conocida la implicación del bloqueo de **receptores colinérgicos** en la aparición de numerosos efectos indeseables (Tabla III): sequedad de boca, estreñimiento, dificultad de acomodación, a veces midriásis, aumento de presión intraocular, trastornos cognitivos y pérdida de memoria. En algunos pacientes, se aprecia atonía gastrointestinal y retención urinaria, aunque los efectos anticolinérgicos se observan en menor medida que con los antidepresivos. Entre los antipsicóticos atípicos destacan la olanzapina y la clozapina por su capacidad antimuscarínica. Sin embargo, el efecto antimuscarínico observado *in vitro* para la olanzapina no se corresponde *in vivo* con estreñimiento ni sequedad de boca, no observándose tampoco empeoramiento cognitivo. Un fenómeno similar se observa con la clozapina, la cual puede incluso mejorar la esfera cognitiva en pacientes esquizofrénicos. Esta aparente discrepancia entre efectos bioquímicos y adversos puede explicarse porque la olanzapina, como consecuencia del bloqueo de receptores muscarínicos M_2 presinápticos y serotoninérgicos 5-HT_6 libera acetilcolina en la corteza cerebral. La risperidona, quetiapina y ziprasidona poseen una escasa capacidad anticolinérgica. Entre los clásicos neurolépticos, estos efectos son más habituales cuando se utilizan agentes de baja potencia a elevadas dosis, como la tioridazina y la clorpromazina, siendo menos frecuentes en el caso del haloperidol.

Como consecuencia del bloqueo de **receptores histaminérgicos** (H_1) se puede producir sedación y somnolencia, así como incremento de peso, hecho observado con algunos antipsicóticos (Tabla III). El aumento de peso es un tema social y sanitario grave que aumenta el riesgo de enfermedades coronarias, hipertensión, diabetes tipo II, así como dolor de es-

palda, cáncer, o problemas respiratorios. A corto plazo, ya que el aumento de peso es muy rápido, tiene repercusiones psicológicas que afectan a la imagen del paciente y produce una disminución de la cumplimentación terapéutica. Este problema, habitual con neurolépticos clásicos, como la clorpromazina y el haloperidol, ha sido detenidamente estudiado con los nuevos antipsicóticos atípicos. El control de la saciedad está sometido a mecanismos complejos, en los que participan, además de diversos neurotransmisores, la leptina que, a través de una acción sobre receptores específicos hipotalámicos y del tracto gastrointestinal, está implicada en la ingesta, consumo de energía y regulación del peso corporal. En este sentido, clozapina y olanzapina antagonizan potentemente receptores H_1, estando esto en correlación con el incremento de los niveles de leptina, aumento del apetito, de la grasa corporal e incremento del peso del paciente. Los agentes principalmente implicados en el incremento ponderal son la clozapina, que parece asociarse al mayor porcentaje de pacientes con incremento de peso, y la olanzapina. Asimismo, otros antipsicóticos atípicos, como quetiapina, risperidona, sertindol y amisulpride, pueden incrementar el peso, aunque en menor medida, mientras, por el contrario, la ziprasidona parece no incrementarlo. Por otra parte, en relación con estos cambios metabólicos, se ha estudiado la capacidad de inducir diabetes del tipo II bajo tratamiento con antipsicóticos. En este sentido, trabajos recientes de diferentes grupos, que incluyen un amplio número de pacientes tratados con risperidona, clozapina, olanzapina y antipsicóticos clásicos, ponen de manifiesto que la tasa de frecuencia de diabetes tipo II no fue superior con risperidona ni con antipsicóticos clásicos de alta potencia a la exhibida por los controles no tratados. Sin embargo, la frecuencia de este cuadro metabólico fue significativamente superior en aquellos pacientes tratados con olanzapina, clozapina o con neurolépticos de baja potencia.

El bloqueo de **receptores adrenérgicos** α_1 se relaciona con dificultades eyaculatorias e hipotensión ortostática (Tabla III). Aunque se produce tolerancia al efecto hipotensor, en ancianos estos cuadros pueden acompañarse de mareos, que dan una gran inseguridad al paciente, así como síncopes y aumento del riesgo de insuficiencia coronaria y de fracturas por caídas. El bloqueo adrenérgico α_1 es común con los antipsicóticos, tanto clásicos como atípicos (sertindol > risperidona > clorpromazina > tioridazina > haloperidol > clozapina > flufenazina > olanzapina

> quetiapina > ziprasidona). Además, el bloqueo de estos receptores puede afectar a la eyaculación y la erección, como se ha observado, en especial, con sertindol y en casos aislados con otros antipsicóticos, como zuclopentixol y olanzapina.

Los antipsicóticos pueden ocasionar anomalías electrofisiológicas cardíacas, en especial la tioridazina, caracterizadas por aplanamiento de la onda T y alargamiento de los intervalos PR y QRS, así como cambios en el segmento ST. Algunos antipsicóticos atípicos, por su capacidad de bloquear el componente rápido de la corriente rectificadora tardía de salida de potasio (I_{Kr}), impiden la salida de este ion del miocito ventricular, retrasando así la repolarización y produciendo de esta manera un alargamiento del intervalo QT del ECG. Entre los antipsicóticos implicados se encuentran el sertindol, la tioridazina, la ziprasidona y la quetiapina. Precisamente este problema fue el origen de la retirada temporal del mercado mundial del sertindol y del retraso de la comercialización de la ziprasidona. De momento, constituye un área de debate e investigación la relación existente entre la prolongación del espacio QT y la arritmia del tipo *torsade de pointes*. Mientras se resuelve la cuestión, es recomendable tener especiales precauciones con los agentes que provocan un incremento del espacio QT, en especial en pacientes con riesgo cardiovascular o cardiópatas.

Selectividad receptorial opuesta a eficacia antipsicótica

En contra de la hipótesis de selectividad propugnada hace algunos años como sinónimo de eficacia y tolerabilidad en distintos campos terapéuticos, la eficacia de los antipsicóticos parece deberse a una falta de limpieza bioquímica. Utilizando un símil musical, se ha pasado de la melodía clásica del receptor D_2 a lo que podría considerarse la disonancia de múltiples receptores (serotoninérgicos, histaminérgicos, colinérgicos, adrenérgicos, etc). Sin embargo, como sucede con la clozapina, todos estos mecanismos parecen haber constituido una bella orquesta que supera la eficacia de los antipsicóticos clásicos. Desde luego, existen instrumentos y notas que desafinan, como el aumento de peso o la sedación, y también tonos disonantes más serios, como la agranulocitosis o las convulsiones, pero ello no empaña la sinfonía de eficacia sobre la

sintomatología negativa, la disfunción cognitiva, los síntomas positivos resistentes, o la melodía que impide la cuesta abajo del progresivo deterioro social que muchos pacientes experimentan. Será necesario, siguiendo la opinión de Stahl, escuchar con atención como interpretan su melodía los nuevos y futuros antipsicóticos. En este sentido, una característica común de distintos antipsicóticos atípicos utilizados en clínica, o a nivel experimental, es exhibir una mayor afinidad por el receptor 5-HT_2 que por los receptores D_2, por lo que casi nadie duda que el dueto 5-HT_2/D_2 (Fig. 2) es un componente muy deseable en la orquesta de los antipsicóticos atípicos para mejorar la sintomatología negativa de la enfermedad con una menor incidencia de efectos extrapiramidales. Sin embargo, no debemos olvidar que estos agentes actúan también sobre los receptores de otros neurotransmisores, lo cual contribuye a potenciar sus efectos adversos, como se ha comentado, pero también puede participar en su perfil terapéutico. De hecho, con el estudio de unión de radioligandos a sus receptores nos quedamos en la superficie de la célula y desconocemos los cambios intracelulares que suceden, en definitiva responsables de los efectos a medio-largo plazo, consecuentes a la actuación sobre el conjunto de diferentes receptores sobre los que actúan cada uno de los antipsicóticos.

En conclusión, independientemente de los mecanismos farmacológicos implicados, parece que los nuevos antipsicóticos atípicos, si bien no están exentos de problemas, son superiores a los neurolépticos clásicos, especialmente en estudios a largo plazo, en lo relativo a sintomatología negativa, mejora del humor y trastornos cognitivos, a la vez que muestran claras ventajas y seguridad sobre la producción de extrapiramidalismos. Ello ha hecho que el británico NICE (*National Institute for Clinical Excellence*), tras revisar más de 200 estudios clínicos comparativos entre agentes atípicos y neurolépticos clásicos, haya recomendado el empleo de atípicos en pacientes con esquizofrenia, pese al mayor coste directo de la medicación. No obstante, los antipsicóticos atípicos presentan efectos adversos, básicamente cardiovasculares y endocrinológicos, que deben ser evaluados individualmente para tratar a cada paciente con el fármaco más adecuado de acuerdo con su perfil de riegos. Puesto que atípico no es sinónimo de idóneo, el desarrollo de nuevos agentes antipsicóticos es una búsqueda activa que, en líneas generales, sigue las directrices que comentaremos a continuación.

NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS EN EL MECANISMO DE ACCIÓN ANTIPSICÓTICO

Exploración de mecanismos dopaminérgicos como base para la obtención de nuevos antipsicóticos

Desde que Carlsson, en 1963, demostró que los neurolépticos bloqueaban receptores dopaminérgicos, junto con la observación de que los agentes eficaces como antagonistas del receptor D_2 tenían una magnitud de efecto proporcional a la potencia clínica, se desarrolló la hipótesis de que el **bloqueo dopaminérgico D_2 era el responsable del efecto antipsicótico** de los neurolépticos. Asimismo, se achacó a este bloqueo los efectos neurológicos extrapiramidales y endocrinológicos de los agentes antipsicóticos. Estos hechos, hicieron pensar en un papel preponderante en la etiopatogenia de la esquizofrenia para este receptor. Sin embargo, pese a que inicialmente no pudo demostrarse una hiperfunción dopaminérgica o ésta se achacaba al bloqueo de receptores D_2 provocado por el tratamiento prolongado con neurolépticos, en la actualidad, con nuevas técnicas *in vivo* a nuestro alcance, podemos afirmar que existe un aumento de la función dopaminérgica, manifestado por una mayor densidad de receptores D_2, un incremento presináptico de dopamina y su metabolito, el ácido homovanílico, en áreas mesolimbocorticales en pacientes esquizofrénicos respecto a los controles. Además, es destacable la alta densidad de receptores D_2 existentes en los núcleos grises basales, fisiopatológicamente implicados en extrapiramidalismos. Sin embargo, la hipótesis de hiperdopaminergia en la esquizofrenia no es perfecta, ya que el tratamiento antipsicótico, como hemos comentado, no es siempre eficaz y los síntomas negativos incluso pueden empeorar con el bloqueo de receptores D_2. Por otra parte, la observación de que el efecto antipsicótico de la clozapina no se correlaciona con su capacidad bloqueante D_2 hizo pensar en la posibilidad de que el citado bloqueo receptorial no fuera necesario para producir el efecto antipsicótico. Sin embargo, recientemente se ha puesto de manifiesto que dosis antipsicóticas de clozapina ocuparían entre un 70 a un 90% de receptores D_2 en núcleo estriado, y posiblemente cifras superiores en el sistema límbico, donde la dopamina endógena es menor, siempre que se estudie el desplazamiento de dopamina como ligando fisiológico del receptor D_2. En este sentido, podría

afirmarse que todos los antipsicóticos, incluida la clozapina, bloquearían de forma parecida los receptores D_2 (Fig. 1). De hecho, de momento no existe ningún antipsicótico con actividad clínica que no bloquee los citados receptores dopaminérgicos.

Desde el punto de vista de desarrollo de nuevos agentes bloqueantes de **receptores D_2**, las líneas de investigación parecen buscar agentes no selectivos que además combinen propiedades sobre otros receptores. El hallazgo más interesante ha sido el aripiprazol, aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) y en la actualidad a punto de ser comercializado, que se comporta como antagonista postsináptico y agonista parcial del receptor D_2 presináptico, por lo que facilita la liberación de dopamina, siendo además antagonista de receptores 5-HT_{2A} y agonista parcial 5-HT_{1A}. Este perfil receptorial, poco selectivo, explicaría su eficacia en sintomatología positiva y negativa, si bien el carecer de actividad sedante hace poco probable su uso en esquizofrenia aguda. Otro agente que explora mecanismos clásicos es la iloperidona, que se encuentra en fase clínica III y combina propiedades bloqueantes D_2 y 5-HT_2, aunque prolonga el espacio QTc, lo cual puede ser un inconveniente importante para su comercialización. La blonanserina exhibe igualmente propiedades bloqueantes D_2 y 5-HT_2, sin antagonizar receptores adrenérgicos, por lo que se supone que tendrá pocos efectos cardiovasculares y sedantes. Se encuentra en fase III de desarrollo en Japón. Otros productos en desarrollo que exploraban mecanismos D_2 han sido suspendidos.

Además, en la actualidad se postula el papel de otros receptores dopaminérgicos en el complejo mecanismo de acción de los agentes antipsicóticos. El perfil receptorial de clozapina ha estimulado la búsqueda de agentes con afinidad por el **receptor D_4**, denominado también «receptor clozapínico». Sin embargo, la importancia del receptor D_4 como responsable del efecto antipsicótico y atipicidad de la clozapina no se ve respaldada por una acción similar de otros agentes. De hecho, los antipsicóticos clásicos o la risperidona, así como el remoxipride, dotado de un alto grado de atipicidad, carecen de afinidad por el receptor D_4 a las dosis empleadas en clínica. Pese a lo comentado, un gran número de compañías farmacéuticas están investigando esta línea, si bien tan sólo tres fármacos han llegado a fase clínica: el sonepiprazol y la belaperidona que alcanzaron la fase II de estudios clínicos, aunque el desarrollo del pri-

mero ha sido discontinuado y del segundo desconocemos su actual situación, pero habida cuenta de la prolongación del espacio QT que induce en estudios animales, la posibilidad de que haya sido discontinuado es alta. De igual modo, el NGD 94-1 no superó la fase I de estudios clínicos. Para más contrariedad, el diseño específico de antagonistas selectivos de receptores D_4, como el L-745870, no demostró poseer eficacia antipsicótica. Por todo ello, parece difícil extraer conclusiones firmes sobre el potencial de agentes bloqueantes D_4 selectivos como antipsicóticos.

Posteriormente, se ha caracterizado un nuevo **receptor dopaminérgico D_3**, perteneciente a la familia D_2, con una localización preferente, aunque no exclusiva, en áreas límbicas, lo que sugiere una posible implicación en el control cognitivo y emocional, por lo que antagonistas de este receptor pueden ser potenciales antipsicóticos. Además, el incremento en un 45% de receptores D_3 en neuronas estriatales de pacientes esquizofrénicos, que se normaliza tras tratamiento antipsicótico, junto con que muchos antipsicóticos exhiben propiedades bloqueantes de este receptor, ha estimulado el estudio del papel de antagonistas de estos receptores en la esquizofrenia. El único fármaco de este grupo en fase clínica II es el LU-201640. Además, existen algunos antagonistas en fase preclínica (AJ-76, UH-232, PNU-177864), no existiendo agentes selectivos sobre este subtipo de receptor que tengan respaldo clínico. Por otra parte el pramipexol, agonista D_3, comercializado como antiparkinsoniano, se muestra eficaz como antidepresivo y se ha postulado su eficacia como antipsicótico, aunque desconocemos su estado de desarrollo en este sentido.

Otro de los receptores dopaminérgicos implicados en la farmacología de los antipsicóticos es el **receptor D_1**. Experimentalmente, aquellos agentes con capacidad bloqueante D_1 antagonizan algunos efectos de la anfetamina y algunos antipsicóticos atípicos preclínicos muestran una afinidad D_1 entre 3 y 16 veces superior a la exhibida por el receptor D_2. Además, estudios realizados con TEP demuestran que existe una disminución de receptores D_1 en corteza prefrontal de esquizofrénicos y que la clozapina, a dosis clínica, es capaz de ocupar entre el 36 y el 52% de estos receptores en el núcleo estriado de humanos. Por todo ello, se inició el estudio de un amplio abanico de nuevos agentes antipsicóticos, como la serie encabezada por el CEE-03-310 (anteriormente conocido como NNC-687), todos ellos antagonistas D_1 selectivos. Estos agentes, estudiados inicialmente para el tratamiento de la

esquizofrenia, se estudian en la actualidad en el tratamiento del insomnio y de la dependencia alcohólica. Asimismo, se han realizado estudios preclínicos con BW-737-C89 y con LY-270411, sin que conozcamos su estado de desarrollo. Estos datos, junto con la observación de que agentes como el haloperidol o el remoxipride carecen de afinidad por el receptor D_1, parecen indicar un escaso futuro antipsicótico para estos antagonistas.

Mecanismos serotoninérgicos en el desarrollo de nuevos antipsicóticos

La capacidad de algunos neurolépticos de bloquear **receptores 5-HT$_2$**, junto con la implicación de la serotonina en un gran número de cuadros patológicos psiquiátricos, ha motivado el interés por el papel jugado por estos receptores en el perfil farmacodinámico de los antipsicóticos. Sin embargo, intentar correlacionar de forma directa el papel de la serotonina con la esquizofrenia o con el efecto antipsicótico está jalonado de «evidencias inconsistentes y contradictorias». De hecho, la ritanserina, bloqueante selectivo 5-HT_{2A}, utilizada de forma aislada, ha mostrado escasa eficacia como agente antipsicótico, lo que indica que el bloqueo exclusivo de receptores 5-HT_2 no es el responsable del efecto antipsicótico observado con algunos neurolépticos, aunque puede suponer, como se ha comentado ampliamente, un beneficio en lo referente a extrapiramidalismos y sintomatología negativa. En este sentido, el gran interés despertado por el M-100907, antagonista selectivo 5-HT_2, con un buen perfil de tolerabilidad, incluida la ausencia de modificación de la secreción de prolactina y del peso corporal, no se ha visto recompensado por falta de eficacia en cuadros de esquizofrenia aguda, habiéndose suspendido el desarrollo en fase III. Un hecho similar sucedió con el MDL-100907, por lo que otros dos antagonistas selectivos 5-HT_2, sin capacidad bloqueante dopaminérgica, como son la eplivanserina y el EMR-62218, ambos en fase II, son esperados con interés, habida cuenta del fracaso como antipsicóticos de otros agentes específicos sobre este receptor. Posiblemente tengan más futuro clínico el Org-5222, en fase clínica II, el SM-13496, en fase I, así como el SSR-181507, que son bloqueantes duales 5-$HT_2 > D_2$, al igual que los atípicos comercializados hasta el momento.

En otra línea receptorial, la localización de **receptores 5-HT$_3$** en zonas mesocorticolímbicas (núcleo accumbens, bulbo olfatorio, amígdala, hipocampo, corteza frontal) y el hecho de que el bloqueo de los mismos

modulen las acciones de la dopamina en estas regiones, avalan la posibilidad de que el bloqueo de estos receptores 5-HT_3 pueda jugar algún papel en el tratamiento de la esquizofrenia. Sin embargo, los estudios clínicos realizados con ondansetron o zaclopride son inconcluyentes, lo que hace pensar que el bloqueo aislado del receptor 5-HT_3 no es suficiente para obtener eficacia antipsicótica. De hecho, en la actualidad no se están desarrollando antipsicóticos con acción específica de bloqueo 5-HT_3, si exceptuamos el UCM-30593 (Universidad Complutense), de cuyo estado de desarrollo no hemos encontrado datos en la literatura revisada.

La reciente clonación de **receptores 5-HT_6**, emparentados farmacológicamente con el 5-HT_2, su presencia preferencial en núcleo estriado y la observación de que la clozapina y otros presuntos agentes atípicos (olanzapina, zotepina, clorotepina, risperidona) exhiben, al contrario de lo observado con los neurolépticos clásicos, una alta afinidad por estos receptores, han hecho pensar en la posibilidad de que el receptor 5-HT_6 pueda contribuir a la carencia de efectos extrapiramidales observados con estos antipsicóticos. El SB-271046 es el primer antagonista de este receptor capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y se encuentra en estudio en fase I.

De igual modo, se postula un papel antipsicótico mediado por acción sobre diversos receptores serotoninérgicos, entre ellos los **receptores 5-HT_{1A}**, si bien son agentes muy inespecíficos, encontrándose en estudios preclínicos, no sólo como antiesquizofrénicos sino también como ansiolíticos, antiagresivos, antidepresivos, etc. Asimismo, puesto que algunos antipsicóticos tienen la capacidad de fijarse sobre **receptores 5-HT_7**, fue estudiado el antagonista de los mismos SB-258741 a nivel preclínico como antipsicótico. Sin embargo, estudios recientes indican su carencia de eficacia en modelos experimentales de sintomatología negativa de la esquizofrenia.

La exploración de mecanismos clozapínicos (no DA/5-HT) como base para el desarrollo de nuevos agentes antipsicóticos

En la actualidad, la mayoría de agentes antipsicóticos atípicos empleados en clínica y en fase de desarrollo clínico exploran mecanismos dopaminérgicos aislados o en asociación con mecanismos serotoninérgicos. Sin embargo, sobre todo a nivel preclínico, se estudian también agentes que ac-

túan sobre otros mecanismos basados en la selección de algún receptor «marcado» por la clozapina. En este sentido, se intentan sintetizar antagonistas o agonistas selectivos del citado receptor, con el fin de definir su poder antipsicótico. Hasta el momento, esta aproximación ha tenido escaso éxito, pero ha permitido identificar una serie de sistemas candidatos para la investigación y desarrollo de futuros antipsicóticos, así como para avanzar en el conocimiento de las bases fisiopatológicas de los trastornos psicóticos. En línea con lo comentado, la exploración de **mecanismos colinérgicos y noradrenérgicos**, pese a ser alterados por diversos antipsicóticos y participar en la regulación fisiológica de neuronas dopaminérgicas, han sido poco explorados, de forma directa, como posible fuente de antipsicóticos.

Estudios neuroquímicos han demostrado una interacción entre **receptores muscarínicos** y dopaminérgicos. En este sentido, el agonista muscarínico xanomelina eleva los niveles de dopamina en áreas corticales y disminuye las descargas de neuronas mesolímbicas, sin afectar las de la sustancia nigra, de modo similar a lo que sucede con antipsicóticos atípicos. Además, la xanomelina y otros agonistas muscarínicos se comportan como antipsicóticos en diversos modelos experimentales, lo que ha hecho pensar que estos agentes puedan tener eficacia clínica en la esquizofrenia. Por otra parte, la alta incidencia de fumadores (superior al 80%) entre pacientes esquizofrénicos, ha hecho pensar que éste sea un mecanismo de automedicación. Se ha estudiado el papel de agonistas del **receptor nicotínico α_7**, cuyo prototipo es el DMXB-A, como agentes potenciales antipsicóticos, habiéndose patentado diversos derivados, que se encuentran de momento en investigación preclínica.

El posible papel de **mecanismos histaminérgicos** en la esquizofrenia se basa en la observación de la existencia de terminales histaminérgicas relacionadas con las vías implicadas en la fisiopatología de este trastorno mental. Asimismo, se han detectado niveles elevados de histamina en líquido cefalorraquídeo (LCR) y alteraciones receptoriales en el gen del receptor H_2 de pacientes esquizofrénicos. En este sentido, la afinidad de los antipsicóticos por receptores de histamina es variable. Sin embargo, se ha despertado un gran interés sobre la relación entre la histamina y la esquizofrenia basado inicialmente en la mejoría llamativa de la sintomatología negativa y positiva de esquizofrénicos tratados con el antagonista H_2 famotidina, en asociación con un antipsicótico convencional. A pesar de esto,

no existen proyectos de investigar agentes bloqueantes H_2 específicamente como antipsicóticos. No sucede lo mismo con antagonistas de receptores H_3, capaces de modular la liberación de diversos neurotransmisores y hormonas, ya que han sido patentados diversos derivados piperidínicos como posibles antipsicóticos, entre otras indicaciones.

Exploración de mecanismos glutamatérgicos

Además de todos los mecanismos comentados, la investigación en el campo de los antipsicóticos se ha desarrollado también explorando vías que escapan al espectro de la clozapina. Entre los mecanismos más prometedores están aquellos basados en la **hipótesis glutamatérgica** de la esquizofrenia. Desde principios de los años 80, se ha postulado la existencia de un déficit en la transmisión glutamatérgica en la esquizofrenia, que podría ser el responsable de un disbalance dopaminérgico en los núcleos accumbens y estriado. Distintos hechos avalan esta hipótesis. La fenciclidina, agente que bloquea el receptor del glutámico NMDA (N-metil-D-aspartato), provoca efectos psicotomiméticos comparables a los de la sintomatología positiva y negativa de la esquizofrenia y además puede provocar recaídas en pacientes estables. Este fenómeno se observa, asimismo, con otros antagonistas competitivos del receptor NMDA (CPP, CPP-ene y CGS-19755). Además, existe un déficit de glutamato y de receptores NMDA en el LCR y cerebros de pacientes esquizofrénicos. Todo ello avala la hipótesis de que conseguir un incremento en el funcionalismo sináptico glutamatérgico es una aproximación válida para conseguir nuevos fármacos antipsicóticos.

El glutamato, principal neurotransmisor excitador cerebral, actúa sobre dos tipos de receptores; unos receptores ionotrópicos ligados a canales, que incluyen al receptor NMDA, kainato y AMPA, y otros receptores metabotrópicos (mGlu) de los cuales existen al menos 8 subtipos, clasificados en tres grupos. La búsqueda de nuevos antipsicóticos se ha centrado básicamente en la exploración de receptores NMDA, AMPA y algunos receptores metabotrópicos.

El **complejo receptorial del NMDA** presenta muchos locus moduladores: un locus para el NMDA, otro para el zinc, dos locus situados en el canal ionóforo, uno para el magnesio y otro para la fenciclidina, una es-

tructura para poliaminas y un locus para la glicina (Fig. 3). La acción de agonistas directamente sobre el ***locus para el glutamato*** del receptor NMDA no parece una diana terapéutica adecuada, ya que estas sustancias son potentes neurotoxinas y provocan convulsiones. Sin embargo, algunos agonistas parciales, como el vinconato, que ha sido patentado, aunque desconocemos su fase de desarrollo clínico, pueden resultar interesantes a este nivel. Las ***poliaminas*** son moléculas endógenas, con estructura emparentada con algunos antipsicóticos, que aumentan de forma moderada la actividad glutamatérgica, pero que no parecen capaces de corregir la hipofunción NMDA sin provocar toxicidad. Dos poliaminas endógenas, la espermina y la espermidina, inhiben la hiperactividad dopaminérgica mesolímbica inducida por anfetamina, sin afectar la estriatal, lo que abre la posibilidad para encontrar derivados de uso clínico. Se ha postulado que la hipoactividad glutamatérgica de la esquizofrenia está causada por ligandos endógenos con actividad fenciclidínica, por lo que los agentes con capacidad bloqueante del ***locus de fenciclidina*** constituirían otra línea de interés terapéutico. En este sentido, el metaphit antagoniza la conducta inducida por fenciclidina en la rata pero su toxicidad impide su empleo clínico. En el futuro, el desarrollo de antagonistas de fenciclidina, así como de agentes moduladores de los locus de

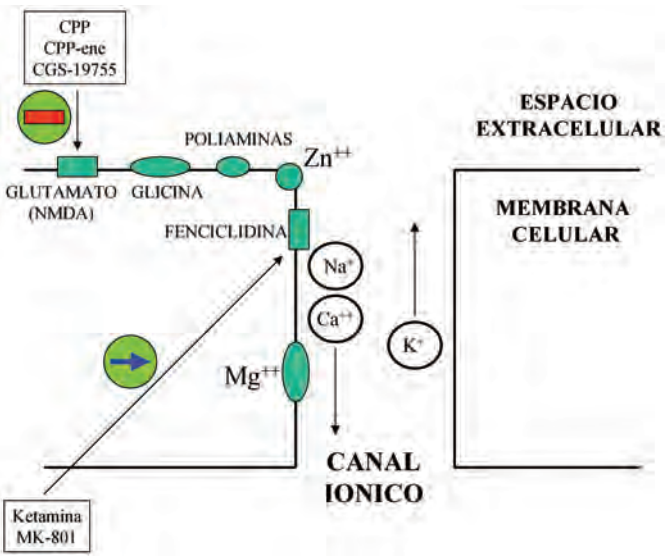


Figura 3. *Complejo receptorial NMDA, con sus distintos locus de acción.*

zinc y magnesio, podrían aumentar el arsenal terapéutico antipsicótico no convencional.

De momento, el ***locus de glicina*** es la diana más prometedora para corregir la hipofunción glutamatérgica existente en la esquizofrenia. La activación de este locus modula alostéricamente al receptor NMDA, siendo un requisito indispensable para la función del mismo. De hecho, en ausencia de glutamato la glicina carece de efecto sobre el receptor NMDA. El L-701324 es un agonista del locus de glicina que está dotado de propiedades antipsicóticas experimentales y carece de efecto sobre la secreción de prolactina, hecho indicativo de que no actúa de forma directa sobre mecanismos dopaminérgicos. Además, se han realizado estudios clínicos empleando glicina, que atraviesa pobremente la BHE, D-cicloserina, que se comporta como agonista parcial, o milacemida, un profármaco de la glicina. La glicina, como tratamiento coadyuvante a neurolépticos, en un estudio controlado frente a placebo, se mostró moderadamente eficaz y mejoró de forma significativa la sintomatología negativa. Aunque los resultados con estos agentes no son concluyentes, abren una vía de investigación que requiere estudios controlados, sobre todo con agonistas puros del locus de glicina.

Otra estrategia empleada para potenciar el funcionalismo NMDA se basa en **incrementar los niveles de glutamato o glicina en la hendidura sináptica**, mediante la inhibición de los mecanismos de transporte y recaptación de ambos aminoácidos. Así, se están investigando, aún en fase inicial, diversos inhibidores del transportador de glutamato. Mayor interés prestan diversas compañías a la investigación de ***inhibidores del transportador de glicina***. Existen al menos dos subtipos de transportadores de glicina, siendo el transportador GLI_1 el más estudiado, por ser el que presenta una distribución más amplia en el Sistema Nervioso Central (SNC). Un inhibidor de este transportador, la glicildodecilamida, potencia el funcionalismo NMDA, a la vez que exhibe actividad antipsicótica experimental. Asimismo, el NFPS, un derivado de la propilsarcosina, y el ALX-5407 inhiben este transportador y son esperados sus resultados clínicos.

Al igual que sucede con el receptor NMDA, el agonismo directo de **receptores AMPA** es una estrategia de riesgo por la posibilidad de inducir convulsiones y toxicidad neuronal. Sin embargo, parece razonable actuar a través de moduladores positivos del receptor AMPA, que facilitan la transmisión glutamatérgica sináptica entre neuronas supervivientes y, por ende,

mejoran la esquizofrenia. Diversas compañías farmacéuticas están investigando en este sentido siendo, el LY404187 un modulador alostérico selectivo y potente del receptor AMPA en fase preclínica. Los agentes mejor estudiados son las AMPAkinas. Estos fármacos carecen de efectos neurotóxicos y han mostrado, además de potenciar la acción de algunos antipsicóticos, antagonizar efectos bioquímicos y conductuales inducidos por las anfetaminas. Mayor trascendencia tienen los resultados clínicos preliminares (fase I y IIa) obtenidos con el fármaco más avanzado de este grupo, el Ampalex (CX-516), que potencia a la clozapina en la sintomatología negativa y efectos cognitivos, lo que hace interesante su desarrollo clínico, junto con otra AMPAkina, la ORG24448, que se encuentra en fase II.

La implicación de **receptores glutamatérgicos metabotrópicos** en la esquizofrenia ha sido recientemente estudiada. Así, se ha encontrado una disminución de diferentes receptores glutamatérgicos metabotrópicos en diferentes regiones cerebrales de pacientes esquizofrénicos. El agonista selectivo del receptor metabotrópico Glu_2, el LY-354740, que está siendo estudiado en clínica como ansiolítico, antagoniza algunos efectos de la metanfetamina y fenciclidina a nivel preclínico, por lo que se piensa que pueda ser eficaz en la esquizofrenia.

Otros mecanismos como dianas de nuevos antipsicóticos

Además de todos los mecanismos comentados, la investigación en el campo de los antipsicóticos se ha desarrollado también explorando vías menos clásicas y, en ocasiones, en fases muy precoces de desarrollo. Estos mecanismos incluyen la exploración de agentes que actúan sobre receptores sigma, antagonistas de receptores de colecistoquinina (CCK), modificando el funcionalismo de la neurotensina, antagonistas de receptores de la neurokinina, potenciadores gabérgicos, etc. Algunos de estos mecanismos se comentan a continuación.

El **receptor sigma** (σ) fue definido para explicar los efectos psicotomiméticos de ciertos opiáceos que, en cierta medida, se parecían a algunos síntomas observados en la esquizofrenia. Algunos agentes antipsicóticos, como el haloperidol o el remoxipride, muestran afinidad por este receptor. Un reciente estudio, en el que se administró BMY-14802, sustancia dotada de propiedades antagonistas del receptor sigma, aunque no selectiva, pro-

dujo una mejoría global moderada, aunque no significativa, en algunos pacientes. Algo similar sucedió en un estudio clínico con rimcazol, que mostró una eficacia parcial. Otros antagonistas σ_1 se han comportado igualmente sin eficacia. Esperamos resultados del E-5842, que se encuentra en fase clínica I y que exhibe un perfil topográfico bioquímico similar a los agentes atípicos, afectando neuronas del área tegmental ventral y respetando la substancia nigra. Los productos en desarrollo más avanzado (fase II) son el SR-31724 y el NE-100, aunque desconocemos sus resultados. Asimismo, se han sintetizado derivados del NE-100, aparentemente antagonistas selectivos y potentes del receptor σ_1, que de forma indirecta modularían el receptor NMDA, lo que permitirá conocer mejor el papel que juega este receptor en el efecto antipsicótico y en la fisiopatología de la esquizofrenia.

La **colecistokinina (CKK)** es un neuropéptido que actúa como cotransmisor, localizado en neuronas glutamatérgicas, que se encuentra deficitario en hipocampo y LCR de pacientes esquizofrénicos. La CKK es capaz de modular la afinidad del receptor D_2 mediante la estimulación de receptores CCK-B y se ha observado que la proglumida, antagonista no selectivo de receptores CCK, es capaz de interactuar con sistemas CCK y dopaminérgicos *in vivo*, por lo que se ha pensado en la posibilidad de usar agentes que actúen sobre estos receptores como posibles antipsicóticos. Pese a la mayor trascendencia del receptor CCK-B, el producto con un desarrollo más avanzado es el lintitrip, un antagonista de receptores CCK-A, que se encuentra en estudios de fase II para la esquizofrenia.

La **neurotensina** es un neuropéptido que coexiste en la vía mesolímbica con la dopamina y que exhibe propiedades prodopaminérgicas en núcleo accumbens. Además, un hecho muy sugerente es que algunos neurolépticos típicos elevan los niveles de neurotensina en diversas áreas cerebrales, como en el núcleo caudado y accumbens, mientras que la clozapina incrementa los citados niveles sólo en el núcleo accumbens sin afectar al caudado. Estudios clínicos han demostrado niveles inferiores de neurotensina en LCR de pacientes esquizofrénicos, que se elevan de forma paralela con la mejoría de la sintomatología negativa. Los datos comentados hablan a favor de una posible participación de la neurotensina en la fisiopatología de la esquizofrenia y en el mecanismo de acción antipsicótico y abren una vía nueva para el estudio de nuevos agentes. En este sentido, se ha comprobado que el CI-943, fármaco con propiedades neurolépticas experimentales y que

no actúa sobre ningún subtipo de receptor dopaminérgico, eleva los niveles de neurotensina en núcleo accumbens y caudado. Sin embargo, el SR48692, que actúa como antagonista de la neurotensina es capaz de modular vías dopaminérgicas mesolímbicas, por lo que esta estrategia para el desarrollo de nuevos agentes antipsicóticos necesita muchos más estudios.

En relación con las **neuroquininas**, se ha desarrollado un antagonista del receptor de la neuroquinina-3 (NK3), denominado osanetant (SR-142801), que se encuentra en fase III de estudios para el tratamiento de la esquizofrenia. Otro antagonista NK3 es el talnetant, en fase II de desarrollo.

El papel de la **adenosina** en la esquizofrenia ha sido investigado desde hace varios años, basándose en la actividad antipsicótica experimental de agonistas de receptores A_2 y en la agravación que produce la cafeína, un antagonista de dichos receptores, de la sintomatología psicótica. Además es conocida la interacción existente entre receptores A_2 y D_2 a nivel cerebral. Sin embargo, los intentos por conseguir algún antipsicótico que emplee mecanismos potenciadores de adenosina no se han visto acompañados del éxito.

El ácido γ-amino-butírico (**GABA**) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC y mantiene una relación funcional importante con la dopamina y el glutamato en diversos modelos animales. Además, en estudios *postmorten* se ha podido detectar un déficit gabérgico en pacientes esquizofrénicos. Pese a estos datos que hablan de la implicación del GABA en la fisiopatología de la esquizofrenia, los fármacos que actúan a través de mecanismos gabérgicos resultan ineficaces como antipsicóticos, si bien se han propuesto estudios controlados con nuevos agentes que actúen sobre mecanismos más selectivos.

Desde la confirmación del papel modulador del **óxido nítrico** (**NO**) en el SNC, el sistema L-arginina-NO-GMPc ha sido ampliamente estudiado y caracterizado, pensándose que este sistema puede jugar un papel fisiopatológico y terapéutico en diversas patologías psiquiátricas (ansiedad, esquizofrenia y trastornos afectivos). Algunos datos hablan a favor de la posible participación del NO en el efecto terapéutico de los antipsicóticos, facilitando la liberación de dopamina, así como en su relación con el receptor NMDA como estimulante de la vía NO-GMPc.

Entre los amplios planes de investigación antipsicótica, no podía faltar el estudio del papel de los **receptores cannabinoides**. En este senti-

do, es conocido que el cannabis puede desarrollar un estado similar a la esquizofrenia hebefrénica, con síntomas negativos predominantes. Además, se sabe que el abuso de cannabis antes de los 18 años incrementa en seis veces el riesgo de esquizofrenia. Asimismo, existe, en esquizofrénicos, un error genético del CNR-1 responsable de la codificación del gen del receptor del cannabis CB-1, lo que sugiere que estos pacientes tienen una vulnerabilidad de base genética. Con estas premisas, se ha estudiado el potencial antipsicótico del rimonabant (SR- 141716), modulador del receptor cannabinoide, que se encuentra en fase clínica III y cuyos resultados se esperan con expectación.

Por otra parte, la posible alteración de los fosfolípidos observada en pacientes esquizofrénicos ha animado al estudio de un **inhibidor de la fosfolipasa**, el SC-111 (Lax-101) como antipsicótico. Estudios en fase II hablan de un papel potenciador de los antipsicóticos clásicos por este nuevo agente. Otra línea de investigación contemplada en la etiología de la esquizofrenia involucra una disregulación del **receptor retinoide**. Algunos análogos retinoides pueden alterar la expresión de receptores dopaminérgicos, lo que abre la posibilidad de su papel como antipsicóticos. En otra vía, habida cuenta que el diazóxido, empleado en formas severas de hipertensión e hiperglucemia por su capacidad de actuar sobre **canales de potasio**, potencia los efectos del haloperidol, sobre todo en la sintomatología positiva, se ha estudiado la posibilidad de buscar agentes que modulen mecanismos iónicos similares, ya que aparentemente existe una alteración de canales de potasio en pacientes esquizofrénicos.

Finalmente, los recientes y futuros avances dentro del campo de la **farmacología molecular**, junto con los conocimientos adquiridos a partir del mapa genético humano, podrán, posiblemente, controlar productos intracelulares que participan en la expresión génica celular supuestamente alterada en la esquizofrenia. En este sentido, a modo de ejemplo, se sabe que la clozapina produce un perfil inmunoreactivo *c-fos* diferenciable del observado con antipsicóticos clásicos, lo que podría servir de guía para desarrollar otros agentes antipsicóticos atípicos.

No debemos olvidar que el conocimiento de las enfermedades mentales y su tratamiento está lleno de escollos, dificultades y fracasos, pero a la vez de éxitos. Así, a principios de este año 2003 se ha descubierto la existencia de un nuevo grupo de proteínas denominadas **DRIPs** (*dopamine re-*

ceptor-interacting proteins), de las cuales la NCS-1 se encuentra en la corteza frontal de pacientes esquizofrénicos en un nivel 50% superior a los controles sanos. Esta proteína se fija intensamente sobre el receptor D_2 lo que aporta nuevas pistas para el desarrollo de nuevos agentes antipsicóticos.

ANTIDEPRESIVOS

La introducción clínica de los primeros fármacos antidepresivos en el arsenal terapéutico tuvo lugar durante la década de los 50 del pasado siglo, con el descubrimiento de las propiedades antidepresivas de la iproniazida y de la imipramina, primeros exponentes de las familias de los inhibidores de la monoamino-oxidasa (IMAOs) y de los antidepresivos tricíclicos (ADTs), respectivamente. Los ADTs, cuyo prototipo es la imipramina, se caracterizan bioquímicamente, por inhibir la recaptación de serotonina (5-HT) y noradrenalina (NA) y ejercer una acción antagonista sobre diversos receptores (adrenérgicos, colinérgicos muscarínicos o histaminérgicos). Estos agentes continúan siendo, en la actualidad, de referencia, sobre todo en investigación clínica, y mantienen las mismas tasas de eficacia que el resto de antidepresivos aparecidos posteriormente, mientras que los IMAOs (fenelzina, tranilcipromina) han sufrido una reducción en su utilización muy amplia, debido, en gran medida, a sus problemas de interacciones con otros fármacos psicoestimulantes y con alimentos ricos en tiramina, que pueden desembocar en serias crisis hipertensivas.

En los años 70 van apareciendo nuevos antidepresivos heterocíclicos, denominados en aquella época «antidepresivos atípicos» o de «segunda generación» (maprotilina, mianserina, trazodona, viloxacina, nomifensina), cuya característica principal es que presentaban una mayor selectividad de acción a nivel de los sistemas de transmisión monoaminérgicos. Por fin, desde finales de los 80 se introduce en clínica una nueva serie de familias de fármacos, que han sido en muchos casos un avance terapéutico, pero en otros una decepción, en el tratamiento de la depresión. Como eventos positivos entre estos nuevos antidepresivos podemos considerar, sobre todo, a los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS; fluvoxamina, fluoxetina, paroxetina, sertralina y citalopram), así como a los inhibidores de la recaptación de noradrenalina y serotonina (IRNS; venlafaxina), los antidepresivos noradrenérgicos y serotoninérgicos específicos (NaSSA; mirtazapina) y el inhibidor

selectivo de la recaptación de noradrenalina (ISRN) representado, hasta el momento, tan sólo por la reboxetina. Estos fármacos han aportado, frente a sus predecesores, considerables ventajas, sobre todo desde la perspectiva de la seguridad y la tolerancia, y algunos de ellos, como los ISRS, han permitido abrir el campo de la terapéutica antidepresiva a facultativos no psiquiatras. Por el contrario, la aceptación de agentes que combinan la inhibición de la recaptación de serotonina con el bloqueo de receptores postsinápticos 5-HT_2 (SARI; nefazodona; recientemente retirada del mercado por problemas hepáticos) y la de los inhibidores selectivos y reversibles de la monoaminooxidasa (RIMA; moclobemida) no ha sido la deseada.

La Tabla IV muestra las distintas familias de fármacos antidepresivos, clasificados en función de su perfil bioquímico.

TABLA IV

Clasificación de los antidepresivos, según su mecanismo de acción

Familia	*Acrónimo*	*Fármaco Prototipo*
Inhibidores de la recaptación de 5-HT y NA con acción bloqueante de diversos receptores	ADT	Imipramina
Inhibidores irreversibles de la MAO	IMAO	Fenelzina
Inhibidores de la recaptación de NA con acción bloqueante de diversos receptores		Maprotilina
Antagonistas de autorreceptores α_2		Mianserina
Inhibidores selectivos de la recaptación de DA	ISRD	Bupropion
Inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT	ISRS	Fluoxetina
Inhibidores reversibles de la MAO	RIMA	Moclobemida
Inhibidores de la recaptación de 5-HT y bloqueantes de los receptores 5-HT_2		Nefazodona
Antagonistas de auto- y heterorreceptores α_2 y receptores 5-HT_2 y 5-HT_3	NaSSA	Mirtazapina
Inhibidores de la recaptación de NA y 5-HT	IRNS	Venlafaxina
Inhibidores selectivos de la recaptación de NA	IRNA	Reboxetina

Tomada de Alamo y cols. (1998).

EFICACIA CLÍNICA DE LOS ANTIDEPRESIVOS: INDICACIONES Y USO TERAPÉUTICO

Actualmente, los antidepresivos se utilizan con gran profusión en toda una serie de cuadros psiquiátricos y no psiquiátricos. Dentro de los primeros, los trastornos afectivos unipolares, particularmente la depresión mayor, constituye su indicación principal, no sólo como tratamiento curativo, sino también profiláctico, para evitar o distanciar la aparición de una nueva fase depresiva o disminuir su intensidad. En la depresión mayor resultan eficaces en el 70% de los pacientes, por lo que en el 30% restante es necesario cambiar el antidepresivo o recurrir a tratamientos combinados. De todos los fármacos antidepresivos comentados anteriormente, los de mayor relevancia clínica y mayor uso terapéutico en la actualidad son los ADTs e ISRS, así como los antidepresivos de más reciente introducción clínica (venlafaxina, mirtazapina y reboxetina). Estos últimos, si bien no comparten propiedades farmacodinámicas y pertenecen a familias distintas, se caracterizan por haberse comercializado, en un intervalo de varios años, durante la segunda mitad de la pasada década de los 90.

Los **ADT** además de en los cuadros depresivos, se emplean también, con una eficacia menor, en las fases depresivas de la enfermedad maníaco-depresiva (generalmente en tratamiento de combinación con otros fármacos), en el tratamiento de la distimia (depresión neurótica) y ciclotimia, en los trastornos obsesivo-compulsivos (clomipramina, particularmente), en las fobias (agorafobia), en las crisis de pánico, en el alcoholismo, en las depresiones orgánicas y en los trastornos de la conducta alimenticia (bulimia y anorexia nerviosa). Fuera del marco psiquiátrico, los ADT pueden resultar eficaces en el manejo del dolor crónico, en algunos tipos de neuralgias (neuralgia postherpética, por ejemplo), en la enuresis, en la migraña, en el síndrome de colon irritable, en la apnea del sueño, en la narcolepsia, y en los accesos de risa o de llanto de la esclerosis múltiple.

La introducción de los **ISRS** dentro del arsenal terapéutico psicofarmacológico supuso un considerable avance en el abordaje de la depresión. Los ISRS han demostrado, mediante numerosos estudios clínicos controlados, una eficacia similar a la de los ADT en distintos cuadros depresivos. Además de los trastornos depresivos, y siguiendo criterios DSM-IV, distintos tipos de trastornos de ansiedad, como el trastorno obsesivo-

compulsivo (TOC), los ataques de pánico y la fobia social, junto con la bulimia nerviosa, han recibido, en distintos países, el aval de las autoridades sanitarias para su utilización. Recientemente, además de estas patologías psiquiátricas, algunos ISRS han sido aprobados por las autoridades reguladoras para su utilización en una patología no psiquiátrica, como es el síndrome disfórico premenstrual. Sin embargo, en los últimos años han comenzado a aparecer en la literatura científica numerosas publicaciones que evidencian la utilidad de estos fármacos ISRS en una gran cantidad de trastornos, tanto de la esfera psiquiátrica, como de patologías no psiquiátricas. Entre los primeros cabe mencionar los trastornos por abuso de sustancias (alcoholismo, adicción a opiáceos y cocaína, etc.), trastornos sexuales (disfunción sexual, parafilias), trastornos psicóticos, otros tipos de trastornos de ansiedad (trastorno de ansiedad generalizada, trastorno por estrés post-traumático), trastornos del control de los impulsos (tricotilomanía, cleptomanía, ludopatía, agresividad impulsiva), trastornos cognitivos (demencia), trastornos de la infancia (autismo), trastorno límite de la personalidad y otras entidades, en menor medida, como la anorexia nerviosa, el trastorno bipolar o los celos patológicos. Por su parte, entre las patologías no psiquiátricas en las que se ha ensayado el empleo de ISRS pueden citarse, además del mencionado síndrome premenstrual, la obesidad, distintos síndromes dolorosos, las cefaleas y migrañas o la epilepsia. Aunque algunas de estas potenciales indicaciones son prometedoras, otras poseen un carácter meramente anecdótico y todas deben ser estudiadas con más detalle, mediante herramientas clínicas controladas.

Los ensayos clínicos realizados con los **antidepresivos de más reciente introducción clínica** ponen de manifiesto, en general, que estos agentes suelen tener una eficacia similar a la de los ADT e ISRS, con los que se han comparado. Algunos ensayos aislados con venlafaxina, mirtazapina y reboxetina indican que su comienzo de acción podría ser más precoz que el observado con los ISRS. La mirtazapina muestra eficacia en depresión con insomnio y/o ansiedad (hecho posiblemente relacionado con el bloqueo selectivo de los receptores 5-HT_{2C}), mientras que la reboxetina parece especialmente eficaz, además de en pacientes diagnosticados de depresión severa, en depresiones que cursan con anergia y fatiga, facilitando, además, la rehabilitación social del paciente.

Aportaciones clínicas de los nuevos antidepresivos frente a los clásicos ADT

Desde el punto de vista clínico, los nuevos antidepresivos, considerando como tales a los ISRS, venlafaxina, mirtazapina y reboxetina, han aportado una serie de ventajas incuestionables sobre los clásicos ADT, constituyendo, en la actualidad, la más completa alternativa terapéutica, en el campo de la depresión. Esta nueva alternativa se basa en unos índices de eficacia clínica y de tiempo necesario para obtener esa respuesta antidepresiva, similares a los obtenidos con ADT, junto a aspectos farmacológicos que condicionan notorias diferencias en sus perfiles de tolerancia y seguridad, que se comentarán con más detalle posteriormente. Además, a estas destacadas ventajas, hay que añadir otras de tipo práctico, como la facilidad de manejo de los fármacos (en el caso de los ADT hay que escalar la dosis, con objeto de mejorar la tolerancia inicial y descartar abandonos terapéuticos por secundarismos) o la necesidad de efectuar una monitorización de los niveles plasmáticos del fármaco, innecesaria en el caso de los nuevos antidepresivos, debido a su gran margen terapéutico. Por último, hay que destacar las ventajas que han puesto de manifiesto los estudios farmacoeconómicos, sobre todo en el caso de los ISRS, en el sentido de que si bien los nuevos antidepresivos suponen un incremento de los costes directos de la depresión, los denominados costes indirectos se han reducido (disminución del riesgo de suicidio, descenso del uso de recursos asistenciales, pérdida de productividad laboral por absentismo, disminución de los gastos consecutivos a las discontinuaciones terapéuticas y al uso de terapéuticas concomitantes, etc.). Por todo ello, los nuevos antidepresivos, fundamentalmente los ISRS, constituyen, en la actualidad, el tratamiento de primera elección en los cuadros depresivos, sin que por ello se deba descartar el empleo de ADT, sobre todo en pacientes con respuesta previa positiva o en casos de fallos terapéuticos con los ISRS.

PERFIL DE TOLERABILIDAD Y SEGURIDAD DE LOS ANTIDEPRESIVOS

Efectos adversos de los fármacos antidepresivos

La actividad farmacodinámica de los antidepresivos no sólo condiciona el efecto terapéutico de los mismos, sino que, como se recoge en

la Tabla V, también determina el diferente perfil de efectos adversos observado con cada uno de ellos. Las diferencias más manifiestas entre los clásicos ADTs y los nuevos antidepresivos se centran en la incidencia de efectos adversos, debidos al diferente perfil bioquímico que exhiben estos agentes, y más concretamente al efecto antagonista de los distintos tipos de neurorreceptores (Tabla VI).

TABLA V

Efectos terapéuticos y adversos de los antidepresivos en función de su actividad farmacodinámica

Actividad farmacodinámica	*Fármacos antidepresivos*	*Efecto terapéutico*	*Efectos adversos*
Inhibición recaptación 5-HT	ADT ISRS Venlafaxina Nefazodona	Antidepresivo	Náuseas Nerviosismo Insomnio Disfunción sexual
Inhibición recaptación NA	ADT Venlafaxina Reboxetina	Antidepresivo	Taquicardia Hipertensión Temblores Disfunción sexual
Activación receptores 5-HT			
5-HT_{1A} postsináptico	ADT IMAOs ISRS Mirtazapina Nefazodona	Antidepresivo Ansiolítico	
5-HT_{1D}	ISRS		Cefaleas, migrañas
5-HT_{2}	ISRS	Antidepresivo Antiobsesivo Antibulímico	Insomnio Ansiedad Disfunción sexual Agitación, acatisia
5-HT_{3}	ISRS		Disminución del apetito Aumento motilidad gastrointestinal Náuseas, diarreas
Desensibilización receptores 5-HT_{1A} presinápticos	ADT ISRS Venlafaxina	Antidepresivo	

TABLA V *(Continuación)*

Efectos terapéuticos y adversos de los antidepresivos en función de su actividad farmacodinámica

Actividad farmacodinámica	*Fármacos antidepresivos*	*Efecto terapéutico*	*Efectos adversos*
Bloqueo receptores 5-HT			
5-HT_{1D} presinápticos	Pindolol	Antidepresivo	
5-HT_2	ADT	Antidepresivo	Hipotensión
	Mirtazapina	Mejoría función sexual	
	Nefazodona		
5-HT_3	Mirtazapina	Antiemético	
Bloqueo receptores colinérgicos muscarínicos centrales y periféricos	ADT (paroxetina)		Visión borrosa, estreñimiento Sequedad de boca Retención urinaria Taquicardia sinusal Trastornos de la memoria
Bloqueo receptores histaminérgicos H_1	ADT mirtazapina		Sedación, somnolencia Aumento de peso Mareos, hipotensión
Bloqueo de receptores adrenérgicos			
Receptores α_1 centrales y periféricos	ADT		Hipotensión ortostática Vértigo Taquicardia refleja Sedación
Receptores α_2	ADT	Antidepresivo	Priapismo
Regulación a la baja de la densidad de receptores β-adrenérgicos	ADT Fluoxetina Fluvoxamina Paroxetina Venlafaxina Nefazodona	Antidepresivo	
Inhibición de la mono-aminooxidasa	IMAO	Antidepresivo	Hepatotoxicidad Crisis hipertensivas Cefaleas, irritabilidad Trastornos esfera sexual Edemas, insomnio

Los clásicos **ADTs** se caracterizan por su falta de «limpieza bioquímica» en relación con su elevada capacidad de antagonismo de diferentes receptores de neurotransmisores (Tabla VI), fenómeno relacionado, en la mayor parte de los casos, con sus efectos indeseables. La prevalencia de efectos adversos significativos con los ADT es elevada, obligando aproximadamente a un 5% de los pacientes a suspender o disminuir la medicación, destacando, en este sentido, el bloqueo de receptores muscarínicos (Tabla V), que origina estreñimiento o sequedad de boca, y, en sujetos predispuestos, retención urinaria, trastornos de la acomodación visual o crisis de glaucoma. A nivel central, el bloqueo muscarínico puede favorecer la aparición de trastornos de la memoria, manifestados en forma de bloqueo de la palabra, confusión y delirio, especialmente en el anciano. En su toxicidad cardíaca intervienen también, aunque no de forma exclusiva, sus propiedades antimuscarínicas. Así, a dosis terapéuticas, puede observarse una ligera taquicardia sinusal, en la que, asimismo, intervienen, de forma refleja, el bloqueo α-adrenérgico y el bloqueo de la recaptación de noradrenalina. Su administración puede conducir a modificaciones electrocardiográficas, como prolongación de los espacios PR, QRS y QT del ECG. El bloqueo de los receptores α-adrenérgicos es, en parte, responsable de la hipotensión ortostática producida por los ADT (Tabla V). Este efecto adverso es muy frecuente (entre un 5 y un 24% de los pacientes según algunas estadísticas). La sedación es un efecto adverso de muchos ADT, que guarda relación con el bloqueo de receptores α_1 y H_1 centrales (Tabla V). Otro efecto adverso observado con los ADT, en tratamientos prolongados, es el aumento de peso, que conlleva, en un gran número de pacientes, al incumplimiento terapéutico. Este efecto se relaciona parcialmente con el bloqueo de receptores H_1 y se manifiesta particularmente por una excesiva apetencia por los alimentos hidrocarbonados.

Los nuevos antidepresivos se caracterizan por una mayor «limpieza bioquímica», debido a la escasa afinidad que exhiben por los receptores colinérgicos, adrenérgicos e histaminérgicos centrales y periféricos (Tabla VI). La mayor parte de los efectos adversos de los **ISRS** suelen ser de naturaleza leve y transitoria y se deben a la hiperestimulación de los receptores 5-HT pre y postsinápticos, como consecuencia del incremento de las concentraciones de serotonina en la hendidura sináptica. Así, el estímulo de los receptores 5-HT_2 es el responsable del efecto ansiogénico inicial (nervio-

TABLA VI

Afinidad receptorial (valores Ki, nM) de los antidepresivos

	5-HT$_1$	*5-HT$_2$*	*D$_2$*	*α_1*	*α_2*	*β*	*H$_1$*	*M*
Imipramina	8900	120	2400	90	3200	>5000	11	90
Amitriptilina	1000	8,3	1200	170	540	>5000	3,3	5,1
Clomipramina	5200	63	190	38	3300	>5000	31	37
Desipramina	2500	160	3800	130	7200	>5000	110	198
Fluvoxamina	>10000	>1000	>10000	7500	>10000	>5000	>10000	24000
Fluoxetina	>10000	>1000	>10000	5900	>10000	>5000	>1000	1300
Paroxetina	>10000	>1000	7700	>10000	>10000	>5000	>1000	89
Sertralina	>10000	>1000	>5000	300	>5000	>5000	>10000	500
Citalopram	>10000	>1000	>10000	4500	>10000	>5000	470	2900
Venlafaxina	>10000	>5000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>5000
Reboxetina	>1000	>1000	8800	>10000	>10000	>10000	1400	3900

5-HT (receptores serotoninérgicos); D (receptores dopaminérgicos); α y β (receptores adrenérgicos); H (receptores histaminérgicos); M (receptores colinérgicos o muscarínicos).
Modificada de Brunello y Racagni (1998).

sismo y/o ansiedad, insomnio, temblor, etc.) y el de los receptores 5-HT$_3$ de los efectos gastrointestinales (náuseas y vómitos). El tercer grupo de efectos adversos más habituales con los ISRS son las disfunciones sexuales (1,9-15,5% en ensayos clínicos), como la anorgasmia y la disminución de la líbido, mediadas posiblemente por el estímulo de receptores 5-HT$_{2A}$. No obstante, los reacciones adversas más habituales (náuseas, vómitos, diarrea, agitación, insomnio, etc.) tienden a disminuir o desaparecer con su uso continuado, debido a la desensibilización que producen de los receptores 5-HT. Además, la incidencia y gravedad de muchos de los efectos adversos son proporcionales a las dosis administradas.

En relación con los **antidepresivos de más reciente introducción**, la venlafaxina destaca por la inducción de náuseas, posiblemente debido al efecto inhibidor de la recaptación de 5-HT, observada también con los ISRS, aunque en menor medida, pues se ve incrementada por la inhibición de la recaptación de noradrenalina, y la tendencia a incrementar la presión sanguínea de forma dosis dependiente, hecho que se observa en el 3% de los pacientes tratados. La sequedad de boca y, en menor proporción, el estreñimiento son un fenómeno común a estos antidepresivos, pese a no bloquear receptores muscarínicos, debido al in-

cremento del tono noradrenérgico. La mirtazapina muestra también una elevada afinidad por los receptores histaminérgicos H_1, lo que se traduce en un incremento del apetito y del peso relacionado con este agente, así como su elevada incidencia de sedación y somnolencia, que aparece hasta en el 24% de pacientes tratados. La reboxetina puede provocar un incremento de la frecuencia cardiaca, menos frecuente en tratamiento crónico, que no se acompaña de anomalías electrocardiográficas. Contrariamente a la mayor parte de los ADT, y de forma similar a los ISRS, la venlafaxina y la reboxetina carecen prácticamente de afinidad sobre los receptores adrenérgicos α_1, α_2 y β, histaminérgicos H_1, dopaminérgicos, serotoninérgicos y colinérgicos muscarínicos (Tabla VI), según se desprende de los estudios de desplazamiento de radioligandos específicos. Por dicho motivo, los efectos indeseables consecuentes al bloqueo de estos receptores no han aparecido con la misma incidencia que la de los ADT, en los ensayos clínicos hasta ahora realizados con estos nuevos antidepresivos.

Seguridad en sobredosis

Además de la incidencia de efectos adversos, una segunda gran diferencia entre los ADT y los nuevos antidepresivos estriba en su perfil de seguridad en sobredosis. Algunos estudios han analizado la toxicidad relativa de los antidepresivos en sobredosis, confirmando la elevada incidencia de muertes (incluso a dosis 5 veces superiores a la terapéutica) en el caso de ADT, generalmente en individuos con ideación suicida. En este sentido, resulta paradójico que una enfermedad como la depresión, que se asocia a un elevado riesgo de suicidio, disponga de una terapia farmacológica que se pueda utilizar, en un momento dado, como herramienta autolítica. Datos recientes confirman que, en el Reino Unido, los ADT se asocian con 36 muertes por millón de prescripciones. La sobredosis con ADT cursa con convulsiones, hipertensión, arritmias y otras alteraciones del ECG y coma, siendo la parada cardiaca la causa primaria de la muerte. Por su parte, el riesgo de mortalidad por sobredosis de ISRS es prácticamente nulo, ya que estos fármacos no inhiben los canales rápidos de sodio, ni deprimen de forma importante el SNC, como los ADT.

Interacciones farmacológicas

La incidencia y trascendencia de las interacciones farmacológicas constituyen, desde el punto de vista de la seguridad, otro gran aspecto diferencial. Tanto los ISRS como los ADT dan lugar a interacciones farmacocinéticas, por su capacidad para inhibir las enzimas del citocromo P-450. Sin embargo, los ADT también pueden ocasionar importantes interacciones de tipo farmacodinámico, entre las que hay que destacar la potenciación de los efectos depresores sobre el SNC del alcohol y de otros psicofármacos, como las benzodiazepinas.

MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTIDEPRESIVOS

Inhibición de los sistemas de recaptación de monoaminas

La actividad terapéutica de los distintos agentes antidepresivos es achacable, sin duda, a diversos mecanismos bioquímicos. En este sentido, la inhibición de la recaptación de monoaminas (serotonina, noradrenalina y dopamina) juega un papel capital para la puesta en marcha y mantenimiento de los mecanismos de adaptación bioquímicos responsables del efecto antidepresivo. Las respuestas fisiológicas debidas a la activación o inhibición de estos sistemas de neurotransmisión pueden condicionar tanto los efectos adversos como los terapéuticos. Sin embargo, es evidente que no existe una correlación entre la potencia *in vitro* y *ex vivo* y las dosis terapéuticas utilizadas en pacientes depresivos. La Fig. 4 muestra la selectividad relativa de los diferentes antidepresivos en la inhibición de la recaptación de monoaminas.

Los **ISRS** se caracterizan por su capacidad de bloquear la recaptación de 5-HT a concentraciones muy alejadas de las necesarias para inhibir la de NA, según se ha puesto de manifiesto en estudios experimentales (sinaptosomas de cerebros de rata o plaquetas de voluntarios sanos), existiendo ciertas diferencias entre los fármacos de esta familia en la capacidad para el bloqueo de los transportadores. La imipramina, representada como prototipo de **ADT** clásico, inhibe ambas monoaminas, de forma inespecífica (Fig. 4). Algo similar sucede con la **venlafaxina**, que

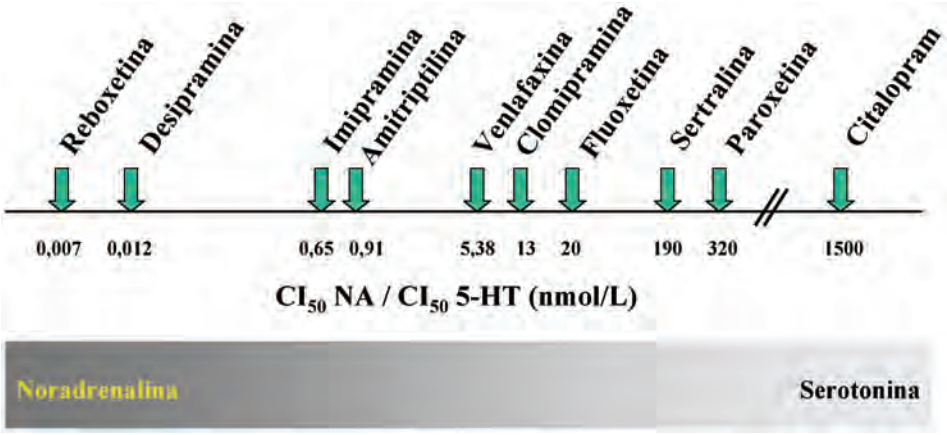


FIGURA 4. *Selectividad relativa de diferentes antidepresivos en la inhibición de la recaptación de monoaminas, representada por el índice NA/5-HT. Valores CI_{50} (concentración necesaria para inhibir el 50% de la captación) expresados en nmol/L. Modificada de Gorman y Sullivan (2000).*

carece asimismo de especificidad, pero que, a bajas concentraciones, inhibe, principalmente, la recaptación de 5-HT y, a concentraciones más elevadas, la de NA. La **reboxetina** es, en la actualidad, el inhibidor más potente y más selectivo de la captación de NA (Fig. 4), siendo necesarias concentraciones muy elevadas, inalcanzables en condiciones terapéuticas en el organismo, para inhibir la captación de 5-HT o de dopamina. La potencia inhibidora de la recaptación de 5-HT y NA viene recogida en la Fig. 4 como el cociente entre la CI_{50} (concentración del antidepresivo que inhibe en un 50% la recaptación de la monoamina correspondiente) para la NA *vs*. la CI_{50} para la 5-HT. Como se puede observar, en ambos extremos de la balanza se encuentran la reboxetina (agente más «noradrenérgico») y el citalopram (agente más «serotoninérgico»).

Mecanismo de acción de los agentes antidepresivos: aumento del tono monoaminérgico

El mecanismo de acción bioquímico responsable de los efectos terapéuticos de los antidepresivos no se conoce exactamente, aunque se han postulado varias hipótesis a tenor de su perfil farmacológico. Entre ellas, la más extendida es la que considera que, cuando estas sustancias inhiben,

en mayor o menor proporción, la recaptación de 5-HT y/o NA, aumentan las concentraciones sinápticas de estas monoaminas, incrementándose la transmisión serotoninérgica y/o noradrenérgica en el SNC (Fig. 5). De hecho, los antidepresivos se comportarían como agonistas indirectos. En este sentido, la inhibición inespecífica de la recaptación de noradrenalina y serotonina constituyen el cuerpo de acción antidepresiva de los ADT (Fig. 5). Los ISRS potenciarían de forma directa la neurotransmisión serotoninérgica, al bloquear el transportador presináptico de 5-HT, mientras que en el caso de la reboxetina, su mecanismo íntimo de acción pasa por la potenciación de la neurotransmisión noradrenérgica, gracias a su capacidad de inhibir de modo selectivo la recaptación de NA (Fig. 5). Por su parte, la venlafaxina es una sustancia dotada de capacidad inhibidora de ambos sistemas de recaptación (Fig. 5). Este fenómeno también es producido por la mirtazapina, pese a carecer de actividad inhibitoria de los sistemas de re-

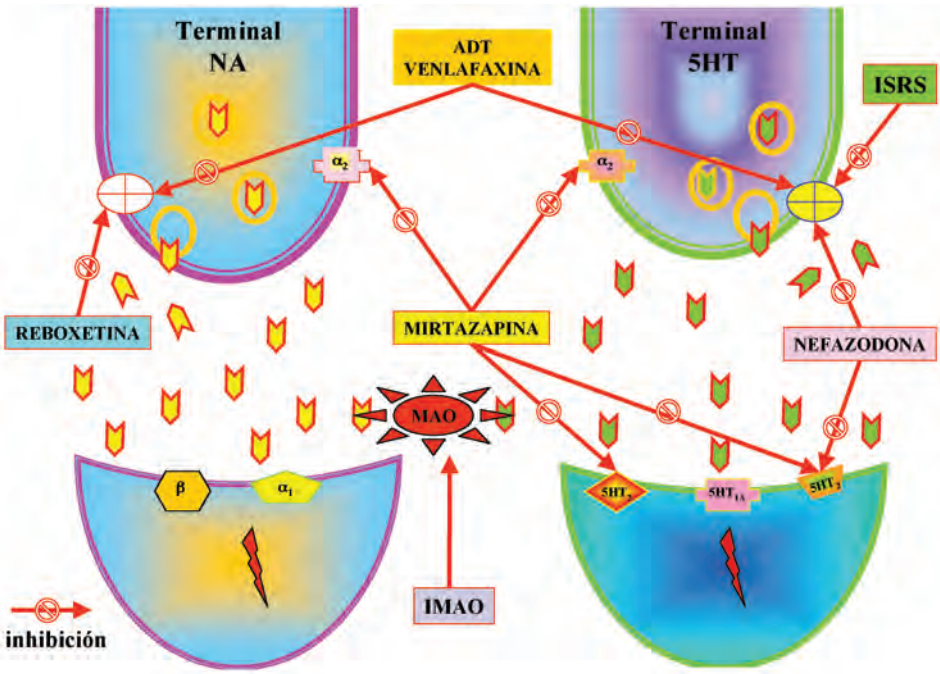


Figura 5. *Mecanismo de acción de los principales antidepresivos a nivel sináptico. Modificada de Alamo y cols. (2003).*

captación. El mecanismo de acción de este antidepresivo es doble; por un lado bloquea los auto— y heterorreceptores α_2 adrenérgicos, con lo que se incrementa la liberación de NA y 5-HT, y, por otro, potencia la neurotransmisión serotoninérgica por dos vías distintas. Primero, el aumento de la liberación de NA origina una descarga de las neuronas serotoninérgicas del rafe, y segundo, la mirtazapina bloquea los receptores 5-HT_2 y 5-HT_3, responsables de la mayor parte de los efectos adversos serotoninérgicos, vehiculizándose toda la transmisión serotoninérgica a través del receptor 5-HT_1, al que se asocia una gran actividad antidepresiva (Fig. 5).

Sin embargo, estas explicaciones resultan a todas luces incompletas, ya que si éste fuera el único mecanismo implicado, debería observarse una respuesta clínica casi inmediata. Por el contrario, la experiencia nos demuestra que la mejoría clínica aparece de forma gradual y, en general, no se observa hasta la segunda semana después de iniciado el tratamiento antidepresivo. No resulta pues ilógico pensar que el incremento en las concentraciones sinápticas de 5-HT y/o NA provoca en el SNC cambios bioquímicos secundarios o terciarios que contrarrestarían la/las anomalías bioquímicas responsables de los trastornos depresivos. En relación a este aspecto, algunos autores consideran que en los pacientes depresivos existe una actividad excesiva de receptores β-adrenérgicos y/o serotonérgicos 5-HT_2, la cual es reducida o regulada a la baja («*down regulation*») por algunos antidepresivo. Además, en algunos estudios experimentales se ha demostrado que los antidepresivos producen una desensibilización de los autorreceptores dopaminérgicos, una disminución de la densidad de los receptores adrenérgicos α_2-presinápticos y una desensibilización del sistema adenilatociclasa acoplado a los receptores β-adrenérgicos, los cuales podrían también contribuir a su actividad antidepresiva. Sin embargo, todos estos cambios adaptativos no se producen inmediatamente, lo que podría explicar el retraso en la aparición de la mejoría clínica tras el inicio del tratamiento con los antidepresivos.

Mecanismos post-receptoriales de transduccion intracelular como dianas de acción de los antidepresivos

Como hemos comentado, el incremento de monoaminas en la hendidura sináptica inicia una serie de cambios neuroquímicos intracelulares

que, según se ha postulado recientemente, influyen decisivamente en el efecto terapéutico de los fármacos antidepresivos. Los efectos intracelulares comentados de los antidepresivos han permitido proponer la hipótesis de que estos agentes, tras incrementar la acción de las monoaminas, *primeros mensajeros*, sobre sus correspondientes receptores y, con independencia de la vía de transducción de *segundos mensajeros* puesta en marcha (AMPc, DAG, etc.), tendrían un punto de convergencia común en las proteína quinasas (PKA, PKC, PKCaM), consideradas *terceros mensajeros*, que controlarían la expresión genética, mediante la fosforilización de factores de transcripción que podrían considerarse como *cuartos mensajeros* (Fig. 6). Según esta hipótesis, los ISRS, los ADT y los IRNA tendrían un mecanismo común intracelular, muy alejado de su punto de acción en la hendidura sináptica, que modularía, a través de modi-

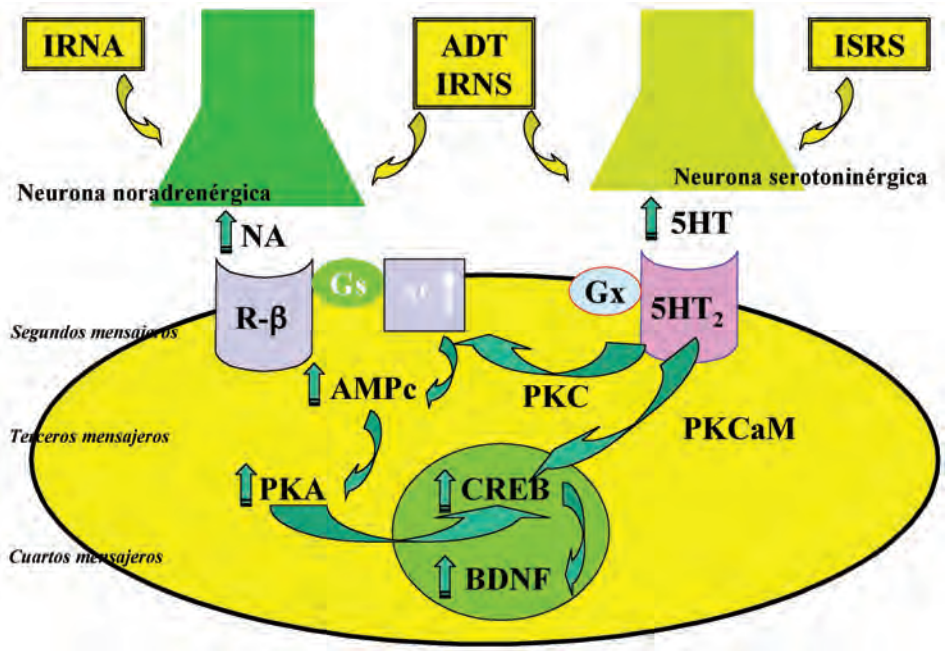


Figura 6. *Efectos neurobioquímicos intraneuronales de los antidepresivos y punto de convergencia final a nivel genético. G (proteínas G); AC (adenilato-ciclasa); PKA (protein-kinasa A); PKC(protein-kinasa C); PKCaM (kinasa dependiente de calcio y caldmodulina); CREB (cAMP response element binding protein); BDNF (brain derived neurotrophic factor). Modificada de Alamo y cols. (2003).*

ficaciones de la expresión génica, la síntesis de determinadas substancias, como la proencefalina, neurotensina, BDNF o enzimas, como la tirosina hidroxilasa, que, en definitiva, van a provocar cambios de adaptación funcional, acciones tróficas, o remodelados sinápticos, tendentes a contrarrestar las posibles anomalías presentes en la depresión.

El papel de las **proteínas G (PG)** en la modulación de señales receptoriales ha tenido, durante los últimos años, un gran interés. Ello es debido a que estas proteínas constituyen el paso post-receptorial inicial en las más importantes vías de transducción intracelular. Los antidepresivos, en administración crónica, son capaces de modificar el funcionalismo de distintas fracciones de estas PG, lo que ha hecho pensar que en la depresión pueda existir algún trastorno en la superfamilia de PG acopladas a receptores y que los antidepresivos actuarían modificando, se supone que hacia la «normalidad», esa disfunción de la PG. Por todo ello, se ha pensado que un objetivo terapéutico en el abordaje de los trastornos afectivos podría implicar la actuación de agentes farmacológicos sobre las PG. Es concebible que la síntesis de estos futuros medicamentos pueda ser obtenida a partir de un mayor conocimiento de las interacciones específicas de las toxinas bacterianas y víricas sobre este sistema de PG, pero, de momento, no existen fármacos dentro de este perfil que sean lo suficientemente específicos como para obtener los efectos deseados, sin que provoquen reacciones adversas importantes.

En un paso intracelular más allá de las PG, se sabe que la administración prolongada, aunque no aguda, de antidepresivos puede modificar los sistemas de fosforilización AMPc dependiente en áreas cerebrales concretas, gracias a la activación de **protein-quinasas**, especialmente la PKA, que regulan factores de transcripción que influyen en la expresión de proteínas específicas adicionales. Así, se ha constatado que la administración crónica de una gran variedad de antidepresivos disminuye la producción de AMPc, estimulada por forskolina, en hipocampo, mientras que otros antidepresivos, como imipramina o tranilcipromina, aumentan la actividad de la PKA no soluble y la disminuyen en la fracción citosólica de la corteza frontal, y la desmetilimipramina (DMI) incrementa las subunidades reguladoras de la PKA en fracción soluble de corteza frontal de rata. Del mismo modo, la administración crónica de fluoxetina o de DMI incrementa la unión del AMPc a la subunidad reguladora de la PKA.

Es importante resaltar que algunos de los pasos de las diferentes vías intracelulares pueden ser modificados de forma diferencial por distintos tipos de antidepresivos. Así, la reboxetina no modifica la fosforilización de una proteína específica del microtúbulo (MAP_2) AMPc dependiente, en contraste con lo que sucede con los ADT y los ISRS. De igual modo, mientras que los ADT y los ISRS son capaces de potenciar la unión del AMPc a la subunidad reguladora de esta PK, la reboxetina hace todo lo opuesto. Por el contrario, el comportamiento de la reboxetina es idéntico al de los ISRS en lo referente al incremento de la actividad fosforilizadora de la PK calcio- y calmodulina-dependiente (PKCaM). Por consiguiente, pese a que los diferentes tipos de antidepresivos pueden compartir mecanismos centrales comunes, la vía por la que afectan los citados mecanismos puede ser diferente, lo que podría contribuir a explicar las diferencias observadas entre antidepresivos, tanto desde el punto de vista terapéutico, como del de sus efectos adversos.

Independientemente de la vía implicada y del tipo de antidepresivo, parece ser que existen algunos cambios bioquímicos intracelulares comunes a la acción de todos los antidepresivos, como las modificaciones sobre un factor de transcripción encargado de mediar en gran parte de las acciones del sistema del AMPc sobre la expresión génica denominado **CREB** (*cAMP Response Element Binding Protein)*. Este sistema CREB está sometido a la acción de antidepresivos que actúan potenciando la transmisión serotoninérgica y/o noradrenérgica, prácticamente todos los conocidos de momento. Así, tras tres semanas de tratamiento con fluoxetina aumenta la función y la expresión del CREB en hipocampo. También se ha puesto de manifiesto que la desipramina, inhibidor de recaptación de noradrenalina, la fluoxetina, de serotonina, o la tranilcipromina, inhibidor de la MAO, administrados de forma crónica a ratones transgénicos (CRE-lacZ), incrementan la actividad del CREB sobre la transcripción genética en diversas áreas límbicas e hipotálamo. Estos datos indican que los antidepresivos, independientemente del mecanismo sináptico inicialmente implicado, provocan una regulación al alza del CREB, posiblemente en estado deficitario en sujetos depresivos, y que el tiempo necesario para que se produzca la inducción del CREB está cronológicamente relacionado con el efecto terapéutico del tratamiento antidepresivo.

Otros datos experimentales resaltan la importancia del CREB en la etiopatogenia de la depresión. El CREB regula el gen c-fos, responsable de la proteína c-fos, que a su vez es uno de los componentes del factor de transcripción AP-1 (proteína activadora 1). La importancia de ésta AP-1 viene dada por su capacidad de regular la expresión génica de la tirosina-hidroxilasa, paso limitante en la síntesis de catecolaminas, de la proencefalina y de la neurotensina. De igual manera, el incremento de CREB disminuye la expresión del ARNm de la hormona liberadora de corticotropina (CRH), hormona cuyos niveles se encuentran elevados en algunos tipos de depresión. También se ha demostrado que la administración de CREB en hipocampo, usando como vector el virus del herpes, produce un efecto antidepresivo experimental. Todos estos datos sugieren que el efecto antidepresivo inducido por agentes que elevan los niveles de CREB en hipocampo (antidepresivos, ECT) puede estar mediado por esta sustancia y que el CREB constituye una diana molecular para el estudio de nuevos agentes antidepresivos.

NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS EN EL MECANISMO DE ACCIÓN ANTIDEPRESIVO

Como se ha comentado, los mecanismos de acción antidepresivos explorados durante los últimos cuarenta años se han centrado fundamentalmente en el campo de las monoaminas. Este hecho tal vez explique, ya desde la perspectiva clínica, que la eficacia antidepresiva de todos los agentes disponibles en la actualidad sea similar, no superando el 70% de los pacientes, y que el inicio de acción de todos ellos sea relativamente lento, generalmente superior a las dos semanas. Recientemente se han elaborado nuevas teorías que intentan explicar, no sólo como actúan los antidepresivos, sino también porqué son eficaces las medidas terapéuticas en un determinado porcentaje de pacientes y en otros no, así como cuales son las causas de los distintos tipos de depresión. Los resultados de estos trabajos concluyen que la posibilidad de que no exista un mecanismo bioquímico unitario para explicar el efecto antidepresivo de todas las sustancias de las que actualmente disponemos es a todas luces evidente. De ahí que las investigaciones para esclarecer el mecanismo de acción de los antidepresivos prosigan en otras direcciones, así como para encontrar

nuevos *locus* de acción antidepresiva. De esta forma, se está estudiando el papel de los factores neurotróficos, de la CRH y de los glucocorticoides, de los aminoácidos excitatorios y del receptor NMDA, así como de otras posibles dianas (sistema opioide, interleukinas, substancia P, óxido nítrico, etc.).

En esta línea, distintos tipos de **neurotrofinas**, así como sus correspondientes receptores, pueden constituir dos dianas de importancia en el desarrollo de conocimientos sobre los mecanismos básicos implicados en la depresión y en su posible tratamiento. Así, existen evidencias que indican que el estrés disminuye la expresión de algunas neurotrofinas en el hipocampo y en el cortex frontal, y que ello puede aumentar la vulnerabilidad de las neuronas a distintas formas de agresión. La familia de las neurotrofinas incluye, entre otras, la neurotrofina-3, la neurotrofina-4 y también el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), proteína neurotrófica que parece jugar un importante papel en los mecanismos que rodean al fenómeno depresivo y al efecto de los antidepresivos, pudiendo actuar, en animales adultos, protegiendo a las neuronas del estrés.

Diversos hechos avalan la hipótesis de que las neurotrofinas puedan participar en el efecto terapéutico de algunos antidepresivos. Por una parte, se sabe que el BDNF exhibe propiedades antidepresivas en distintos modelos experimentales de depresión. Además, la administración crónica de antidepresivos, entre los que se encuentran los IRNS, inhibidores selectivos de la recaptación de alguna de estas aminas, IMAO y antidepresivos atípicos, así como la ECT, aumentan la expresión de BDNF y de los receptores de neurotrofinas (trkB) en hipocampo, coincidiendo estos efectos temporalmente con el efecto terapéutico. El BDNF es capaz también de aumentar el crecimiento de neuronas noradrenérgicas y serotoninérgicas, y proteger a estas neuronas del efecto neurotóxico. Por tanto, estos hechos apoyan el papel del BNDF en las acciones de los antidepresivos. Además, en necropsias de sujetos tratados con antidepresivos se observó un incremento de BDNF en diversas zonas del hipocampo en relación con los niveles de sujetos no tratados. Estos datos concuerdan con los incrementos de CREB observados en necropsias de pacientes tratados con antidepresivos y ponen de manifiesto que el incremento de BDNF es secundario al aumento de CREB inducido por el tratamiento antidepresivo, no sólo en animales de experimentación sino también en humanos.

Desde una perspectiva terapéutica, la posibilidad de incrementar la expresión de BDNF por inhibición de la metabolización del AMPc ha sido evaluada, mediante la administración crónica de inhibidores de la fosfodiesterasa (rolipram, RO-20-1724) de forma prolongada. En estas condiciones, se observa un aumento de la expresión del CREB y del BDNF en el hipocampo de rata, hecho que no se produce tras la administración aguda. Por otra parte, los datos expuestos permiten la búsqueda de análogos del BDNF capaces de actuar sobre el receptor trkB y poner en marcha los mecanismos intracelulares, supuestamente responsables del efecto de esta neurotrofina.

El descubrimiento, hace un par de décadas, del papel de la **CRH**, también conocida como CRF (*Corticotropin Releasing Factor*), en el control de las reacciones del eje hipofiso-adrenal, así como de otras zonas del SNC, ante el estrés, ha revolucionado nuestro conocimiento de la neurobiología de la depresión y ha abierto interesantes perspectivas terapéuticas. En la depresión, se ha descrito una hiperactividad del eje HHA (Hipotálamo-Hipofiso-Adrenal) (Fig. 7), manifestada por un incremento de niveles plasmáticos, urinarios y en LCR de cortisol, un aumento de ACTH, un aumento de los niveles de CRH en LCR y en cerebros de depresivos «post morten» y una disminución del control de retroalimentación negativo de glucocorticoides. La CRH parece actuar, no sólo como un factor liberador de ACTH, sino también como un neurotransmisor que media las acciones endocrinas, a través del eje HHA, las reacciones emocionales, a través de los núcleos amigdalinos, las respuestas cognitivas y conductuales, mediante las neuronas corticales, y las respuestas autonómicas, gracias a la conexión entre áreas amigdalinas y núcleos del tronco cerebral, en especial el locus coeruleus.

La acumulación de evidencias biológicas y clínicas hacen que en la actualidad se considere la alteración del sistema HHA como una parte integral de la patofisiología de la depresión, lo que ha motivado diversos investigadores se interesen por el posible papel antidepresivo de agentes que antagonizan los efectos de los glucocorticoides. En este sentido, se sabe que el tratamiento a largo plazo con antidepresivos aumenta la unión de los glucocorticoides a sus receptores cerebrales; además, aumenta la expresión génica del receptor corticosteroide y, en definitiva, aumenta el número de receptores de corticoides en estas áreas del SNC, lo que lle-

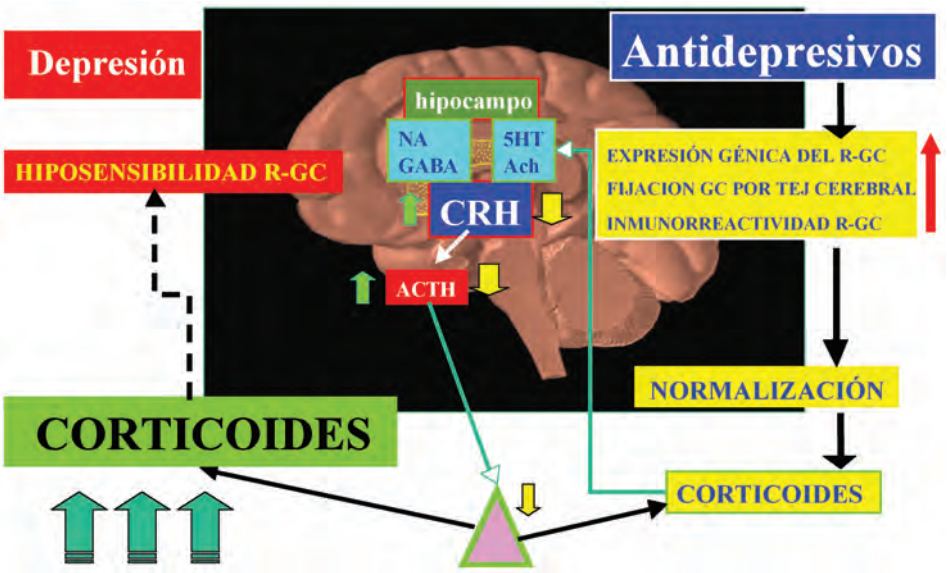


Figura 7. *Representación esquemática del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal y mecanismos de control en sujetos depresivos y tras tratamiento antidepresivo.*

va a la normalización de la cortisolemia (Fig. 7). De igual modo, se sabe que la ECT normaliza los niveles de CRF en LCR, al igual que lo hace la fluoxetina y ciertos ADT. Estos resultados concuerdan con el hecho de que la hiperactividad del eje HHA provoca una regulación a la baja de los receptores de los glucocorticoides, que es revertida por el tratamiento antidepresivo. Esto sugiere que los antidepresivos disminuyen la hiperactividad del eje HHA como resultado de una potenciación del «*feedback*» negativo, lo que normalizaría los niveles de glucocorticoides elevados (Fig. 7).

La importancia de la implicación del eje HHA en la depresión y su modificación por el tratamiento antidepresivo ha estimulado la búsqueda de nuevos abordajes de la depresión. Parece lógico, pues, que se haya intentado actuar, frente a la depresión, modificando de forma directa los niveles de cortisol, mediante la inhibición de su síntesis. En esta línea, tres agentes inhibidores de la síntesis de corticosteroides, como son la metirapona, la aminoglutetimida y el ketoconazol, así como un antagonista del receptor glucocorticoide, la mifepristona, han sido estudiados. Des-

afortunadamente, los datos obtenidos no son concluyentes, debido a la ausencia de estudios controlados, o controlados con placebo pero en un corto número de pacientes, lo que unido a la toxicidad y a una escasa eficacia, hace que, por el momento, no podamos contar con estos agentes en el arsenal terapéutico antidepresivo. Por otra parte, durante los últimos años, existe un enorme interés en el desarrollo de antagonistas del CRF como potenciales antidepresivos y ansiolíticos. En este momento, existen, aproximadamente, una decena de antagonistas en fase de desarrollo preclínico de los que los más estudiados son el CRA1000, CP-154,526 y DMP696.

En la línea de encontrar agentes que actúen a través de mecanismos diferentes a los clásicos, existen datos que hablan de la participación del **NMDA** en el mecanismo de acción de los antidepresivos. Como se ha señalado, la importancia del receptor NMDA en el espectro antidepresivo viene dada, además, por la capacidad que exhiben diversos antidepresivos de modular este receptor. De hecho, diversos ADT (imipramina y desipramina), IMAO (clorgilina, tranilcipromina), ISRS (fluoxetina, sertralina, citalopran), y agentes de segunda generación (mianserina) administrados de forma prolongada (14 días), antagonizan el locus de glicina del receptor NMDA en membranas corticales. Por otra parte, diversos moduladores del complejo receptorial del NMDA (Fig. 3), antagonistas (ácido 2-aminofosfoheptanóico), dizolcipina, y agonistas parciales de glicina (ACPC), mimetizan los efectos de los antidepresivos en varios modelos preclínicos predictivos de acción antidepresiva y provocan una hiporregulación de receptores β-adrenérgicos corticales. Además, con los ACPC, a las dos semanas de tratamiento, se consiguen efectos similares a los obtenidos a las 5 semanas del tratamiento con imipramina. Hay que recordar que un adelanto en el inicio de la acción antidepresiva es uno de los objetivos más buscados en investigación y terapéutica antidepresiva.

Desde el punto de vista clínico, se ha realizado una prueba conceptual en pacientes deprimidos tratados con una infusión de ketamina, modulador del canal del complejo receptorial NMDA. Estos pacientes, que eran resistentes a la terapia antidepresiva convencional, manifestaron una mejoría del humor, mantenida durante 72 horas tras la administración de ketamina. Este estudio piloto es coherente con los datos preclínicos observados con antagonistas del receptor NMDA. No obstante, los antago-

nistas competitivos de receptores de NMDA, como ketamina o fenciclidina, presentan el inconveniente de exhibir propiedades psicotomiméticas. Sin embargo, pueden tener mayor interés agentes de baja afinidad, como la nemantina, empleada en procesos neurodegenerativos crónicos, o los ACPC, actualmente en fase I, o agentes que actúan sobre otros locus del receptor NMDA, como el eliprodil y su análogo, el infeprodil, que lo hacen sobre el sitio de la poliamina, que no han mostrado, en los estudios clínicos en curso, propiedades psicotomiméticas.

Además, una serie de agentes antidepresivos (ADT, sertralina, bupropion, mianserina, IMAO, iprindol, trazodona y nomifensina) son capaces de fijarse, de forma específica, al receptor σ, marcado con pentazocina tritiada. Sin embargo, otros agentes estudiados, como la DMI, la paroxetina, la fluvoxamina y la sertralina, disminuyen la densidad del receptor σ en tratamiento agudo, aunque, por el contrario, la aumentan en tratamiento crónico. De acuerdo con estos hechos, se ha elaborado la hipótesis de que los antidepresivos podrían provocar cambios adaptativos en los receptores NMDA, como consecuencia de la modulación de los receptores σ, que a su vez modularían la respuesta neuronal a la estimulación del *locus* de glicina presente en el receptor NMDA. Si se considera por lo expuesto que la adaptación de receptores NMDA es necesaria para la acción de los antidepresivos convencionales, parece lógico pensar que los mecanismos implicados en la citada adaptación pueden ser una buena fuente para el estudio de nuevas moléculas antidepresivas que actúen más allá de los mecanismos aminérgicos. En este sentido es de destacar que existen interrelaciones importantes entre el receptor NMDA y el BDNF. De hecho, es conocido que esta neurotrofina ejerce un efecto protector neuronal y que por el contrario el receptor NMDA, mediante la facilitación de la entrada de calcio en la célula, ejerce un efecto agresivo sobre la neurona. Los antidepresivos incrementan, vía CREB, los niveles de BDNF y se ha podido demostrar que la exposición de células granulares a BDNF reduce los niveles de proteína y del ARNm de los receptores NMDA-2_A y NMDA-2_C. La magnitud de esta disminución de ARNm está dentro del rango de la observada tras la administración crónica de imipramina. Además, las modificaciones receptoriales NMDA inducidas por el BDNF se acompañan de una disminución de la entrada de calcio en la neurona, de modo similar a como lo realizan los antagonistas del receptor NMDA.

Algunos autores han implicado también al **sistema opioide** en la depresión y en el mecanismo de acción de los antidepresivos. Se basan, fundamentalmente, en la observación clásica de que algunos opiáceos podrían tener cierto poder antidepresivo. De hecho, algunos autores solicitan la aprobación de la buprenorfina en las depresiones resistentes. Pero, además, se sabe que la ECT incrementa los niveles plasmáticos de β-endorfina y que la administración de amitriptilina aumenta la concentración de leu-encefalina en hipotálamo y médula espinal. Además, se ha detectado un aumento en la densidad de receptores opioides del tipo μ, tanto en corteza frontal como en núcleo caudado de suicidas, densidad que disminuye cuando, de forma crónica, se administran antidepresivos. Finalmente, el hecho de que los opiáceos exógenos, endógenos e inhibidores del catabolismo de las encefalinas sean eficaces en modelos predictivos de actividad antidepresiva avalan la posibilidad de que, en un futuro, se puedan conseguir agentes antidepresivos que actúen a través de mecanismos opioides, sin los problemas de adicción que éstos presentan.

De forma paralela al rápido desarrollo de nuevos métodos inmunológicos, los mecanismos de inmunidad están ganando mayor importancia en el conocimiento de los trastornos psiquiátricos. Se han descrito alteraciones del sistema inmune en los trastornos depresivos y también en la esquizofrenia. En este sentido, existen indicios de que la cascada de citoquinas puede ser activada por procesos neuronales que tienden un estrecho puente teórico entre el estrés y su influencia sobre la inmunidad, en los trastornos depresivos. La **interleukina** 6 puede estimular neuronas *in vitro* para liberar dopamina y probablemente otras catecolaminas. De hecho, la aplicación periférica de interleukina 6 en el animal de experimentación potencia mecanismos dopaminérgicos y serotoninérgicos en el hipocampo y en la corteza frontal. Además, se han podido detectar niveles elevados de interleukina 6 en el suero de pacientes afectos de depresión mayor, correlacionados con los niveles de cortisol plasmático, lo que habla a favor de que ésta ejerciera algún efecto estimulador sobre el eje HHA. Por otro lado, el incremento de interleukina 6 se asocia con una disminución de triptófano en pacientes deprimidos, lo que parece enfatizar la influencia de la misma en mecanismos serotoninérgicos. En esta línea, es importante destacar que, en pacientes deprimidos, se ha podido observar una disminución de interleukina 6 tras tratamiento con fluoxetina, hecho que abre la hipótesis de una actuación de este antidepresivo

a través de mecanismos inmunológicos, lo que puede, posiblemente, ser un punto de partida en la psicofarmacología del futuro.

Además, se ha demostrado a nivel experimental que el tratamiento antidepresivo a largo plazo no sólo reduce los niveles cerebrales de interleukinas, sino también de prostaglandina E_2. La importancia de esta observación estriba en que la liberación presináptica de aminas biógenas se reduce por la PGE_2 y que los niveles plasmáticos de esta última están elevados en los pacientes depresivos. Por consiguiente, no resulta ilógico postular que los antidepresivos normalizan la neurotransmisión aminérgica central, gracias a la reducción de los niveles cerebrales de PGE_2, a través de una inhibición de la actividad ciclooxigenasa cerebral. Estos cambios, unidos a los descritos en relación a la función de los receptores glucocorticoides pueden ser los responsables de la normalización de la defectuosa neurotransmisión central, durante el tratamiento antidepresivo.

La **substancia P**, una neuroquinina que actúa sobre los receptores NK1, ha despertado un enorme interés en psiquiatría, ya que los antagonistas de estos receptores parecen exhibir propiedades ansiolíticas y antidepresivas experimentales. El MK-869 es el antagonista NK-1 mejor estudiado desde el punto de vista clínico, conociéndose sus propiedades antieméticas, aunque, curiosamente, pese al importante papel de la substancia P en el dolor, carece de propiedades antinociceptivas en el humano. Sus propiedades antidepresivas se han puesto de manifiesto en un estudio controlado, siendo superior al placebo y mostrando una eficacia similar a la de paroxetina, si bien con menos efectos adversos. Sin embargo, en estudios en fase II se observó una alta respuesta al placebo, por lo que la eficacia de este y otros antagonistas de la substancia P necesitan un ulterior respaldo clínico.

Por último, hay que comentar que distintos grupos de trabajo han centrado sus investigaciones en otras piezas del complejo depresión-antidepresivos, destacando, entre otros, la somatostatina, el neuropéptido Y (NPY), los mecanismos colinérgicos, los estrógenos, la testosterona, la leptina, la melatonina o el propio oxido nítrico (NO). Sin embargo, sin restar importancia a estas aportaciones, probablemente el problema que nos ocupa no tiene una única llave y es el conjunto de todos los esfuerzos lo que, finalmente, conseguirá que, en este milenio, podamos abrir la «caja de Pandora» que constituyen los trastornos afectivos y su tratamiento.

REGULADORES DEL HUMOR

Otro de los avances importantes dentro del campo de la psicofarmacología es el relativo al control de la sintomatología del trastorno bipolar. A los fármacos encargados de actuar en este difícil cuadro psiquiátrico se les ha denominado **eutimizantes, timorreguladores, estabilizadores o reguladores del humor**. El prototipo por excelencia de este grupo terapéutico es el **litio**. Este metal monovalente es el más ligero de todos los existentes en la Naturaleza y es químicamente el fármaco más sencillo de los utilizados en terapéutica psiquiátrica pero, por actuar a nivel intracelular, de los más complejos en cuanto a sus múltiples acciones farmacológicas. Las propiedades antimaníacas del litio fueron descubiertas en 1949 por el psiquiatra australiano John Cade, y en la actualidad, pese a sus limitaciones, conserva un lugar de privilegio dentro del arsenal terapéutico psicofarmacológico. De hecho, es considerado por muchos clínicos como el patrón de oro o estándar de los eutimizantes.

El litio actuaría como un agente «normalizador» sobre sistemas funcionales hiperactivos, sin afectarlos cuando se encuentran en condiciones basales normofuncionales. Ello explicaría su neutralidad psicodinámica en sujetos normales y su eficacia en pacientes con trastorno bipolar, impidiendo las fluctuaciones excesivas del humor, tanto hacia la manía como hacia la depresión. Por ejemplo, el litio inhibe la actividad adenilatociclasa estimulada por diversos agentes (noradrenalina, dopamina, histamina, etc.) y de igual modo, puede inhibir el recambio (*turnover*) de fosfoinositoles estimulado por diversas sustancias (acetilcolina, etc.), sin alterar ambos sistemas cuando se encuentran en condiciones de funcionamiento basal.

La eficacia antimaníaca del litio ha sido establecida (indicación aprobada por la FDA desde 1970) mediante estudios abiertos y controlados frente a placebo y antipsicóticos. En la actualidad, es considerado agente de **primera elección en los episodios maníacos e hipomaníacos agudos**, ya sea solo, en los cuadros más leves, o asociado a otros eutimizantes. Los primeros estudios de la eficacia del litio en la **profilaxis del trastorno bipolar**, realizados en las décadas de los 60 y 70, demostraron disminuir el número de recaídas, la intensidad de los síntomas y la duración de los episodios maníacos y depresivos, aunque en éstos su eficacia era menor. Sin embargo, estudios naturalísticos realizados poste-

riormente no fueron tan optimistas, no tanto por falta de eficacia sino por otras variables que afectan a la efectividad, como la no cumplimentación, el mal control de la litemia, la comorbilidad psíquica o somática, o la inclusión de pacientes con un diagnóstico cada vez más amplio dentro del espectro de trastorno bipolar. Pese a ello, en la profilaxis de los trastornos afectivos bipolares, el litio sigue jugando un papel importante, en especial cuando la sintomatología dominante es la maníaca sobre la depresiva. Estudios recientes, no obstante, cuestionan la eficacia del litio en la profilaxis de la fase depresiva, verdadero caballo de batalla de los eutimizantes, probablemente por su lento inicio de acción.

Pese a la incuestionable eficacia del litio, éste tiene una serie de limitaciones como son un margen terapéutico (dosis terapéutica/dosis tóxica) muy estrecho, junto con una excesiva frecuencia de efectos adversos (entre el 35 y el 93% de los pacientes los presentan) relacionados con sus concentraciones plasmáticas estacionarias o con los picos alcanzados tras su administración oral. Este perfil de efectos adversos, junto con la posibilidad de interacciones con otros medicamentos y la necesidad de controles periódicos de la litemia llevan al paciente, en muchas ocasiones, al incumplimiento de la medicación. Asimismo, el litio presenta menor eficacia antimaníaca en cuadros graves o de causa orgánica, así como cuando el inicio es en la adolescencia o en el anciano. En la manía mixta o disfórica y en cicladores rápidos, la eficacia del litio es muy deficiente. Tampoco debemos olvidar que, pese a la eficacia del litio, más del 50% de los pacientes bipolares se muestran refractarios al tratamiento, a lo que se añaden fenómenos de pérdida de eficacia (tolerancia farmacológica). Por lo expuesto, no es de extrañar que se busquen alternativas terapéuticas al litio que mejoren su eficacia y tengan un perfil de tolerabilidad más adecuado.

ALTERNATIVAS AL LITIO

En la actualidad, podemos considerar que el eutimizante ideal, es aquel que además de actuar sobre las fases depresivas y maníacas de la enfermedad, debe modificar la vulnerabilidad del sujeto a padecer las citadas crisis. Este regulador aún no ha sido descubierto. Por ello, con la introducción en este campo de los antipsicóticos y de los anticonvulsi-

vantes se hace necesario redefinir el termino eutimizante. Así, tal y como señala Charles Bowden (Universidad de Texas), un eutimizante sería un agente farmacológico que controlara al menos un aspecto primario del trastorno bipolar y que no empeorara ningún aspecto de la enfermedad. Con esta definición, según el autor, se pueden considerar eutimizantes el litio, el valproato, la carbamazepina, la lamotrigina y algunos antipsicóticos atípicos, y se excluirían los antidepresivos y los neurolépticos clásicos, por su capacidad de agravar la fase maníaca o la depresiva, respectivamente.

Los **anticonvulsivantes clásicos**, en especial la carbamazepina y el valproato**,** se han empleado desde principios de la década de los 70 en el tratamiento del trastorno bipolar. Desde el punto de vista clínico**,** existe una cierta polémica en torno al papel de la **carbamazepina** en el trastorno bipolar, motivada, fundamentalmente, por críticas metodológicas a los estudios clínicos. En la actualidad, la carbamazepina centra fundamentalmente su utilidad en la manía aguda, donde se ha mostrado con igual o menor eficacia que el litio, por lo que se reserva para pacientes resistentes al ion. En la prevención de recurrencias, la carbamazepina fue menos eficaz que el litio y se asoció con una alta tasa de abandonos de la terapéutica por su mala tolerabilidad y problemas de interacciones. En la actualidad, este agente ha visto disminuida sus recomendaciones en las más recientes guías de expertos. El **ácido valproico** y su sal sódica (**valproato**) son agentes anticonvulsivantes que han sido estudiados en diversos ensayos clínicos en el tratamiento de la manía aguda, mostrándose superior al placebo y similar al litio y a los antipsicóticos (haloperidol, olanzapina). En el tratamiento de mantenimiento de pacientes recurrentes, su eficacia es menor que en la manía aguda, previniendo mejor las fases maníacas que las depresivas.

Habida cuenta de las limitaciones comentadas del litio, la inclusión en el arsenal terapéutico del trastorno bipolar de los anticonvulsivos clásicos, como la carbamazepina y el valproato, abrió el espectro de tratamiento. Pese a ello, muchos pacientes son refractarios a los esquemas convencionales y otros manifiestan problemas de tolerancia, debido a los efectos colaterales de los medicamentos. Por eso prosigue la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para esta difícil enfermedad. En particular, la depresión bipolar, así como los cuadros de ciclación rápida y la manía mixta (disfórica) continúan siendo un problema para los tratamientos clásicos.

De acuerdo con el criterio de Bowden, los **nuevos fármacos anticonvulsivantes** han renovado el interés por la terapia del trastorno bipolar, habida cuenta de su eficacia y de la menor incidencia de reacciones adversas observada, sobre todo, en un gran número de pacientes epilépticos, en los que se tiene una amplia experiencia. En los últimos años, estos fármacos, que han revolucionado el tratamiento de la epilepsia, han sido estudiados también como posibles eutimizantes; de ellos, la **lamotrigina** es la que tiene una mayor evidencia de eficacia basada en estudios clínicos controlados, lo que ha permitido que haya sido el primer fármaco aprobado por la FDA, después del litio, en el tratamiento de la fase de mantenimiento del trastorno bipolar. La lamotrigina ha mostrado su eficacia en cuadros bipolares refractarios, siendo más eficaz que el litio en la prevención de las recurrencias depresivas. Del mismo modo, en pacientes cicladores rápidos y en depresión bipolar, en asociación o monoterapia, mostró mayor eficacia que valproato y carbamazepina. El perfil clínico de lamotrigina indica que parece ser especialmente eficaz en pacientes con predominio de fases depresivas, a diferencia del litio y de los antiepilépticos clásicos, que previenen mejor la manía que la depresión. La Asociación de Psiquiatría Americana (APA) recomienda la lamotrigina en el tratamiento de los episodios depresivos bipolares y como alternativa al valproato en el tratamiento de cicladores rápidos. Asimismo, la lamotrigina parece más eficaz en la terapia de mantenimiento del trastorno bipolar II (caracterizado por fases depresivas con episodios de hipomanía). El resto de nuevos antiepilépticos, como el **topiramato** o la **gabapentina** pueden considerarse medicación coadyuvante. En efecto, su posible efecto antimaníaco, observado en estudios abiertos, en monoterapia o en asociación, no se ha visto confirmado en estudios controlados. La ventaja aparente del topiramato como coadyuvante estriba en que no ocasiona aumento de peso, fenómeno muy frecuente con otros eutimizantes, sino que más bien podría ayudar a disminuirlo. En relación con la gabapentina hemos de señalar que, a la luz de estudios controlados frente a principios activos y placebo, carece de eficacia antimaníaca significativa. Su papel en estos cuadros parece secundario a su efecto ansiolítico, en asociación con otros eutimizantes. La **oxcarbazepina** exhibe un perfil clínico similar a la carbamazepina, pero con menos potencial de efectos secundarios e interacciones, por lo que su eficacia antimaníaca se presupone.

En relación con los **antipsicóticos clásicos** o **neurolépticos**, la clorpromazina y el haloperidol han sido los más estudiados. El haloperidol es el neuroléptico más empleado en la fase aguda de la manía para controlar la hiperactividad psicomotora que experimentan algunos pacientes y su empleo se recomienda en los primeros momentos del tratamiento, junto a la terapia con sales de litio. Estos agentes no han mostrado eficacia a largo plazo en la terapia de mantenimiento. Además, los neurolépticos pueden provocar numerosos efectos secundarios, especialmente de tipo extrapiramidal, y agravar la sintomatología depresiva, por lo que su empleo debe ser limitado a la fase aguda. La aparición de los **antipsicóticos atípicos**, dado su diferente perfil de tolerabilidad, ha renovado el interés en la investigación terapéutica en las distintas fases de la enfermedad bipolar. Además, su amplio uso en la esquizofrenia aporta datos fiables de su mayor seguridad sobre los antipsicóticos convencionales. Como consecuencia de ello, tanto la **risperidona** como la **olanzapina** han conseguido la aprobación de su indicación como agentes antimaníacos. Asimismo, existen datos que hablan a favor de que esta eficacia se hace extensiva a clozapina, ziprasidona y quetiapina.

ANSIOLÍTICOS

Con anterioridad a la denominada «era de la psicofarmacología», los únicos agentes farmacoterapéuticos utilizados en el tratamiento de los trastornos de ansiedad fueron el alcohol, el opio y los bromuros. Desde que, en 1903, se introdujo en terapéutica el barbital, los barbitúricos presidieron el tratamiento de la ansiedad y el insomnio, hasta la década de los 50. Sin embargo, el estrecho margen terapéutico de estos agentes, dio paso, en la década de los 50, a la introducción del meprobamato, que disociaba, mejor que los barbitúricos, los efectos ansiolítico y sedante, aunque el desarrollo de síndromes de retirada limitó rápidamente su uso. Al principio de los años 60 se comercializaron las primeras benzodiazepinas (BZDs), agentes que se mostraron muy eficaces en el tratamiento de la ansiedad y aportaron un mayor margen de seguridad. Finalmente, en la década de los 90 se empiezan a explorar las características clínicas de agentes que actúan a través de mecanismos diferentes a los de las BZDs (entre los que destaca la buspirona), pero sobre todo, se consigue un mejor conocimiento de las propiedades ansiolíticas de los nuevos antidepresivos.

Los ansiolíticos, como cualquier familia terapéutica, pueden clasificarse de acuerdo a diferentes criterios (químicos, funcionales, etc.), aunque una forma muy interesante de hacerlo es a tenor del tiempo necesario para el inicio de su acción ansiolítica, pues este espacio de tiempo es fundamental en su uso terapéutico y suele implicar mecanismos básicos diferentes. De esta forma, existen agentes cuyo ***inicio de acción es rápido***, que, por lo general, emplean mecanismos en los que está implicado el funcionalismo gabérgico y el de aminoácidos excitatorios, y que producen ansiolisis poco tiempo después de alcanzar el SNC. Entre éstos se encuentran las **BZDs**; además, pertenecen a este grupo agentes en claro desuso, como los **barbitúricos** y el **meprobamato**, y sustancias, como el alcohol, que, pese a su amplio uso, no pueden considerarse, en sentido estricto, agentes terapéuticos. Por otra parte, existen fármacos cuyo ***inicio de acción es retardado***, que suelen implicar mecanismos aminérgicos en su acción farmacológica, y consiguen su eficacia ansiolítica varios días después de su administración continuada. Entre estos se encuentran las **azapironas**, cuyo prototipo es la buspirona, y sus análogos ipsapirona y gepirona, que se comportan como agonistas parciales de los receptores 5-HT_{1A}, así como diversos **antidepresivos**, cuyas propiedades ansiolíticas fueron conocidas casi al unísono de las antidepresivas. Algunas características farmacológicas diferenciales de los ansiolíticos vienen recogidas en la Tabla VII.

Otros agentes que se han considerado en el tratamiento de la ansiedad han sido los **antihistamínicos**, que no son buenos ansiolíticos, ya que su efecto sedante es intenso y el desarrollo de tolerancia aparece al poco tiempo de tratamiento, y los **neurolépticos**, que poseen propiedades ansiolíticas, aunque su uso como tales debe limitarse a cuadros donde el componente psicótico sea predominante. Consideración especial merecen los **bloqueantes β-adrenérgicos** que, pese a no tener un efecto directo sobre la ansiedad, reducen la sintomatología vegetativa y la preocupación del paciente por su estado de salud. También los agentes **anticonvulsivantes,** especialmente la gabapentina, están siendo empleados en ciertos tipos de trastornos de ansiedad, como el trastorno de estrés post-traumático (TEPT) y el trastorno de pánico.

En la actualidad, se podría afirmar que un agente ansiolítico es aquel capaz de controlar y mejorar los síntomas de ansiedad, a dosis a las que

no produce sedación o sueño. Esta diferenciación puede ser de gran trascendencia clínica, ya que permite al sujeto enfrentarse a sus labores socio-laborales sin ansiedad y sin merma de su rendimiento.

EFICACIA CLÍNICA DE LOS ANSIOLÍTICOS: INDICACIONES Y USO TERAPÉUTICO

Tradicionalmente, las **BZDs** han sido el primer escalón en la farmacoterapia de los pacientes con ansiedad, así como en individuos sanos bajo condiciones de estrés. En líneas generales, el efecto ansiolítico aparece de forma rápida, lo cual constituye una importante ventaja frente a otros agentes, y puede conseguirse a dosis que provocan mínima sedación. Las BZDs alivian la sintomatología vegetativa, tanto objetiva como subjetivamente, así como la tensión muscular acompañante de los cuadros ansiosos. Asimismo, estos agentes disminuyen la situación de alerta o hipervigilancia presente en la ansiedad (Tabla VII).

TABLA VII

Características farmacológicas diferenciales de los ansiolíticos

	BZDs	*Buspirona*	*Antidepresivos*		*Antagonistas-β*
			ADTs	*ISRSs*	
Mecanismo acción	Potenciación transmisión GABA	Estímulo receptores 5-HT	Potenciación transmisión aminérgica		Bloqueo receptores NA
Inicio acción	↑↑↑ **(rápido)**	↑↑ **(intermedio)**	↑↑↑ **(ratardado)**	↑↑↑ **(ratardado)**	↑↑↑ **(rápido)**
Aprensión	↓	↓↓	↓↓↓	↓↓↓	0
Vigilancia	↓↓↓	↓	↓	↑→0	↓
Síntomas vegetativos					
Subjetivos	↓↓↓	↓↓	↓↓	↑→↓↓	↓↓↓
Objetivos	↓		↓	0	↓↓↓
Tensión muscular	↓	0	0	0	0
Tolerancia	+ / –	0	0	0	0
Abuso	+	0	0	0	0

Tomada de Cuenca y cols. (2002).

El uso de BZDs en periodos cortos de tiempo puede ser de utilidad para la profilaxis de situaciones previsibles de estrés (viajes aéreos, extracciones dentarias, maniobras ortopédicas, exploraciones endoscópicas) o en el estrés provocado por situaciones catastróficas o accidentes, durante algunos días, ya que estos cuadros tienen una alta tasa de resolución espontánea. Sin embargo, el uso de BZDs en periodos prolongados es mucho más discutido y controvertido. En este sentido, parece existir un cierto contrasentido, ya que muchas BZDs han sido aprobadas para ser empleadas durante periodos cortos mientras que en muchas ocasiones la manifestación de la ansiedad es crónica y necesita un tratamiento prolongado. El trastorno de ansiedad generalizada (TAG) es un ejemplo. En el TAG, el tratamiento recomendado con BZDs supone su administración durante intervalos intermitentes de tiempo de entre 2 y 4 semanas de duración. Sin embargo, este trastorno suele tener un curso crónico y muchos pacientes necesitarán tratamiento durante varios años. En cualquiera de los casos, menos de 2/3 de los pacientes obtienen la remisión total de sus síntomas, por lo que se han impuesto en este cuadro otras alternativas terapéuticas como son los antidepresivos. En el caso de las fobias sucede algo parecido, ya que la eficacia de las BZDs es superior a la de los antidepresivos en las primeras semanas de tratamiento, pero inferior a partir de este momento. Por otra parte, como el cese de la medicación en estas patologías se acompaña de un 80% de recaídas, existe la tendencia a recurrir a las BZDs de forma continuada, con los problemas que ello puede acarrear.

Desde el punto de vista clínico, la **buspirona** muestra una actividad ansiolítica similar a la del diazepam, e incluso superior en cuadros con sintomatología depresiva asociada, sin ocasionar en estos pacientes el deterioro cognitivo que inducen las BZDs, ni disminuir el rendimiento psicomotor o ejercer una depresión respiratoria, propiedades todas ellas de utilidad para el anciano o para pacientes con patología respiratoria o apnea del sueño. Además, no induce fenómenos de dependencia y abstinencia, y no interacciona con el alcohol y otros depresores del SNC. La principal indicación de la buspirona es el TAG, donde ejerce un efecto ansiolítico de inicio retardado. Asimismo, puede emplearse en pacientes en los que la ansiedad es un fenómeno acompañante de la depresión o en casos de consumo de alcohol. Sin embargo, entre sus inconvenientes clínicos destaca el retraso en el inicio del efecto ansiolítico (hasta 2 semanas), lo que ha limitado enormemente su uso terapéutico.

El descubrimiento de las propiedades ansiolíticas de los **antidepresivos** fue un hecho casi paralelo al hallazgo de la eficacia antidepresiva de la imipramina. Los ADTs han mostrado su eficacia en el trastorno de angustia, en el TAG, así como en los síntomas ansiosos y depresivos presentes en el TEPT. Desde una perspectiva general, la imipramina y la clomipramina pueden considerarse agentes «antipánico» reconocidos, procurando un estado libre de crisis en un porcentaje importante de pacientes y manteniendo una eficacia terapéutica a largo plazo. Además, sobre la sintomatología depresiva, asociada al trastorno de angustia, los ADTs muestran una eficacia superior a las BZDs. Además, los ADTs mejoran la agorafobia y disminuyen el deterioro sociolaboral provocado por el trastorno de angustia. A pesar de estos hechos, existen una serie de limitaciones en el uso clínico de estos agentes como ansiolíticos, que se añaden a su elevada incidencia de efectos adversos. Así, la eficacia de los ADTs en la fobia social es cuestionada y, con la excepción de la clomipramina, son ineficaces en el TOC. Por su parte, los IMAOs (fenelzina, iproniazida) han sido empleados en varios cuadros ansiosos y han mostrado su eficacia en cuadros equivalentes al trastorno de angustia, pero la información no se encuentra suficientemente actualizada, ni se conoce su eficacia a largo plazo. Además, el problema de las interacciones con otros medicamentos y alimentos prácticamente los ha relegado a un plano de utilización muy marginal.

Sin embargo, los nuevos agentes antidepresivos, que poseen un mejor perfil de efectos indeseables que los ADTs e IMAOs, han renovado el interés por el estudio de su eficacia clínica en los diferentes estados de ansiedad. En la actualidad, el empleo de ISRSs en el trastorno de angustia es una práctica habitual, siendo considerados los fármacos de primera elección en esta patología ansiosa, por presentar igual o mayor eficacia que otros antidepresivos o que el alprazolam, un mejor perfil de efectos adversos y una dosificación más sencilla. En lo relativo a la acción de los ISRSs sobre la agorafobia, el componente de ansiedad global y la sintomatología depresiva comórbida al trastorno de angustia, es de destacar que su eficacia es similar o superior a la de los ADTs, así como en la mejoría del funcionamiento sociolaboral. Por todos estos motivos, los ISRSs están emergiendo como agentes de primera elección y como los más eficaces en el tratamiento global del trastorno de angustia. En relación con el TAG, los ISRSs, al igual que sucede con los ADTs, obtie-

nen mejores resultados que las BZDs a partir de las 3-4 semanas de tratamiento, en especial en lo referente a la sintomatología psíquica. La eficacia de los ISRSs en el TOC y en la fobia social ha sido contrastada con numerosos estudios clínicos controlados. Asimismo, la eficacia de los ISRSs en la sintomatología del TEPT, a dosis superiores a las antidepresivas, también ha sido confirmada mediante ensayos clínicos.

PERFIL DE TOLERABILIDAD Y SEGURIDAD DE LOS ANSIOLÍTICOS

Entre los efectos adversos más frecuentes de las **BZDs**, utilizadas a dosis terapéuticas, pueden citarse la somnolencia (10% de los pacientes) y la sedación, más manifiestas al inicio del tratamiento, ya que se produce tolerancia, la disminución del rendimiento psicomotor y ciertos cuadros confusionales, aunque también pueden aparecer mareos y ataxia. La amnesia anterógrada se asocia al uso de las BZDs más potentes. Muy raramente se han descrito reacciones alérgicas o un aumento paradójico de la agresividad. Estos fármacos también pueden producir deficiencias respiratorias significativas en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica o con apnea del sueño.

A pesar de ser una de las herramientas más utilizadas en los casos de ideación suicida, las BZDs, por sí solas, son relativamente seguras en sobredosis, sobre todo en comparación con otros agentes sedantes como los barbitúricos. El síntoma principal de la sobredosis por BZDs consiste en la inducción de un cuadro de sueño prolongado, aunque sin una depresión importante de las funciones respiratoria y cardiovascular. Los efectos más peligrosos ocurren cuando se administran concomitantemente con otros sedantes como el alcohol. En estos casos puede producirse una excesiva somnolencia, desinhibición y depresión respiratoria, así como graves déficits cognitivos.

El problema de seguridad que más suele preocupar a profesionales sanitarios, generalmente no clínicos, y pacientes, en relación con las BZDs, al igual que sucede con los clásicos ansiolíticos (barbitúricos y meprobamato), es su capacidad para ocasionar **fenómenos de tolerancia y dependencia**. Es un hecho contrastado que la utilización a largo plazo de las BZDs puede ocasionar un fenómeno de tolerancia a sus efectos farmacológicos, que

es más manifiesto para el efecto hipnótico, sedante y la alteración del rendimiento psicomotor. Por el contrario, la tolerancia a los efectos ansiolíticos es muy improbable y, en su caso, de inicio muy tardío. Las BZDs, al igual que otros agentes sedantes, ansiolíticos e hipnóticos, dan lugar, tras su suspensión brusca, a una serie de síntomas de retirada, que suelen corresponder a la imagen en espejo de sus efectos terapéuticos, como son ansiedad, agitación, insomnio, etc. La aparición de estos cuadros sintomatológicos constituiría una expresión del desarrollo de un fenómeno de dependencia. cuya forma más grave, aunque de incidencia muy baja, es el denominado síndrome de abstinencia con convulsiones o «crisis de abstinencia», más frecuente en pacientes politoxicómanos o con antecedentes de trastornos convulsivos. El tipo de BZD también parece influir en la génesis de estos cuadros, de forma que la aparición de síntomas de supresión guarda una relación inversa con la vida media del fármaco (comienzan antes y son más intensos después de la interrupción brusca de BZDs de vida media corta). Sin embargo, hay que hacer constar que las BZDs, cuando se emplean bajo control médico y no a título recreativo, no constituyen un grupo de fármacos de carácter adictivo, ya que con ellas no tienen lugar las características propias de las drogas de abuso (deseo de consumir y dificultad para interrumpir el consumo, pérdida de control sobre el mismo, tendencia a consumir sobredosis, existencia de un patrón de consumo crónico de tipo compulsivo o el desarrollo de graves consecuencias para el sujeto y su entorno socio-familiar). Por otra parte, su aislado como adictivos es mínimo. De hecho, en una serie de cerca 33.000 pacientes tratados con BZDs durante 15 años, el grupo de Allgulander sólo constató 38 casos de dependencia.

Por su parte, la **buspirona** aporta una serie de ventajas evidentes sobre las BZDs, desde la perspectiva de la seguridad, pues posee un perfil de efectos adversos notoriamente más favorable (sin fenómenos de dependencia y abstinencia, sin interacciones con el alcohol y otros depresores del SNC, sin efecto sedante y amnesiante, etc.). Entre los principales efectos adversos de este fármaco se encuentran las náuseas, vértigos y cefaleas, que pueden minimizarse iniciando el tratamiento con dosis bajas e incrementándolo gradualmente. Sin embargo, entre sus inconvenientes clínicos, además de su ineficacia en pacientes tratados previamente con BZDs, destaca el retraso en el inicio del efecto ansiolítico (hasta 2 semanas), lo que ha hecho que en España y otros países europeos, no así en USA y Gran Bretaña, su uso terapéutico sea anecdótico.

MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ANSIOLÍTICOS

La mayor parte de las acciones farmacológicas de las **BZDs** a nivel del SNC (sedación, hipnosis, disminución de la ansiedad, relajación muscular, amnesia anterógrada y actividad anticonvulsiva) tienen lugar por la capacidad de estos agentes de potenciar las acciones del GABA, al unirse ambas moléculas al complejo receptorial $GABA_A$-benzodiazepínico-canal ionóforo del cloro (Fig. 8). Este complejo receptorial, perteneciente a una superfamilia de receptores ligados a canales iónicos de respuesta rápida, está integrado por tres elementos constitutivos: a) un lugar de acción para el aminoácido, el receptor $GABA_A$, b) un sitio para las BZDs, el receptor benzodiazepínico y c) un canal ionóforo para el cloro. En concreto, la estimulación del receptor $GABA_A$ aumenta la entrada del ion cloro al interior de la célula, lo que ocasiona una hiperpolarización de la membrana neuronal. Por tanto, el GABA se comporta como un neurotransmisor inhibidor. Esta inhibición puede ser presináptica, disminuyen-

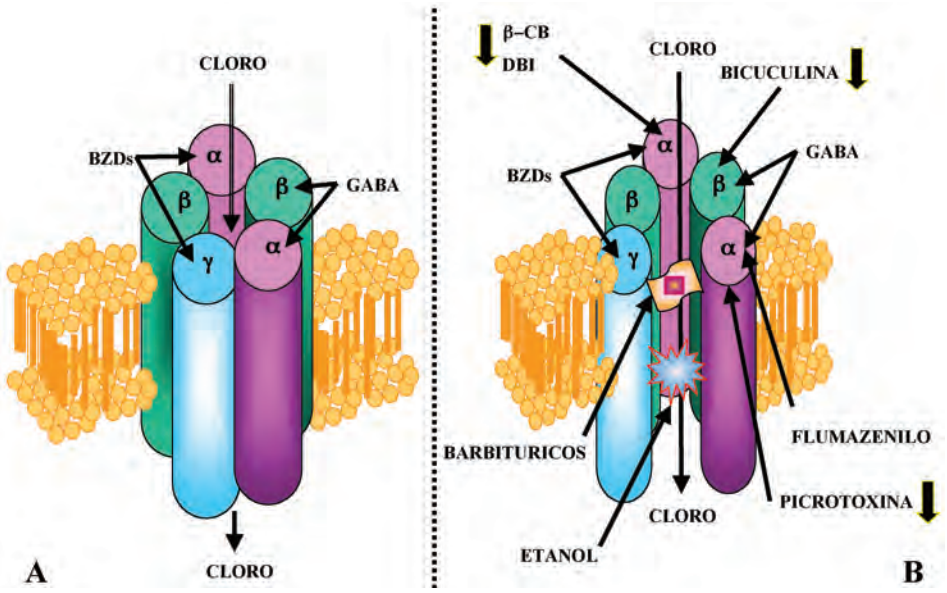


Figura 8. *Complejo receptorial GABA-benzodiazepínico-canal ionóforo del cloro, con sus 5 subunidades y los locus de acción del GABA y las BZDs (Fig. A). Numerosas substancias actúan sobre este complejo receptorial (Fig. B), modificando la conductancia del cloro hacia el interior de la neurona. Modificada de Alamo y cols. (2000).*

do la cantidad de neurotransmisor liberado, o postsináptica, disminuyendo la respuesta de esta neurona.

El receptor $GABA_A$ está constituido por un complejo proteínico de 5 subunidades, alineadas simétricamente, formando en su seno un canal que atraviesa la membrana neuronal, por el que penetra el cloro (Fig. 8). Mediante estudios de clonación, se ha podido determinar la presencia de múltiples subunidades diferentes, denominadas α, β, γ, δ, ρ, que podrían dar lugar a más de 10.000 posibles combinaciones de receptores $GABA_A$. La combinación más frecuente es la $\alpha_1\beta_2\gamma_2$, que constituye el 43% de los receptores presentes en cerebro de rata. A este receptor se le ha denominado también ω_1 y presenta una alta afinidad por las 1,4-BZDs, las triazolopiridazinas y el zolpidem. Por su parte, la combinación $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ reproduce las propiedades del llamado receptor benzodiazepínico-2 ó ω_2. La denominación de los receptores benzodiazepínicos como receptores omega (ω) se fundamenta en que sobre ellos pueden fijarse también moléculas químicamente dispares a las BZDs.

En este sentido, es importante conocer que las diferentes combinaciones de subunidades tienen distinta relevancia funcional. Así, se sabe que la coexpresión de las subunidades α y β es necesaria para que el GABA active al canal del cloro, mientras que es preciso la presencia adicional de la subunidad γ para que, sobre este complejo receptorial, puedan actuar las BZDs, potenciando el efecto inhibidor del GABA. Modificaciones de estas subunidades varían la afinidad de las BZDs por el complejo receptorial. A modo de ejemplo, podemos señalar que la presencia de subunidad α_4 ó α_6 convierte al receptor en insensible al diazepam, mientras que la subunidad α_5 lo hace insensible al zolpidem; la subunidad γ_2 dota al receptor de una gran afinidad por las BZDs mientras que la γ_1 disminuye la sensibilidad receptorial. Estudios con ratones *knockout* carentes del gen que expresa la subunidad α_1 han revelado que esta subunidad media en el efecto sedante de las BZDs, así como en la amnesia anterógrada, pero no en el efecto ansiolítico, que parece mediado por la subunidad α_2. Este tipo de estudios pueden aportar datos fundamentales para la búsqueda de nuevos agentes farmacológicos más selectivos que activen subunidades específicas del receptor GABA-benzodiazepínico, como, por ejemplo, disponer de agonistas capaces de fijarse a subunidades α_2, α_3 o α_5 pero no sobre α_1, que fuesen ansiolíticos despro-

vistos de acción sedante. Así, en los últimos años se han sintetizado nuevos agentes (imidazenilo, abecarnilo, bretazenilo, divaplon), que actúan como agonistas parciales de algún subtipo de receptor $GABA_A$ (aunque pueden ser agonistas totales de otros subtipos) y presentan, *a priori*, un perfil de efectos secundarios notoriamente mejorado frente a las convencionales BZDs.

Cuando una BZD se fija sobre el complejo receptorial GABA-benzodiazepínico-canal ionóforo del cloro se produce una modulación alostérica, que aumenta la eficacia del GABA sobre su receptor. Esta modulación alostérica es un fenómeno sólo descrito con el receptor $GABA_A$, pudiéndola producir, no sólo las BZDs sino también otros agentes, como barbitúricos, esteroides, alcohol y sustancias proconvulsivantes, como la picrotoxina y el pentetrazol (Fig. 8). Estos moduladores alostéricos del receptor $GABA_A$ actúan de manera diferente sobre este canal. Así, los barbitúricos y ciertos esteroides (como el anestésico alfaxolona) potencian la respuesta del GABA, aumentando la entrada de cloro en la célula, al prolongar el tiempo de apertura del canal. Los barbitúricos pueden, además, abrir *per se*, en ausencia de GABA, el citado canal ionóforo. En relación con las BZDs, éstas necesitan, de forma imprescindible, la presencia de GABA para ejercer su efecto, consistente en un aumento de la frecuencia de apertura y cierre del canal. Además, las BZDs no aumentan el efecto máximo del GABA y carecen de efecto cuando en el medio existen elevadas concentraciones de este neurotransmisor. Estos hechos pueden explicar el diferente margen terapéutico que presentan BZDs y barbitúricos. Por el contrario, los agentes proconvulsivantes, como la picrotoxina o el pentetrazol, cierran el canal del cloro abierto por el GABA, por barbitúricos o por esteroides (Fig. 8).

En relación con la presencia de moduladores endógenos del receptor benzodiazepínico, se ha especulado ampliamente sobre la génesis de la ansiedad. El DBI (*diazepam binding inhibitor*) se encuentra anatómicamente superpuesto a la presencia de receptores de $GABA_A$ y podría ser un cotransmisor (sintetizado, almacenado y liberado por la misma neurona) con el GABA, que contrarrestaría los efectos del aminoácido. De la misma manera que existen substancias endógenas capaces de provocar ansiedad, como el DBI o las β-carbolinas, también podrían existir moléculas benzodiazepínicas naturales, que se supone proceden de la alimen-

tación exógena, si bien su presencia en cultivos celulares nerviosos indica la posibilidad de una procedencia endógena. Todo ello, avala ciertas hipótesis fisiopatológicas de la ansiedad, mediadas por un desequilibrio entre componentes ansiógenos y ansiolíticos endógenos.

Las BZDs deprimen la actividad basal neuronal, así como la estimulada eléctricamente, siendo su efecto predominante a nivel del sistema límbico, en especial en amígdala e hipocampo. La localización de este efecto diferencia a las BZDs de los barbitúricos y otros hipnóticos, ya que éstos actúan de forma más generalizada, deprimiendo también la actividad de la formación reticular. La acción depresora de las BZDs puede ser consecuencia de una acción directa sobre el sistema límbico, mediada por la modulación potenciadora del receptor $GABA_A$, o a través de un mecanismo indirecto, inhibiendo las vías serotoninérgicas que nacen en los núcleos del rafe y lanzan sus terminales hacia el hipocampo y la amígdala. Este mecanismo indirecto abre un puente de unión entre la acción ansiolítica de las BZDs y otros agentes, como la buspirona o los ISRS, que implican mecanismos serotoninérgicos. Además, las BZDs disminuyen, en las áreas anatómicas implicadas en la ansiogénesis, el recambio de acetilcolina, dopamina y noradrenalina, hechos que pueden contribuir a su eficacia ansiolítica.

Los agonistas de receptores $5\text{-}HT_{1A}$, de los cuales el más representativo es la **buspirona**, se caracterizan por exhibir propiedades ansiolíticas en clínica. Este efecto se pone de manifiesto tras varios días o semanas de tratamiento, lo que parece indicar que la buspirona pone en marcha una serie de cambios adaptativos, responsables del efecto clínico. La buspirona actúa como agonista sobre los autorreceptores somatodendríticos, por lo que el estímulo prolongado los desensibiliza y hace que aumenten los niveles de 5-HT en la hendidura sináptica. Puesto que a nivel postsináptico actúa como un agonista parcial, cuando los niveles de 5-HT son muy elevados se comporta como un antagonista y, contrariamente, cuando los niveles de la amina son bajos se comporta como un agonista, sobre todo en el hipocampo, pudiendo actuar como un regulador del funcionalismo serotoninérgico. En este sentido, los agentes **antidepresivos** también ejercen su acción ansiolítica modulando el funcionalismo serotoninérgico (y/o noradrenérgico), como se ha comentado previamente. Así, existen evidencias que sugieren que un incremento de la actividad de las vías sero-

toninérgicas ascendentes puede desempeñar un papel regulador de diversos estados experimentales de ansiedad. El efecto ansiolítico observado tras tratamiento repetitivo con antidepresivos se relaciona con una potenciación serotoninérgica consecuente a la desensibilización de autorreceptores somatodendríticos.

Según algunas hipótesis etiopatogénicas, en ciertos trastornos de ansiedad, como el TEPT, los núcleos límbicos se sensibilizan (*kindling*), de modo que, en lo sucesivo, exhiben una respuesta excesiva a estímulos traumáticos de menor intensidad. En consecuencia, se pensó en la posibilidad de que los antiepilépticos pudieran jugar algún papel terapéutico en este trastorno. Sin embargo, los resultados de los estudios clínicos con los clásicos anticonvulsivantes no parecen ser muy alentadores, en este sentido. Además, en relación con los nuevos agentes antiepilépticos, al actuar potenciando mecanismos gabérgicos e inhibiendo la acción de aminoácidos excitatorios, parece lógico pensar que posean mayor actividad en los trastornos de ansiedad. En este sentido, la gabapentina exhibe una intensa actividad en diversos modelos experimentales de ansiolisis, lo que ha incrementado su interés terapéutico en este campo.

Por último, comentar que los agentes antagonistas β, al bloquear los receptores β-adrenérgicos, son especialmente eficaces en el control de las manifestaciones somáticas vegetativas (temblor, sudoración, palpitaciones, etc.) que acompañan a los cuadros de ansiedad. Su acción central parece secundaria, ya que algunos agentes que no atraviesan prácticamente la BHE (practolol, atenolol, sotalol), tienen la misma actividad que los que alcanzan el SNC.

NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS EN EL MECANISMO DE ACCIÓN ANSIOLÍTICO

La investigación de nuevos agentes ansiolíticos no es una tarea fácil, desde una perspectiva neurobiológica experimental. Por una parte, la existencia de múltiples modelos experimentales que valoran, en general de forma muy indirecta, conductas de miedo, angustia o ansiedad, difícilmente delimitables y no siempre extrapolables a las entidades patológicas, dificultan la obtención de conclusiones válidas para la clínica. Del

mismo modo, los conocimientos que poseemos sobre la psicobiología de los trastornos de ansiedad, cuadros por otra parte sumamente heterogéneos, son parciales, y además, su gran complejidad hace difícil predecir que clases de fármacos pueden tener la posibilidad de actuar sobre la base neurobiológica del trastorno o solamente sobre algún tipo de síntomas que caracterizan cada cuadro clínico.

A pesar de estos inconvenientes, y con objeto de evitar ciertos problemas ocasionados por las BZDs, como la sedación, los trastornos amnésicos, la potenciación de los efectos del alcohol, el desarrollo de tolerancia farmacológica, dependencia, síndrome de abstinencia, etc., así como las limitaciones de los agentes antidepresivos (inicio del efecto ansiolítico muy retardado, etc.), se ha trabajado intensamente en el desarrollo de nuevas familias químicas útiles en el manejo de los trastornos de ansiedad. No obstante, el fruto de esta labor de investigación no ha sido muy alentador, ya que en las últimas tres décadas sólo se han introducido en clínica dos grupos diferentes de agentes ansiolíticos, las azaspirodecanodionas, cuyo ejemplo más representativo es la buspirona, y los denominados análogos de las BZDs, entre los que se encuentran las ciclopirrolonas, como la zopiclona, las imidazopiridinas, como el zolpidem, y las pirazolopirimidinas, como el zaleplón. Estas últimas se caracterizan por actuar sobre ciertas subunidades del receptor benzodiazepínico que contiene la subunidad α_1 (responsable de los efectos sedantes) y se vienen utilizando únicamente como hipnóticos.

El funcionalismo del **sistema gabérgico** ha sido explorado en dos sentidos para lograr nuevos agentes ansiolíticos diferentes de las BZDs; la búsqueda de agonistas parciales del receptor GABA-benzodiazepínico y de inhibidores selectivos de la recaptación de GABA (ISRG). Con respecto a los primeros, la pagoclona es el único **agonista parcial del receptor GABA-benzodiazepínico** que ha sido incluso ensayado en el humano, en sujetos con trastorno de pánico y TAG, observándose propiedades ansiolíticas (disminución del número de ataques de pánico), sin los efectos adversos habituales de las BZDs. No obstante, son necesarios estudios controlados con agentes activos y con mayores muestras de pacientes para corroborar estos resultados iniciales. Con respecto a los **ISRG**, existe experiencia clínica previa con el antiepiléptico tiagabina, único inhibidor del transportador GAT-1 del GABA disponible en tera-

péutica, que ha demostrado su efecto ansiolítico en sujetos con trastornos de ansiedad resistente al tratamiento convencional y en pacientes con TEPT, como potenciador del tratamiento antidepresivo. Del mismo modo, en modelos animales de ansiedad, los ISRG (tiagabina, SKF-89976-A) mejoraron la coordinación motora y la actividad exploratoria, y disminuyeron las conductas ansiosas de los roedores. Hay que comentar que otro agente antiepiléptico de acción gabérgica, la gabapentina (un potenciador de la liberación de GABA, básicamente desde células gliales), ha demostrado un efecto ansiolítico en clínica en sujetos diagnosticados de fobia social, trastorno de pánico, TOC y en otros sujetos psiquiátricos con ansiedad comórbida.

El efecto ejercido por los **neuroesteroides** (alopregnanolona, epialopregnanolona, pregnanolona, tetrahidrodeoxicorticosterona, etc.) sobre el funcionalismo gabérgico (modulación alostérica del receptor $GABA_A$) constituye otra línea de trabajo explorada en relación con la ansiedad y los agentes ansiolíticos. Algunas de estas sustancias, como la alopregnenolona (ALLO), son ligandos del receptor $GABA_A$ incluso más potentes que las BZDs o los barbitúricos. En modelos animales de ansiedad, la ALLO y la tetrahidrodeoxicorticosterona han mostrado una significativa actividad ansiolítica, y a nivel clínico la pregnanolona se comporta como ansiolítico a dosis bajas (aunque como ansiogénico a dosis altas). En el humano, los niveles plasmáticos y en LCR de ALLO y pregnanolona se encuentran reducidos en pacientes con trastorno depresivo mayor no tratados, y estos niveles vuelven a la normalidad con la administración de ISRS, agentes también indicados en el manejo de los trastornos de ansiedad. Sin embargo, estudios recientes, en diferentes trastornos de ansiedad, no reflejan una correlación tan estrecha.

Dada la eficacia ansiolítica de los agonistas 5-HT_{1A}, se estudió la posibilidad de modificar la ansiedad a través de otros **receptores serotoninérgicos**. En este sentido, los antagonistas 5-HT_3 mostraron un perfil experimental diferencial respecto a los agonistas 5-HT_{1A} y a las BZDs. Los estudios experimentales realizados con ondansetrón, granisetrón y tropisetrón parecían prometedores, pero su eficacia ansiolítica no se corroboró en el humano. En la actualidad, se están estudiando las probables acciones ansiolíticas de distintos agonistas y antagonistas de otros receptores 5-HT.

El hecho de que la **colecistoquinina (CCK)** sea un neuropéptido altamente distribuido en el SNC de los mamíferos y de que el efecto excitador provocado en las neuronas del hipocampo fuera abolido por BZDs hizo pensar en su posible participación en la ansiogénesis. La CCK-4 es un agonista selectivo del receptor CCK-B capaz de producir ataques de pánico en el humano que pueden ser inhibidos por antagonistas de estos receptores (L-365-260). Estudios en animales han demostrado la participación de la CCK en la génesis de la ansiedad, lo que ha estimulado la búsqueda de agentes ansiolíticos que actúen bloqueando a este neuropéptido. La mayor eficacia viene dada por los bloqueantes del receptor CCK-B (CI-988). El perfil ansiolítico experimental de estos agentes es similar al de los antagonistas 5-HT_3, no mostrando actividad sedativa. Además, estos antagonistas parecen bloquear la ansiedad producida por la abstinencia a BZDs o alcohol, careciendo de potencial adictivo. Aunque estos datos parecen alentadores, son necesarios estudios clínicos controlados para poder comprobar si esta promesa se convierte en realidad.

Los agentes que actúan sobre los **canales del calcio** también parecen jugar un papel en el manejo de la ansiedad. Así, la pregabalina ha mostrado su eficacia en pacientes con TAG en sendos estudios controlados *versus* alprazolam y venlafaxina. Aunque el mecanismo de acción ansiolítico de estos agentes es desconocido, podrían ejercerlo modulando algún subtipo de canales del calcio en el SNC.

Otra vía experimental en la búsqueda de agentes ansiolíticos es la que explora, desde la perspectiva etiopatogénica, las relaciones entre el **estrés** y la ansiedad, vía que presenta numerosos nexos comunes con la etiología de los trastornos afectivos, y que también podría contribuir a explicar el efecto ansiolítico de los agentes antidepresivos. Uno de los hechos más contrastados provocados por el estrés es su capacidad de provocar la atrofia de neuronas hipocampales. Esta atrofia, posiblemente reversible, se observa en neuronas piramidales CA3 tras ser sometidas a 2-3 semanas de estrés por inmovilización o por aislamiento social prolongado. La atrofia de neuronas CA3 se observa igualmente tras la exposición de los animales de experimentación a niveles elevados de **glucocorticoides**. Además, el papel de los corticoides no se limitaría a un efecto destructivo de neuronas y su estructura funcional, sino que también tendrían un efecto inhibidor de la neurogénesis. Según esta hipótesis, algunos tipos

de neuronas, como las CA3, que son más vulnerables al estrés y otras poblaciones neuronales que son sensibles, además, a la hipoxia, isquemia o hipoglucemia, no podrían regenerarse, ya que los niveles elevados de glucocorticoides estarían frenando la neurogénesis reparadora. Desde una perspectiva terapéutica futura, es ilustrativo que la cianoketona, un bloqueante de la síntesis de glucocorticoides, antagoniza la atrofia inducida por el estrés. Este hecho es indicativo del papel endógeno que juegan los corticoides en la atrofia dendrítica provocada por el estrés, y abre, como se ha señalado anteriormente, un importante campo de investigación terapéutica.

En esta misma línea, numerosos estudios experimentales han confirmado el papel fundamental de la amígdala en la manifestación de algunos síntomas de ansiedad, como la aprehensión y el miedo, y algunos estudios de neuroimagen han puesto de manifiesto una hiperactividad de esta zona en sujetos con diferentes trastornos de ansiedad. Estas observaciones han hecho pensar que el **CRF**, uno de los neurotransmisores liberados en la amígdala, podría ser una importante diana en la búsqueda de agentes ansiolíticos. De hecho, la inyección de CRF en el *locus coeruleus* ocasiona una llamativa respuesta ansiogénica en el animal de laboratorio. En el humano, por su parte, se ha demostrado que existen niveles más elevados de CRF en LCR de sujetos con TEPT que en controles. A nivel experimental, el R-121919, un antagonista de los receptores CRF-1, inhibe selectivamente el estrés inducido por CRF en ratas, aunque solo parece ser efectivo cuando los niveles de ansiedad son muy elevados. Lamentablemente, su toxicidad hepática ha evitado su desarrollo clínico, aunque ha abierto las puertas para la búsqueda de nuevos agentes ansiolíticos que actúen como antagonistas CRF. Recientemente se han descubierto dos nuevos miembros de la familia CRF (urocortina II y urocortina III), que actúan como agonistas selectivos de los receptores CRF-2 centrales y están dotados de actividad ansiolítica, por lo que pueden constituir otra diana de investigación en el campo de la ansiedad.

En la atrofia y muerte neuronal observadas en hipocampo ante situaciones sostenidas de estrés también influye la acción de los aminoácidos excitatorios sobre el **receptor NMDA**. Es conocido, además, que el estrés continuado produce atrofia de dendritas apicales de neuronas piramidales CA3. Este efecto parece secundario al incremento de aminoáci-

dos excitatorios en hipocampo y es bloqueado por el antiepiléptico fenitoína, que bloquea la liberación de glutamato y los canales T del calcio estimulados durante la liberación del citado aminoácido. En este sentido parece ser que el estrés actuaría impidiendo la recaptación de glutamato más que facilitando o incrementando su liberación. Sea cual fuere la causa del incremento sináptico de glutamato, el bloqueo de receptores NMDA previene la atrofia dendrítica producida por el estrés y podría asociarse a efectos ansiolíticos. A nivel preclínico se ha estudiado el efecto ansiolítico del MK-801 (dizocilpina), un antagonista no competitivo del receptor NMDA, confirmándose estos efectos en distintos modelos experimentales, aunque a dosis altas. Por otro lado, diferentes agentes que actúan sobre el receptor NMDA (el propio MK-801, el antagonista competitivo ácido 2-amino-7-fosfonoheptanoico, o el agonista parcial del locus de la glicina ACPC) han mostrado eficacia antidepresiva, lo que hace pensar en un potencial efecto ansiolítico, como sucede con la mayoría de los antidepresivos comercializados en este momento. Otra vía explorada en relación con los aminoácidos excitatorios es la administración de agentes agonistas del **receptor gutamatérgico mGluR**, que disminuyen la liberación presináptica de glutamato y bloquean la liberación de cortisol estimulada por yohimbina. En la prevención experimental de crisis de pánico inducidas por lactato en rata, el agonista mGluR LY-354740 se mostró tan eficaz como el alprazolam, así como en las crisis de ansiedad inducidas por yohimbina en monos.

En situaciones de estrés también se encuentran elevados los niveles de **neuroquininas**, un grupo de neurotransmisores entre los que la **sustancia P** es el más conocido. La sustancia P ejerce su acción preferentemente sobre los receptores NK-1, que se distribuyen ampliamente en regiones muy relacionadas con las manifestaciones de la ansiedad, como la amígdala y el hipocampo. Además, la inyección de substancia P en el cerebro de roedores ocasiona alteraciones de la conducta y modificaciones de los parámetros cardiovasculares de naturaleza ansiogénica. Teniendo en consideración estos hechos, se han estudiado los efectos ansiolíticos y antidepresivos de varios antagonistas de la substancia P, como el L-760735 o el GR-205171, observándose una respuesta en modelos animales de ansiedad y depresión similar a la fluoxetina. Datos similares fueron obtenidos, a nivel preclínico, con NKP-608, un antagonista de los receptores NK-1, cuando se comparó con imipramina, y a nivel clínico

con el antagonista de la substancia P MK-896 en un estudio comparativo con paroxetina.

Por último, hay que mencionar que el estrés es capaz de inducir una disminución de ciertas **neurotrofinas** (BDNF, neurotrofina-3), lo que supone una merma de factores protectores y de la capacidad de intercomunicación entre neuronas. Así, alteraciones en estas conexiones en el hipocampo pueden estar relacionadas con trastornos de la memoria y respuesta frente al estrés, mientras que, en la amígdala, fenómenos plásticos parecidos podrían estar implicados en las respuestas ante el miedo, fenómenos ambos observados en los trastornos de ansiedad. Con todo lo expuesto, cobra fuerza la hipótesis de que diversos tipos de estrés mantenido disminuyen la expresión de **BDNF** en hipocampo, lo cual, junto con el incremento de corticoides y glutamato, puede provocar atrofia, o incluso muerte, de neuronas vulnerables de hipocampo de ratas y de primates, sin que se produzca la neurogénesis reparadora. Estos estudios constituyen la base de una teoría molecular de la ansiedad y de la depresión y del efecto de ciertos agentes farmacológicos, entre los que se encuentran, por ejemplo, los antidepresivos, que, mediante la normalización de los niveles de glucocorticoides, antagonizando los receptores de NMDA y aumentando los niveles de BDNF, jugarían un papel protector frente a estas agresiones.

CONCLUSIONES

Los avances conseguidos en el campo de la psicofarmacología en los últimos 50 años han sido sumamente importantes aunque no definitivos. El tratamiento, que se sigue basando en una terapéutica fundamentalmente empírica como corresponde a patologías cuya fisiopatología no se ha desvelado por completo, es sintomatológico y no curativo. Sin embargo, y pese a que gracias a los psicofármacos se ha conseguido ir conociendo algunas bases de las enfermedades mentales, su tratamiento no tiene una única llave y es el empleo conjunto de todos los esfuerzos, farmacológicos, que permiten además una mejor utilización y aceptación de las medidas psicoterapéuticas psicoterapéuticos, sociales y familiares lo que conseguirá minimizar la sintomatología, prevenir las recaídas y ayudar a los pacientes a convivir con los sufrimientos y molestias propios de su enfermedad, así como incrementar la calidad de vida de los mismos y de sus familiares.

BIBLIOGRAFÍA

Álamo C, Cuenca E, López-Muñoz F. Antipsicóticos atípicos: perfil receptorial. En: Nuevos Antipsicóticos Atípicos (C García Ribera, ed.). Barcelona, Masson S.A., 1996: 1-24.

Álamo C, López-Muñoz F, Cuenca E. Contribución de los antidepresivos y los reguladores del humor al conocimiento de las bases neurobiológicas de los trastornos afectivos. Psiquiatría.Com (revista electrónica) 1998; 2(3): citado 22/10/98, Art. 7.

Álamo C, López-Muñoz F, Cuenca E. Fármacos ansiolíticos. En: Fundamentos Biológicos en Psiquiatría (JA Cervilla, C García-Ribera, eds.). Barcelona, Masson S.A., 2000: 299-314.

Álamo C, López-Muñoz F, Cuenca E. Mecanismo de acción de los fármacos antipsicóticos. En: Guía para el Tratamiento de los Pacientes con Esquizofrenia (G Rubio, JA Hernández, MA Jiménez-Arriero, T Palomo, eds.). Madrid, Fundación Cerebro y Mente, 2002: 147-172.

Alamo C, López-Muñoz F, Cuenca E. Fármacos antidepresivos. En: Avances en Farmacología y Farmacoterapia, Módulo II, Avances en Farmacología del Sistema Nervioso (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, ed.). Madrid, Acción Médica, S.A., 2003: 191-237.

Bowden CL. Pharmacological treatment of bipolar disorder: A review. En: Bipolar Disorder (M Maj, HS Akiskal, JJ López-Ibor, N Sartorius, eds.). Chichester, John Wiley & Sons, Ltd., 2002: 192-221

Brunello N, Racagni G. Rationale for the development of noradrenaline reuptake inhibitors. Human Psychopharmacol 1998; 13: 13-19.

Caroff SN, Mann SC, Campbell EC, Sullivan KA. Movement disorders associated with atypical antipsychotic drugs. J Clin Psychiatry 2002; 63 (suppl. 4): 12-19.

Chen AC, Shirayama Y, Shin KH, et al. Expression of the cAMP response element binding protein (CREB) in hippocampus produces an antidepressant effect. Biol Psychiatry 2001; 49: 753-762.

Cuenca E, Álamo C, López-Muñoz F. Mecanismo de acción de las sales de litio. En: Clínica del Litio (E Álvarez, J Pérez, V Pérez, eds.). Barcelona, Masson, S.A., 2000: 11-30.

Cuenca E, Álamo C, López-Muñoz F. Tratamiento en las neurosis: 2. Psicofarmacología. En: Trastornos Neuróticos (M Roca, coord.). Barcelona, Ars Médica, 2002: 823-866.

Duman RS. Molecular and cellular determinants of stress an antidepressant treatment. En: Cerebral Signal Transduction: from First to Fourth Messengers. Totowa, Reith Humana Press Inc., 2000: 223-247.

Gorman JM. New Molecular Targets for Antianxiety Interventions. J Clin Psychiatr 2003, 64 (suppl. 3): 28-35.

Gorman JM, Sullivan MG. Noradrenergic approaches to antidepressant therapy. J Clin Psychiatry 2000; 61 (suppl 1): 13-16.

Jacobs BL, Van Praag H, Gage FH. Adult brain neurogenesis and psychiaty: a novel theory of depression. Mol Psychiatry 2000; 5: 262-269.

Keck PE, McElroy SL. Antiepileptics drugs. En: Essentials of Clinical Pharmacology (AF Schatzberg, CB Nemeroff, eds.). Washington D.C., American Psychiatric Publishing Inc., 2001: 237-263.

Kronfol Z, Remick DG. Cytokines and the brain: implication for clinical psychiatry. Am J Psychiatry 2000; 157: 683-694.

Le Mellédo JM, Baker GB. Neuroactive steroids and anxiety disorders. J Psychiatr Neurosci 2002, 27: 161-165.

Lydiard RB. The Role of GABA in anxiety disorders. J Clin Psychiatr 2003, 64 (suppl. 3): 21-27.

Manji HK, Moore GJ, Rajkowska G, et al. Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders. Mol Psychiatry 2000; 5: 578-593.

Marder SR. Evidence for using atypical antipsychotics in psychosis. Primary Care Companion. J Clin Psychiatry 2003; 5 (suppl 3): 22-26.

McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. Ann Rev Neurosci 1999; 22: 105-122.

Meltzer HY. Mechanism of action of atypical antipsychotic drugs. En: Neuropsychopharmacology. The Fifth Generation of Progress (KL Davis, D Charney, JT Coyle, C Nemeroff, eds). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 819-831.

Mitchell AJ. The role of CRF in depressive illness: a critical review. Neurosci Biobehav Rev 1998; 22: 635-652.

Morinobu S, Nibuya M, Duman RS. Chronic antidepressant treatment down-regulates the induction of c-fos mRNA in response to acute stress in rat frontal cortex. Neuropsychopharmacology 1995; 12: 221-228.

National Institute for Clinical Excellence. Schizophrenia: Core Interventions in the Treatment and Management of Schizophrenia in Primary and Secondary Care, Clinical Guideline 1 (developed by the National Collaborating Centre for Mental Health), December 2002.

Nemeroff CB. Anxiolytics: past, present, and future aents. J Clin Psychiatr 2003, 64 (suppl. 3): 3-6.

Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element-binding protein (CREB) in rat hippocampus. J Neurosci 1996; 16: 2365-2372.

O`Brien D, Skelton KH, Owens MJ, et al. CRF receptor antagonists potential antidepressants? Hum Psychopharmacol Clin Exp 2001; 16: 81-87.

Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, et al. Risk stratification in the long-QT syndrome. N Engl J Med 2003; 348: 1866-1874.

Reid IC, Stewart CA. How antidepressants work. Br J Psychiatry 2001; 178: 299-303.

Reul J, Holsboer F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. Curr Opin Pharmacol 2002, 2: 23-33.

Richelson E. Preclinical pharmacology of neuroleptics: focus on new generation compounds. J Clin Psychiatry 1996; 57 (suppl.): 4-11.

Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. Arch Gen Psychiatry 2000; 57: 925-935.

Seeman P. Atypical antipsychotics: Mechanism of action. Can J Psychiatry 2002; 47: 27-38.

Seeman P, Tallerico T. Antipsychotic drugs which elicit little or no Parkinsonism blind more loosely than dopamine to brain D2 receptors, yet occupy high levels of these receptors. Mol Psychiatry 1998; 3:123-134.

Skolnick P. Antidepressants for the new millenium. Eur J Pharmacol 1999; 375: 31-40.

Stahl SM. Describing an atypical antipsychotic: Receptor binding and its role in pathophysiology. Primary Care Companion. J Clin Psychiatry 2003; 5 (suppl 3): 9-13.

Thome J, Sakai N, Shin K, et al. cAMP response element mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment. J Neurosci 2000; 20: 4030-4036.

Thornley B, Adams C. Content and quality of 2000 controlled trials in schizophrenia over 50 years. Br Med J 1998; 317: 1181-1184.

Volavka J, Sheitman B, Lindenmayer JP, et al. Clozapine, olanzapine, risperidone, and haloperidol in the treatment of patients with chronic schizophrenia and schizoaffective disorder. Am J Psychiatry 2002; 159: 255-262.

Futuro del tratamiento farmacológico de las enfermedades cardiovasculares

JUAN TAMARGO, EVA DELPÓN

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid

En los países occidentales, las enfermedades cardiovasculares (hipertensión arterial, cardiopatía isquémica, ictus, taquiarritmias, insuficiencia cardíaca) representan la principal causa de mortalidad. En España, esta patología es responsable de casi el 40% de los fallecimientos anuales, duplicando casi los producidos por la segunda causa de mortalidad, el cáncer. Esta alta prevalencia, que es de prever que siga aumentando en un futuro inmediato dado el aumento progresivo de las expectativas de vida de la población, asociada a la alta morbimortalidad y a los elevados gastos económicos que las enfermedades cardiovasculares conllevan, explica el gran interés por desarrollar nuevas estrategias terapéuticas, más eficaces y seguras que las actualmente disponibles. El desarrollo de estas nuevas estrategias debe de ser el resultado lógico de un sólido conocimiento de la fisiopatología del proceso a tratar. Es el desconocimiento de ésta el que limita el diseño racional de dichas estrategias y explica el fracaso de fármacos en los que se habían depositado grandes esperanzas. Una alternativa a la farmacología tradicional es la terapia génica. Aunque originalmente fue diseñada para modificar la expresión de un gen específico en las células somáticas del paciente, hoy sus aplicaciones son mucho más amplias, utilizándose también para la transferencia génica de citocinas, hormonas, anticuerpos o proteínas modificadas.

En este capítulo, revisaremos las perspectivas terapéuticas que en un futuro próximo podrán ser utilizadas en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. Algunos fármacos son «viejos conocidos», que pre-

sentan aplicaciones para las que no fueron diseñados originalmente; otros se encuentran en fase de desarrollo experimental o clínico, por lo que hemos de esperar a que los ensayos clínicos controlados confirmen o rechacen las expectativas que en ellos hemos depositado.

I. INSUFICIENCIA CARDÍACA

La insuficiencia cardíaca (IC) representa la principal causa de hospitalización en pacientes de más de 65 años y conlleva importantes gastos, representando casi un 2% del gasto sanitario anual en España. Su prevalencia sigue aumentando, habiéndose calculado que 50 de los 1000 millones de personas que viven en los 47 países que forman parte de la Sociedad Europea de Cardiología presentan problemas relacionados con la IC. A pesar de que en ensayos clínicos bien diseñados, los inhibidores del enzima de conversión (IECA), bloqueantes β-adrenérgicas y la espironolactona han reducido en más de un 35%, la mortalidad de los pacientes con IC sigue siendo muy alta. De hecho, un 50% de los pacientes diagnosticados de IC ha fallecido en menos de 5 años, mientras que la mortalidad por cáncer de colon o de próstata es muy inferior en ese mismo periodo de tiempo (25% y 5%, respectivamente). Estas cifras confirman la necesidad de disponer de nuevos fármacos para reducir o retrasar la evolución de la enfermedad.

El desarrollo racional de nuevos fármacos se basa en el conocimiento de la fisiopatología del proceso. Así, entre 1950-1970 se pensaba que la IC era un síndrome congestivo y se trataba con digitálicos y diuréticos; entre 1970 y 1990 se pensaba que era un problema hemodinámico y se introdujeron fármacos vasodilatadores. En los años 90 se puso de manifiesto la importancia de la activación neurohumoral en la evolucion de la IC, lo que llevó a la introducción de los bloqueantes β-adrenérgicos y de los fármacos que bloquean el sistema renina-angiotensina-aldosterona. En la actualidad, sabemos que la IC conlleva cambios en la estructura ventricular, en el metabolismo cardíaco y en la cinética del calcio, que representan nuevas dianas de potencial interés terapéutico. Los fármacos actualmente en desarrollo los agrupamos en 4 apartados (Tabla 1).

TABLA 1

Nuevos fármacos en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca

A. Moduladores neurohumorales
   1. Peptidos natriuréticos auriculares: nesiritida, vasonatrida, anaritida, mini ANP
   2. Inhibidores de vasopeptidasas:
      • IECA+EPN: omapatrilato, fasidotrilo, mixanprilo, sampatrilato, CGS30440, MDL100,240, Z13752A
   3. Antagonistas de los receptores de la endotelina
      – ET_A: darusentán, sitasentán, A127722, BQ-123, EMD1229646/94246, PD151242/182874
      – ET_B: A192621, BQ788, IRL2500/2659, Ro468443
      – ET_A/ET_B: bosentán, enrasertán, tazosentán, BQ-610, L749329/745142, PD145065/142983
   4. Antagonistas del TNFα: pentoxifilina, FR167653, candesartán, β-bloqueantes
   5. Antagonistas de los receptores de la vasopresina:
      • V1A/V2: conivaptán
      • V2: tolvaptán (OPC-41061), OPC-31260, VPA-985, SR-121463
   6. Antagonistas de la aldosterona: eplerenona
   7. Otros fármacos:
      • Antagonistas de los receptores A1 (BF9714)
      • Simpaticolíticos: nepicastat, nolomirona
      • Fármacos que mejoran el metabolismo cardíaco: carnitina, etoxomir, hormona del crecimiento, ranolazina, etoxomir
      • IECAs, β-bloqueantes, ARAII, espironolactona
      • Antagonistas de los receptores AT1 de la angiotensina II: candesartán, eprosartán, forasartán, irbesartán, olmesartán, ripisartán, tasosartán, telmisartán

B. Nuevos inotrópicos positivos: levosimendán

C. Modulación del remodelado ventricular Inhibidores de metaloproteinasas: hidroxamatos (batimastat, ilomastat, marimastat, prinomastat), β-bloqueantes, glucocorticoides, tetraciclinas, CP-471,474, PD166793 Antagonistas de la plasmina

D. Terapia génica

ECA: enzima de conversión de la angiotensina. EPN: endopeptidasa neutra.

A. Moduladores neurohumorales

La IC se acompaña de una marcada activación neurohumonal, habiéndose demostrado un aumento en los niveles plasmáticos de aquellos mediadores que producen vasoconstricción (que aumenta las resistencias

vasculares periféricas y coronarias), retención hidrosalina y edemas y efectos mitogénicos (catecolaminas, sistema renina-angiotensina-aldosterona, endotelina-1, vasopresina) y una disminución de los que presentan propiedades vasodilatadoras, natriuréticas y antiproliferativas (péptidos natriuréticos, dopamina, óxido nítrico-NO). En un intento de contrarrestar la activación neurohumoral se están desarrollando:

1. *Péptidos natriuréticos auriculares*. Juegan un importante papel en la regulación de la presión arterial y del volumen extracelular. Se han descrito 3 péptidos que se sintetizan y liberan en respuesta a la distensión auricular (péptido natriurético auricular-ANP, 28 aminoácidos), al aumento de la presión y del volumen ventricular (péptido B-BNP, 32 aminoácidos) y al cizallamiento endotelial (péptido C-CNP, 22 aminoácidos). Los niveles plasmáticos de ANP y BNP aumentan en pacientes con IC, infarto de miocardio, hipertensión arterial, insuficiencia renal terminal, cirrosis y ascitis. En pacientes con IC sintomática, los niveles plasmáticos de BNP han demostrado ser un excelente marcador de su evolución y de la efectividad del tratamiento. Estos péptidos actúan sobre 3 tipos de receptores específicos, denominados A, B y C. La interacción de los péptidos con los receptores A y B estimula la actividad de la guanilato ciclasa particulada y aumenta los niveles celulares de GMPc. Como consecuencia, producen vasodilatación arterio-venosa sistémica (disminuyen pre y poscarga) y coronaria y natriuresis, inhiben el tono simpático y el sistema renina-angiotensina-aldosterona (disminuyen la liberación de renina por las células yuxtaglomerulares y de aldosterona por la zona glomerulosa del córtex adrenal) y ejercen acciones antiproliferativas sobre las células musculares cardíacas y lisas vasculares. Además, producen vasodilatación de la arteriola glomerular aferente y constricción de la eferente, aumentando la velocidad de filtración glomerular y la fracción de filtración incluso en pacientes con insuficiencia renal aguda y oliguria. El ANP inhibe la reabsorción de Na y agua producida por la angiotensina II a nivel del túbulo proximal y por la vasopresina en el túbulo colector, produciendo diuresis y natriuresis. El CNP produce mínimos efectos natriuréticos y vasodilatadores venosos, pero es un potente vasodilatador arterial y exhibe efectos antimitogénicos.

La administración de BNP recombinante humano (nesiritida) aumenta el volumen minuto y disminuye la sintomatología (disnea, fatiga) en pacientes con insuficiencia cardíaca aguda o descompensada. Por vía i.v.

sus acciones aparecen al cabo de 15 minutos y presenta una semivida de 18-24 minutos, ya que se degrada por la endopeptidasa neutra; ello que obliga a administrarlo en infusión i.v. continua (0.015-0.03 μg/kg/min). Sin embargo, desconocemos sus efectos sobre la mortalidad. En la actualidad, se estudian nuevos péptidos obtenidos por tecnología recombinante: ANPα (28 amionoácidos), mini ANP (15 aminoácidos), anaritida (ANP de 25 aminoácidos) y vasonatrida (quimera de ANP y CNP).

2. *Inhibidores de las vasopeptidasas*. Son fármacos que inhiben tres metalopeptidasas: la endopetidasa neutra (EPN) y las enzimas convertidoras de la angiotensina II-ECA y de la endotelina-1 (ECE). El fármaco más representativo es el omapatrilato, un inhibidor mixto de ECA y EPN, que aumenta los niveles plasmáticos de diversos mediadores vasodilatadores (péptidos natriuréticos, adrenomedulina, cininas, prostaciclina-PGI_2, NO) y disminuye la de diversos vasocontrictores (angiotensina II-AII, tono simpático). El estudio IMPRESS ha demostrado que en pacientes con ICC, el omapatrilato es más efectivo que el lisinoprilo para mejorar la sintomatología y reducir la mortalidad y la rehospitalización por insuficiencia cardíaca a medio plazo. Recientemente, el estudio OVERTURE, realizado en pacientes con ICC, en clase funcional II-IV y de los que un tercio era diabético, ha demostrado que el omapatrilato es tan efectivo como el enalaprilo para reducir la morbimortalidad en este subgrupo de pacientes. Sin embargo, tanto este estudio como el OCTAVE han confirmado la aparición de cuadros de angioedema en los pacientes tratados con omapatrilato, lo que ha detenido la comercialización del producto. En el estudio OCTAVE la incidencia de angioedema era 3 veces superior que en los pacientes tratados con un IECA (2.17% vs 0.68%), mientras que en el OVERTURE era del 0,8% en los pacientes tratados con omapatrilato y del 0.5% en los tratados con enalaprilo.

3. *Antagonistas de los receptores de la endotelina-1 (ET-1)*. La ET-1 es un péptido que actúa sobre receptores ET_A (produciendo vasoconstricción, retención hidrosalina, efectos proliferativos-hipertrofia cardíaca y liberación noradrenalina y AII) y receptores ET_B (produciendo vasodilatación al liberación desde las células endoteliales NO y eicosanoides). En la ICC están aumentados los niveles plasmáticos de ET-1, particularmente en los pacientes con congestión pulmonar y disminuye la expresión de receptores ET_B, observándose que estos cambios se asocian a un peor pronósti-

co. De los numerosos antagonistas de la ET-1 existentes, el bosentán (estudios ENABLE-1 y 2) y el tezosentán (estudios RITZ1-4), no han demostrado ser superiores al tratamiento convencional (diuréticos, digoxina e IECA) para reducir la morbimortalidad. Por el contrario, el enrasentán (estudio ENCOR) aumentaba la morbimortalidad, triplicando las hospitalizaciones y muy recientemente, el estudio RITZ-4 demostraba que el tezosentán exhibía acciones proisquémicas en pacientes con IC descompensada y el estudio EARTH que el darusentán, un bloqueante selectivo de los receptores ETA, no modifica los parámteros hemodinámicos en pacientes con IC. Por tanto, no parece que el bloqueo de los receptores de la ET-1 ofrezca muchas perspectivas en el futuro tratamiento de la IC.

4. *Inhibidores de citocinas*. Esta familia de proteínas incluye interleucinas (ILs), interferones, factores de estimulación de colonias (CSFs), cimiocinas (RANTES, proteína quimiotáctica de monocitos-MCP-1) y citotoxinas (factor de necrosis tumoral α-TNFα). Las citocinas son producidas por las células endoteliales, linfocitos T, monocitos y macrófagos en respuesta a diversos estímulos y participan en el proceso inflamatorio de la placa de ateroma y en la progresión de la ICC.

El TNFα deprime la contractilidad cardíaca, aumenta el catabolismo proteico y la producción de radicales libres y produce disfunción endotelial, dilatación e hipertrofia ventriculares, activación neurohormonal y apoptosis de los cardiomiocitos. Los niveles plasmáticos de TNFα y la densidad de sus receptores (TNF-R1 y TNF-R2) aumentan en pacientes con ICC, particularmente en aquéllos con caquexia. El etanercept es una proteína de fusión formada por dos moléculas de ligandos solubles para los receptores TNFα-R2 fusionados a la fracción Fc de la IgG humana, que se fija al TNFα e inhibe su unión a sus receptores de membrana. En estudios a corto plazo, mejora los síntomas y aumenta la tolerancia al ejercicio, pero estos efectos desaparecen en tratamientos crónicos, razón por la que los estudios RENAISSANCE y RECOVER han sido recientemente suspendidos. Recientemente, se han publicado los resultados del estudio ATTACH, que demostraba que el tratamiento con infliximab (5 y 10 mg/kg durante 28 semanas) aumentaba las hospitalizaciones y la mortaliudad por IC a la dosis más alta ensayada.

La pentoxifilina inhibe la producción del TNFα y, a dosis a las que no modifica la presión arterial o la frecuencia cardíaca, mejora la sinto-

matología, la fracción de eyección y la tolerancia al ejercicio en pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática. Sin embargo, desconocemos sus efectos a largo plazo o sobre la mortalidad. Otros inhibidores de citocinas se muestran en la Tabla 1. Debemos llamar la atención sobre el hallazgo de que algunos fármacos que sí reducen la morbimortalidad del paciente con IC (candesartán, β-bloqueantes) disminuyen los niveles plasmáticos de TNFα.

5. *Antagonistas de los receptores de la vasopresina*. Esta neurohormona hipotálamica se libera por diversos estímulos (aumento de la osmolaridad plasmática, hipotensión, AII). La vasopresina actúa sobre dos tipos de receptores, V1 (subtipos V1A y V1B) y V2. Los receptores V1A se localizan en las células musculares lisas vasculares (CMLV), plaquetas, células mesangiales, túbulo colector, sistema nervioso central e hígado y su estimulación produce vasoconstricción arterio-venosa e hipertrofia cardíaca. La estimulación de los receptores V1B, localizados en la hipófisis anterior, facilitan la liberación de ACTH y la de los receptores V2, localizados en el túbulo colector, facilitan la reabsorción de agua libre.

El conivaptán (YM-087) es un antagonista de los receptores V1A (cuya estimulación produce vasoconstricción arterial e hipertrofia cardíaca) y V2 (su estimulación aumenta la reabsorción de agua a nivel del túbulo colector), que aumenta la diuresis y el aclaramiento de agua libre con mínima pérdida de Na. Por ello, podría ser de gran utilidad en pacientes con IC, edemas e hiponatremia, que con frecuencia presentan resistencia a los diuréticos tiazídicos o del asa. De hecho, el conivaptán aumenta la excreción utinaria incluso en pacientes resistentes a furosemida. En la actualidad, se encuentran en desarrollo clínico dos antagonistas selectivos de los receptores V2 (OPC-41061 o Tolvaptán, VPA-985) en pacientes con IC. Sin embargo, desconocemos los efectos de todos estos fármacos sobre la activación neurohumoral y la morbimortalidad en pacientes con IC.

5. *Antagonistas de la aldosterona*. La sobrecarga de presión ventricular aumenta la producción de matriz extracelular por los fibroblastos cardíacos y disminuye la distensibilidad ventricular en pacientes con HTA, hipertrofia cardíaca e IC. La AII (vía receptores AT1) y la aldosterona aumentan la fibrosis intersticial y perivascular cardíaca, si bien la li-

beración de aldosterona es independiente de la de AII, aumentando la matriz extracelular incluso en presencia de un IECA. Dosis subpresoras de espironolactona, un antagonista de los receptores de la aldosterona, reduce la fibrosis cardíaca, mejora la distensibilidad ventricular y disminuye la morbimortalidad en pacientes con IC. Recientemente, el estudio EPHESUS analizó los efectos de la eplerenona, otro antagonista de la aldosterona, en pacientes hipertensos con hipertrofia cardíaca e infarto de miocardio previo, demostrando que este fármaco reducía la mortalidad total y la morbimortalidad cardiovascular. La eplerenona presenta una alta afinidad por el receptor mineralocorticoideo y una baja afinidad por los receptores estrogénicos y de progesterona (< 1% y 0.1% de la de la espironolactona), lo que se traduce en una menor incidencia de ginecomastia e hiperpotasemia que con la espironolactona. Una ventaja adicional de ambos antagonistas de la aldosterona es que su efecto beneficioso persiste en pacientes tratados con β-bloqueantes e IECA, algo que no sucede con los antagonistas de los receptores AT1 de la angiotensina II (ARAII).

6. *Otros fármacos*. En la actualidad, se evalúa la seguridad y eficacia de diversos antagonistas de los receptores A1 de la adenosina (BF9719, que produce una vasodilatación selectiva de la arteriola glomerular aferente y una acción natriurética como consecuencia de sus efectos sobre los túbulos proximal y distal), el nepicastat (inhibidor de la dopamina-β-hidroxilasa que aumenta la síntesis y liberación de dopamina), la nolomirona (agonista de los receptores presinápticos α2 y DA2 que disminuye la liberación de noradrenalina y el tono simpático) y fármacos que mejoran el metabolismo cardíaco. Dentro de este último grupo se encuentran la carnitina, la hormona del crecimiento-GH, la ranolazina (activa piruvato-deshidrogenasa y la oxidación de la glucosa y los niveles de ATP) y el etoxomir (inhibidor de la carnitina-palmitoil-transferasa). La GH produce, a corto plazo, una mejoría hemodinámica y funcional en enfermos con insuficiencia cardiaca secundaria a miocardiopatía dilatada, pero desconocemos sus efectos a largo plazo. En pacientes con diabetes tipo I, nefropatías o caquexia disminuye la expresión de receptores para GH, pudiendo aparecer resistencia a sus acciones.

7. *Los viejos fármacos*. Aún quedan importantes lagunas en nuestro conocimiento acerca de las acciones de fármacos que ya han demos-

trado su seguridad y eficacia en pacientes con ICC (IECAs, β-bloqueantes, ARAII, espironolactona). A pesar de su indudable eficacia, los IECAs y los β-bloqueantes se prescriben poco (a menos del 50% de los pacientes) y a dosis inferiores a las utilizadas en los ensayos clínicos (desconocemos el posible beneficio que su uso conlleva) y desconocemos su utilidad en mujeres, ancianos, pacientes con disfunción diastólica o que reciben antiinflamatorios no esteroideos. Muy recientemente, el estudio CHARM ha demostrado que: a) en pacientes con IC sintomática e intolerancia a los IECAs, el candesartán reduce la mortalidad y morbilidad cardiovascular (CHARM-alternative). b) la adición de candesartán a un IECA (y β-bloqueante), produce una importante reducción de la morbimortalidad cardiovascular en pacientes con IC (CHARM-added); este beneficio se obtiene con relativamente pocos efectos adversos, aunque hay un incremento del riesgo de hipotensión, hiperkalemia y disfunción renal. c) En pacientes con IC y fracción de eyección >40% tratados con un IECA, el candesartán (CHARM-preserved) no modifica la mortalidad, pero reduce las hospitalizaciones por IC y la aparición de diabetes mellitus.

Muy importantes son los resultados del estudio COMET, que han demostrado que el carvedilol produce una mayor reducción de la mortalidad en pacientes con IC, lo que le convierte en el β-bloqueante de elección en la IC. Este estudio ha permitido calcular que el carvedilol prolonga en 1,4 años la vida del paciente con IC más que los bloqueantes β_1-selectivos. En la actualidad, el estudio SENIORS analiza los efectos del nevibolol en ancianos y el VALIANT los del valsartán en pacientes con disfunción ventricular e infarto de miocardio previo.

B. Nuevos fármacos inotrópicos positivos: Fármacos que aumentan la sensibilidad al calcio de las proteínas contráctiles

Los fármacos que aumentan la contractilidad cardíaca (inotrópicos positivos) fueron los primeros utilizados en el tratamiento de la IC. Sin embargo, la mayoría de los inotrópicos positivos (simpaticomiméticos: dopamina, dobutamina, floxequinán; inhibidores de fosfodiesterasa III: amrinona, milrinona, enoximona, vesraninona) aumentan la mortalidad; la excepción es la vieja digoxina, que en el estudio DIG demostró que no

modificaba la mortalidad, pero reducía la sintomatología y hospitalización por IC. Este aumento de la mortalidad se ha atribuido a su capacidad para aumentar los niveles intracelulares de AMPc, ya sea por incrementar la actividad de la adenilato ciclasa (agonistas β-adrenérgicos) o por inhibir su degradación (inhibidores de la fosfodiesterasa III). Este aumento en los niveles cardíacos de AMPc activa la protein cinasa A, que fosforila-activa los canales de Ca tipo-L e incrementa la entrada de Ca a su través y la concentración intracelular de Ca libre ($[Ca]_i$). El aumento de la $[Ca]_i$ a nivel de las proteínas contráctiles incrementa la contractilidad, pero también la frecuencia cardíaca, las demandas miocárdicas de O_2 (MVO_2) y los procesos de necrosis y apoptosis cardíacos. Todos estos efectos aumentan la incidencia de cardiopatía isquémica, de arritmias ventriculares de alto riesgo y la mortalidad del paciente.

La troponina (Tn) es una proteína globular de la que existen 3 subunidades: T (38 kDa), C (18 kDa) e I (22 kDa). La TnC se encuentra entre la TnT y la TnI y es la subunidad a la que se une el Ca. Durante la diástole ($[Ca]_i$ = 0.1 μM), la actina está recubierta por la TnI y la tropomiosina, que forman un complejo que impide que la actina se una a las cabezas globulares de la miosina y aumente su actividad ATP-asa. Durante la sístole aumenta la $[Ca]_i$ (0.6-1 μM) y el Ca interactúa con la TnC produciendo un cambio conformacional, de tal forma que la TnI rota y se disocia de la actina y de la tropomiosina, lo que permite que queden libres las zonas activas que existen en la superficie de la actina y que representan los puntos en los que se van a establecer los enlaces cruzados con la cabeza de miosina. La formación de los enlaces cruzados permite el deslizamientos de los filamentos de actina entre los de miosina, acortando la longitud del sarcómero durante la sístole. Durante la relajación, la $[Ca]_i$ disminuye, lo que suprime la formación de los enlaces cruzados y facilita que la TnI y la tropomiosina vuelvan a su posición inicial.

Recientemente, ha aparecido un nuevo grupo de fármacos inotrópicos positivos que se unen a la TnC y aumentan su sensibilidad por el calcio. El levosimendán se une al dominio N-terminal de la TnC y potencia los cambios conformacionales producidos en la TnC al aumentar la $[Ca]_i$. Como consecuencia, acelera la formación y el número de enlaces cruzados entre actina y miosina. El resultado es un aumento de la contractilidad cardíaca sin modificar la $[Ca]_i$, el consumo de ATP, las de-

mandas miocárdicas de O_2 o la relajación ventricular. Por tanto, se ha propuesto que la persistencia de los enlaces cruzados sería la forma más eficiente, en términos energéticos, de aumentar la contractilidad. El efecto del levosimendán es dependiente de la $[Ca]_i$, de tal forma que según disminuye ésta durante la diástole el fármaco se disocia de la TnC; ello explica porqué el levosimendán no retrasa la relajación ventricular.

El levosimendán, además, activa los canales de K sensibles a ATP ($I_{K(ATP)}$) a nivel de la célula muscular lisa vascular, produciendo vasodilatación sistémica y coronaria. En pacientes hospitalizados con insuficiencia cardiaca aguda o crónica descompensada, la administración i.v. de levosimendán mejora las alteraciones hemodinámicas y reduce la estancia hospitalaria y los reingresos. El estudio LIDO comparó los efectos de levosimendán y dobutamina en pacientes con ICC grave o descompensada, demostrando que el levosimendán era más efectivo que la dobutamina para controlar los parámetros hemodinámicos, presentaba un menor riesgo arritmogénico y aumentaba la supervivencia y el tiempo que el paciente permanecía sin hospitalizar. Es importante señalar que en este estudio los efectos del levosimendán, pero no los de la dobutamina, persistían en los pacientes tratados con β-bloqueantes. Esta es una ventaja muy importante, dado que cada vez es mayor el porcentaje de pacientes con IC tratados con β-bloqueantes.

C. Modulación del remodelado ventricular. Las metaloproteinasas (MMPs) son una amplio grupo de enzimas [(colagenasas (MMP-1,8,13 y 18), gelatinasas (MMP-2 y 9), estromelisinas (MMP-3,10 y 11), elastasa (MMP-12) y unidas a membrana (MMP-14-17)] que regulan la composición de la matriz extracelular. Ésta juega un importante papel en el mantenimiento de la arquitectura cardíaca y en la génesis de los procesos de dilatación, remodelado e hipertrofia ventricular que aparecen en pacientes con hipertensión arterial (HTA), infarto de miocardio, IC o cardiomiopatía dilatada. La expresión de metaloproteinasas aumenta por radicales libres, citocinas (TNFα, IL-1), factores de crecimiento (epidérmico-EGF, plaquetario-PDGF o fibroblástico-FGF) y AII (a través de receptores AT2); por el contrario, existen inhibidores endógenos (TIMPs) y farmacológicos de las metaloproteinasas [tetraciclinas, antraciclinas, fosfonamidatos, hidroxamatos (batimastat, ilomastat, marimastat, prinomastat), β-bloqueantes, glucocorticoides o heparina].

La expresión de las MMP-1, 2, 3 y 9 aumenta y la actividad de los TIMP-1 y 3 disminuye durante el proceso de remodelado ventricular que aparece en el miocardio del paciente hipertenso o con infarto de micoardio previo, en las placas de ateroma y tras angioplastia. En el área de infarto aumentan los niveles de MMP 2,9,1,8,13 y disminuyen los de TIMPs; también disminuye la expresión de TIMP-1, 3 y 4 en pacientes con cardiopatía isquémica y los ratones con deficiencia en TIMP-1 presentan hipertrofia ventricular y un aumento del volumen telediastólico. Además, algunos polimorfismos de las MMP-3, 9 y 12 aumentan la incidencia de cardiopatía isquémica y aneurismas aórticos, mientras que la delección de la MMP-9 inhibe la dilatación ventricular posinfarto de miocardio. Por otro lado, en modelos animales, los TIMPs reducen la dilatación ventricular y mejoran la función ventricular posinfarto. Toda esta evidencia sugiere que la inhibición de las metaloproteinasas cardíacas podría prevenir la disfunción ventricular y retrasar la progresión hacia la IC en pacientes con un infarto de miocardio previo. Sin embargo, desconocemos el papel y los factores que regulan la actividad de cada MMP en el miocardio humano y si la mejoría de la función ventricular conlleva una reducción de la mortalidad para el paciente. La vía plasminógeno-plasmina participa en el remodelado ventricular, ya que activa diversas metaloproteinasas y libera factor de crecimiento transformante (TGFb), que inhibe la proliferación celular y el acúmulo de colágeno. Esta vía puede amplificarse por la uroquinasa y el activador tisular del plasminógeno-tPA o bloquearse por el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1).

D. Terapia génica. Dos han sido las estrategias utilizadas en modelos animales (Tabla 2): a) recuperar la vía de señalización de los receptores β-adrenérgicos, ya sea sobreexpresando los receptores β2 o la adenilato ciclasa o inhibiendo la proteína cinasa acoplada al receptor o (βARK1) y b) normalizar el aumento de la [Ca] intracelular durante la diástole, ya sea inhibiendo la función y o la expresión de fosfolambdano o aumentando la expresión de la ATPasa Ca-dependiente del retículo sarcoplásmico (SERCA2a) y/o del gen NCX, que codifica el intercambiador Na/Ca. El aumento de la expresión de la SERCA2 está implicado en la mejoría de la función ventricular producida por los β-bloqueantes en pacientes con IC.

TABLA 2

Genes candidatos para la terapia génica de las enfermedades cardiovasculares

1. Insuficiencia cardíaca congestiva
   - Sobreexpresión de SERCA2a, NCX, receptores β2 y adenilato ciclasa
   - Inhibición de fosfolambdano y βARK1
2. Hipertensión arterial
   - Sobreexpresión de NOSe, PGI sintasa, calicreína, péptidos natriuréticos auriculares, adrenomedulina
   - Inhibición de los genes del angiotensinógeno, ECA, receptores AT1 y β1-adrenérgicos
3. Hiperlipidemia
   - Sobreexpresión de los receptores para LDL y VLDL
   - Sobreexpresión de lipoprotein lipasa, lipasa hepática, ABC-1, LCAT, SR-B1 y enzimas antioxidantes
   - Sobreexpresión de HDL y Apo-AI
   - Inhibir la expresión de Apo (a) y Apo B100, CETP, VCAM, ICAM
4. Prevenir estenosis posangioplastia/stent
   - Reguladores del ciclo celular
   - Oligonucleótidos antisentido frente a factores de crecimiento (PDGF, FGF, TGFβ) y genes reguladores del ciclo celular (PCNA, cdk-2, c-myb, c-myc, Rb)
   - Sobreexpresión de los inhibidores del ciclo celular (p21, p27 y p53), mutantes dominantes negativos del protooncogen Ras
   - Transfección de NOSe
5. Angiogénesis
   - VEGF (A,B,C), FGF (1,2,4), MCP-1
   - MMPs, HIF-1, NOSe, NOSi
6. Modulación de la apoptosis cardíaca
   - Sobreexpresión de Bcl2 y caspasa 3
   - Inhibición de la subfamilia Bax

ABC-AI: transportador de la familia ABC que exporta colesterol fuera de la célula. ACAT: lecitin colesterol aciltransferasa. Apo: apolipoproteína. βBARK1: proteína cinasa acoplada al receptor β-adrenérgico. CEPT: proteína transportadora de ésteres de colesterol. FGF: factor de crecimiento de fibroblastos. HIF-1: factor de transcripción inducido por la hipoxia. LCAT: lecitin colesterol aciltransferasa. MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos. MC-SF: factor estimulante de colonias de monocitos. MMPs: metaloproteinasas. NCX: intercambiador Na-Ca. NOS: óxido nítrico sintasa endotelial (e) e inducible (i). PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular. Rb: proteína del retinoblastoma. SR-B1: receptor barredor. VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

Moléculas de adhesión: intercelular-ICAM, vascular-VCAM.

II. HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Los estudios epidemiológicos han demostrado que la hipertensión arterial (HTA) es un factor de riesgo que aumenta la incidencia de complicaciones cardiovasculares, tales como enfermedad coronaria, accidentes cerebrovasculares, arteriopatía periférica e insuficiencia cardíaca y renal. Más aún, existe una relación lineal, continua e independiente entre los niveles de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) y la incidencia de complicaciones cardiovasculares. En un reciente meta-análisis de 61 estudios, que incluían más de 1 millón de pacientes sin enfermedad cardiovascular previa, se demostró que en individuos con cifras de PAS/PAD > a 115/75 mm Hg el riesgo cardiovascular se duplica con cada incremento de 20/10 mm Hg. Por tanto, sería de esperar que el tratamiento antihipertensivo redujera la morbimortalidad cardiovascular y renal. En estudios comparativos frente a placebo, que incluían 47.653 pacientes tratados fundamentalmente con diuréticos y bloqueantes β-adrenérgicos, se demostró que una reducción media de la PAS de 10-12 mm Hg y de la PAD en 5-6 mmHg durante 5 años reducía, independientemente del fármaco utilizado, la incidencia de ictus (38%), cardiopatía isquémica (16%) e insuficiencia cardíaca (40%), así como la mortalidad cardiovascular (21%). Igualmente, en ancianos con HTA sistólica aislada, la reducción en 10 mm Hg en la PAS durante 4 años se acompañaba de una reducción de la mortalidad total (13%) y cardiovascular (18%), complicaciones cardiovasculares (26%), ictus (30%) y eventos coronarios (23%). Podemos, por tanto, concluir que el control del paciente hipertenso permite reducir su morbimortalidad y que el tratamiento antihipertensivo debe ser tanto más agresivo cuanto mayor sea el riesgo cardiovascular. Así, mientras que en la población general, el objetivo es reducir las cifras de PAS/PAD por debajo de 140/90 mm Hg, en pacientes diabéticos o con enfermedad cardiovascular previa el objetivo es alcanzar cifras < 130/85 mm Hg y si el paciente presenta insuficiencia renal y proteinuria > 1g/24 horas, los niveles de la PA deben ser < 125/75 mm Hg.

Para alcanzar estas cifras, en la actualidad disponemos de 6 familias de fármacos antihipertensivos: diuréticos, bloqueantes α- y β-adrenérgicos, antagonistas del Ca, IECAs y ARAII. Pero, a pesar del gran número de fármacos disponibles, tan sólo el 25% de los hipertensos tiene su presión arterial controlada, lo que avala la necesidad de desarrollar nuevos antihipertensivos más eficaces y seguros. En la actualidad se encuentran en fase de desarrollo diversos grupos de fármacos (Tabla 3).

TABLA 3

Nuevos fármacos antihipertensivos

A. Inhibidores enzimáticos
   1. Inhibidores de vasopeptidasas
      • ECA+ECE (CGS342256), ECA+EPN (tabla 1), ACE+EPN+ECE
   2. Inhibidores de la cimasa
   3. Inhibidores del ECE: CGS26303, CGS35066, RO0687629, FR901533
   4. Inhibidores de la vía Rho/RhoA cinasa

B. Agonistas y antagonistas de los receptores
   1. Antagonistas de los receptores A1 de la adenosina
   2. Antagonistas de la vasopresina (Tabla 1)
   3. Agonistas de los receptores ETA y ETB (Tabla 1)
   4. Agonistas de los receptores B2 de las cininas: careport, JMV-1116, FR-190997

C. Otros fármacos
   1. Agonistas de los canales de potasio vasculares (maxiK, K_{ATP})
   2. Inhibidores de los receptores de la aldosterona: eplerenona
   3. Tiazolidinadionas: ciglitazona, darglitazona, englitazona, pioglitazona, rosiglitazona
   4. Nuevas formulaciones galénicas de acción prolongada (1 vez al día/semana)
   5. Asociaciones a dosis fijas de fármacos antihipertensivos con estatinas, antiagregantes, etc.

D. Terapia génica

ECA: enzimas de conversión de la angiotensina II. ECE: enzima de conversión de la endotelina. EPN: endopeptidasa neutras. maxiK. Canales de potasio activados por calcio de alta conductancia. K_{ATP}: canales de potasio sensibles a ATP.

1. *Inhibidores de peptidasas*. El omapatrilato, un inhibidor mixto de ECA y EPN, produce una reducción de las presiones arteriales sistólica y diastólica superior a la de otros antihipertensivos (amlodipino, lisinoprilo), independientemente de la edad, sexo y raza del paciente. Sin embargo, ya mencionamos que la aparición de cuadros de angioedema ha detenido la comercialización del producto.

2. *Fármacos inhibidores de la cimasa*. Este enzima juega un importante papel en la síntesis de AII en el miocardio humano y, además, convierte la big-endotelina en un péptido vasoconstrictor de 31 aminoácidos (endotelina 1-31). Por tanto, sería de esperar que los inhibidores de

la cimasa potenciaran las acciones de los IECAs y ARAII. Sin embargo, el gran número de cimasas existentes dificulta el diseño de inhibidores selectivos.

3. *Agonistas de los receptores B2 de las cininas*. Su estimulación produce efectos vasodilatadores, antiisquémicos, antiproliferativos y antiaterogénicos, tanto por una acción directa como a través de la liberación por las células endoteliales de NO, PGI_2 y factor hiperpolarizante de origen endotelial. De hecho, la estimulación de los receptores B2 es responsable de parte de los efectos beneficiosos de los IECAs y de los inhibidores de la vasopeptidasa. Durante la isquemia coronaria aumenta marcadamente la liberación de cininas, que estimulan los receptores B2 y reducen el área de infarto, el remodelado ventricular y la incidencia y duración de las arritmias ventriculares; por el contrario, los ratones que carecen de receptores B2 presentan dilatación ventricular y cardiomiopatía. Las cininas también facilitan el precondicionamiento isquémico a través de la apertura de canales de potasio sensibles a ATP. Por tanto, los agonistas B2 podrían representar un nuevo abordaje en el tratamiento de la HTA y de la cardiopatía isquémica.

4. *Inhibición de la vía RhoA/Rho cinasa*. Además de la $[Ca]_i$, la contracción de las CMLV depende de la sensibilidad al calcio de las proteínas contráctiles. Diversos agonistas (p.ej. noradrenalina, endotelina-1, tromboxano A_2) producen una contracción de la CMLV mayor que la producida al despolarizar la membrana celular, a pesar de que en ambas circunstancias se produce un aumento similar en la $[Ca]_i$. Más aún, aunque la $[Ca]_i$ se mantenga estable, estos agonistas pueden inducir una respuesta contráctil, lo que indica que producen una sensibilización de las proteínas contráctiles al Ca.

En la CMLV, el aumento de la $[Ca]_i$ se une a la calmodulina formando un complejo Ca-calmodulina, que activa la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), que, a su vez, fosforila la cadena ligera de la miosina (MLC_{20}), facilitando su interacción con la actina y la contracción muscular. La relajación muscular tiene lugar cuando disminuye la $[Ca]_i$, lo que activa la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) que desfosforila-inactiva la MLC_{20}. La activación de la MLCK o la inhibición de la MLCP producen la fosforilación de la MLC_{20} y sensibilizan a las proteínas contráctiles al Ca; por el contrario, un aumento de la actividad

de la MLCP o una disminución de la actividad de la MLCK produce relajación y desensibilización de las proteínas contráctiles al Ca.

Diversos agonistas que estimulan sus receptores acoplados a las proteínas $G\alpha_{12/13}$ (p.ej. los TP del tromboxano A_2) y $G\alpha q$ (p.ej. los receptores α-adrenérgicos) activan una proteína G denominada RhoA que se une al GTP y activa la Rho cinasa. Ésta fosforila la subunidad reguladora de la MLCP e inhibe su actividad enzimática, a la vez que aumenta la fosforilación de la MLC_{20} y la contractilidad vascular. Recientemente, se ha demostrado que el Y-27632, un inhibidor de la Rho cinasa, exhibe propiedades antihipertensivas, lo que abre la posibilidad de controlar el tono vascular inhibiendo la sensibilización de las proteínas contráctiles al calcio. Por tanto, la inhibición de la RhoA/Rho cinasa representa una nueva diana para el desarrollo de fármacos antihipertensivos.

5. *Agonistas de los canales de K regulados por ATP de la célula muscular lisa vascular*. La salida de K hiperpolariza el potencial de membrana y disminuye la probabilidad de apertura de los canales L de calcio y la [Ca] intravascular, produciendo una vasodilatación arteriovenosa sistémica (disminuye pre/poscarga) y coronaria (suprime el vasoespasmo). La vasodilatación arterial aumenta por vía refleja el tono simpático y el sistema renina-angiotensina-aldosterona, lo que se traduce, respectivamente, en: a) un aumento de la contractilidad, la frecuencia, el volumen minuto y las demandas miocárdicas de O_2, lo que obliga a asociarlos con un bloqueante β-adrenérgico y contraindica su utilización en pacientes con cardiopatía isquémica. b) Retención hidrosalina y edemas, por lo que deben asociarse a un diurético tiazídico o del asa. Por tanto, los agonistas de los canales de potasio no son fármacos de primera elección en el tratamiento de vasculopatías.

6. *Nuevos fármacos antihipertensivos*. En un intento de reducir el riesgo cardiovascular y aumentar la protección de los órganos diana del hipertenso, se encuentran actualmente en fase de desarrollo preclínico y/o clínico diversos fármacos antihipertensivos que se muestran en la Tabla 3. Estos fármacos los agrupamos en fármacos que modulan la actividad de diversos receptores, enzimas y canales iónicos en las células musculares lisas vasculares. Además se incluyen fármacos utilizados en el tratamiento de dislipidemias (inhibidores de HMG-CoA reductasa o estatinas) y de la diabetes (acarbosa, glitazonas) y que, además, reducen la presión arte-

rial. Además, están las nuevas formulaciones de fármacos antihipertensivos, que permiten administrar el fármaco una vez al día o a intervalos más prolongados y reducen la incidencia de reacciones adversas. Finalmente, están las asociaciones de fármacos antihipertensivos a dosis fijas con otros antihipertensivos o con otros fármacos ampliamente utilizados en pacientes con riesgo cardiovascular, como son las estatinas o los antiagregantes plaquetarios. La seguridad y eficacia de todos estos fármacos deberá ser evaluada en futuros ensayos clínicos controlados frente a placebo o a otros antihipertensivos.

7. *Terapia génica*. Aunque se han identificado algunas formas monogenómicas de hipertensión, la HTA esencial es un síndrome multigénico y multifactorial. En modelos animales, la terapia génica de la HTA ha ido dirigida a sobreexpresar genes que codifican mediadores vasodilatadores (péptidos natriuréticos, PGI_2 sintasa, calicreína, adrenomedulina, óxido nítrico sintasa endotelial-NOSe) o a la utilización de oligonucleótidos antisentido frente al receptor β1-adrenérgico o diversos componentes del sistema reuina-angiotensina-aldosterona o SRAA (ECA, angiotensinógeno, receptor AT1) (Tabla 2). Ambas estrategias reducen la presión arterial 20-30 mm Hg durante 3-12 semanas y, en ocasiones, revierten la disfunción endotelial y las lesiones de los órganos diana. Esta corta respuesta podría explicarse por la naturaleza multigénica de la HTA y la limitada eficiencia de la transferencia génica.

La selección de un fármaco antihipertensivo se realiza empíricamente y no disponemos de datos que permitan predecir cuál será la respuesta a un determinado fármaco, aunque sabemos que los afroamericanos responden mejor a diuréticos y antagonistas del Ca y peor a β-bloqueantes e IECAs. Existe evidencia de que estas diferencias podrían explicarse por la existencia de polimorfismos de los genes que codifican las dianas (receptores, canales, transportadores) sobre los que actúan los fármacos antihipertensivos. En modelos animales y en pacientes con HTA, algunas variantes del gen ADD1, que codifica la aductina α (Gly460Trp), una proteína heterodimérica del citosqueleto de las células del túbulo renal que regula el transporte iónico, se asocian a mayor sensibilidad a la sal y a una mejor respuesta a los diuréticos. También se ha descrito la asociación de un polimorfismo en el exón 5 del gen que codifica la subunidad α de la proteína Gs del receptor β-adrenérgico (FokI +/-) que

acopla la adenilato ciclasa con la respuesta a los β-bloqueantes. Algunos polimorfismos del gen del angiotensinógeno (M235T) aumentan la respuesta antihipertensiva a los IECA, mientras que los polimorfismos de inserción/delección (I/D) del gen del ECA no se asocian a cambios en la respuesta a IECA, atenolol o nifedipino; el polimorfismo del gen del receptor AT1 (A1166C) tampoco se asocia a cambios en la respuesta a los IECA. En ratas genéticamente hipertensas de la cepa Lyon, se ha identificado un *locus* en el cromosoma 2, donde se localiza el gen de la proteína cinasa II-δ dependiente de calmodulina, que parece modular la respuesta a las dihidropiridinas calcioantagonistas. Algunos hipertensos con polimorfismos en los genes de la ECA, la apolipoproteína E o la lipoproteinlipasa presentan un mayor descenso de la presión arterial con el ejercicio físico, mientras que polimorfismos del gen de la apolipoproteína E determinan la respuesta a las dietas hipocalóricas. Estos ejemplos resaltan la importancia de los estudios de farmacogenómica para conocer mejor el mecanismo de acción de los fármacos antihipertensivos y poder desarrollar otros más seguros y eficaces.

III. TRATAMIENTO DE LAS HIPERLIPOPROTEINEMIAS

Las alteraciones del metabolismo lipídico, que cursan con un aumento de los niveles plasmáticos de colesterol, triglicéridos o de ambos, se denominan hiperlipoproteinemias y afectan a más del 10% de la población en los países occidentales. Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que las hiperlipoproteinemias son un importante problema socio-sanitario ya que:

a) Existe una correlación directa entre el aumento de la ingesta de una dieta rica en grasa y los niveles plasmáticos de colesterol y entre la elevación de los niveles plasmáticos de colesterol total y unido a las LDL (LDL-C) y la aparición de aterosclerosis y sus complicaciones (cardiopatía isquémica, hipertensión arterial, accidentes cerebrovasculares, vasculopatías periféricas). Por el contrario, el aumento del colesterol transportado por las HDL (HDL-C) reduce la incidencia de cardiopatía isquémica, mientras que los niveles bajos de HDL-C son un factor de riesgo, posiblemente el más frecuente en pacientes que presentan signos de cardiopatía isquémica prematura. En el Framingham Heart Study, los

individuos con cifras normales de LDL-C, pero con valores de HDL-C bajos (< 40 mg/dl) presentan el mismo riesgo de cardiopatía isquémica que los que presentan niveles altos de colesterol total (230-260 mg/dl) y normales de HDL-C (> 40 mg/dl). Por ello, el cociente entre ambas lipoproteínas (LDL-C/HDL-C) se considera un factor predictivo de riesgo cardiovascular.

b) La reducción de los niveles elevados de LDL y triglicéridos retrasa la progresión, e incluso a reducción del tamaño de la placa de ateroma y disminuye la incidencia de cardiopatía isquémica, la mortalidad coronaria y la necesidad de realizar by-pass coronarios. De hecho, el Lipid Research Clinics Program demostró que la reducción de un 25% del colesterol plasmático total disminuía hasta en un 50% la incidencia de accidentes coronarios.

Toda esta evidencia pone de manifiesto que el control de la hipercolesterolemia es de crucial importancia en la prevención primaria y secundaria de las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, el beneficio producido por los fármacos hipolipemiantes, en particular por las estatinas, es muy superior al que cabría esperar de la reducción de los niveles plasmáticos de LDL-C.

En la Tabla 4 se muestran distintas estrategias para el control de las hiperlipidemias.

1. *Inhibidores de la HMG-CoA reductasa (estatinas).* Las estatinas son un grupo de fármacos análogos del ácido mevalónico que producen una potente inhibición competitiva y reversible de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), enzima limitante de la síntesis endógena del colesterol, que convierte el 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A en ácido mevalónico. Las células responden a esta inhibición aumentando la expresión, particularmente a nivel hepático, de los genes que codifican la HMG-CoA reductasa, por lo que la síntesis de colesterol disminuye sólo ligeramente, y los receptores celulares de las LDL, lo que aumenta la captación hepática de LDL y de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Si a ello añadimos que las estatinas también reducen la degradación de dichos receptores, el resultado es que aumenta la captación celular de ambas lipoproteínas, disminuyendo sus niveles plasmáticos.

TABLA 4

Nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de las hiperlipidemias

1. Aumentar la expresión de receptores para las LDL
   - Inhibidores de la HMG-CoA reductasa: itarvastatina, NK-104, pitavastatina, rosuvastatina
   - Inhibidores de escualeno sintasa y escualeno ciclasa
2. Inhibir la proteína microsomal transportadora de triglicéridos: BMS-201030
3. Inhibir la reabsorción de ácidos biliares: colesevelam
4. Activar la lipoprotein lipasa: NO-1886
5. Inhibir la ACAT: avasimiba, CS-505, F-12511, F-1394, TS-892
6. Inhibir la absorción/reabsorción de colesterol: ezetimiba, fitosteroles, fitostanoles
7. Inhibir el transporte de ácidos biliares en el íleon: S-8921
8. Aumentar la síntesis de HDL: CI-1027
9. Administración de HDL o Apo-AI
10. Inhibir la CEPT: inhibidores orales, inmunización
11. Agonistas de los receptores PPARα y γ (tiazolidinedionas)
12. IECAs
13. Terapia génica

ACAT: acil colesterol acil transferasa. CETP: proteína transportadora de ésteres de colesterol. IECAs. inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina II. PPARs: receptores nucleares de proliferación activados por proliferadores de peroxisomas.

Efectos sobre las lipoproteínas. Las estatinas reducen los niveles plasmáticos de colesterol total (20-45%), LDL-C (25-65%) y triglicéridos (5-20%) y aumentan discretamete los de HDL-C (5-15%). Además, reducen las apoB-100, que representan un 95% del contenido proteico de las LDL y las apoC-II, C-III y E y aumentan las apoA-I y A-II que representan hasta el 80% del contenido proteico de las HDL-C. Estos cambios en la composición de apolipoproteínas hace que las LDL sean menos susceptibles a la oxidación. Sin embargo, las estatinas no modifican las concentraciones plasmáticas de lipoproteína(a).

Acciones pleiotrópicas de las estatinas. Los ensayos clínicos han demostrado que las estatinas producen efectos que no pueden explicarse a través de la reducción de los niveles plasmáticos que producen. Estas acciones, denominadas pleiotrópicas, se resumen en la **Tabla 5** y se ha sugerido que podrían estar relacionadas con la reducción de isoprenoides que las estatinas producen. La inhibición de la síntesis de ácido mevaló-

TABLA 5

Acciones pleiotrópicas de las estatinas

1. Estabilizan la placa de ateroma
   - Inhiben la endocitosis de las LDL por macrófagos y CMLV
   - Inhiben la esterificación del colesterol en los macrófagos
   - Reducen la expresión de metaloproteinasas 1, 2, 3 y 9
2. Revierten la disfunción endotelial
   - Disminuyen las LDLox y la producción de radicales libres
   - Estimulan la expresión de la NOSe y la liberación de NO
   - Inhiben la expresión de ET-1
   - Inhiben la apoptosis de las células endoteliales
3. Acciones antiinflamatorias y antiproliferativas
   - Disminuyen el acúmulo y la activación de macrófagos y linfocitos T
   - Reducen las células T killer y los niveles de proteína C reactiva
   - Inhiben la activación del NF-kB producida por las LDLox
4. Acciones antitrombogénicas
   - Inhiben la agregación plaquetaria
   - Reducen la expresión de factor tisular y del PAI-1
   - Aumentan los niveles de t-PA
5. Modulan el sistema renina-angiotensina-aldosterona
6. Promueven la vasculogénesis
7. Acciones antihipertensivas

CMLV: células musculares lisas vasculares. PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno. t-PA: activador tisular del plasminógeno.

nico disminuye la formación de varios isoprenoides que regulan diversas funciones celulares: la isopentil adenosina, presente en algunos ARN de transferencia, los dolicoles (requeridos para la síntesis de lipoproteínas), la ubiquinona y la hemo A (participan en la cadena transportadora de electrones) y el geranil geranilo pirofosfato y el farnesil pirofosfato, que participan en la isoprenilación de diversos factores de regulación intraceulares necesarios para la proliferación y diferenciación celular (p.ej. las proteínas G de pequeño tamaño rho A, ras y rac 1), el funcionamiento del citoesqueleto y el transporte endocitótico y exocitótico.

Efectos sobre la función endotelial. Diversos factores de riesgo, incluída la hipercolesterolemia, reducen la vasodilatación arteriolar producida por la acetilcolina y que está asociada a la liberación de NO por las células endo-

teliales (ver disfunción endotelial). Las LDL oxidadas (LDLox) inhiben la expresión de la NOSe y la liberación de NO y estimulan la actividad de la NADPH oxidasa, que incrementa la producción de radical superóxido y de dimetilarginina, que aceleran la inactivación del NO. Como consecuencia, en pacientes hipercolesterolémicos disminuyen las acciones vasodilatadora, antiagregante plaquetaria y antimotogénica del NO. Además, las LDLox estimulan la proliferación y apoptosis de las células de músculo liso vascular y la expresión del factor tisular en los monocitos y estimulan la aparición de una respuesta inflamatoria.

Las estatinas restauran la función endotelial ya que: a) aumentan la expresión de la NOSe y la liberación de NO por las células endoteliales. Este aumento de la NOSe se debe a que disminuyen el geranigeranilo pirofosfato, que permite que la proteína G pequeña Rho se una a la membrana e inhiba la producción de NO. b) Actúan como antioxidantes y barredores de radicales libres, disminuyen la formación de LDLox e inhiben la actividad de la NADPH oxidasa y la formación de radical superóxido. c) Reducen los niveles plasmáticos de endotelina-1 y la expresión de ARN mensajero de la preproendotelina 1 en las células endoteliales.

Efectos sobre la oxidación de LDL. Las estatinas reducen la susceptibilidad de las LDL a oxidarse, ya que: a) disminuyen el contenido de colesterol de las lipoproteínas. b) Se unen a la fracción fosfolipídica de las LDL y previenen la difusión de los radicales libres generados en el interior de las lipoproteínas en condiciones de estrés oxidativo. c) Los metabolitos de algunas estatinas (atorvastatina, fluvastatina) presentan una potente acción antioxidante que previene la oxidación de las LDL. La inhibición de las LDLox disminuye la formación de células espumosas en la placa de ateroma.

Efectos sobre los componentes de la placa de ateroma. Los síndromes coronarios agudos asociados a la ruptura de una placa de ateroma aparecen más fácilmente en las placas con alto contenido de lípidos y macrófagos, factor tisular y moléculas de adhesión (intercelular: ICAM-1, vascular: VCAM-1). Los macrófagos activados, además, liberan metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular y destruyen la capa fibrosa, facilitando la rotura de una placa.

Las estatinas disminuyen la expresión de moléculas de adhesión en los monocitos, la entrada de monocitos al subendotelio, la oxidación de

las LDL, el acúmulo de ésteres de colesterol en los macrófagos de la placa, el crecimiento de las células musculares lisas vasculares y la expresión por los macrófagos de metaloproteinasas 1 y 9. Todos estos efectos estabilizan la placa de ateroma y previenen su rotura.

Efectos sobre el proceso inflamatorio. La adherencia de los monocitos al endotelio alterado y su posterior migración transendotelial es uno de los primeros pasos en la formación de la placa de ateroma. Las moléculas que facilitan la adhesión y la migración de los monocitos actúan conjuntamente con factores quimiotácticos generados por el endotelio, células musculares y monocitos (proteína quimiotáctica de monocitos: MCP-1, LDLox) para atraer monocitos y células T a la pared arterial. Por otro lado, las citocinas inflamatorias secretadas por linfocitos y macrófagos [factor nuclear kappa B-NF-κB, TNFα, MCP-1, interleucinas (IL) 1 y 6, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y moléculas de adhesión (ICAM, VCAM, selectinas E, L y P)] aumentan la lesión endotelial y estimulan la proliferación de células musculares, la degradación del colágeno y la trombosis.

Las estatinas inhiben diversos pasos del proceso inflamatorio a nivel de la placa, tales como la infiltración por macrófagos y la expresión de citocinas (interleucina-6), moléculas de adhesión (ICAM-1, MCP-1) y moléculas de superficie (integrina CD11b/CD18) necesarias para la adhesión de los monocitos a las células endoteliales. También reducen los niveles plasmáticos de proteína C reactiva (PCR), un marcador inflamatorio de riesgo cardiovascular. Estas propiedades antiinflamatorias explican por qué los efectos beneficiosos de las estatinas son mayores en los pacientes que presentan una elevación de los marcadores inflamatorios (proteína C, selectina P, ICAM-1, IL-6 o TNFα).

Las estatinas inhiben la inducción del complejo mayor de histocompatibilidad tipo-II (MHC-II), comportándose como represores de la activación de los linfocitos T. Esta acción es la base de su aplicación en pacientes con leucemia y explica porqué las estatinas mejoran el estado inmunológico pos-transplante.

Efectos sobre la proliferación, migración y apoptosis de miocitos. Las estatinas, con excepción de la pravastatina, disminuyen la proliferación y aumentan la apoptosis de las células musculares lisas vasculares, lo que

explicaría porqué en modelos animales retrasan la hipertofia y la hiperplasia vasculares y la proliferación de la neoíntima.

Acciones antitrombóticas. Las LDLox aumentan la agregación plaquetaria y la producción de tromboxano A2 y la hipercolesterolemia aumenta los niveles plasmáticos de PAI-1 y disminuye los del tPA. De hecho, la expresión de PAI-1 aumenta en las lesiones ateromatosas y el aumento de sus concentraciones plasmáticas se asocia a un mayor riesgo de infarto de miocardio. La expresión del factor tisular, que juega un papel importante como iniciador de la vía extrínseca de la coagulación, también aumenta en los macrófagos ricos en lípidos de placas ateroscleróticas.

Las estatinas ejercen un efecto antitrombótico, ya que inhiben la agregación plaquetaria y la producción plaquetaria de TXA2 y potencian las acciones antiagregantes del NO. También disminuyen los niveles de fibrinógeno y la expresión de factor tisular en macrófagos humanos y aumentan la fibrinolisis, pues reducen la expresión de PAI-1 inducido por citocinas (TNFα e interleucina-1) y aumentan la expresión de tPA por las células endoteliales.

Acciones protectoras cardiovasculares. Las estatinas disminuyen la presión arterial, un efecto que podría explicarse por su capacidad para inhibir la expresión del RNA mensajero de la preproendotelina 1 y la hipertrofia-hiperplasia de las células musculares lisas vasculares. Además, modulan la actividad del sistema renina-angiotensina tisular. En pacientes hipercolesterolémicos, la AII produce una mayor respuesta hipertensiva y aumenta la expresión de los receptores AT1. Las estatinas reducen los niveles tisulares del enzima de conversión y de AII y suprimen la mayor respuesta presora que ésta produce en pacientes con hiperlipidemia. También inhiben la activación de la vía de las cinasas activadas por mitógenos y del NF-κB producida por la AII, lo que explicaría la regresión del remodelado cardiovascular. Las estatinas disminuyen la incidencia de insuficiencia cardíaca y las hospitalizaciones por deterioro de la enfermedad en pacientes con cardiopatía isquémica.

Efectos sobre el crecimiento tumoral. El papel de la vía del mevalonato sobre la proliferación celular y el que muchas células tumorales exhiban una alta actividad de la HMG-CoA reductasa, sugiere que la inhibición selectiva de esta enzima podría representar una nueva alternativa en el tratamiento del cáncer.

2. Nuevas alternativas terapéuticas (Tabla 4)

En fase de desarrollo se encuentran:

a) *Nuevas estatinas* más potentes, que presentan una distribución preferencial hepática (hepática > periférica), producen una inhibición prolongada de la HMG-CoA reductasa hepática y presentan menos interacciones medicamentosas. En los próximos años debemos conocer el significado clínico de los efectos pleiotrópicos de las estatinas, las posibles diferencias existentes entre cada una de ellas y los posibles beneficios que la combinación de estatinas con otras alternativas terapéuticas (antiagregantes, IECAs, ARAII) conllevan en el paciente hipercolesterolémico.

b) *La ezetimiba,* que inhibe a nivel de las células en cepillo intestinales el transporte del colesterol de la dieta y del que alcanza el intestino a través de la vía biliar; ello disminuye el aporte hepático de colesterol e induce la síntesis de receptores para las LDL. Su asociación con estatinas permite reducir de forma muy importante la dosis diaria de éstas. Ello se traduce en una potenciación en la reducción de los niveles de LDL-colesterol y en una menor incidencia de reacciones adversas musculares (miositis) y hepáticas de las estatinas. La ezetimiba está indicada en el tratamiento de la hipercolesterolemia primaria heterozigótica, familiar o no, que no responde a estatinas o en las que están contraindicadas, en la hipercolesterolemia homozigótica familar (que no responde a estatinas) y en la sitosterolemia homozigótica (fitosterolemia), enfermedad asociada a una mutación recesiva del gen ABCG5 o ABCG8.

c) *Inhibidores de la captación intestinal de ácidos biliares,* que representan una alternativa a las resinas clásicas.

d) *Fármacos que inhiben la acil colesterol acil transferasa (ACAT).* A nivel de los enterocitos esta enzima esterifica las micelas de colestrol, que se unen a los triglicéridos y a diversas apolipoproteínas para formar quilomicrones que pasan a través de la linfa a la circulación sistémica.

e) *Fármacos/anticuerpos que inhiben la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP)*

f) *El aumento de los niveles plasmáticos de HDL* ejerce efectos antiaterogénicos atribuibles a la apolipoproteína (Apo)-AI, ya que la sobreexpresión del gen de la Apo-AI humana en ratones C57B/6 o la admi-

nistración intravenosa de HDL o de Apo-AI reducen el contenido lipídico, ejercen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, revierten la disfunción endotelial, estabilizan la placa de ateroma e inhiben la hiperplasia vascular responsable de la restenosis tras intervenciones coronarias y la progresión de las lesiones ateroscleróticas. Los niveles de HDL pueden aumentarse administrando HDL de origen plasmático o recombinante, por transferencia génica o tras la administración de fármacos (estatinas, niacida, fibratos, fenitoína y hormonas sexuales femeninas).

g) *Terapia génica*. Las alteraciones genéticas del metabolismo lipídico han sido controladas en modelos animales utilizando transplantes autólogos de hepatocitos que sobreexpresan el receptor de las LDL; también se han transfectado con éxito la lipoprotein lipasa y la lipasa hepática y enzimas antioxidantes en la pared vascular y se ha inhibido la expresión de la Apo(a) proaterogénica con ribozimas. Otras alternativas incluyen:

- La sobreexpresión de la proteína ABCA1, que regula el flujo de salida de colesterol desde los enterocitos hacia la luz intestinal, lo que reduce la absorción digestiva del colesterol de origen dietético.
- La sobreexpresión de los genes responsables del transporte inverso de colesterol: lecitina colesterol aciltransferasa-LCAT, Apo-AI, receptor barredor SRB1 y transportadores de la familia ABC. Las HDL captan el colesterol libre, no esterificado, de la superficie de las membranas celulares. Este proceso está mediado por la interacción con un receptor barredor denominado SRBI al que se acopla la apoA-1. Este receptor permite el paso de colesterol desde las células espumosas de la pared arterial hacia las HDL y su sobreexpresión disminuye el riesgo de aterosclerosis, mientras que su supresión la acelera. Las proteínas transportadoras de membrana de la familia ABC (ATP binding cassette: ABC1 y ABCG1), facilitan la transferencia de colesterol no esterificado desde las células (macrófagos, hepatocitos) hacia las HDL, donde es esterificado con ácidos grasos de cadena larga por acción de la LCAT, proceso que requiere la presencia de apoA-1 como cofactor. Los pacientes con defícit de apoA-1 o con defectos de las proteínas ABC (enfermedad de Tangier) o de la LCAT presentan bajos niveles plasmáticos de HDL-C (< 35 mg/dl) y, por tanto, un alto riesgo de padecer cardiopatía isquémica temprana.

- La ApoE juega un importante papel en el metabolismo de las VLDL y de los remanentes, por lo que su transferencia génica podría constituir un objetivo terapéutico en pacientes con hipertrigliceriemias.
- Los triglicéridos se sintetizan en el retículo endoplásmico y gracias a una proteína microsomal de transferencia (MTP), se transportan al punto de unión con la apoB-100, formándose las VLDL. La supresión de la MTP impide la síntesis de triglicéridos y, por tanto, de VLDL, IDL y LDL y a nivel intestinal la transferencia de los triglicéridos de la dieta en quilomicrones.

IV. FÁRMACOS MODULADORES DE LA TRANSCRIPCIÓN GÉNICA A NIVEL CARDIOVASCULAR

Dados los problemas que aún plantea la terapia génica, se ha propuesto la utilización de fármacos que modulan la transcripción de aquellos genes que juegan un importante papel en la génesis de las enfermedades cardiovasculares. Estos son los mecanismos de acción de dos familias de fármacos.

1. *Agonistas selectivos de los receptores nucleares* α *o* γ *de proliferación activada por proliferadores de peroxisomas (PPAR*α*, PPAR*γ*.).* Estos receptores se expresan en células endoteliales, CMLV, macrófagos, tejido graso, hígado y en la placa de ateroma y su estimulación produce una heterodimerización con miembros de la familia del receptor X retinoide y la posterior unión a elementos de respuesta (PPRE) que modifican la expresión de diversos genes.

Los agonistas de los PPARα aumentan la expresión de los genes implicados en el transporte inverso de colesterol (Apo-AI y AII, SR-B1, ABC-1 y lipoproteinlipasa) y en la utilización de los ácidos grasos por el miocardio y a nivel de la placa de ateroma reducen el contenido graso y el acúmulo de macrófagos activados, a la vez que aumentan el contenido de colágeno y facilitan su estabilización. La activación de los PPARγ por las tiazolidinadionas mimetiza algunos efectos genómicos de la insulina. Así, estimulan la diferenciación de los preadipocitos en adipocitos en el tejido subcutáneo (no a nivel de los adipocitos abdominales) y au-

mentan la expresión de los genes de la lipoprotein lipasa y la proteína de unión de lípidos en los adipocitos (aP2); ambos efectos aumentan la lipogénesis y la captación tisular de glucosa y de ácidos grasos, disminuyendo sus niveles plasmáticos. También aumentan la expresión y translocación del transportador GLUT-4 hacia la membrana de las células de la musculatura esquelética y de los adipocitos y el transporte de glucosa hacia su interior. En modelos animales, las tiazolidinadionas inhiben la proliferación y migración de las CMLV, la expresión de moléculas de adhesión, quimiocinas, citocinas y MMP-9, la respuesta inflamatoria y la progresión de la placa de ateroma y los agonista de los PPAR-α la expresión de VCAM-1, factor tisular e IL-6.

En pacientes con diabetes tipo 2, las tiazolidinadionas: a) disminuyen los niveles plasmáticos de glucosa, hemoglobina glicosilada e insulina en ayunas, la glucemia posprandial y la resistencia a la insulina. b) Retrasan la aparición de hiperglucemia y la progresión de la nefropatía (aparición de proteinuria), revierten la disfunción endotelial y reducen la presión arterial. c) Disminuyen los niveles plasmáticos de triglicéridos y los cocientes colesterol total/HDL-colesterol y LDL/HDL; además, aumentan los niveles plasmáticos de HDL-colesterol y el cociente LDL-colesterol/ApoB, lo que sugiere que modifican el tamaño de las partículas lipídicas, predominando aquéllas de mayor tamaño, menos densas y menos proaterogénicas. d) Reducen los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres que participan en la génesis de la resistencia a la insulina, producen disfunción endotelial (reducen la producción de NO), aumentan la presión arterial y activan la coagulación y la agregación plaquetaria, efectos que aumentan el riesgo cardiovascular del paciente diabético.

En los próximos años deberemos conocer si todas estas acciones se traducen en una reducción de la morbimortalidad en pacientes diabéticos con hiperlipemia e HTA asociadas.

2. *Modulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA).* El SRAA juega un papel central en la génesis de diversos procesos cardiovasculares. La AII no sólo ejerce acciones vasoconstrictoras, aumenta el tono simpático y estimula la liberación de aldosterona y vasopresina, sino que produce efectos proliferativos asociados a la activación de cinasas activadas por mitógenos (Erks, JNKs, p38). A nivel de la placa de ateroma, la AII induce, a través de la activación de NF-κB, la infiltración de

monocitos en la íntima y aumenta la expresión de múltiples genes implicados en procesos de crecimiento, diferenciación y proliferación celulares, inflamación y trombosis (Tabla 6). La AII también activa las oxidasas de función mixta NADP/NADPH y aumenta la producción de radicales superóxido y la oxidación de las LDL en la neoíntima, produciendo disfunción endotelial. Todas estas acciones facilitan la respuesta inflamatoria, la proliferación neointimal y la progresión de la placa de ateroma, a la que hacen más vulnerable, facilitando su rotura y la obstrucción vascular.

Los fármacos que modulan el SRAA, ya sea inhibiendo la síntesis de AII (IECA) o sus acciones mediadas a través de los receptores AT1 (ARAII), podrían actuar como moduladores indirectos de la expresión génica inducida por la AII.

TABLA 6

Efectos de la angiotensina II

Vasoconstricción	Aumenta la [Ca] intracelular Estimula la liberación de noradrenalina, aldosterona, vasopresina y ET-1 Inhibe la expresión de la NOSe y la actividad vasodilatadora del NO
Inflamación	Activa monocitos/macrófagos Induce la expresión de NF-κB, MCP-1, MC-SF, citocinas (IL-6, TNFα), VCAM e ICAM Estimula la actividad NADP/NADPH y la oxidación de las LDL
Remodelado	Estimula la hiperplasia de los cardiomiocitos Estimula la proliferación y migración de las CMLV Aumenta la producción de matriz extracelular (la expresión de genes de fibronectina, colágenas Iα y IIIα1, laminina-α1 y β2) y la expresión de las metaloproteinasas Estimula las cinasas activadas por mitógenos (Erks, JNKs, p38) Aumenta la expresión de protooncogenes (fos, myc, myb, jun, junB, erg-1) y factores de crecimiento (PDGF, bFGF, IGF-1 y TGFβ1) Estimula la expresión de la aldosterona sintasa (CYP11B2)
Trombosis	Estimula la expresión de PAI-1 y 2 Activa las plaquetas, aumenta su adhesión y agregación

CMLV: célula muscular lisa vascular. Factores de crecimiento transformador-TGFβ1, plaquetario-PDGF, fibroblástico-FGF-2, tipo-insulina o IGF-1. PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno

Los IECA no modifican el perfil lipídico, pero reducen la progresión de la placa de ateroma en modelos animales. Estos efectos antiaterogénicos han sido atribuidos a su capacidad para normalizar la presión arterial, inhibir la producción del anión superóxido, la proliferación y migración de las CMLV hacia la íntima vascular y la adhesión de los monocitos al endotelio y su posterior infiltración en el espacio subendotelial inducidos por la AII; además, aumentan los niveles tisulares de cininas y NO, que ejercen acciones vasodilatadoras y antimitogénicas y revierten la disfunción endotelial en pacientes hipertensos, con cardiopatía isquémica o con diabetes no insulino-dependiente**.** A ello debemos añadir que los IECA disminuyen la permeabilidad vascular para las LDL, inhiben el tono simpático y alteran el balance fibrinolítico, ya que disminuyen la síntesis de AII, un potente estímulo de la síntesis del PAI-1 y aumentan los niveles de cininas, un potente estímulo para la secreción de t-PA por las células endoteliales. En la actualidad, diversos estudios analizan los efectos de los IECA en pacientes con cardiopatía isquémica, función ventricular conservada y patología asociada, p.ej. hipertensión o hiperlipidemia.

V. TRATAMIENTO DE LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA

Bajo esta denominación se engloban diversos trastornos en los que existe un desequilibrio entre el aporte coronario de O_2 y las necesidades o demandas miocárdicas de O_2 (MVO_2). Su manifestación clínica más frecuente es la *angina de pecho*, definida como dolor, opresión o malestar, generalmente torácico, atribuible a isquemia miocárdica transitoria. En ocasiones, la isquemia cardíaca no produce síntomas, por lo que hablamos de *isquemia silente*, mientras que otras veces la isquemia evoluciona hacia la necrosis cardíaca o *infarto de miocardio*. Los síndromes coronarios agudos (angina inestable e infarto de miocardio) se producen casi siempre por una reducción brusca del flujo sanguíneo coronario producida por la presencia de una placa de ateroma y la superposición de un trombo y/o de un aumento brusco y transitorio del tono coronario (vasoespasmo).

Tres factores controlan el flujo sanguíneo coronario: a) el gradiente de perfusión coronaria, determinado por la diferencia existente entre la presión diastólica aórtica y la presión telediastólica del ventrículo izquierdo. Cuanto mayor sea la diferencia, mayor será el flujo coronario; por el contrario, una

marcada hipotensión disminuye el gradiente y el flujo coronario, pudiendo llegar a producir cardiopatía isquémica. b) La duración de la diástole, ya que este es el momento del ciclo cardíaco en el que se realiza el flujo coronario efectivo. Los fármacos que aumentan la frecuencia cardíaca acortan la duración de la diástole y disminuyen el aporte sanguíneo coronario. c) Las resistencias vasculares coronarias, que a su vez están reguladas por factores intrínsecos (tono vegetativo, productos metabólicos) y extrínsecos (compresión mecánica de los vasos intramiocárdicos durante la sístole).

Las demandas miocárdicas de O_2 están determinadas por la frecuencia y contractilidad cardíacas (reguladas por el tono simpático cardíaco) y la tensión de la pared ventricular durante la sístole. Esta última, a su vez, depende de la presión diastólica que distiende al ventrículo antes de contraerse (precarga) y de la fuerza contra la que se contrae el ventrículo (poscarga); en la práctica ambos parámetros equivalen a la presión telediastólica ventricular izquierda y a las resistencias vasculares periféricas, respectivamente. Un aumento de cualquiera de estos 4 factores incrementa las MVO_2. El ejercicio físico y el aumento del tono simpático (emociones, estrés) aumentan la frecuencia y la contractilidad cardíacas, la presión arterial y las MVO_2 y disminuyen el aporte coronario (se acorta la diástole durante la taquicardia), facilitando la aparición de fenómenos de isquemia coronaria.

Clasificación y tratamiento de la angina de pecho

Existen 3 tipos de angina de pecho:

a) *Angina de esfuerzo*. Es aquélla provocada por el ejercicio o por otras situaciones que impliquen un aumento de las MVO_2. Se asocia a la presencia de placas de ateroma (lesiones fijas) en las arterias epicárdicas que ocluyen, en mayor o menor grado, la luz vascular. En estas condiciones, el flujo coronario suele ser suficiente en reposo, produciéndose la isquemia al aumentar las MVO_2, pues la estenosis coronaria no permite que el flujo sanguíneo aumente de forma paralela. Los objetivos del tratamiento de la angina de esfuerzo son: 1) controlar la angina y mejorar la capacidad física. 2) Mejorar el pronóstico, disminuyendo la morbilidad (urgencias-hospitalización, revascularización) y la incidencia de infarto de miocardio y, si fuera posible, aumentar la supervivencia del paciente. Ambos objetivos pueden alcanzarse utilizando nitratos, bloqueantes

β-adrenérgicos, antagonistas del calcio y antiagregantes plaquetarios. 3) Retrasar la progresión de la arteriosclerosis coronaria utilizando estatinas. A pesar de que todos estos fármacos producen una mejroía sintomática, sólo el ácido acetilsalicílico y las estatinas reducen la mortalidad.

b) *Angina de reposo*. Aparece de forma espontánea y se asocia a la presencia de un vasoespasmo coronario, por lo que el objetivo terapéutico es suprimir éste con nitratos y antagonistas del calcio.

c) *Angina inestable*. Implica la ruptura de la placa aterosclerótica, que estimula la agregación plaquetaria y la formación de un trombo que ocluye, en mayor o menor grado, la luz vascular y da lugar a la aparición de vasoespasmo coronario. La evolución del cuadro puede ser hacia la lisis espontánea del trombo o su progresión hacia la necrosis cardíaca (infarto de miocardio) y la muerte del paciente. En este caso el objetivo es controlar la crisis anginosa y prevenir el infarto de miocardio y la muerte del paciente, utilizando fármacos capaces de suprimir la agregación plaquetaria y la trombosis.

A. Nuevos antianginosos. En los últimos años han aparecido dos nuevos grupos de fármacos antianginosos:

1. *Nicorandilo*. Produce una vasodilatación arteriovenosa y coronaria por un doble mecanismo: a) libera NO, que activa la guanilato ciclasa y los niveles celulares de GMPc, produciendo una vasodilatación venosa y b) activa canales de K regulados por ATP, lo que hiperpolariza el potencial de membrana y disminuye la probabilidad de apertura de los canales de Ca tipo-L y la $[Ca]_i$, produciendo una vasodilatación arteriovenosa. Estos efectos aparecen a dosis a las que apenas si modifica la frecuencia, la contractilidad o la velocidad de conducción cardíacas. También exhibe propiedades antiagregantes plaquetarias.

2. *Trimetazidina*. Es el primer fármaco antiisquémico cuyos efectos no se relacionan con cambios en las MVO_2 o en el flujo coronario, sino con un efecto protector del metabolismo cardíaco. La trimetazidina mantiene los niveles celulares de ATP y reduce la acidosis y la $[Ca]_i$ durante la isquemia. Además, previene el acortamiento de la duración del potencial de acción cardíaco que facilita la aparición de arritmias cardíacas (es decir, que ejerce una acción antiarrítmica del grupo III), reduce la frecuencia sinusal e inhibe la infiltración de neutrófilos (lo que confiere al fármaco una cierta acción antiinflamatoria).

B. Tratamiento de los síndromes coronarios agudos

La lesión inflamatoria de la pared vascular y la activación y agregación plaquetarias juegan un papel fundamental en la génesis de la aterosclerosis y de la trombosis que ocluye la luz coronaria. Su tratamiento implica la utilización de fármacos hipolipemiantes (Tabla 5), anticoagulantes (inhiben la síntesis/función de los factores de la coagulación), antiagregantes plaquetarios y trombolíticos (lisan los trombos formados, pero no previenen la formación de otros nuevos) (Tabla 7) y de fármacos que estabilizan la placa de ateroma (Tabla 8).

TABLA 7

Tratamiento de los síndromes coronarios agudos

A. Nuevos anticoagulantes

1. Inhibidores de la antitrombina III :
   - Heparinas de bajo peso molecular: ardeparina, certoparina, nadroparina, logiparina, parnaparina, reviparina, tedelparina
   - Antitrombina III recombinante
2. Inhibidores del complejo factor tisular (TF)-factor VIIa: mutantes del TF, anticuerpos anti-TF, sobreexpresión del inhibidor de la vía del TFrPI, NaPc2, inhibidores del factor VII
3. Inhibidores de la trombina:
   a. Inhibidores del factor Xa: antistatina, TAP (tick anticoagulant peptide), DX9065, lefaxina, fondaparinux, terostatina, YM-75466, ZK-807834
   b. Anticuerpos contra el factor IXa y Xa
   c. Activadores de la vía de la proteína C: derivados de la proteína C, trombomodulina
   d. Inhibidores selectivos de la trombina: argatrobán, bivaluridina, efegatrán, H376/95, hirugén, inogatrán, melagatrán, napsagatrán, UK-156406, ximelagatrán

B. Antiagregantes plaquetarios
   - Inhibidores de la glucoproteína IIb/IIIa: XV459, roxifibán

C. Nuevos fibrinolíticos
   - Mutaciones en la molécula de t-PA: E6010, pamiteplasa
   - Híbridos de t-PA y urocinasa: amideplasa
   - Anticuerpos monoclonales antifibrina

TABLA 7 *(Continuación)*

Tratamiento de los síndromes coronarios agudos

- Estafilocinasa recombinante
- Activador tisular del plasminógeno de origen animal: BAT-PA, rDSPAa1
- Fibrolasa
- Lisosomas de estreptocinasa

D. Fármacos cardioprotectores
- Reducir la concentración de calcio intracelular
- Inhibir el intercambiador sodio/calcio: KB-R7943
- Inhibir el intercambiador sodio/protones: cariporide, HOE694, SMP-300
- Inhibidores de la HMG CoA reductasa
- Dadores de óxido nítrico
- Bradicardizantes selectivos: ivabradina
- Mejorar el metabolismo cardíaco: trimetazolina
- Antioxidantes
- Agonistas de canales de potasio regulados por ATP: nicorandilo

E. Fármacos que estabilizan la placa de ateroma (tabla 8)

TABLA 8

Estrategias terapéuticas para prevenir la proliferación de la íntima vascular y la restenosis coronaria

1. Oligonucleótidos antisentido frente a
   - Factores de crecimiento (PDGF, FGF, TGFβ)
   - Genes que regulan el ciclo celular (PCNA, Cdc-2, cdk-2, c-myb, c-myc, Rb, E2F)
2. Ribozimas frente a c-myb, PCNA y TGFβ
3. Bloqueantes de las señales intracelulares (mutantes dominantes negativos del protooncogen Ras, Raf cinasa)
4. Sobreexpresión de los inhibidores del ciclo celular (p21, p27 y p53)
5. Transfección vascular del gen de la NOSe
6. Fármacos que inhiben las cinasas dependientes de ciclinas: flavopiridol, CVT-113
7. Fármacos administrados a través de stents
   - Antiproliferativos: actinomicina D, paclitaxel, sirolimus
   - Inhibidores de metaloproteinasas: batimastat
   - Inhibidores del VEGF: tranilast
   - Angiopeptina
   - Inhibidores de tirosina cinasa: ST638
   - Oligonucleótidos antisentido c-myc
   - Antitrombóticos: NO, inhibidores de GPIIb/IIIa, hirudina, iloprost
   - Otros: estradiol, metilprednisona,

PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular. Rb proteína del retinoblastoma. VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

Anticoagulantes, antiagregantes y fibrinolíticos

Diversos anticoagulantes se encuentran en fase de desarrollo (Tabla 7): a) heparinas de bajo peso molecular, que presentan un menor riesgo de producir hemorragias (son menos anticoagulantes y más antitrombóticas) que la heparina no fraccionada. En la actualidad, se estudia su utilidad en el tratamiento de la trombosis venosa o arterial, de los síndromes coronarios agudos y del ictus isquémico y trombótico, así como en la prevención de la restenosis coronaria y de los accidentes tromboembólicos en pacientes con fibrilación auricular. Presentan una semivida de 15-18 horas y en estudios de fase III ha resultado ser más efectivas que la heparina no fraccionada en la profilaxis en la trombosis venosa. b) Inhibidores del complejo factor tisular-factor VIIa. El NaPc2 es una proteína aislada del *Ancylostoma caninum* que inhibe el factor VIIa en el complejo TF-VIIa y presenta una semivida de 60 horas. c) Inhibidores de la trombina. En este grupo se incluyen: los inhibidores directos (hirudina, bivaluridina, argatrobán, melagatrán, ximelagatrán, inogatrán, efegatrán, napsagatrán, UK-156406), los inhibidores del factor Xa, los anticuerpos contra el factor IXa y Xa y los activadores de la vía de la proteína C (derivados de la proteína C, trombomodulina). Entre los inhibidores del factor Xa está el pentasacárido fondaparinux (1.728 Da), que presenta una semivida de 15-18 horas y que en estudios de fase III ha resultado más efectivo que la enoxaparina en la profilaxis en la trombosis venosa.

Los inhibidores directos de la trombina bloquean tanto la trombina circulante como la unida a fibrina, reduciendo la actividad de la trombina más que las heparinas clásicas o de bajo peso molecular; tampoco son inactivados por las heparinasas, produciendo una respuesta anticoagulante más predecible y no producen trombocitopenia. Un reciente meta-análisis ha demostrado que los inhibidores directos de la trombina bivalentes (hirudina, bivaluridina, que se unen al punto catalítico y al punto de reconocimiento del sustrato) son más efectivos que la heparina no fraccionada en el tratamiento de los síndromes coronarios agudos, aunque la incidencia de hemorragias graves sea más alta. Por el contrario, los univalentes (sólo se unen al punto catalítico) no han demostrado ser superiores a la heparina en estas circunstancias.

En fase de investigación preclínica se encuentran diversos *inhibidores de la adhesión plaquetaria* (anticuerpos monoclonales frente al complejo glucoproteína Ib/IX o el factor de von Willebrand).

Los antiagregantes plaquetarios previenen la trombosis intravascular y alteran el curso de la enfermedad aterosclerótica. Los inhibidores de la glucoproteína IIb/IIIa plaquetaria, que representa la vía final común de la agregación plaquetaria inducida por múltiples agonistas (serotonina, adrenalina, vasopresina, AII, trombina, tromboxano A_2, factor activador plaquetario), reducen la incidencia de angina y reinfarto en pacientes con angina inestable y/o infarto de miocardio sin onda Q y previenen la reoclusión coronaria en pacientes sometidos a intervenciones percutáneas coronarias (angioplastia, implantación de **stents**). Sin embargo, desconocemos la dosis y duración ideal del tratamiento, el riesgo de hemorragias o las ventajas/riesgos de su asociación con aspirina, heparinas no fraccionadas o de bajo peso molecular y fibrinolíticos. Los nuevos fármacos deberán producir una inhibición prolongada de la GPIIb/IIIa, evitando las fluctuaciones en los niveles plasmáticos que favorecen la aparición de efectos protrombóticos; ello se consigue diseñando fármacos que presenten una alta afinidad por su receptor, una lenta velocidad de disociación del mismo (fast-onset, slow-offset) y una semivida prolongada.

Los *nuevos fibrinolíticos* en estudio deben presentar alta especificidad por la fibrina del coágulo, mayor resistencia frente al PAI-1 y una semivida que permita administrarlos en bolo. En este grupo se incluyen: a) híbridos de t-PA y urocinasa (la amideplasa es la fusión del N-terminal del rt-PA y del C-terminal de la porción catalítica de la urocinasa), b) anticuerpos monoclonales antifibrina, c) estafilocinasa recombinante (rSTAR, menos antigénica que la estreptocinasa), d) activadores del plasminógeno derivados de la saliva del vampiro *Desmodus rotundus* (BAT-PA, rDSPAa1), e) fibrolasa, obtenida del *Agkistrodom contortrix contortrix,* f) lisosomas de estreptocinasa, que reducen su actividad antigénica y g) modificaciones de la molécula del rt-PA. A este último grupo pertenecen el E6010 (mutación cisteína-84-serina en el dominio del factor de crecimiento epidérmico) y la pamiteplasa (delección del dominio kringle 1 y mutación arginina-glutamina en K2).

C. Tratamiento de la restenosis coronaria

El éxito de los procedimientos percutáneos coronarios (angioplastia, **stents**) está limitado por la posterior aparición de hiperplasia neointimal

y acúmulo de matriz extracelular en la capa media, que reducen la luz vascular y facilitan la restenosis y los procesos de isquemia miocárdica. En modelos animales, es posible prevenir y/o revertir este proceso, pero en la clínica ninguno de los fármacos ensayados (IECAs, anticoagulantes, antiagregantes plaquetarios, fármacos citotóxicos) ha inhibido la restenosis posangioplastia coronaria.

Terapia génica de la restenosis coronaria. La inhibición del ciclo celular ha sido la estrategia más utilizada para inhibir la migración y proliferación de las CMLV e inhibir la proliferación neointimal y la restenosis coronaria. La progresión del ciclo celular está facilitada por diversas ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) y se inhibe por proteínas que se unen a las Cdks e inhiben su acción o CdkIs (familias INK: p14-19; CIP7KIP: p21, p27 y p57). Las CdkIs están inducidas por los genes p53 y de la proteína del retinoblastoma. En la célula en reposo, la proteína Rb inhibe la actividad del factor de transcripción E2F, que activa los genes que promueven la proliferación celular. Tras un estimulo mitogénico, el complejo ciclina D-Cdk4 hiperfosforila la proteína del retinoblastoma, produciendo su disociación del E2F, que entonces es capaz de activar la expresión de los genes de las ciclinas A, B y E y de la Cdk1. Los factores de transcripción GATA-6 y GAT también inhiben la proliferación celular por inducir la expresión de p21 durante el ciclo celular. El NO disminuye la expresión de Cdk2 y ciclina A y aumenta p21, facilitando también la parada del ciclo celular. En la actualidad, el estudio REGENT analiza si la transfección de la NOS previene la restenosis intra-**stent.**

Las estrategias utilizadas para inhibir la proliferación neointimal se resumen en la Tabla 8; sin embargo, todas ellas presentan el problema de que la transducción adenoviral produce una reacción inflamatoria, particularmente cuando se administran por vía intraluminal, que puede contribuir a la hiperplasia neointimal y facilita la trombosis. El único estudio positivo es el PREVENT I, que demostró en pacientes con arteriopatías subinguinales graves que el tratamiento *ex vivo* de injertos autólogos de vena safena con oligonucleótidos antisentido frente al factor de transcripción E2F reducía al cabo de 12 meses la incidencia de reoclusiones del injerto. El reciente análisis de los resultados peliminares del estudio PREVENT II demuestran una reducción del 40% de la estensois crítica tras 12 meses de seguimiento.

Para evitar estos inconvenientes, se están desarrollando fármacos que inhiben las Cdks (flavopiridol: Cdks 1,2,4 y 7; CVT-113: Cdk2) o que paran el ciclo en G1 (sirolimus, paclitaxel). El paclitaxel es un antitumoral que estabiliza los microtúbulos en un estado despolarizado. El sirolimus es un fármaco liposoluble que atraviesa las membranas y se acumula a nivel citoplasmático en las CMLV, donde se une a su receptor intracelular, la proteína de unión FKBP12, aumenta la expresión de p^{27kip1} e inhibe la fosforilación de la proteína del retinoblastoma, la cdk2, así como la progresión del ciclo celular y la proliferación y migración de las CMLV coronarias. Recientemente, se ha demostrado que los *stents* recubiertos con paclitaxel o con sirolimus disminuyen la restenosis coronaria y que este efecto se mantiene a lo largo del tiempo. Los fármacos administrados a través de **stents** se resumen en la Tabla 8. En particular, los resultados obtenidos con el sirolimus, abren las puertas a otros fármacos moduladores del ciclo celular para prevenir la restenosis coronaria y la hiperplasia intimal. Están en marcha diversos estudios que analizan los efectos del recubrimiento del **stent** con batimastat (inhibidor de la MMP-1), metilprednisona (estudio STRIDE) y actinomicina D (estudio ACTION) para prevenir la estenosis intrastent y se diseñan otros para conocer el posible efecto beneficioso de los agonistas de los PPARγ; sin embargo, el tranilast (estudio PRESTO), un antiinflamatorio que inhibe la proliferación y migración celulares inducidas por los factores de crecimiento PDGF y TGFβ1; no ha modificado la restenosis. Debemos señalar que los **stents** actuales no son idóneos para administrar fármacos; es necesario diseñar **stents** microporosos, reabsorbibles y biodegradables (de ácido poli-l-láctico) y recubrimientos que permitan almacenar mayores concentraciones de fármacos y que los liberen durante un tiempo prolongado. Además, es necesario aclarar el posible riesgo de trombosis tardía observada con los **stents** de paclitaxel.

D. Arteriogénesis cardíaca

Un porcentaje importante de pacientes con isquemia miocárdica no puede someterse a técnicas de revascularización percutánea o de cirugía cardíaca o persisten sintomáticos aún tras tratamiento médico in-

tensivo. En ellos, una alternativa terapéutica sería estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos que irriguen el miocardio isquémico. En la vida posnatal existen dos formas de crecimiento vascular: a) la angiogénesis o formación de nuevas redes capilares a partir de estructuras vasculares preexistentes y b) la arteriogénesis, que implica el desarrollo de nuevos capilares y de arterias colaterales a partir de las arterias existentes. Este proceso se produce en respuesta a la oclusión vascular en pacientes con cardiopatía isquémica. Las células endoteliales se encuentran rodeadas por la membrana basal que contiene colágeno tipo IV, laminina y fibronectina; para poder formar nuevos vasos, las células endoteliales liberan MMls (1, 2, 8, 9 y 13) que degradan la membrana subendotelial en el punto donde se formará el nuevo vaso. Los macrófagos activados en zonas inflamatorias o isquémicas liberan citocinas que facilitan la liberación de las MMPs por las células endoteliales y la arteriogénesis cardíaca.

Diversas moléculas estimulan (factores de crecimiento endotelial vascular- VEGF, transformante-TGF y fibroblástico-FGF, angiogenina y angiopoyetinas) o inhiben la angiogénesis (angiostatina, endostatina, trombospondina, factor 4 plaquetario, fragmento N-terminal de 16 kDa de la prolactinA). Los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), transformante (TGF) y fibroblástico (FGF-1 y 2) se han administrado por diversas vías (intravenosa-i.v., intracoronaria, transendocárdica, intracardíaca o epicárdica) para inducir arteriogénesis coronaria en pacientes con isquemia coronaria o de las extremidades inferiores. La expresión del VEGF aumenta en situaciones de isquemia e hipoxia y por distintas citocinas (TNFα, IL-1), TGF y prostaglandina E2 y sus efectos están mediados a través de dos receptores, VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR2 (flk-1). El VEGF induce la proliferación y migración de las células endoteliales, aumenta la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) y la permeabilidad vascular y activa diversas metaloproteinasas (MMP-2) y activadores del plasminógeno tipo-urocinasa que degradan la matriz extracelular. La extravasación de plasma y proteínas plasmáticas (fibrina) hacia el espacio intersticial facilita la aparición de edemas, particularmente en pacientes con isquemia de las extremidades inferiores. Sin embargo, el estudio FIRST, que comparó los efectos de FGF-2 frente a placebo en pacientes anginosos, no pudo demostrar efecto beneficioso alguno

al cabo de 90 días sobre la capacidad de ejercicio o la incidencia de angina. Tampoco el estudio VIVA pudo demostrar beneficio en pacientes anginosos tratados por vía intracoronaria e i.v. con VEGF. Recientemente, se ha demostrado que la MCP-1, pero no el VEGF, estimula el crecimiento de los vasos colaterales a través de un proceso de remodelado de los ya existentes. Sin embargo, muy recientemente se ha demostrado que la administración intracoronaria de FGF-4 (Ad5FGF-4) es bien tolarada y mejora la perfusión coronaria en pacientes con angina crónica estable.

En los próximos años debemos conocer cuales son los factores angiogénicos más adecuados, la vía de administración más idónea, los efectos terapéuticos y las reacciones adversas que producen, así como el tipo de pacientes que más se podrían beneficiar del tratamiento. FGF y VEGF y sus receptores se encuentran sobreexpresados en tejidos isquémicos, en tumores malignos y en pacientes con retinopatía diabética y VEGF y MCP-1 facilitan el acúmulo de macrófagos activados en la placa de ateroma. Por ello, es necesario descartar que la administración de factores angiogénicos no acelera el crecimiento tumoral, no produce angiomas o neovascularización de la placa de ateroma y no acelera su progresión o su ruptura. De hecho, el VEGF produce hemangiomas en el ratón y acelera el proceso de aterosclerosis en ratones carentes de ApoE.

E. La respuesta inflamatoria como diana terapéutica en la patología cardiovascular

Ya a finales del siglo XIX se propuso que la arteriosclerosis es intrínsecamente un proceso inflamatorio. Las placas más inestables son aquéllas con un alto contenido lipídico, marcada vascularización, fina cubierta fibrosa (menor contenido de colágeno y de CMLV productoras de matriz extracelular) e importante componente inflamatorio (presencia de monocitos/macrófagos y linfocitos T activados). A nivel de la placa, las células inflamatorias activadas tienen potencial para:

a) Liberar citocinas (IL-1β y 6, interferón γ, TNFα, endotoxinas), que estimulan la expresión de moléculas de adhesión y la proliferación de las CMLV, inducen la oxidación de las LDL, inhiben

la expresión de la NOSe y estimulan la liberación de factor tisular, que activa la cascada de la coagulación y facilita la obstrucción trombótica coronaria tras la rotura de la placa. Las citocinas también inhiben la síntesis de la matriz extracelular a la vez que aumentan la liberación de MMP; ambos efectos debilitan la cápsula fibrosa, desestabilizan la placa y facilitan su posterior ruptura. Por todo ello, los niveles plasmáticos de marcadores inflamatorios (proteína C reactiva, moléculas de adhesión, citocinas) permiten predecir el riesgo cardiovascular del paciente.

b) Convertir las propiedades antiadhesivas y anticoagulantes del endotelio en adhesivas y procoagulantes. Las células endoteliales estimuladas por citocinas y LDLox sobreexpresan en su superficie moléculas de adhesión (ICAM, VCAM, selectinas E y P) que facilitan el paso de las células inflamatorias a la pared arterial, segregan moléculas quimiotácticas (MCP-1, M-CSF, IL-8) y promueven la trombogénesis.

La naturaleza del impulso inflamatorio es desconocida, aunque se ha propuesto una posible infección por *H. pylori, Chlamydia pneumonii,* citomegalovirus o virus del herpes simple. Varios estudios han demostrado que en pacientes con angina inestable o infarto de miocardio sin onda Q la administración de azitromicina o roxitromicina reduce los accidentes coronarios (muerte cardiovascular, hospitalización, infarto de miocardio o isquemia recurrente).

Para el tratamiento del proceso inflamatorio de la placa de ateroma se han desarrollado diversas estrategias (Tabla 9):

1) Antagonistas de la interacción leucocito-célula endotelial, de selectinas (de la glicoproteína de la selectina P de los neutrófilos o PSGL-1), integrinas (LFA-1, Mac-1) y citocinas (TNFα, MCP-1). En ratones en los que se suprime la expresión de MCP-1 disminuye la respuesta inflamatoria y se retrasa la progresión de la placa.

2) Inhibir la expresión de moléculas de adhesión o la activación del NF-kB.

3) Estabilizar la placa de ateroma, para prevenir su ruptura y la posterior trombosis oclusiva de la luz vascular.

TABLA 9

Tratamiento del proceso inflamatorio de la placa de ateroma

1. Antagonistas de la interacción leucocito-endotelio, de selectinas, integrinas y citocinas
2. Inhibir la expresión de moléculas de adhesión o la activación de NF-κB.
3. Estabilizar la placa de ateroma
   a. Reducir el contenido de colesterol y el componente inflamatorio: estatinas, IECAs, agonistas de los PPARs
   b. Inhibir las metaloproteinasas
   c. Mejorar la disfunción endotelial: estatinas, IECAs
   d. Restaurar el equilibrio trombosis-trombolisis: antagonistas de la plasmina y del factor tisular
   e. Reducir el estrés de la pared vascular: β-bloqueantes
   f. Antibióticos: macrólidos, quinolonas
   g. Fármacos antioxidantes

PPARs: receptores nucleares de proliferación activados por proliferadores de peroxisomas.

F. Disfunción endotelial

Las células endoteliales ejercen un importante papel en la regulación del tono y de la estructura vascular, ya que liberan potentes mediadores vasodilatadores-antimitogénicos (NO, prostaglandina E2, prostaciclina-PGI_2) y vasoconstrictores-mitogénicos (endotelinas, tromboxano A_2). Diversos mediadores vasodilatadores (acetilcolina, cininas, sustancia P) estimulan sus receptores específicos endoteliales y estimulan la síntesis de NO y PGI_2. A su vez, las células endoteliales contienen diversos enzimas (ECA, ECE, EPN) que regulan los niveles de AII, ET-1, péptidos natriuréticos auriculares y cininas.

La disfunción endotelial es un proceso caracterizado por una disminución de la vasodilatación dependiente del endotelio que aparece en pacientes con HTA, IC, diabetes, aterosclerosis o vasculopatías postransplante, en fumadores o en presencia de un aumento del estrés oxidativo. Este cuadro ha sido atribuido a la inhibición de la síntesis/liberación de NO, a la degradación del NO por radicales libres y/o a un predominio de sustancias vasoconstrictoras (p.ej. ET-1 o AII) que, además, aumentan la producción de radicales libres. Como muestra la Figura 1, la disfunción

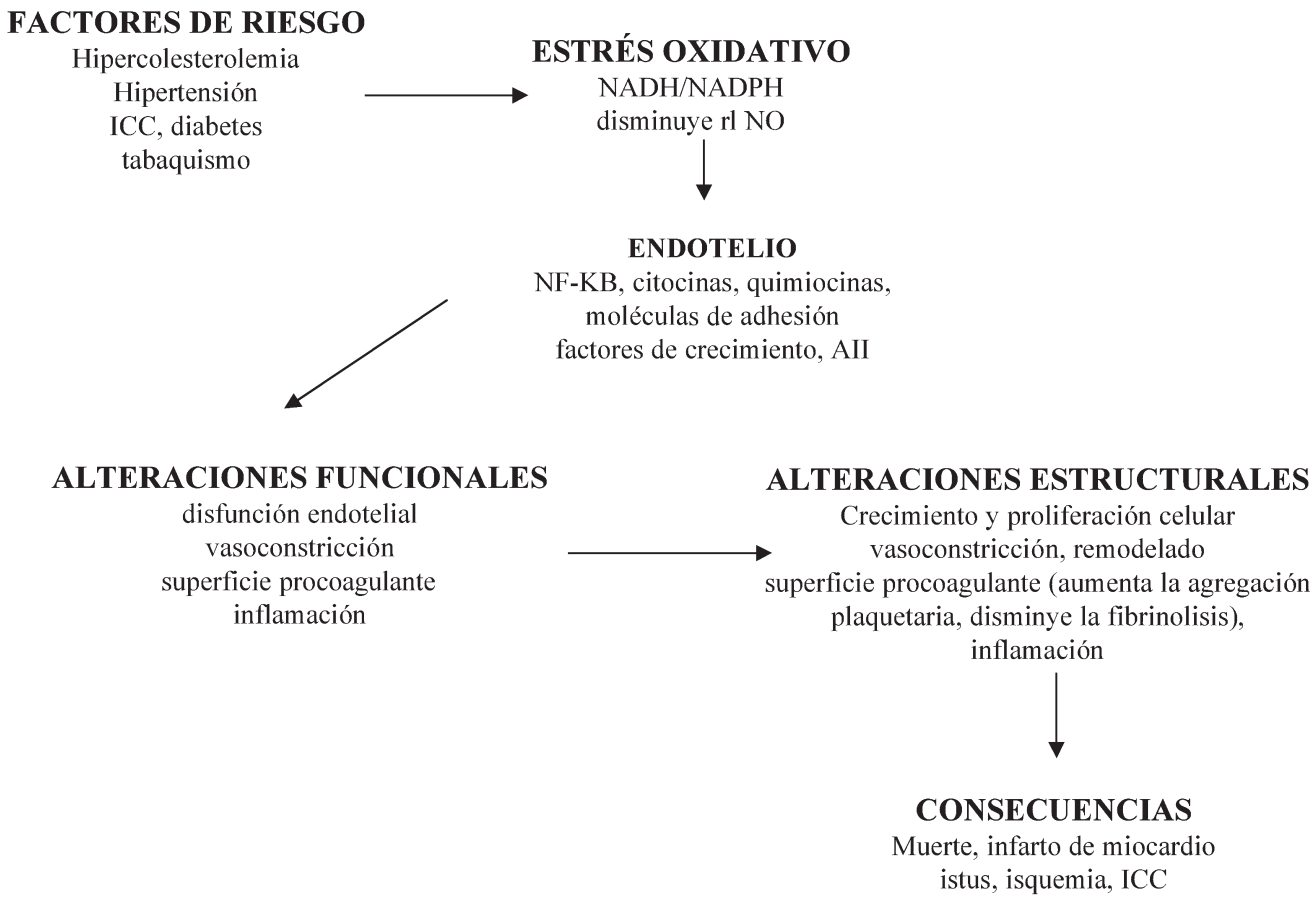


FIGURA 1. *Mecanismos implicados en la lesión vascular.*

endotelial produce vasoconstricción arterial, facilita el acúmulo de monocitos y macrófagos en la pared vascular y estimula la expresión de moléculas de adhesión y citocinas por las células endoteliales o las CMLV, la agregación plaquetaria y el crecimiento, migración y proliferación de las CMLV.

Diversos grupos de fármacos mejoran la disfunción endotelial:

a) F*ármacos que aumentan los niveles de NO*. Dado que la disfunción endotelial se asocia a una reducción de la síntesis/liberacion o a una mayor degradación del NO, una alternativa podría ser utilizar precursores (L-argi-

TABLA 10

Fármacos que revierten la disfunción endotelial

1. Fármacos que aumentan los niveles tisulares de óxido nítrico
   - Donadores directos: NO gas, nitroprusiato sódico, sal de Angeli´s, derivados p-nitrosofosfato, dietilamino/NO, dietilenetriamina/NO, sidnoniminas, furoxanos
   - Donadores que requieren metabolización previa: nicorandilo
   - Donadores bifuncionales: NO-AINEs (S-NO-diclofenaco), S-NO-N-acetil-l-cisteína, S-NO-glutation, nitroaspirinas (NCX-4016, NCX-4215)
   - Precursores del NO: L-arginina
2. Fármacos que aumentan la actividad biológica del NO endógeno: estatinas, IECA, ARAII, calcioantagonistas, β-bloqueantes
3. Transferencia génica de la NOSe en la pared arterial
4. Terapéutica hormonal sustitutoria: estrógenos
5. Fármacos antioxidantes
   - Enzimáticos: superóxido dismutasa, catalasa, glutation peroxidasas
   - Antioxidantes hidrosolubles: ácido ascórbico (vitamina C), bilirrubina, glutation
   - Antioxidantes liposolubles: α-tocoferol (vitamina E), coenzima Q10, β-caroteno (provitamina A), licopeno
   - Polifenoles del vino y del té
   - Sobreexpresión de enzimas antioxidantes en la pared vascular (NOSe, xantino oxidasa)
   - Inhibidores del sistema renina-angiotensina: IECA, ARAII
   - Otros: Estatinas, tiazolidindionas
6. Heme-oxigenasa-1 (HO-1)

ARAII: antagonistas de los receptores AT1 de la angiotensina II

nina) o fármacos dadores de NO (Tabla 10). Sin embargo, no disponemos de ensayos clínicos que confirmen la seguridad y eficacia de los fármacos diseñados como alternativa a los nitratos clásicos. Sí disponemos de fármacos que aumentan la actividad biológica del NO endógeno y mejoran la disfunción endotelial: estatinas (ya comentado), IECAs, calcioantagonistas y β-bloqueantes. Los *IECAs* inhiben la síntesis de AII y la activación de la oxidasa NADP/NADPH, disminuyendo la degradación de NO a la vez que aumentan los niveles de bradicinina que, a su vez, libera NO y PGI_2. Los *ARAII* también aumentan los niveles de NO, pero este efecto es secundario al hecho de que la AII estimula los receptores AT2. Algunos *calcioantagonistas* de la familia de las dihidropiridinas aumentan la actividad de la NOSe y la liberación de NO por la célula endotelial (nitrendipino, amlodipino). Ello es el resultado de la sobreexpresión de la NOSe, un aumento en la actividad de la superóxido dismutasa y una disminución de la [Ca] en la célula endotelial secundaria al bloqueo de los canales de Ca tipo-L. También los β-*bloqueantes* aumentan la liberación endotelial de NO en pacientes hipertensos. El fármaco más potente del grupo es el nevibolol, cuyas acciones parecen estar mediadas a través de receptores serotonérgicos.

b) Otra alternativa es la *transferencia génica de la NOSe* en la pared arterial, que en modelos animales aumenta la producción local de NO, revierte la disfunción endotelial, inhibe el crecimiento y migración de las CMLV (disminuye la expresión de Cdk2 y ciclina A y aumenta la de p21) y la proliferación de la matriz extracelular y suprime la hiperplasia neointimal producida tras la lesión vascular con un catéter-balón. El NO también inhibe la actividad del NF-κB y la expresión de moléculas inflamatorias en la pared arterial.

c) *Fármacos antioxidantes*. El estrés oxidativo, representado por la oxidación de las LDL y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO: anión superóxido O_2^-, peróxido de hidrógeno H_2O_2) juega un importante papel en la génesis de la disfunción endotelial. Las concentraciones de ERO también aumentan en pacientes con isquemia-reperfusión coronaria, fibrilación auricular crónica o IC sintomática. Las LDLox y las ERO participan también en la respuesta inflamatoria que facilita la formación/progresión/rotura de la placa de ateroma, en la proliferación de las CMLV, responsable del remodelado vascular, y la restenosis coronaria y en la apoptosis cardíaca, posiblemente a través de la expresión

del protooncogen proapoptótico $p66^{shc}$. Tres sistemas enzimáticos facilitan el estrés oxidativo: la xantino oxidasa, la NOSe en su forma desacoplada y las oxidasas NADP/NAPDH, que son la principal fuente de radicales superóxido. La AII y diversas citocinas aumentan la actividad de las oxidasas NADP/NADPH e inducen la producción de radicales libres.

Los ERO producen disfunción endotelial (inactivan el NO e inhiben la NOSe) e inhiben las acciones vasodilatadora, antiagregante plaquetaria y antimitogénica del NO y activan el SRAA. A su vez, la AII, a través de la activación de los receptores AT1, estimula las oxidasas NADP/NADPH y aumenta la producción de ERO a nivel cardíaco y en la pared vascular. Además, las ERO aumentan el tono vascular y la peroxidación lipídica, regulan la migración y crecimiento de las CMLV, activan las proteína cinasas activadas por mitógenos y diversas caspasas y estimulan la expresión de factores protrombóticos (factor tisular, PAI-1) y la agregación plaquetaria, aumentando el riesgo trombogénico. También facilitan la interacción entre las células inflamatorias, las endoteliales y las CMLV e incrementan la expresión de NF-κB que, a su vez, aumenta la expresión de citocinas, cimiocinas (MCP-1) y moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM), jugando un papel central en la génesis de procesos inflamatorios cardiovasculares (aterosclerosis, HTA, restenosis). Así pues, las ERO representan un punto de unión entre hiperlipidemia, disfunción endotelial y lesión vascular, por lo que las estrategias terapéuticas dirigidas a reducir el estrés oxidativo celular deberían revertir la disfunción endotelial y prevenir la lesión vascular.

A nivel de la placa de ateroma, los fármacos antioxidantes actúan inhibiendo la peroxidación de las LDL, la expresión de moléculas de adhesión, el acúmulo de monocitos y la producción de ERO. Además, inhiben la citotoxicidad de las LDLox y ERO sobre las células endoteliales, mejorando la disfunción endotelial en pacientes fumadores o con cardiopatía isquémica. Los ensayos clínicos han demostrado que las vitaminas C y E y el β-caroteno mejoran la función endotelial, inhiben la agregación plaquetaria y disminuyen el riesgo de ruptura de la placa; sin embargo, los ensayos clínicos controlados que han analizado su utilidad en la prevención secundaria de la cardiopatía isquémica han demostrado resultados dispares sobre la reducción de la incidencia de eventos coronarios no fatales y que no modifican o aumentan la mortalidad. Estos malos resultados han sido atribui-

dos a que el tratamiento es demasiado tardío, la corta duración de los estudios (menos de 4 años de seguimiento), la administración de dosis inadecuadas, el desconocimiento del grado de estrés oxidativo basal y del efecto antioxidante producido por el tratamiento o a que aún no se ha encontrado el antioxidante eficaz. Sin embargo, algunos estudios sugieren la existencia de una relación inversa entre el consumo de alimentos ricos en flavonoides (vino, té) y las enfermedades cardiovasculares.

d) La *heme-oxigenasa-1 (HO-1)* se expresa en la pared arterial en respuesta a estímulos inflamatorios (LDLox, citocinas, ERO) y exhibe propiedades vasodilatadoras, antiinflamatorias y antioxidantes que protegen a la pared vascular en pacientes con HTA, aterosclerosis o posangioplastia. El gen hHO-1 degrada el heme a monóxido de carbono, ferritina y bilirrubina, que aumentan la producción de NO y disminuyen la formación de ERO y de LDLox. Por tanto, la sobreexpresión de HO-1 podría ser un nuevo abordaje de las respuestas vasoconstrictora e inflamatoria asociadas a la progresión de las lesiones ateromatosas y a la restenosis posangioplastia.

G. Nuevos fármacos antiarrítmicos

El tratamiento de las arritmias cardíacas ha sufrido importantes cambios en los últimos 10 años. Ello ha sido consecuencia de la demostración de que muchos fármacos antiarrítmicos (FA) son inefectivos y que en pacientes con un infarto de miocardio previo, los FA del grupo I (bloqueantes de los canales de Na) producen efectos proarrítmicos que pueden poner en peligro su vida. Este hallazgo, unido a los buenos resultados obtenidos con amiodarona y sotalol en pacientes con taquicardia/fibrilación ventricular, desplazaron el interés hacia los FA del grupo III, que prolongan la duración del potencial de acción (DPA) y de los períodos refractarios (PR) cardíacos a dosis a las que no modifican la velocidad de conducción intracardíaca. Sin embargo, y a pesar de su efectividad y de sus mínimos efectos proarritmogénicos, la amiodarona presenta una alta incidencia de reacciones adversas, algunas graves (fibrosis pulmonar, hipo/hipertiroidismo, hepatopatías), que limitan su utilidad y presenta una farmacocinética compleja, persistiendo en el organismo el fármaco y sus metabolitos activos hasta 90 días después de suspender el tratamiento. A su vez, el sotalol prolon-

ga el intervalo QT del ECG y puede producir taquiarritmias ventriculares polimórficas (*torsades de pointes*) que obligan a suspender el tratamiento si el intervalo QTc es > 500 ms.

Todo ello estimuló la búsqueda de nuevos FA del grupo III, más efectivos y seguros. La Tabla 11 muestra los FA en desarrollo. El primer grupo es el de los FA que bloquean de forma selectiva el componente rápido de la corriente rectificadora tardía ($I_{Kr).}$ Sin embargo, estos FA prolongan la DPA a frecuencias lentas, pero este efecto desaparece al aumentar la frecuencia cardíaca; este fenómeno, denominado *«reverse use-dependence»* disminuye su efectividad en presencia de taquiarritmias y facilita la aparición de *torsades de pointes*. El riesgo de *torsades de pointes* es mayor en mujeres y en pacientes con bradicardia, hipopotasemia hipertrofia cardíaca, que reciben fármacos o presentan patologías que también prolongan el intervalo QTc (antidepresivos, fenotiazinas, macrólidos, antifúngicos, antihistamínicos H1, etc). Otra estrategia es diseñar FA que bloquean diversos canales iónicos y receptores y otra «mejorar el perfil» de algunos FA ya comercializados. Así, han aparecido la dronedarona, un derivado deyodado de la amiodarona y la trecetilida, un derivado de la ibutilida activo por vía oral.

TABLA 11

Nuevos fármacos antiarrítmicos del grupo III

1. Bloqueantes selectivos de la I_{Kr}: dofetilida, ibutilida, trecetilida.	
2. Bloqueantes de la I_{Kr} y de los Rβ1: sotalol, ersentalida	
3. Fármacos con múltiples acciones:	
Ambasilida	Bloquea I_{Kr}, I_{Ks} e I_{CaL}
Azimilida*	Bloquea I_{Kr}, I_{Ks}, I_{Na} e I_{CaL}, Rβ1 y RM2
BRL-32872	Bloquea I_{kr} e I_{CaL}
Clofilium*	Bloquea I_{ks} e I_{to}
Ibutilida	Bloquea I_{Kr} y aumenta I_{Na}
Dronedarona*	Bloquea I_{Kr}, I_{Ks}, I_{Na} e I_{to}
Tedisamilo*	Bloquea I_{Kr} e I_{to} (I_{KATP})
Trecetilida	Similares a las de la ibutilida
4. Bloqueantes selectivos de la I_{Kur}:	

I_{Na} e I_{CaL}: corrientes de entrada de sodio y de calcio (a través de los canales tipo-L)
I_{to}: corriente transitoria de salida de potasio. I_{Kur}, I_{Kr} e I_{Ks}: componentes ultrarápido, rápido y lento de la corriente rectificadora tardía. I_{KATP}: corriente de salida de potasio sensible a ATP. Rβ1: receptores β-1 adrenérgicos RM2: receptores muscarínicos-M2.

Nuevas estrategias antiarrítmicas. Recientemente se ha demostrado que la patología cardíaca que cursa con un aumento en la incidencia de arritmias (HTA, IC, cardiopatía isquémica, valvulopatías), produce cambios en las propiedades eléctricas (expresión de canales y bombas de la membrana) y morfológicas (fibrosis, hipertrofia, isquemia, inflamación), a los que se denomina *remodelado cardíaco*. Estos cambios: a) constituyen el sustrato arritmogénico que en ocasiones inicia y con seguridad mantiene y autoperpetúa la arritmia. b) Presentan importantes diferencias dependiendo del proceso patológico subyacente, lo que explicaría porqué una misma arritmia responde de forma muy distinta a un determinado fármaco en función del substrato que la genera y/o mantiene. c) El remodelado puede modificar la diana sobre la que actúan los fármacos. Así, en la fibrilación auricular disminuye la densidad de determiandos canales de potasio sobre los que actúan los FA del grupo III, lo que explicaría su pobre eficacia terapéutica.

Todos estos hallazgos han llevado a proponer un nuevo abordaje en el tratamiento de las arritmias cardíacas. Mientras que durante más de 70 años se habían utilizado fármacos para controlar la actividad eléctrica que observábamos en el electrocardiograma utilizando fármacos que bloquean corrientes iónicas y/o receptores, en el momento actual se piensa que el objetivo es prevenir o revertir el sustrato arritmogénico que genera/mantiene la arritmia, ya sea: a) suprimiendo los factores que desencadenan la arritmia, b) previniendo la evolución de la enfermedad que crea el sustrato arritmogénico. Ello ha llevado a una nueva forma de enfocar el tratamiento antiarrítmico. Como ejemplo analizaremos el proceso de remodelado eléctrico ventricular en pacientes con infarto de miocardio (IM) previo.

En pacientes con IM previo, existen diversas alteraciones estructurales que facilitan la aparición de arritmias ventriculares: a) la fibrosis, que disocia los haces de células cardíacas y facilita la aparición de zonas de bloqueo de la conducción intraventricular, b) los cambios en la expresión y distribución de uniones estrechas (*gap-junctions*) que reducen la velocidad de conducción intracardíaca, c) la hipertrofia cardíaca, que aumenta la inhomogeneidad de los periodos refractarios ventriculares y d) el remodelado de la pared ventricular, que facilita la distensión de los miocitos cardía-

cos, lo que se traduce en un aumento en la disparidad de la refractariedad ventricular. En estas condiciones, las arritmias ventriculares pueden desencadanarse por episodios de isquemia recurrente, fluctuaciones del tono vegetativo y de la activación neurohumoral, alteraciones electrolíticas y fármacos que prolongan el intervalo QT del electrocardiograma. En estos pacientes, la profilaxis de las arritmias ventriculares debería ir dirigida a prevenir la formación de la escara fibrótica y los cambios estructurales ventriculares, que constituyen el remodelado ventricular posinfarto. Para ello, en la fase aguda del infarto de miocardio deben administrarse fármacos que reducen el área infartada y/o en riesgo [fibrinolíticos, antiagregantes-aspirina, β-bloqueantes e IECAs]. Posteriormente, los esfuerzos deberían ir dirigidos a prevenir la isquemia coronaria (nitratos, β-bloqueantes, verapamilo, diltiazem), retrasar la progresión de la placa de ateroma (estatinas), revertir la hipertrofia y la fibrosis cardíaca (IECAs, espironolactona) e inhibir la activación neurohumoral (β-bloqueantes, IECA, espironolactona, ARAII).

H. Terapia génica de las enfermedades cardiovasculares

Los resultados de los ensayos de fase I pueden calificarse de esperanzadores, habiéndose demostrado que es posible aumentar el flujo regional y evitar la amputación de miembros inferiores, mejorar déficits sensoriales en pacientes con neuropatía isquémica periférica, aumentar la tolerancia al ejercicio y la perfusión coronaria en pacientes con cardiopatía isquémica o disminuir el rechazo en injertos vasculares en las extremidades inferiores. Sin embargo, estos estudios incluyen un grupo reducido de pacientes seleccionados, que representan una muestra de la población general y esperan su confirmación en ensayos clínicos a gran escala.

La mayoría de las enfermedades cardiovasculares (IC, HTA, vasculopatías coronarias, cerebrales o periféricas) son procesos multigénicos y multifactoriales. Ello implica que pueden ser múltiples las alteraciones genéticas implicadas en su génesis y que incluso si alcanzamos terapias génicas seguras y eficaces, será necesario combinarlas con los tratamientos médicos convencionales. En la actualidad, el éxito de la terapia génica se ve limitado, entre otros factores, por la ausencia de vectores ca-

paces de transportar el material genético a la célula diana, lo que se traduce en una expresión génica pobre y transitoria. Es pues necesario: a) disponer de vectores con una alta selectividad tisular y que no produzcan reacciones inmunológicas e inflamatorias, b) seleccionar la vía óptima de administración que permita alcanzar una expresión génica estable y persistente en el punto deseado y reduzca la incidencia de reacciones adversasa asociadas a la expresión génica en otro tejidos; c) asegurar que no se alteran las células germinales. En los últimos años están adquiriendo un notable desarrollo los vectores no víricos, entre los cuales se encuentran los liposomas de carácter catiónico, las microesferas biológicamente erosionables y los complejos ligando de polilisina. La expresión génica selectiva cardíaca podría alcanzarse utilizando promotores específicos (*mlc-v*: cadena ligera de la miosina ventricular; α*a-mhc*: cadena pesada de la miosina cardíaca; cTNT: gen promotor de la troponina T cardíaca) por vía intracavitaria. La transferencia coronaria de VEGF podría permitir alcanzar una revascularización cardíaca sin estimular la neovascularización en otros territorios vasculares.

I. Modulación farmacológica de la apoptosis

La muerte celular programada juega un importante papel en la regulación de la homeostasis cardiovascular. En condiciones patológicas, su papel puede ser perjudicial o beneficioso, dependiendo del momento, intensidad y tipo de célula en la que el proceso tiene lugar. Así, la apoptosis es un proceso que podría prevenir la progresión de la placa de ateroma o de la hiperplasia neoíntima, mientras que una apoptosis excesiva a nivel de la placa de ateroma puede facilitar su ruptura y a nivel de los miocitos cardíacos facilitaría la progresión de la ICC.

El proceso de apoptosis está regulado por el equilibrio existente entre proteínas proapoptóticas de las subfamilias Bax (Bax, Bak, Bcl-xS/L) y BH3 (Bid, Bad, Bik/Nbk/Blk, Bim/Bod, Hrk/DP5) y proteínas antiapoptóticas (Bcl2, BclxL, BclB, Bclw). La mitocondria juega un papel central en la apoptosis por 3 mecanismos: a) la alteración del transporte de electrones, de la fosforilación oxidativa y de la producción de ATP, b) la liberación de citocromo c al citoplasma a través de poros de la membrana mitocondrial, donde activa el factor estimulante de la apoptosis (apaf-1) y las

caspasas 3 y 9; las caspasas, además, inactivan las proteínas antiapoptóticas (Bcl, BclxL) e incluso las convierten en fragmentos proapoptóticos. c) La alteración del potencial redox, que conduce a un aumento en la producción de ERO. Las ERO facilitan esta liberación a través de un poro activado por proteínas proapoptóticas de las subfamilias BH3, lo que altera la cadena transportadora de electrones y produce más ERO cerrando el circulo vicioso. Por el contrario, las proteínas antiapoptóticas son capaces de cerrar el poro mitocondrial y de formar en el citoplasma un complejo con la caspasa 9, el apaf-1 y el citocromo c, impidiendo su activación.

En pacientes con cardiopatía isquémica o con IC aumentan los niveles citoplasmáticos de proteínas proapoptóticas, citocromo c mitocondrial y caspasa-3 y disminuye la expresión de Bcl-2, lo que confirma que la apoptosis cardíaca juega un importante papel en la progresión de la enfermedad. Las células inflamatorias de la placa de ateroma producen citocinas (TNFα, FasL) y ERO, facilitando la apoptosis de las CMLV. La estimulación β-adrenérgica y la AII también inducen apoptosis de los cardiomiocitos, lo que podría explicar el aumento de mortalidad producido por los agonistas β-adrenérgicos en pacientes con IC.

Estos hallazgos sugieren que la terapéutica antiapoptótica podría salvar miocitos viables en pacientes con cardiopatía isquémica o IC y revertir los procesos de reoclusión coronaria. La sobreexpresión de Bcl2 y la supresión de la subfamilia Bax (BclxL) aumenta la supervivencia cardíaca, mientras que la inactivación de la caspasa-3 mejora la recuperación del miocardio aturdido y protege de la muerte a los miocitos cardíacos durante la isquemia. También se han utilizando análogos de los inhibidores endógenos de las caspasas [FLIP-caspasa 8, proteínas IAP-caspasas 3 y 9, zVAD-caspasas 8 y 10]. Estatinas, IECAs y algunos ARAII (candesartán) y β-bloqueantes (carvedilol) inhiben la apoptosis producida por mediadores inflamatorios, citocinas y ERO en modelos experimentales. Los agonistas de los canales mitocondriales sensibles a ATP y la superexpresión de la NOS mitocondrial suprimen los cambios de potencial mitocondrial y la apoptosis inducida por los ERO. No obstante, antes de proponer la terapéutica antiapoptótica en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares debemos conocer mejor cuál es el papel de la apoptosis en la génesis de la patología cardiovascular y las consecuencias que su inhibición podrían conllevar a largo plazo.

CONCLUSIONES

Las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de muerte en los países occidentales y su incidencia sigue aumentando, lo que explica la intensa investigación y los numerosos fármacos actualmente en desarrollo para su tratamiento. Los continuos avances en nuestros conocimientos fisiopatológicos se traducen en la identificación de nuevas dianas y en el correspondiente desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. A su vez, los estudios de farmacogenómica abren nuevas perspectivas que permitirán en un futuro no muy lejano realizar un tratamiento específico e individualizado del paciente. En cualquier caso, la seguridad y eficacia de todas estas nuevas opciones terapeúticas vendrán determinadas por los resultados de los ensayos clínicos controlados, que serán el filtro que determinará la posición final de todas ellas.

REFERENCIAS

Akao M, Ohler A, O'Rourke B *et al*. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells. Circ Res 2001; 88: 1267-1275.

Armstrong P., Collen D. Fibrinolysis for acute myocardial infarction. Circulation 2001; 103:2862-2866.

Barger P, Kelly D. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. Trends Cardiovasc Med 2000; 10: 238-245.

Brown WV. Novel approaches to lipid lowering: What is on the horizon? Am J Cardiol 2001; 87 (Suppl): 23B-27B.

Corti R, Burnett J, Rouleau J *et al*. Vasopeptidase inhibitors. A new therapeutic concept in cardiovascular disease? Circulation 2001; 104:1856-1862.

Creemers E, Cleutjens J, Smits J *et al*. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction. A new approach to prevent heart failure? Circ Res 2001; 89: 201-210.

d'Uscio L, Luscher T. Vasopeptidase inhibition and endothelial function in hypertension. Curr Hypertens Rep 2001;3 (supl 2): S6-14.

Dzau V. Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease. A unifying hypothesis. Hypertension 2001; 37: 1047-1052.

Dzau V, Mann M, Ehsan A *et al*. Gene therapy and genomic strategies for cardiovascular surgery: the emerging field of surgiomics. J Thorac Cardiovasc Surg 2001; 121: 206-216.

Duckers HR. Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. Nature Med 2001; 7: 692-698.

Epstein S, Kornowski R, Fuchs S *et al*. Angiogenesis therapy: Amidst the hype, the neglected potential for serious side effects. Circulation 2001; 104: 115-119.

Fenster BE, Tsao PS, Rockson S. Endothelial dysfunction: Clinical strategies for treating oxidant stress. Am Heart J 2003; 146: 218-2226.

Hammond K, McKiman D. Angiogenic gene therapy for heart disease: a review of animal studies and clinical trials. Cardiovasc Res 2001; 49: 561-567.

Hare JM. Oxidative stress and apoptosis in heart failure progression. Circ Res 2001; 89: 198-200.

Heitsch H. Bradykinin B2 receptor as a potential therapeutic target. Drug News Perspect 2000; 13: 213-225.

Herrera E, Herrera J, Rodríguez H *et al*. Importancia del factor de necrosis tumoral alfa en la patogenia de la insuficiencia cardíaca. Rev Esp Cardiol 2002; 55: 61-66.

Hirsh J. New anticoagulants. Am Heart J 2001; 142: S3-S8.

Hofma S, Van Beusekom H, Serruys P *et al*. Recent developments in coated stents. Curr Intevent Cardiol Rep 2001; 3: 28-36.

Hurlimann D, Enseleit F, Noll G *et al*. Endothelin antagonists and heart failure. Curr Hypertens Rep 2002; 4:85-92.

Ignarro L, Napoli C, Loscalzo J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide. A critical review. Circ Res 2002; 90: 21-28.

Kelly D. The pleiotropic nature of the vascular PPAR gene regulatory pathway. Circ Res 2001; 89: 935-937.

Khurana R, Martin J, Zachary I. Gene therapy for cardiovascular disease. A case for cautions optimism. Hypertension 2001; 38: 1210-1216.

Lee CR, Watkins ML, Patterson JH *et al*. Vasopressin: a new target for the treatment of heart failure. Am Heart J 2003; 146: 9-18

Lefer A, Scalia R, Lefer D. Vascular effects of HMG Co-reductase inhibitors (statins) unrelated to cholesterol lowering: new concepts for cardiovascular diseases. Cardiovasc Res 2001; 49: 281-287.

Levin E, Gardner D, Samson W. Natriuretic peptides. N Engl J Med 1998; 339: 321-328.

Luft FC. Mechanisms and cardiovascular damage in hypertension. Hypertension 2001; 37: 594-598.

McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? Free Radic Biol Med 1999; 26: 1034-1053.

Mendivil C, Sierra I, Pérez C *et al*. Antioxidantes y enfermedad vascular. Clin Invest Arterioscl 2002, 14: 26-40.

Narula J, Haider N, Virmani R *et al*. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. N Engl J Med 1996; 335: 1182-1189.

Phillips K, Veenstra D, Oren E *et al*. Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions. JAMA 2001; 286: 2270-2279.

Pitt B, Zannad F, Remme W *et al*. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. N Engl J Med 1999; 341: 709-717.

Post M, Laham R, Selke F *et al*. Therapeutic angiogenesis in cardiology using protein formulations. Cardiovasc Res 2001; 49: 522-531.

Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. N Engl J Med 1999; 340: 115-126.

Scarborough R, Leiman N, Phillips D. Platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists. What are the relevant issues concerning their pharmacology and clinical use? Circulation 1999; 100: 437-444.

Shah P, Kaul S, Nilsson J *et al*. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins. Circulation 2001; 104: 2498-2502.

Simons M, Bonow R, Chornos N *et al*. Clinical Trials in Coronary Angiogenesis: Issues, problems, consensus. An Expert Panel Summary. Circulation 2000;102:e73-e86.

Sousa J, Serruys PW, Costa MA. New frontiers in cardiology: Drug-eluting stents: Part II. Circulation 2003; 107: 2383-2389.

Sriram V, Patterson C. Cell cycle in vasculoproliferative diseases. Potential interventions and routes of delivery. Circulation 2001; 103: 2414-2419.

Swynghedaw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. Physiol Revs 1999; 79: 215-262.

Tamargo J, Delpón E. Futuro del tratamiento farmacológico de las arritmias cardíacas. En: Cardiología Clínica. Eds. Bayés de Luna A, López-Sendón J, Attié F, Alegría Ezquerra E. Ed. Masson S.A., Barcelona. 2003: 861-882.

Tamargo J. A review: Drug-induced torsades de pointes: from molecular biology to bedside. Jap J Pharmacol 2000; 83: 1-19.

Tamargo J, Delpón E. Farmacología clínica de los nuevos medicamentos antiarrítmicos. Rev Portug Cardiol 2001; 20: 887-898.

Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure. Eur Heart J 2001; 22: 1527-1560.

Turner S, Schwartz G, Chapman A *et al*. Antihypertensive pharmacogenetics: getting the right drug into the right patient. J Hypertens 2001; 19: 1-11.

Udelson J, Smith W, Hendrix G *et al*. Acute hemodynamic effects of conivaptan, a dual V1A and VB vasopressin receptor antagonist, in patients with advanced heart failure. Circulation 2001; 104:2417-2423.

Vale P, Losordo D, Milliken C *et al*. Randomized single-blind, placebo-controlled pilot study of chatheter-based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. Circulation 2001; 103: 2138-2143.

Weir M, Dzau V. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. Am J Hypertens 1999; 12: 205S-213S.

Socios de la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia a quien expresamos nuestra sincera gratitud por su mecenazgo:

CAJA MADRID

* * *

Farmaindustria

* * *

Laboratorios Rovi

* * *

Alcaliber, S. A.
Almirall Prodesfarma
Bristol-Myes Squibb, S. L.
Fundación Aventis
Grupo Ferrer Internacional
Industria Farmacéutica Cantabria
Laboratorios Esteve
Laboratorios Lilly
Laboratorios Menarini
Novartis Farmacéutica
Tedec-Meiji Farma, S. A.

* * *

Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos
Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid

* * *

Colegios Oficiales de Farmacéuticos de: A Coruña, Alicante, Badajoz, Barcelona, Bizkaia, Burgos, Cáceres, Cádiz, Ciudad Real, Girona, Palencia, Principado de Asturias, Santa Cruz de Tenerife, Tarragona, Toledo y Zaragoza.