

Volumen 153
N° 1-2
2011



Fundada en 1858

**COMITÉ DE PUBLICACIÓN
EDITORIAL BOARD**

Coordinador
Miguel D'Aquino

Secretario
Gabriel Gutkind

Miembros
Miguel Caso
Luis E. Díaz
Manuel Limeres
Mario A. Los
Ronaldo Meda
Marcelo C. Nacucchio
Maria Luz Pita Martín
Marta M. Salseduc
Marcelo Squassini

Editada por la
**Academia Nacional de
Farmacia y Bioquímica**
Junín 956 - P. P.
Tel./Fax: (011)4964-8213
Buenos Aires
acad@ffyb.uba.ar

Dirección postal
Junin 956 P.P.
1113 Buenos Aires - Argentina
<http://www.ffyb.uba.ar/academia/infex.htm>

Diseño y composición láser
Tall. Gráf. Su Impres S.A.

La presente edición
se terminó de imprimir en
Tall. Gráf. Su Impres S.A.
Tucumán 1480 C.A.B.A.
Tel./Fax: 4371-0029/0212

**REVISTA
FARMACÉUTICA
REVIEWS**

Editada por la
Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica
Personería Jurídica N°1 762-30/8/1968

CONSEJO DIRECTIVO 2011

Presidente
Acad. Carlos M. Baratti

Vicepresidente
Acad. Miguel Ángel Caso

Secretario General
Acad. Gabriel Mato

Prosecretario
Acad. Marta M. Salseduc

Tesorero
Acad. Ronaldo Meda

Protesorero
Acad. Miguel D'Aquino

Vocales Titulares
Acad. Carlos A. Gotelli
Acad. Juan P. Rossi

Vocales Suplentes
Acad. Otmaro Roses
Acad. Modesto C. Rubio

Revisores de Cuentas
Acad. Alfredo A. Hager
Acad. Eloy L. Mandrile
Acad. Francisco J. Stefano

Las ideas que se exponen en el Reviews son de exclusiva responsabilidad de los autores y no reflejan necesariamente la opinión de la Academia¹ Nacional de Farmacia y Bioquímica.

ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

ACADÉMICOS TITULARES		
Acad. Sem M. Albonico	Acad. Tomás de Paoli	Acad. Marcelo C. Nacucchio
Acad. María Cristina Anón	Acad. Luis E. Díaz	Acad. Edgardo Poskus
Acad. Carlos M. Baratti	Acad. Carlos H. Gaozza	Acad. Rubén V. D. Rondina
Acad. Mirta J. Biscoglio	Acad. Héctor I. Giuliani	Acad. Otmaro E. Roses
Acad. Alberto A. Boveris	Acad. Carlos A. Gotelli	Acad. Juan Pablo F. C. Rossi
Acad. Carlos Bregni	Acad. Gabriel O. Gutkind	Acad. Modesto C. Rubio
Acad. Rodolfo Brenner	Acad. Alfredo A. Hager	Acad. José Alberto Santomé
Acad. Néstor O. Caffini	Acad. Silvia Hajos	Acad. Alfredo Salibian
Acad. Clyde N. Carducci	Acad. Mario A. Los	Acad. Marta M. Salseduc
Acad. Ricardo A. Caro	Acad. Eloy L. Mandrile	Acad. Francisco J. E. Stéfano
Acad. Miguel A. Caso	Acad. Horacio José Gabriel Mato	Acad. María G. Volonté
Acad. Miguel D'Aquino	Acad. Ronaldo Meda	Acad. Regina L. W. de Wikinski
ACADÉMICOS EMÉRITOS		
Acad. Arnaldo L. Bandoni	Acad. Mateo Chekherdeman	Acad. Juan C. Sanahuja
Acad. Osvaldo D. Castrelos	Acad. Enrique Ióvine	Acad. Antonio Somaini
Acad. Jorge D. Coussio	Acad. Alejandro C. Paladini	Acad. Horacio B. Rodríguez
Acad. Héctor M. Chechile		
ACADÉMICOS HONORARIOS		
BRASIL	ESPAÑA	ITALIA
Acad. Evaldo de Oliveira	Acad. Benito del Castillo García	Acad. Rodolfo Paoletti
	Acad. Federico Mayor Zaragoza	
	Acad. M. Teresa Miras Portugal	
ACADÉMICOS CORRESPONDIENTES		
Acad. Aníbal Amat	Acad. Rubén H. Manzo	Acad. Gabriela del Valle Perdigón
Acad. Marcelo O. Cabada	Acad. Modesto R. Montecchia	Acad. Hugo G. Pérez
Acad. Osear H. Fay	Acad. Aldo Mottino	Acad. M. Luz Pita Martín de Pórtela
Acad. Raúl C. Fazio	Acad. Elsa María Nadalin	Acad. Clelia M. Riera
Acad. Aída Pesce de Ruiz Holgado	Acad. Jorge O. Nicolini	Acad. Alfredo Salibian
Acad. Manuel Limeres	Acad. Otto Orsingher	Acad. Marcelo Squassini
Acad. Guillermo Lossa	Acad. Ana María Pechen D'Angelo	

ACADÉMICOS CORRESPONDIENTES EN EL EXTRANJERO

ALEMANIA

Acad. Pablo Steinberg

BRASIL

Acad. Aluisio Pimenta
Acad. Caio Romero Cavalcanti

CHILE

Acad. Aquiles Arancibia Orrego
Acad. Marco A. Montes Guyot
Acad. Rosa I. Moran Gana
Acad. Wanda Quilhot Palma

COLOMBIA

Acad. Fleming Martinez Rodríguez

CUBA

Acad. Ricardo Galvis
Acad. Héctor Zayas Bazán y Perdomo

ECUADOR

Acad. Julio E Aráoz
Acad. Eduardo Goetchel

ESPAÑA

Acad. María del Carmen Francés Causapé
Acad. Tomás Adzet Porredón
Acad. Francisco Zaragoza García
Acad. Eduardo Marino Hernández
Acad. Miguel Ylla Cátala Genis
Acad. Antonio Monge Vega

ESTADOS UNIDOS

Acad. Jorge R. Barrio
Acad. Jorge D. Brioini
Acad. Marcel E. Nimni

FRANCIA

Acad. Jean Marc A'iache
Acad. Paul Fleury
Acad. Carlos Soto

ITALIA

Acad. Stefano Govoni

MÉXICO

Acad. Pedro Joseph-Nathan

PANAMÁ

Acad. Ceferino Sánchez

PARAGUAY

Acad. Luis H. Berganza

PERÚ

Acad. Bertha P. Pareja
Acad. José Amiel Pérez
Acad. Fernando Quevedo Ganoza

URUGUAY

Acad. Jorge Ares Pons
Acad. Cayetano Cano Marotta Acad.
Cosme de los Santos Carballido
Acad. Uberfil Delbene Garate Acad.
Pietro Fagiolino
Acad. Raquel Lombardo de Bertolaza
Acad. Justo Emilio Menes
Acad. Patrick Moyna
Acad. Aníbal Alberto Olmos Ferreira
Acad. Osear Polla Bermúdez
Acad. Joaquín E. Royer Meicoso

VENEZUELA

Acad. José Luis Andrade

ACADEMIA NACIONAL
DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**REVISTA
FARMACÉUTICA**
Reviews

Vol. 153 (Nº 1-2) Año 2011
SUMARIO

LAS ACADEMIAS DE FARMACIA COMO ORGANOS DE OPINION Y CONSULTA DE LOS PROBLEMAS DE LA SOCIEDAD ACTUAL. <i>Baratti CM, Rubio MC, Nacucchio MC, D'Aquino M.</i>	5
COMPOSICION DE LAS FORMULAS PARA NUTRICIÓN PARENTERAL. PARENTERAL NUTRITION FORMULAE COMPOSITION. <i>Ana María Menéndez, María Luz Pita Martín de Portela</i>	11
EL PAPEL DEL FARMACÉUTICO EN EL SISTEMA DE SALUD A TRAVÉS DE LA HISTORIA. THE ROLE OF THE PHARMACIST IN THE HEALTH SYSTEM THROUGH HISTORY. <i>Mariano Guillermo Blake, Mariano Martín Boccia, María del Carmen Krawczyk y Carlos María Baratti</i>	33
ADITIVOS ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EN ALIMENTOS, FÁRMACOS Y COSMÉTICOS. POSIBLES EFECTOS ADVERSOS <i>Miguel D'Aquino</i>	43
FARMACOTERAPIAS ACTUALES Y FUTURAS PARA EL TRATAMIENTO DEL AUTISMO. CURRENT AND FUTURE PHARMACOTHERAPY IN THE TREATMENT OF AUTISM. <i>Analía Gabriela Reínés</i>	59
BIOQUÍMICA DE LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN INSECTOS VECTORES DE ENFERMEDADES HUMANAS. BIOCHEMISTRY OF INSECTICIDE RESISTANCE IN HUMAN DISEASE VECTOR- INSECTS. <i>Pablo L. Santo Orihuela</i>	69
PROTEÍNAS "DESESTRUCTURADAS": ¿PATOLOGÍA O SALUD? "UNSTRUCTURED" PROTEINS: PATOLOGY OR HEALTH? <i>Néstor O. Caffini</i>	83
INFLUENCIA DE LA PROTEÍNA DE RESISTENCIA DEL CÁNCER DE MAMA (BCRP) EN LA FARMACOCINÉTICA DE LOS ANTIRRETROVIRALES. <i>Roxana Noemí Peroni</i>	91
LAS b-LACTAMASAS COMO EJEMPLO DE VERSATILIDAD AL SERVICIO DE LA RESISTENCIA BACTERIANA. <i>Pablo Power, José Di Conza, Gabriel Gutkind</i>	103
BACTERIAS Gram (+) PROBIOTICAS: INFLUENCIA SOBRE EL SISTEMA INMUNE <i>Carolina, Maldonado Galdeano y Gabriela Perdigón</i>	123

LAS ACADEMIAS DE FARMACIA COMO ORGANOS DE OPINION Y CONSULTA DE LOS PROBLEMAS DE LA SOCIEDAD ACTUAL. "UNA VISIÓN PRAGMÁTICA DESDE NUESTRA REALIDAD" *

Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica, República Argentina.

Baratti CM, Rubio MC, Nacucchio MC, D'Aquino M.

* Presentado por el Sr. Presidente de la ANFyB en el IV Congreso de la Asociación Iberoamericana de Academias de Farmacia (A. I. A. F), Cartagena, España, Mayo 2011.

Resumen

Las academias son responsables del cumplimiento de "misiones conceptuales o universales" vinculadas a la Ciencia, la Tecnología y la Ética, todas ellas prioritarias en su quehacer. Por otra parte, sus "misiones puntuales" surgen como propias y específicas de las Academias Científicas, incluidas las de Farmacia. Fomentar el estudio, la investigación y la difusión de las ciencias farmacéuticas, bioquímicas y afines, asesorar, cuando le sea solicitado o bien por iniciativa propia, al Gobierno Nacional y a los Gobiernos Provinciales y Municipales, y a todo otro organismo público o privado acerca de las problemáticas vinculadas con la Farmacia, la Bioquímica, la salud y el medicamento, así como a los organismos responsables de las políticas científicas, son parte de las misiones puntuales de las Academias de Farmacia. También lo es, mantener una estrecha cooperación mutua con todos los estamentos responsables de la Cultura y la Educación.

Si bien "la personalidad de las Academias viene determinada por la excelencia de sus Académicos" (Académico JM Reol Tejada, Madrid) y ello es esencial para el logro de sus fines, no menos necesario es que nuestras Academias posean independencia económica y financiera. Además, deben establecer un diálogo con los nuevos factores de poder, tal como

son las Organizaciones No Gubernamentales (ONG), que en el caso de nuestro país, presentan un fuerte perfil institucional, político, importantes recursos económicos y gran capacidad de gestión.

Por último, es imperioso que reconozcamos que se ha producido una verdadera revolución en las formas y modos de comunicación social, a partir de la avasallante irrupción en el ámbito público y privado de las llamadas Redes Sociales (Facebook y Twitter).

Las fortalezas (F), las oportunidades (O), debilidades (D) y las amenazas (A), reunidas en un análisis FODA que examina nuestra situación como Academia frente al entorno con el cual "compite", nos ilustrará acerca de la visión pragmática a la que alude el título de esta presentación.

Orígenes

En sus orígenes las Academias tuvieron funciones estrictamente culturales y en su devenir histórico fueron incorporando otras que han extendido su misión. Así, las Academias comenzaron a desarrollar actividades científicas que se prolongaron a lo largo de los siglos, dando lugar a las Academias Científicas, entre las cuales las Academias de Farmacia ocupan un lugar más que relevante (Sanahuja, 1999, 2005). En nuestro país, la Academia de Medicina (1822)

fue la primera de esas características. Treinta y cuatro años más tarde, el 12 de Agosto de 1856, se crea la Asociación Farmacéutica Bonaerense, a la cual consideramos como la Institución madre de la actual Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica (ANFyB). El carácter de Academia Nacional lo adquiere en 1997 a través de la Ley 24.824/97.

En nuestro País, y de acuerdo al Decreto 4362/55, las Academias Nacionales están formadas por "Las personas mas conspicuas y representativas en el cultivo de las ciencias, las letras y las artes".

Deseamos destacar esta situación como no de escasa importancia ya que "dados la edad, el nivel de reconocimiento alcanzado y la no dependencia sus integrantes están en condiciones optimas para opinar respecto de los problemas nacionales vinculados con su experiencia" (Roncoroni A.J. 2003)

Misiones y Objetivos

En más de una oportunidad, el Acad. Emérito Sanahuja se ha referido a las "misiones conceptuales o universales" de las Academias, que son las vinculadas a la Ciencia, la Tecnología y la Ética, todas ellas prioritarias en su quehacer. Por otra parte, las "misiones puntuales" de las Academias surgen como propias y específicas de las Academias Científicas, incluidas, claro está, las de Farmacia. Dichas misiones en el ámbito de nuestras Academias podrían resumirse como se indica a continuación:

- Fomentar el estudio, la investigación y la difusión de las ciencias farmacéuticas, bioquímicas y afines, y su aplicación para el logro de una mejora de la calidad de vida de la población.

- Asesorar al Gobierno Nacional y a los gobiernos Provinciales y Municipales, así como a todo otro organismo público o privado, acerca de las problemáticas vinculadas con la Farmacia, la Bioquímica, la salud y el medicamento, cuando le sea solicitado, o bien por iniciativa propia. Cabe también el asesoramiento a los organismos responsables de las políticas científicas, con miras especialmente al resguardo del recurso humano que será responsable de su realización.
- Mantener una estrecha cooperación mutua con todos los estamentos responsables de la Educación y la Cultura

Realidades

"La personalidad de las Academias viene determinada por la excelencia de los Académicos...". Así se expresó en alguna oportunidad el Académico Juan Manuel Reol Tejada, recordado Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia. En tal sentido no tenemos ninguna duda que la composición del Claustro de la ANFyB, y de todas de las Academias aquí reunidas, asegura pluralidad de ideas, conocimiento, experiencia y capacidad para la toma de decisiones orientadas al logro de las misiones y objetivos antes señalados, evitando convertirse en un "Cenaculo de notables envueltos en reminiscencias de épocas que juzgan mejores, de limitada utilidad para el progreso" (Roncoroni A.J., 2003)

Sin embargo, para la puesta en práctica de los medios requeridos para el logro de cualquier objetivo, se requiere una adecuada financiación. Este es el talón de Aquiles de nuestra Academia, ya que en el mismo momento en que es nacionalizada, también es privada de "... las

contribuciones y subsidios previstos a favor de las academias nacionales...”, que están destinados “... al pago de su personal administrativo y a la atención de los gastos de funcionamiento, entre los cuales deben reservar una parte para la impresión y distribución de sus publicaciones...” (Ley 4362/55). Pese a los esfuerzos que venimos realizando desde hace 14 años, la situación de discriminación que sufre la ANFyB, y que también alcanza a la Academia Nacional de Odontología, no se ha revertido.

Articulación de ANFyB con la Sociedad

En los últimos años hemos asistido al nacimiento y desarrollo acelerado de dos fenómenos con fuertes connotaciones sociales, que pueden condicionar y restringir las posibles articulaciones que las Academias y otras instituciones científico-culturales mantienen con la Sociedad a la cual se deben. Nos referimos a las **Organizaciones No Gubernamentales (ONG) u Organizaciones De La Sociedad Civil (OSC)**, *con fuerte perfil institucional y político*, y a las **Redes Sociales (RS)** (Facebook y Twitter) que impactan (y modifican) los modos (y contenidos) en que se comunican los distintos actores sociales.

En términos políticos y de poder económico, las ONG son “... organizaciones con staffs muy profesionalizados, años de experiencia y presupuestos millonarios [...] con gran poder de lobby...” (Sued, G, 2010). En nuestro país existen más de ciento cincuenta de ONG, alguna de ellas con fuertes aportes monetarios externos, decidida influencia en los debates legislativos y, en casos particulares, dudosa neutralidad político-partidaria.

Nuestra Academia, pese a ser Nacional, ya se ha dicho, no recibe aportes del Estado. Su presupuesto anual es ridículamente inferior al de una ONG y está basado en el aporte solida-

rio de sus Académicos, de algunas entidades benefactoras provenientes de la industria farmacéutica y bioquímica y profesionales, ninguna de las cuales ejerce presión para que la ANFyB favorezca sus intereses particulares.

Las Academias “no viven para sí mismas “... y deben mantenerse sensibles a los grandes temas que interesan a la Sociedad, deponiendo intereses corporativos y sosteniendo un diálogo permanente con los distintos factores de poder. Reconocemos que las ONG son parte integral de los mismos y creemos que es necesario comenzar a considerar qué tipo de vínculo debería mantener la ANFyB con esas Organizaciones, respetando a ultranza nuestras propias normas estatutarias y reglamentarias. El debate está planteado en el seno del Claustro de la ANFyB.

De igual forma es imperioso que reconozcamos que se ha producido una verdadera revolución en las formas y los modos de comunicación social, a partir de la avasallante irrupción en el ámbito público y privado de las llamadas Redes Sociales, cuyas expresiones, tal como se ha mencionado, son Facebook y Twitter. En nuestro país existirían más de diez millones de adherentes al primero y cerca de medio millón (en crecimiento) al segundo. Ambas RS constituyen una mesa gigante de intercambio de opiniones, en muchos casos sin la adecuada fundamentación y emitidas bajo la influencia de una gran carga emocional y de manera tendenciosa. Nos preguntamos si estos estilos de comunicación social también alcanzarán de lleno a las Academias y a otros protagonistas del quehacer cultural y científico, y cómo impactarán en sus costumbres y modos de interrelación. Desde ya, creemos firmemente que las Academias deberán sostener el verdadero cambio de ideas (discusión) sobre las bases éticas, morales y científicas que establecen sus estatutos y reglamentos. Sin embargo, también deberán reflexionar acer-

ca de una inserción más realista en la Sociedad a la cual pertenecen.

Por otra parte, debemos comenzar a tomar en cuenta que el uso desmedido de las formas de comunicación social antes señaladas, a las cuales añadimos los mensajes de texto e Internet, ejercería efectos no deseables sobre el comportamiento de sus adherentes "fanáticos". Ello parecería particularmente aplicable a poblaciones de jóvenes menores de 18 años y en plena etapa de su formación escolar secundaria. Así, un estudio realizado con estudiantes secundarios del medio oeste de los EEUU, reveló que un 20% de ellos enviaba más de 120 mensajes de texto diarios, y que un 12% pasaba más de 3 horas por día en contacto con redes sociales virtuales (Scott, 2010). Los adolescentes "hiperconectados" presentaron riesgos más altos de expresar comportamientos agresivos, mayor consumo de alcohol y promiscuidad sexual. A su vez, los adolescentes con excesiva actividad en los "sitios sociales" de la red, manifestaron mayor tendencia a bajos rendimientos académicos, al abuso de sustancias, a la depresión y al suicidio (Scott, 2010).

En ambos casos estaríamos frente a "comportamientos desadaptativos individuales conducentes a un deterioro significativo tanto personal como de las relaciones interpersonales" (Baratti y col., 2009), una de las características salientes de las adicciones. En la Argentina, el 16% de los usuarios de Facebook tiene menos de 18 años de edad. Vale entonces mantenernos alerta frente a este nuevo problema, en cuanto órganos de opinión y consulta.

Análisis Final

A partir de lo expuesto, resumiremos nuestras Fortalezas (F), Oportunidades (O), Debilidades (D) y Amenazas (A), utilizando un

bosquejo muy simplificado de gestión empresarial conocido como Análisis FODA. El mismo examina la interacción entre las características particulares de nuestra ANFyB y el entorno con el cual "compite". Para ello se tomarán en cuenta algunos aspectos internos de la Academia (F y D) y del entorno (A y O).

ANALISIS FODA

- Fortalezas: Pluralidad de ideas, experiencia, conocimientos específicos y objetividad y neutralidad política-ideológica de sus opiniones.
- Oportunidades: Acciones previstas por su Estatuto y Reglamento. Asesora de entes públicos y privados.
- Debilidades: Presupuesto propio no previsible y aleatorio. Procedimientos internos más lentos de lo deseable por tratarse de una estructura corporativa que requiere de consenso para la toma de decisiones. Disparidad de tiempos dedicados por sus Académicos a las actividades de la Academia.
- Amenazas: Desconocimiento de la comunidad del concepto de Academia. Poca o nula aceptación para la figura del Académico como experto en áreas de su competencia con influencia en la Sociedad

Reconocer y aceptar las realidades resumidas en esta presentación, podría contribuir a mantener plenamente vigente lo expresado hace muchos años por el académico Santiago A Celsi "Uno de los prejuicios generalizados es el de considerar a las Academias como corporaciones intelectuales dominadas por un espíritu conservador, por la rutina, por el anquilosamiento de las ideas. Nada menos cierto ni más injusto".

Referencias

- Baratti CM, Boccia MM, Blake MG, Krawczyk MC (2009). Neurofarmacología de las adicciones. *Revista Farmacéutica*, 151: 5-20.
- Roncoroni, A.J (2003). Sobre la función de las Academias Científicas, Editorial, La Nación, 18 de enero.
- Sanahuja, JC (1999). Las academias y el pluralismo de su misión cultural. La figura del Instituto. Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires.
- Sanahuja, JC (2005). Vinculaciones entre la ciencia, la cultura y la profesión en las Academias de Farmacia. *Revista Farmacéutica*, 147:55-63.
- Scott, F (2010). Hypertexting and hypernetworking: A new Elath risk category for teens? American Public Health Association 138th Annual Meeting. Denver.
- Sued, G (2010). El poder de las ONG. Enfoques, La Nación, Buenos Aires, 12 de Septiembre

COMPOSICION DE LAS FORMULAS PARA NUTRICIÓN PARENTERAL

PARENTERAL NUTRITIÓ N FORMULAE COMPOSITION

Ana María Menéndez (1)

María Luz Pita Martín de Portela (2) *

* Dirigir la correspondencia a: Càtedra de Nutrició n. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
Junín 956 2p (1113) CA Buenos Aires. mportela@ffyb.uba.ar

(1).Carrera de Farmacia, Càtedra de Farmacia Hospitalaria y Clínica. Universidad de Belgrano, Buenos Aires. Villanueva 1324, CA de Buenos Aires.

(2) Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Càtedra de Nutrició n.
Facultad de Farmacia y Bioquímica. Junín 956 2p (1113) CA Buenos Aires.

Indice

Resumen

Summary

Introducció n

Indicaciones de la nutrició n parenteral

Composició n de las fórmulas para Nutrició n Parenteral

Preparació n de las fórmulas para Nutrició n Parenteral

Nutrientes necesarios en Nutrició n Parenteral

Fluidos

Energía

Macronutrientes

Proteínas

Carbohidratos

Lípidos

Electrolitos y macronutrientes minerales

Micronutrientes

Vitaminas

Microminerales esenciales

Productos comerciales de para NPT

Conclusiones

Referencias bibliográficas

Resumen

La nutrición parenteral (NP) es uno de los grandes avances de la medicina que, desde el siglo pasado, ha permitido que muchos pacientes reciban, por vía endovenosa, los nutrientes necesarios que no son capaces de tolerar, por su estado fisiopatológico, mediante la alimentación oral o enteral. La indicación general es la necesidad de nutrir a pacientes gravemente enfermos, con diferentes patologías, cuando existe incapacidad o necesidad de reposo de utilizar el tubo digestivo o situaciones que no permiten el aporte completo de nutrientes por vía enteral. Las mezclas de NP son preparados farmacéuticos estériles, extemporáneos y de gran volumen para infusión endovenosa. Deben ser elaboradas asépticamente en base a más de 50 componentes nutricionales que se transfieren a un recipiente único de plástico (bolsas estériles) para brindar al paciente una compleja fórmula farmacéutica en un único sistema de administración. Los nutrientes que se utilizan en NP deben administrarse bajo la forma química en que son utilizados por el organismo. Los macronutrientes orgánicos son aminoácidos, glucosa y lípidos; los electrolitos son sales solubles de calcio, fósforo, magnesio, sodio, potasio y cloruro o sales orgánicas de calcio y fósforo; los micronutrientes incluyen los oligoelementos o microminerales y las vitaminas. Para llevar a cabo con éxito esta terapéutica nutricional es

necesario el trabajo interdisciplinario que garantice la eficacia, reduzca las complicaciones, aumente la eficiencia y mejore el costo beneficio

Palabras clave:
nutrición parenteral, nutrientes

Summary

Over the past four decades parenteral nutrition (PN) has become an important primary and adjunctive therapy in a variety of disease states. Parenteral nutrition refers to total nutrient mixtures and formulations which benefits patients having significant disruption in gastrointestinal function. PN formulations are extremely complex, containing 50 or more components including amino acids, dextrose, fat emulsions, water, electrolytes, trace elements, and vitamins. Each of these components is a regulated prescription drug product.. With a potential for significant benefit to many patients, its complexity warrants an effective process of ordering, preparation, administration and monitoring to assure a quality outcome from therapy. Early PN programs focused on minimizing the frequency, severity, and type of complications that could result from this therapy. The interdisciplinary approach was found to improve efficacy, reduce complications, and facilitate efficient, cost-effective PN therapy.

Key words:
parenteral nutrition, nutrients

Introducción

La nutrición parenteral (NP) es uno de los grandes avances de la medicina que, desde el siglo pasado, ha permitido que muchos pacientes reciban, por vía endovenosa, los nutrientes necesarios que no son capaces de tolerar, por su estado fisiopatológico, mediante la alimentación oral o enteral.

La NP puede administrarse por vía central o periférica. La elección de una u otra vía tiene en cuenta: el contenido de la fórmula de nutrición parenteral, las necesidades del paciente, el estado de los accesos venosos y el tiempo estimado de tratamiento nutricional (1).

La NP central es la más utilizada en los pa-

cientos adultos. Se administra a través de venas periféricas que llegan a una central, o centrales de gran calibre –subclavia, yugular interna, vena cava superior o femoral para alcanzar la aurícula derecha - que permiten la administración de soluciones o emulsiones sin restricción de volumen ni de osmolaridad (2).

La NP periférica se administra a través de una vena periférica (basílica, cefálica o umbilical). En la actualidad, se utiliza más en pediatría que en adultos y, se indica a pacientes que requieren nutrición parenteral por no más de 7 a 10 días, o en los que es imposible o está contraindicado un acceso venoso central (quemados, politraumatizados). Si bien presenta menor riesgo de complicaciones técnicas –neumotórax, hemotórax-, menor costo y menor riesgo de infección, tiene el inconveniente que se pueden administrar solo limitados volúmenes, y las soluciones deben ser de una osmolaridad de 500-900 mOsm/L, similares a la del plasma, como máximo. Por lo tanto, para no superar esta osmolaridad, se puede administrar escasa concentración de aminoácidos, hidratos de carbono, electrolitos y minerales. En cambio la concentración de lípidos, puede ser prácticamente la misma que por vía central, ya que al agregarlos disminuye la osmolaridad de la emulsión final (3).

Indicaciones de la nutrición parenteral

La mayoría de los individuos que requiere Nutrición Parenteral son pacientes gravemente enfermos. La indicación general es la necesidad de nutrir a pacientes con disfunción severa del intestino y/o con la incapacidad de absorber nutrientes por vía enteral u oral. Este tipo de nutrición está indicada en diferentes patologías, cuando existe incapacidad de utilizar el tubo digestivo o hay necesidad de reposo del tubo digestivo u otras situaciones donde se recomienda la NPT hasta lograr el aporte completo

de nutrientes por vía enteral (cuadro 1) (4, 5, 6, 7, 8).

Composición de las fórmulas para Nutrición Parenteral

Las mezclas de NPT son preparados farmacotécnicos extemporáneos, y constituyen infusiones endovenosas estériles de gran volumen, elaboradas asépticamente en base a más de 50 componentes nutricionales requeridos por el organismo. Los componentes individuales de nutrientes, contenidos en envases estériles de plástico, frascos de vidrio, frasco-ampollas, ampollas, se transfieren a un recipiente único de plástico (bolsas estériles) para brindar al paciente una compleja fórmula farmacéutica en forma de un único sistema de (9).

Estas mezclas intravenosas (IV), generalmente, se denominan “dos en uno” y “tres en uno o todo en uno”. Las primeras, son una formulación acuosa que, a pesar de la incorrecta denominación, suelen contener todos los nutrientes excepto lípidos, y las “todo en uno” son emulsiones que generalmente contienen todos los nutrientes incluyendo los lípidos (10). Cualquiera sea la denominación, deben cumplir ciertas características que garanticen su calidad: la esterilidad y apirogenicidad, la exactitud en las dosis de cada uno de los nutrientes y la compatibilidad y estabilidad de los componentes entre sí y en la emulsión, una vez que se ha efectuado la preparación.

Preparación de las fórmulas para Nutrición Parenteral

Según la disposición Argentina, ANMAT-2592/2003, de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica (11) y las legislaciones de los demás países de América y del mundo, el proceso de preparación de las mezclas de Nutrición Parenteral

debe ser realizado y supervisado por un profesional farmacéutico (9,11, 12, 13, 14).

La disposición Argentina estipula que la Nutrición Parenteral es una terapéutica que se utiliza en pacientes con situaciones clínicas de alto riesgo y por lo tanto, la elaboración de dichas mezclas intravenosas solo pueden realizarse en laboratorios, especialmente diseñados, dependientes de los servicios de farmacia hospitalaria (11) o en establecimientos privados, habilitados por la autoridad sanitaria, como Laboratorios Elaboradores de Soluciones Nutricionales de Uso Inmediato (11). Para la obtención de dicha habilitación se debe cumplir con ciertos requisitos referentes a las instalaciones, estructura, equipamiento, personal. Además, en la actualidad el Laboratorio elaborador deberá cumplir las Buenas Prácticas de Fabricación y Control (16), y poseer un Sistema de Gestión de la Calidad a fin de garantizar que las preparaciones cumplan con los requisitos de calidad, seguridad y pureza establecidos (11).

Nutrientes necesarios en la NPT

El primer requisito a tener en cuenta cuando es necesario recurrir a la NPT es el cálculo de los fluidos a administrar y el aporte de las calorías necesarias para reponer y mantener el estado nutricional normal, así como, la calidad y cantidad de los demás nutrientes requeridos.

Para determinar los requerimientos calóricos y el reparto de esas calorías en los nutrientes necesarios, se deberá tener en cuenta la fisiología, edad, el estado nutricional y la patología del paciente (17).

Los nutrientes que se utilizan en NP deben administrarse bajo la forma química en que son utilizados por el organismo: los macronutrientes orgánicos como aminoácidos, glucosa, lípidos; el agua; los electrolitos como sales solubles de calcio, fósforo, magnesio, sodio, potasio y

cloruro o sales orgánicas de calcio y fósforo; los micronutrientes que incluyen los oligoelementos o microminerales y las vitaminas. En aquellos pacientes que lo requieren se agregan, además, medicamentos.

Fluidos

Los requerimientos normales de agua son de 35 a 50 ml/Kg/día en adultos, de 50 a 100 ml/Kg/día en los pediátricos y de 100-120 ml/kg/día en los neonatos.

Para el cálculo de los *requerimientos de fluidos en pacientes adultos se debe tener en cuenta (18)*:

- La diuresis (1200 ml)
- Las pérdidas insensibles (alrededor de 1000 ml)
- Otras pérdidas: diarrea, fístulas, drenajes, etc
- Hipertermia: 300 ml por cada grado de temperatura superior a lo normal.

En neonatología y pediatría la cantidad de fluidos necesarios guarda una relación inversa con el grado de madurez, la edad y la talla. En neonatos prematuros los requerimientos de fluidos se deben incrementar a medida que aumentan las pérdidas, causadas por: aumento de la superficie corporal, inmadurez del estrato córneo y de la epidermis, inmadurez de la función renal y al *uso de incubadoras y terapia con luz UV (19)*.

La cantidad del volumen total de fluidos, en pacientes que reciben NP, se recomienda calcularla según se muestra en la **Tabla 1**.

Energía

La finalidad del Soporte Nutricional es preservar o mejorar las funciones fisiológicas y evitar la pérdida excesiva de peso, o restaurar el peso y la composición corporal de los enfermos (20). La pérdida de peso severa (20 a 30% del peso) representa una amenaza para la vida. Es

importante aportar la cantidad de calorías adecuadas para cada paciente, ya que en enfermos con traumas severos, en quienes se producen grandes y rápidas pérdidas, no se pueden hacer aportes parciales menores al requerimiento diario. Tampoco se debe administrar excesiva cantidad de calorías que producirán efectos adversos, con importantes alteraciones metabólicas (21).

El gasto energético se puede medir con exactitud mediante calorimetría directa o indirecta, pero pocos centros hospitalarios cuentan con calorímetros disponibles (22). Por dicho motivo, el aporte calórico total a administrar al paciente se acostumbraba calcularlo en relación al gasto energético, para evitar un déficit significativo. Sin embargo, las ecuaciones que permiten calcular el gasto energético basal de sujetos sanos no se adaptan al enfermo.

En pacientes hospitalizados se reduce el gasto energético debido al grado de desnutrición, la inanición y la inmovilización, pero se contrarresta con el incremento de requerimientos asociados a la severidad del trauma o a la sepsis. Una aproximación consiste en tomar un valor promedio de 1 Kcal/kg/hora (ó 4,18 kJ/kg/hora) para varones, no estresados, en reposo, y realizar ajustes según el sexo (menos 5-10% en mujeres), el grado de estrés y las anormalidades del peso (por ejemplo en obesos) (21).

En los años 70 se administraban enormes cantidades de calorías, de acuerdo al criterio de "hiperalimentación parenteral", basándose en supuestos erróneos: que en pacientes gravemente enfermos se debía obtener un balance nitrogenado positivo; la idea que "si un poco hace bien, más hará mejor", y la creencia que las condiciones de trauma severo y sepsis se asocian con gran aumento del gasto energético. Después se demostró, que la mayoría de los pacientes que ingresan a los hospitales presentan

cierto grado de desnutrición, que disminuye el gasto energético. Por lo tanto, el soporte nutricional debe tener objetivos más modestos, tales como: modular la respuesta catabólica, limitar el desgaste y la pérdida de tejidos y mantener las funciones de los órganos (21). Por todo lo expuesto, las necesidades calóricas se deben determinar en relación con el gasto, pero además teniendo en cuenta la capacidad del paciente para metabolizar los nutrientes y utilizar las calorías en forma correcta. La mayor parte de los pacientes hospitalizados presenta una combinación de enfermedad grave y desnutrición. Sus gastos calóricos son generalmente mucho menores a los valores obtenidos con las ecuaciones clásicas y de las tablas publicadas en los libros. La gran mayoría de los pacientes adultos, inclusive los internados en unidades de terapia intensiva, tienen gastos energéticos que no superan las 2000 Kcal/día. Durante la fase metabólica aguda del trauma o la sepsis, no se debe dar un aporte excesivo de calorías para lograr un balance nitrogenado positivo, ya que la sobrealimentación puede conducir a graves complicaciones y efectos adversos (23). En la **Tabla 2** se especifican los requerimientos de calorías totales.

Macronutrientes

Se debe considerar el aporte calórico total y la proporción de los diferentes sustratos que la proveen.

Proteínas

Entre el 10-15% del aporte calórico total debe ser administrado en forma de proteínas (7, 8). El Comité de Expertos de Dietary Reference Intakes, 2002 (22) concluyó que el aporte de proteínas, de alto valor biológico, para un adulto es de 0,80 g/kg de peso corporal por día. Los requerimientos de proteínas para los pacientes con Nutrición Parenteral se observan en las **Tabla 3** (5, 7,8,20).

La determinación de las necesidades de proteínas y aminoácidos durante la enfermedad presenta dificultades porque la intensidad de cada proceso patológico modifica los requerimientos. Durante la fase aguda de distintos estados (fiebre, fracturas, quemaduras y traumatismos quirúrgicos) se pierde una gran cantidad de proteínas, que se deben recuperar durante la convalecencia. Por esto, son diferentes los requerimientos proteicos durante la fase aguda que durante la recuperación. Se recomienda que los pacientes con depleción proteica reciban un aporte de aminoácidos esenciales similar al de los niños en crecimiento. Se debe reducir el aporte proteico en algunas enfermedades tales como: insuficiencia hepática aguda, para evitar el coma hepático, o en la uremia (0,5 g de proteína/kg de peso) donde la capacidad de excretar los productos finales de nitrógenos es limitada (23).

Se debe tener en cuenta que para lograr la síntesis proteica, no basta aportar sólo fuentes nitrogenadas, sino que se debe administrar el aporte energético necesario para la síntesis. Actualmente se considera que la relación nitrógeno/calorías no proteicas en pacientes hospitalizados debe ser: 120-150 Kcal/g de nitrógeno y en situaciones de agresión severa o sepsis: 80-100 Kcal/g de nitrógeno (20).

En nutrición parenteral el aporte nitrogenado se realiza a través de la administración de una mezcla de L-aminoácidos libres, provistos por la industria farmacéutica en forma líquida y estéril. El organismo utiliza de 18 a 20 aminoácidos para llevar a cabo la síntesis de las distintas proteínas, nueve de ellos no pueden ser sintetizados en forma endógena y son llamados esenciales o indispensables. Se suelen clasificar en indispensables, dispensables y condicionalmente indispensables (24, 25).

- **Indispensables:** leucina, isoleucina, valina, trip-

tofano, treonina, fenilalanina, lisina, metionina e histidina.

- **Condicionamente indispensables:** arginina, taurina, tirosina, glutamina y cisteína. glutamina, prolina, serina.

- **Dispensables:** ácido glutámico, alanina y ácido aspártico.

Existen aminoácidos que se denominan esenciales específicos, porque son condicionalmente indispensables en determinadas etapas fisiológicas de la vida o en algunas enfermedades. En lactantes: la histidina es necesaria para el crecimiento, en neonatos pretérmino y a término: cisteína, taurina y tirosina, en prematuros: tirosina, taurina y L-carnitina (26), en enfermos renales: histidina y serina; en pacientes con enfermedad hepática, sepsis o injuriados: leucina, isoleucina y valina; y en el síndrome de Intestino corto-SIC y síndromes de mala absorción: la glutamina. En la insuficiencia renal crónica, la concentración de tirosina y su relación con la fenilalanina son muy bajas debido a una oxidación reducida de tirosina a partir de la fenilalanina (por inhibición parcial de la enzima fenilalanina-hidroxilasa) (27).

Los aminoácidos ramificados (AAR) son componentes cuantitativamente mayoritarios de la proteína muscular; por ello, sus requerimientos son muy elevados -entre el 38 y el 45% del total de aminoácidos- en todas las etapas de la vida. Los AAR en la Nutrición Parenteral constituyen un importante factor de inhibición de la proteólisis, se requieren para la síntesis de las proteínas de fase aguda y de la albúmina, y estimulan la repleción de la masa muscular (27).

Los aminoácidos condicionalmente indispensables, como la Taurina, Glutamina y Arginina y otros aminoácidos del ciclo de la urea, que tienen funciones protectoras contra mediadores proinflamatorios, y actúan como inmunomoduladores, participan de la respuesta al estrés y previenen la eventual

hiperamoniemia causada por la sobrecarga de aminoácidos (26,27).

Carbohidratos

La glucosa es el carbohidrato que más se utiliza en las fórmulas para Nutrición Parenteral. La glucosa puede ser utilizada por la mayoría de las células del organismo, incluyendo las células del sistema nervioso central y periférico, las células sanguíneas y las de los tejidos de cicatrización (28). La glucosa se almacena en el hígado y en el músculo esquelético, pero las reservas hepáticas son limitadas y se agotan después de 24 a 36 horas de ayuno. El glucógeno muscular no puede ser utilizado por otro tipo de células. Cuando las reservas de glucógeno hepático se agotan, la glucosa se produce por gluconeogénesis a partir de los aminoácidos, como la alanina, el glicerol o lactato. En situaciones de trauma, la alta tasa de gluconeogénesis no puede ser reducida en forma eficiente por el mayor aporte de glucosa (28). La captación y utilización de la glucosa se ve reducida por la acción de hormonas de contrarregulación (catecolaminas, glucagón, cortisol) produciendo hiperglucemia, glucosuria y coma hiperosmolar. Por esto, grandes aportes de glucosa en el paciente crítico pueden aumentar el estrés, que se evidencia a través del aumento de las catecolaminas. La administración de grandes cantidades de glucosa a pacientes hipermetabólicos da lugar a acumulación hepática de glucógeno y grasa, pudiendo asociarse a una hepatomegalia súbita y disfunción severa que se inicia como colestasis (27, 28).

La glucosa es el sustrato energético de preferencia y el hidrato de carbono mejor tolerado por vía parenteral en situaciones normales. En estado post-agresivo no presenta las mismas ventajas, ya que la tolerancia disminuye y da origen a la saturación de los tejidos y las conse-

cuencias son hiperglicemias y glucosurias. Por este motivo, se han buscado fuentes alternativas de energía; entre ellas, otros carbohidratos solubles como la fructosa y los polialcoholes: xilitol, sorbitol y glicerol, todos con similar coeficiente respiratorio y densidad energética de aproximadamente 4 Kcal/g (27). Estas fuentes alternativas presentan ventajas y desventajas que se señalan en el **Cuadro 2** (27,28).

A pesar que la administración de fructosa tiene ventajas en pacientes con intolerancia a la glucosa, porque no requiere insulina, su utilización se ha limitado debido a los efectos adversos observados. El xilitol difunde rápidamente dentro de la célula y al igual que la fructosa no es insulino dependiente. Por su parte, el sorbitol se transforma a nivel hepático en fructosa, siendo ambos sustratos interconvertibles (27).

Las combinaciones de carbohidratos utilizadas en la clínica son: fructosa-glucosa; glucosa-fructosa-xilitol y sorbitol-xilitol. De ellas la que más se ha utilizado es la de glucosa-fructosa-xilitol en las proporciones 1:2:1. Sin embargo, actualmente se utiliza exclusivamente glucosa como fuente de carbohidratos en la nutrición parenteral. La incidencia y severidad de las alteraciones metabólicas se reducen cuando el aporte de glucosa se mantiene por debajo del gasto energético, y se recomienda una tasa máxima de infusión inferior a 5 mg/kg/minuto. Aportes mayores de glucosa estimulan el consumo de oxígeno y aumentan la producción de dióxido de carbono, lo que causa problemas respiratorios y disfunción hepática, en especial en pacientes adultos gravemente enfermos (27,28).

Lípidos

Las grasas constituyen un sustrato energético necesario y tienen, además, una influencia sobre el sistema inmune y sobre la síntesis de eicosanoides.

En la NPT las grasas se administran en forma de emulsiones lipídicas, no sólo para prevenir la deficiencia de ácidos grasos esenciales (AGE), sino también para administrar un importante aporte calórico (30-40% de las calorías) principalmente en pacientes graves con resistencia a la insulina (27,29). La administración de lípidos, junto con los demás nutrientes, permite disminuir la incidencia y severidad de los efectos adversos provocados por el exceso de glucosa. Los requerimientos de lípidos deberán ser estimados para cada paciente en particular, ya que variará notablemente de un individuo a otro.

También es importante considerar la composición de los ácidos grasos, la proporción de lípidos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, la relación de $w-6$ y $w-3$, y el contenido de antioxidantes de las emulsiones lipídicas. Las emulsiones elaboradas en base a aceite de soja y/o cártamo, contienen una proporción excesiva de ácidos grasos poliinsaturados –principalmente $w-6$ – pero una cantidad escasa de antioxidantes, como α -tocoferol (29). Actualmente se ha puesto un especial interés en el aporte de ácidos grasos poliinsaturados $w-3$ (PUFA $w-3$, provenientes de aceite de pescado) por considerarse que los eicosanoides formados por la serie $w3$ son menos inmunosupresores que los producidos por el ácido araquidónico. Las soluciones comerciales de LCT son eficaces para mantener los depósitos de $w-6$ (linoleico), $w-9$ (oleico) y $w-3$ (linoleico) (27, 29).

Desde hace más de 20 años han aparecido en Europa y se comercializan en nuestro país productos que contienen mezcla de triglicéridos de cadena larga (LCT) provenientes de la soja y triglicéridos de cadena media (MCT). Existen otras preparaciones que contienen aceite de oliva, aceite de pescado y triglicéridos estructurados que incluyen en la misma solución

una mezcla de ácidos grasos de cadena larga y media, o con contenido adicional de α -tocoferol. Los MCT son ésteres de ácidos grasos saturados con 8 a 12 átomos de carbono, pero no son fuente de ácidos grasos esenciales. Su bajo peso molecular y su hidrosolubilidad facilita la acción de las enzimas digestivas en la luz intestinal y, por lo tanto, su hidrólisis es más rápida y completa que los LCT (18). Por otro lado, tienen más rápida depuración en sangre; rápido metabolismo y oxidación; no se almacenan en el tejido adiposo; son mejores donantes de energía y no necesitan carnitina para su betaoxidación en la mitocondria. Es por esto que se utilizan en los prematuros, pacientes pediátricos y en los adultos graves o sépticos.

Los lípidos para uso endovenoso se encuentran en el mercado en forma de emulsiones aceite en agua. Estos productos son fuente de ácidos grasos esenciales, poseen alta densidad calórica, entre 10 y 11 Kcal/g (por el agregado de glicerol) y una baja osmolaridad que permite su administración en nutrición parenteral periférica, y las dosis recomendadas para NPT se observan en la Tabla 4 (27, 29).

En prematuros de menos de 32 semanas de gestación se debe agregar L-carnitina o una mezcla de ácidos grasos de cadena media con ácidos grasos de cadena larga (MCT/LCT). También se utilizan en niños los lípidos con 80% de aceite de soja y 20 % de aceite de oliva y aquellos que poseen además el agregado de aceite de pescado.

Electrolitos

En NP se deben administrar al paciente sodio, potasio, calcio, magnesio, cloruro, acetato y fosfato. En la Tabla 5 se muestran los requerimientos normales de electrolitos durante la Nutrición Parenteral de pacientes adultos. En algunos casos es necesario ajustar los

valores de acuerdo con la situación clínica de los pacientes, por ejemplo, aumentar las dosis cuando hay pérdidas excesivas gastrointestinales (fístulas, diarreas) o reducirlos en la insuficiencia renal, cardíaca o ante la presencia de una sobrecarga.

Sodio

Es el principal catión y agente osmótico del líquido extracelular. Aunque el cuerpo puede contener hasta 4000 mmol de sodio, sólo la mitad es libremente intercambiable. Aproximadamente 22400 mmol de sodio se filtran a través del riñón diariamente y 22300 son reabsorbidos en los túbulos renales. Como respuesta a los cambios de presiones y flujos intravasculares, el riñón reacciona por medio del sistema renina-angiotensina-aldosterona, las hormonas natriuréticas, la dopamina, las prostaglandinas y el sistema simpático, para controlar la cantidad de sodio excretado y mantener la condición de equilibrio en el líquido extracelular. La desnutrición y los estados patológicos pueden alterar el manejo renal del sodio (20).

El sodio se aporta como cloruro de sodio y como fosfato de sodio, también hay que considerar el sodio y potasio que contienen las soluciones de aminoácidos.

Potasio

Es el catión principal intracelular (20) y cuando el potasio sérico está bajo, refleja deficiencia de potasio, particularmente si está acompañado de alcalosis, aunque la pérdida corporal total puede estar asociada con hiperkalemia en un estado catabólico acompañando por oliguria.

Cuando las células comienzan a sintetizar glucógeno y proteínas se produce la captación de potasio y es necesario realizar mayores apor-

tes con la NPT. El potasio es requerido en orden de 5 mEq por cada gramo de nitrógeno, para la síntesis proteica. La acidosis se asocia con pérdida de potasio intracelular y por el contrario, el aumento de pH se acompaña de captación de potasio. La manifestación de una depleción severa de potasio es la alcalosis con aciduria paradójica. Este trastorno se trata, no sólo con potasio sino con reemplazo de volumen.

La glucosa, en especial en combinación con insulina, causa una rápida captación celular y una caída en los niveles séricos de potasio. Por esto, en los primeros días de la terapia nutricional es necesario realizar el ionograma diariamente y ajustar el contenido en las mezclas de nutrición parenteral para restablecer las pérdidas de potasio sérico (20). En la NPT se aporta como cloruro de potasio y como fosfato de potasio.

Magnesio

Se distribuye principalmente en el tejido óseo (500-600 mmol) y en el espacio intracelular (500-850 mmol). Sólo 12-20 mmol están presentes en el líquido extracelular, en una concentración de 0,7 y 1,2 mmol/L. Es un componente esencial de muchos sistemas enzimáticos y tiene una función en la estabilidad del potencial de membrana (Na^+ , K^+ , ATPasa). Cuando los niveles en sangre están bajos y hay deficiencia de magnesio se produce una hiperirritabilidad neuromuscular, y en los casos severos pueden producirse convulsiones, arritmias cardíacas y vasodilatación periférica (20).

Se encuentra deficiencia de magnesio, especialmente en la enfermedad gastrointestinal, acompañada por pérdidas excesivas de líquido y en el síndrome de intestino corto. En la enfermedad de Crohn, donde suelen presentarse diarreas y fístulas se puede desarrollar hipomagnesemia clínicamente significativa (30).

En la nutrición parenteral total de pacientes adultos se utilizan soluciones de sulfato de magnesio, en cantidades diarias de 5-12 mEq/ día (tabla 5).

Fosfato

Es el anión más abundante en el organismo y gran parte está ligado al tejido óseo (25000 –27000 mmol). El resto se distribuye en el líquido intracelular y solo una pequeña parte se halla en el líquido extracelular (12-20 mmol). El fosfato es necesario para muchos sistemas de coenzimas y otros compuestos que participan en los procesos metabólicos. El riñón filtra 150 mmol/día y reabsorbe 120 mmol/d. La excreción renal de fosfato aumenta a medida que aumenta su concentración plasmática, excepto en la insuficiencia renal. En los procesos catabólicos por enfermedades, las células pierden fosfato que se excreta por vía renal. Por el contrario, con el comienzo del anabolismo o la administración de glucosa y proteínas hay una captación celular de fosfato y debe administrarse una cantidad adecuada para evitar la peligrosa hipofosfatemia, que causa debilidad muscular, insuficiencia cardíaca y respiratoria, deterioro de la conciencia y muerte (20). Se administra como fosfato de sodio o de potasio de 30 a 64 mEq/día y como fosfatos orgánicos (tabla 5).

Calcio

Es el catión más abundante del cuerpo humano y su contenido es de 1300 g. El 99% se encuentra en el esqueleto y sólo el 1% es libremente intercambiable. La concentración normal en el plasma es de 2,2-2,5 mmol/L, en un 50% unido a proteínas. Por lo tanto, con la caída de la albúmina sérica asociada a la enfermedad, la concentración de calcio se debe ajustar (30,31).

El calcio juega un rol fundamental en la conductibilidad neural, la contracción muscu-

lar, la secreción de hormonas y como segundo mensajero en muchos procesos metabólicos. La disminución del calcio libre se relaciona con tetania, convulsiones, pérdida de conciencia y aún muerte.

En los pacientes con nutrición parenteral durante un período corto o durante una enfermedad crítica no suele verse deficiencia de calcio; por el contrario, en nutrición parenteral a largo plazo se puede presentar enfermedad ósea. Por esto es importante el adecuado aporte de calcio y vitamina D, especialmente en los lactantes, niños y embarazadas (30). El calcio en la nutrición parenteral se adiciona en forma de sales orgánicas de gluconato de calcio y en el adulto las dosis utilizadas son de 4,6 a 6,9 mEq/ día (tabla 5).

Micronutrientes

La administración de dosis adecuadas de micronutrientes esenciales orgánicos (vitaminas) e inorgánicos (oligoelementos o minerales) es imprescindible para el mantenimiento de la vida y la recuperación de los pacientes que reciben NPT.

Vitaminas

En los cuadros 3 y 4 se describe la función, mecanismo de acción bioquímica, signos de deficiencia y dosis de las vitaminas liposolubles e hidrosolubles, respectivamente, para los pacientes adultos con NPT (20)(31, 32, 33, 34, 35).

Los signos clínicos de deficiencia de las vitaminas hidrosolubles que intervienen en el metabolismo energético (B₁, B₂, niacina) pueden aparecer a los pocos días de administrar la NPT, ya que el organismo no cuenta con reservas. También pueden manifestarse signos de deficiencia de vitamina C a consecuencia del estrés fisiológico asociado a las diversas patologías (32,33).

En el caso de las vitaminas liposolubles, ácido

fólico y vitamina B12 la deficiencia puede aparecer fundamentalmente en pacientes con procesos cróni-cos que han llevado a depleción de los depósitos o en aquellos que reciben NPT durante períodos prolon-gados (33).

Microminerales esenciales

La deficiencia de algunos micronutrientes minerales puede ser la causa principal del compromiso clínico del paciente. Por lo tanto el Equipo de Terapia Nutricional necesita valorar su importancia y asegurar su administración en todos los pacientes que reciben nutrición paren-teral (31, 36, 37).

La mayoría de los pacientes, al inicio de la NPT, presentan una deficiencia de microminerales y muchos tendrán aumentados sus requerimientos debido a una inadecuada absorción gastrointestinal, excesivas pérdidas o anomalías en el metabolismo (37). Esto puede ocurrir como resultado de una dieta pobre en estos minerales por razones médicas o culturales, o en el caso de los ancianos, porque habitual-mente consumen poca cantidad de alimentos. También pueden afectar los requerimientos de microminerales, el alcohol y las drogas de abuso. Los neonatos tienen un requerimiento especial ya que experimentan un rápido crecimiento postnatal, poseen una pequeña reserva al momento del nacimiento, inmadurez del tracto gastrointestinal e importantes pérdidas endógenas. En el momento de prescribir una fórmula para nutrición parenteral se debe considerar que los requerimientos de micronutrientes de los niños nacidos a término y de los prematuros son muy diferentes (26).

Los microminerales considerados esenciales en el humano son: **cobre, cromo, hierro, manganeso, molibdeno, zinc, selenio, yodo y fluoruro** (17,36). Cada elemento tiene por lo menos un rol importante que cumplir dentro del organis-

mo, y para cada uno hay un rango dentro del cual se mantiene la homeostasis (36 37, 38, 39

Se debe tener en cuenta que las cantidades de micro minerales que deben ser aportadas en la NPT presentan diferencias sustanciales con las de la alimentación oral ya que los nutrientes por vía parenteral llegan directamente al torrente sanguíneo. Por ello, gran parte del avance en el conocimiento de las necesidades de micronutrientes minerales se ha debido a la administración de fórmulas para NPT que no los tenían incorporados o los tenían en cantidad insuficiente. En algunos de esos pacientes alimentados con NP se han descrito alteraciones en los niveles plasmáticos de micronutrientes minerales, indicativos de deficiencia aguda así como sintomatología clínica que, en algunos casos ha llevado a trastornos irreversibles y a la muerte (39,40,41).

En el cuadro 5 se resumen las funciones, el mecanismo bioquímico de acción, los efectos de la deficiencia y las dosis recomendadas en pacientes adultos que reciben NP (39,42,43).

No es aconsejable el agregado de Fe en las fórmulas de NPT ya que puede agravar la patología del paciente grave y durante un proceso infeccioso exacerbar la incidencia y virulencia de ciertas infecciones (20,

Productos comerciales para NP

Aminoácidos: *en el mercado argentino hay mezclas de aminoácidos en concentraciones del 5%, 6,9%, 8,5%, 10%, 11,5% y 15%.*

Existen soluciones de aminoácidos:

a) *Estándar, que cumplen con las proporciones indicadas para adultos.* b) *Órgano-específicas: para pacientes renales con aminoácidos esenciales y en-riquecidos con aromáticos; para pacientes hepáticos (con mayor porcentaje de aminoácidos ramificados);* c) *soluciones específicas para pediatría, con histidi-na, taurina y cisteína, que son aminoácidos condicio-nalmente indispensables en niños y en prematuros (26,27).*

La cisteína está presente en el mercado farmacéutico en forma individual y se utiliza en niños prematuros; la glutamina existe en forma de dipéptidos para agregar a las mezclas de Nutrición Parenteral (26, 27).

Las especialidades medicinales de soluciones de aminoácidos son productos fabricados por Laboratorios de nuestro país (Laboratorios Rivero y Roux Ocefa) o son importados de Estados Unidos y Europa (Laboratorios Baxter, Braun y Fresenius).

Carbohidratos, para uso endovenoso, presentes en la industria farmacéutica: son productos con glucosa en agua, en forma de dextrosa, en concentraciones del 5% al 70% en envases que generalmente son de 500 o 1000 mL. Para las preparaciones de las mezclas de Nutrición Parenteral los farmacéuticos utilizan, por razones de restricción de volumen, las soluciones de dextrosa en agua al 50 y 70%. Las mezclas con concentraciones superiores al 10% solo podrán utilizarse por vía endovenosa central.

Lípidos para uso endovenoso: se encuentran en el mercado en forma de emulsiones aceite en agua en presentaciones de 500 mL o 1 litro al 10%, al 20% y al 30%, fabricados por Laboratorios de Estados Unidos (Abbott y Baxter) o de Europa (B Braun, Fresenius). Estos productos son fuente de ácidos grasos esenciales, poseen alta densidad calórica, entre 10 y 11 Kcal/g (por el agregado de glicerol) y una baja osmolaridad que permite su administración en nutrición parenteral periférica y central.

Electrolitos para vía IV están presentes en diferentes Laboratorios Farmacéuticos en la Argentina (Rivero, FADA, etc.). Las concentraciones que se utilizan habitualmente para la preparación de la NP son:

Sulfato de Magnesio al 25%; Fosfato de sodio (3 mmol de fósforo/mL); Fosfato de po-

tasio (3 mmol de P/mL); Glicerofosfato de sodio anhidro (Fosfato: 1 mmol/mL; Fósforo 31 mg/mL); Cloruro de Sodio al 20% (Na y Cl⁻: 3,4 mEq/mL); Cloruro de Potasio 1 Molar y 3 Molar (1 y 3 mEq/mL); Gluconato de Calcio al 10% (Ca: 4,65 mEq/mL, 9,3 mg/mL), Acetato de sodio 1 molar y lactato de sodio 1 molar.

Vitaminas para uso endovenoso: están presentes en la industria farmacéutica en productos para niños y para adultos. Las formulas de cada frasco-ampolla de liofilizado para adultos contiene las siguientes vitaminas: Acido Ascórbico 100.0 mg; Vitamina A 1.0 mg; Ergocalciferol 5.0 mcg; Tiamina Clorhidrato 3.36 mg; Riboflavina 5-Fosfato-Sódico 3.6 mg; Piridoxina Clorhidrato 4.86 mg; Niacinamida 40.0 mg; Dexpantenol 15.0 mg; Vitamina E 10.0 mg; Biotina 60.0 mcg; Acido Fólico 400.0 mcg; Cianocobalamina 5.0 mcg. Las formulas de niños contienen las vitaminas en las concentraciones: Acido Ascórbico 80 mg; Vitamina A 2300 U USP; Ergocalciferol 400 U USP; Tiamina Clorhidrato 1.2 mg; Riboflavina 5-Fosfato-Sódico 1.4 mg; Piridoxina Clorhidrato 1 mg; Niacinamida 17 mg; Dexpantenol 5 mg; Vitamina E 7 U USP; Biotina 20 mcg; Acido Fólico 140 mcg; Cianocobalamina 1 mcg; Fitonadiona 200 mcg.

Oligoelementos o microminerales están disponibles en envase multidosis de elementos traza que contiene en mg/mL: Zinc 0,327, Cobre 0,076, Hierro 0,195; Manganeseo 0.055; Cromo 0,001; Molibdeno 0,001; Selenio 0,002; Fluor 0,057 y Yodo 0,013 (Tracutil ®, Laboratorio Braun y Ritraz ®, Laboratorios Rivero). Además, Zinc, Cobre, Cromo, Molibdeno, Selenio y Manganeseo se encuentran disponibles en envases individuales (Laboratorio FADA y Rivero).

Referencias bibliográficas

- (1). Sarabia MI. (2001) Aspectos farmacológicos de la Nutrición Parenteral. En: Programa de Educación y Actualización Farmacéutica- PROEF- Tercer Ciclo. Módulo 4. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana;11-33.
- (2). Kehr J, Maíz A. (2007) Nutrición Parenteral Central. Cap. 23. En: Arenas Márquez H, Anaya Prado R. Nutrición Enteral y Parenteral. México DF, México: McGraw-Hill Interamericana;243-55.
- (3) Echeverri Sonia et al. (2004). Curso Interdisciplinario de Nutrición Clínica -. CINC Mod. II, Cap. 4. Editado por Federación Latinoamericana de Nutrición Parenteral y Enteral – FELANPE, 2da. Edición., Bogotá, Colombia 2004: 81-99.
- (4) Sitges Serra A. (1986) Técnicas de soporte nutricional. Indicaciones de la alimentación parenteral. En: Alimentación parenteral: bases metabólicas y técnicas. Sitges Serra A (edt.). Cap. 5. Barcelona, España: Editorial Salvat:69-75.
- (5) ASPEN: Board of Directors. (1993). Guidelines for the use of parenteral and enteral nutrition in adult and pediatric patients. JPEN 17(Suppl): 1SA-52SA,.
- (6) Celaya Pérez S. (1998) Desnutrición: Concepto, etiología, incidencia y su repercusión en el paciente. Capítulo 5. En: Celaya Pérez S. Tratado de nutrición artificial. Tomo I. Madrid, España: Grupo Aula Médica SA; 71-93.
- (7) ASPEN Board. (2002) Guidelines for the Use of Parenteral and Enteral Nutrition in Adult and Pediatric Patients. JPEN, January-February (25): 31SA.
- (8) ASPEN, Board of Directors (2002) Administration of specialized nutrition support. Section V. JPEN;(26)5 (supplement): S18-S22.
- (9). Marí AA, Jiménez Torres NV. (1999) Formulación de unidades nutrientes parenterales. Cap. 18. En: Mezclas Intravenosas y Nutrición Parenteral. Jiménez Torres V (edt.). Valencia, España: CONVASER,; 469-501.
- (10). Barnett MI, Pertkiewicz M, Cosslett AG, Muhlebach S, Dudrick SJ. (2004) Parenteral Nutrition Admixtures. How to prepare Parenteral Nutrition Admixtures. Chap 6.3. In: Basics in Clinical Nutrition. Sobotka, L et al. ESPEN. Prague, Czech Republic: House Galen:260-274.
- (11) Disposición Argentina, ANMAT-2592/2003 (2003). Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Mezclas de Nutrición Parenteral Extemporáneas. Boletín Oficial de Argentina, Nro. 30162, junio-2003.
- (12). Brasil, Portaria nº 272, (1998); SIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária.. Regulamento técnico para a terapia de nutrição parenteral. Diário Oficial da União. República Federativa do Brasil, Brasília, Seção I, p.78, 71-E 15 de abril de 1999.
- (13) Norma General Técnica Chilena Nº 59 (2001) Manipulación de Medicamentos Estériles en Farmacias de Hospitales.
- (14) USP 29-NF. (2006) Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional. Edición anual en español. Compendio de Normas Oficiales. Página 528, Rockville, USA.
- (15) Menéndez, AM. (1997) Guía de los Servicios Farmacéuticos Hospitalarios: Preparación de Mezclas de Uso Endovenoso. Programa de Medicamentos Esenciales

- y Tecnología. División de Desarrollo de Sistemas y Servicios de Salud. Editado por la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. OPS/OMS. Washington, Estados Unidos:1-17.
- (16) Disposición ANMAT 2819/2004,(2004). Lineamientos generales de Buenas Prácticas de Fabricación para Elaboradores, Importadores/Exportadores de Medicamentos. Boletín Oficial del 18 de mayo de 2004.
 - (17). Menéndez AM. (1999) Nutrientes en Nutrición Parenteral. Cap. 14. En Nutrición Enteral y Parenteral, Montemerlo H, Menéndez AM, Slobodianik N (edts.). Buenos Aires, Argentina: Ed. Abbott Laboratories Argentina SA; 181-98.
 - (18) Cardona D, Alastrué A, Clapés J, Llorens J, Massó A, Shinca N. (1993) Terapéutica Nutricional. En: Farmacia Hospitalaria. Bonal J, Domínguez-Gil A (edts.). Madrid, España: Editorial Médica Internacional;4.4:88-89.
 - (19). Veal DF. (1996) Nutritional Support of the Pediatric Patient. In: Nutritional Support Pharmacy Practice Review Course ASPEN/ASHP. Las Vegas, Nevada, USA: American Society of Parenteral and Enteral Nutrition;37-45.
 - (20) ASPEN (2004). Board of Directors. Safe practices for parenteral Nutrition. Task Force for the revision of Safe practices for parenteral Nutrition. JPEN vol 28 (6) Suppl: S39-S70.
 - (21). Carpentier YA. (2004) Substrates used in la parenteral and enteral nutrition. Energy. Chap 4. En: Basics in Clinical Nutrition. Sobotka, L et al (edts.). ESPEN. Prague, Czech Republic: House Galen;149-50.
 - (22) Dietary Reference Intakes. Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids. Cholesterol, Protein and Amino Acids. (2002) Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. The National Academies Press. USA.
 - (23) Ortiz Leiba C, Jiménez Jiménez FJ, Garnacho Montero J. (1999) Nutrición Parenteral en el Paciente Crítico. En: Jiménez Torres V (eds). Mezclas Intravenosas y Nutrición Artificial. 4ta. Edición. Valencia, España: Convaser CEE;:400-42.
 - (24). Laidlaw SA and Kopple JE. (1987) Newer concepts of the indispensable amino acids. Am. J. Clin. Nutr; (46): 593-605.
 - (25). Fürst P. (2004) Proteins and amino acids. En: Basics in Clinical Nutrition. Sobotka, L et al (edts.). ESPEN. Prague, Czech Republic: House Galen;157-64.
 - (26). Peguero Monforte G. (1995) Alimentación parenteral en neonatología. Barcelona, España: Mosby-Doynma Libros;11-12.
 - (27) Río de Gómez del Río ME, Slobodianik NH, Menéndez AM. (2001) Elementos de Apoyo Nutricional para farmacéuticos. En: Programa de Educación y Actualización Farmacéutica- PROEF- Tercer Ciclo. Módulo 3. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana;11-3.
 - 28. Carpentier Y. (2004). Carbohydrates. Chap. 4.2. En: Basics in Clinical Nutrition. Sobotka, L et al (edts.). ESPEN. Prague, Czech Republic: House Galen;151-53.
 - 29 Carpentier Y. (2004). Lipids. Chap 4.3. En: Basics in Clinical Nutrition. Sobotka, L et al (edts.). ESPEN. Prague, Czech Republic: House Galen;153-56.
 - 30. Sobotka L Allison SP, Stanga Z. (2004). Water and electrolytes during nutritio-nal support. Charper 4.5. En: Basics in Clinical Nutrition. Sobotka, L et al (edts.). ESPEN. Prague, Czech Republic: House

- Galen;165-68.
- 31. Greene HL, Hambidge KM, Schanler R and Tsang RC. (1988). Guidelines for the use of vitamins, trace elements, calcium, magnesium, and phosphorus in infants and children receiving total parenteral nutrition: report of the Subcommittee on Pediatric Parenteral Nutrient Requirements from the Committee on Clinical Practice Issues of the American Society for Clinical Nutrition. *Am J Clin Nutr* 148:1324-42.
 - 32. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. (2001). Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board & Institute of Medicine, National Academy of Sciences, Washington, D.C.
 - 33. Shenkin A, (2004) Physiological function and deficiency states of vitamins. En: *Basics in Clinical Nutrition*, Lubos Sobotka. ESPEN. Prague, Czech Republic: House Galen;99-105.
 - (34) Pita Martín de Portela ML. (2003) *Vitaminas y Minerales en Nutrición. Segunda Ed. La Prensa Médica Argentina, Buenos Aires, 9-83.*
 - (35) Dietary Reference Intakes (DRI) for Thiamin, Riboflavin, vitamin B6, Niacin, folate, vitamin B12 and choline. (1998) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board & Institute of Medicine, National Academy of Sciences, Washington, D.C.
 - (36) Mertz W (1998) Review of the scientific basis for establishing the essentiality of trace elements. *Biol Trace Element Res*; 66: 185-191.
 - (37). Solomons, NW. (1991) Zinc, Trace Elements. En: *Clinical Guide to Parenteral Micronutrition* Thomas G Baumgartner (Edit). Chapter 9. Second Edition. USA: Lyphomed;216-231.
 - (38) Shenkin A, Allwood MC. (2002) Oligoelementos y vitaminas en la nutrición intravenosa en adultos. Capítulo 4. En: *Nutrición Clínica*. Rombeau JL, Rollandelli RH (eds.). *Nutrición Clínica Nutrición Parenteral*. México DF: McGraw-Hill Interamericana: 65-86.
 - (39) Shenkin A. (2004) Physiological function and deficiency states of trace elements. En *Basics in Clinical Nutrition*, Lubos Sobotka. Ed. ESPEN. Prague, Czech Republic: House Galen; 94-98.
 - (40) Shenkin A. (2004) Trace elements and vitamins in parenteral and enteral nutrition. En: *Basics in Clinical Nutrition*. Sobotka L, Allison SP, Fürst P et al. Edited for European Society for Clinical Nutrition and Metabolism- ESPEN. 3rd. ed. Chap. 4.6. Prague, Czech Republic: House Galén;169-174.
 - (41) National Institute of Clinical Excellence. *Nutrition Support in Adults* (2006) Oral nutrition support, enteral tube feeding and parenteral nutrition (cited from: www.rc-seng.ac.uk).
 - (42) Hardy G, Menéndez AM, Manzanares W. (2009) Trace element supplementation in parenteral nutrition: Pharmacy, posology and monitoring guidance. *Nutrition*: 1-12.
 - (43) Boosalis, M.G. (2001) Micronutrients. In: *The Science and Practice of Nutrition Support: A Case-Based Core Curriculum*, Kendall/Hunt Publishing Co. Dubuque, IA, Publications;85-106.
 - (44) Howard L, Ashley C, Lyon D, Shenkin A. (2007) Autopsy tissue trace elements in 8

long-term parenteral nutrition patients who received the current US FDA formulation. JPEN; 31:388-96.

In Modern Nutrition in health and disease. Shils ME, Olson JA, Shike M. 8^o Edition. USA:Lea & Febiger;231-241.

- (45) Turnlund JR. Cooper. (1994) Chapter 11.

Cuadro 1

Indicaciones de la nutrición parenteral

Según patologías	
<input type="checkbox"/> Enfermedad de páncreas: Pancreatitis aguda complicada, Pancreatectomías con íleo	
<input type="checkbox"/> Cáncer del tracto digestivo alto, posterior a una resección quirúrgica.	
<input type="checkbox"/> Fístulas enterocutáneas o Fístulas linfáticas	
<input type="checkbox"/> Síndrome de intestino corto	
<input type="checkbox"/> Enfermedades inflamatorias del Intestino: Colitis ulcerosa, Enfermedad de Crohn rebelde al tratamiento medicamentoso convencional	
<input type="checkbox"/> Complicaciones de cirugía digestiva: Esofagoplastias, Reintervenciones y abscesos intra-abdominales, Estenosis pilórica, Fístulas internas	
<input type="checkbox"/> Otras indicaciones: comas neuroquirúrgicos, enteritis actínica, desnutrición post-bypass yeyunoileal, etc.	
Según la capacidad digestiva	
<input type="checkbox"/> Incapacidad de utilizar el tubo digestivo: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Cirugía: resección intestinal o cirugía digestiva mayor; cirugía de cabeza y cuello; complicaciones: peritonitis, dehiscencia de suturas. ➤ Ileo intestinal ➤ Síndromes obstructivos ➤ Trauma abdominal ➤ Malabsorción severa ➤ Intolerancia a la nutrición enteral (NE) ➤ Quimio y radioterapia ➤ Malformaciones congénitas 	
<input type="checkbox"/> Necesidad de reposo del tubo digestivo: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Fístula enterocutánea ➤ Enfermedad inflamatoria intestinal descompensada ➤ Diarreas incorercibles ➤ Pancreatitis aguda grave 	
<input type="checkbox"/> Otras situaciones: <p>donde podría utilizarse la vía digestiva, pero se recomienda la NPT, hasta lograr un aporte completo de nutrientes por vía enteral:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Grandes quemados ➤ Politraumatismo y TCE ➤ Sepsis ➤ Fracaso renal y hepático 	

Ref: (4, 5, 6, 7, 8)

Tabla 1

Requerimiento de flúidos expresado como volumen de líquidos

	Requerimientos
Neonatos-Prematuros	110 - 150 mL Kg/día
Niños según Peso (kg)	
2-10	100mL Kg/día
11- 20	1000 mL + 50 mL/Kg (> a 10 Kg)
> de 20	1500 mL + 20 mL/Kg (> a 20 Kg)
Adultos	1000- 3000 mL/día

Ref: (19); (20).

Tabla 2

	Requerimiento calórico
Pacientes	Kcal/kg/día
Adultos	20-30
Neonatología	
Prematuros (<1500 g)	110-120
Pediatría	
Niños a término o lactantes	80-105
1 a 7 años	75-90
7 a 12 años	50-75
12 a 18 años	30-50

Ref: (19); (20)

Tabla 3

Requerimientos proteicos para pacientes con NPT *.	
Según estado fisiológico	
	g/Kg de peso
Adultos	1 - 1,2
Adolescentes (11 a 17 años)	0,8-1,5
Lactantes	2 - 3
Prematuros	2 - 4
ADULTOS Según patología**	
	g/Kg de peso
Mantenimiento	0,8 - 1
Pacientes catabólicos	1,2 - 2
Alteración renal crónica	1,2 - 1,5
Alteración renal aguda catabolismo	1,5 - 1,8

Ref: (7, 8), (20).

Cuadro 2
Carbohidratos alternativos en Nutrición Parenteral

Carbohidratos	Ventajas	Efectos adversos e inconvenientes
Simples		
Fructosa	- No insulino-dependiente	Acidosis láctica, lipogénesis hepática, hipofosfatemia, incremento de los niveles de ácido úrico y bilirrubina, depleción de ATP.
Polialcoholes		
Xilitol	- No insulino dependiente	No puede ser utilizado directamente por los tejidos periféricos. Causa acidosis láctica y diuresis osmótica
Sorbitol	- No insulino-dependiente. - Interconvertible con fructosa	Acidosis láctica, lipogénesis hepática, hipofosfatemia , incremento de los niveles de ácido úrico y bilirrubina, depleción de ATP.

Ref: (27).

Tabla 4

LÍPIDOS ENDOVENOSOS: dosis recomendadas en NPT	
Adultos	0,8 a 1.2 g/kg de peso /día
Neonatos a término y lactantes	1 a 3 g/kg de peso /día
Prematuros	0.5 a 2,5 g/kg de peso /día

Ref: (27, XX).

Tabla 5

ELECTROLITOS: cantidades recomendadas en NPT

Requerimiento estándar				
Electrolito	Adultos	Neonatos pretérmino	Niños	Adolescentes y niños > 50 Kg
Fósforo	20-40 mmol	1-2 mmol/Kg	1-2 mmol/Kg	10-40 mmol
Magnesio	8-20 mEq	0.3-0.5 mEq/Kg	0.3-0.5 mEq/Kg	10-30 mEq
Calcio	10-15 mEq	2-4 mEq/Kg	2-4 mEq/Kg	10-20 mEq
Potasio	1 – 2 mEq/Kg	2-4 mEq/Kg	2-4 mEq/Kg	1 – 2 mEq/Kg
Sodio	1 – 2 mEq/Kg	2-5 mEq/Kg	2-5 mEq/Kg	1 – 2 mEq/Kg
Acetato	70 – 150	Cantidades necesarias para mantener el equilibrio ácido-base		
Cloruro	105 – 175			

Ref: (20, 30).

Cuadro 3

VITAMINAS LIPOSOLUBLES			
Función, mecanismo de acción, deficiencia y dosis recomendadas en NPT de adultos			
Vitamina y Sinonimia	Función y mecanismo bioquímico de acción	Efectos por Deficiencia	Dosis IV/día
Vitamina A Retinol Antixeroftálmica Antiinfecciosa	Visión crepuscular (Rodopsina en retina) Integridad de epitelios, conjuntiva y córnea Síntesis proteica y de glicoproteínas Reproducción, crecimiento, desarrollo Diferenciación celular (receptores nucleares) Expresión génica Función inmune	Xeroftalmia Ceguera nocturna Aumento de susceptibilidad a infecciones	1000 µg/día (retinol ó palmitato de retinilo)
Vitamina D Colecalciferol Antirraquítica	Absorción del Ca Homeostasis del Calcio y Fósforo Metabolismo óseo Transcripción mediada por receptores a 1-25-di-OH D Diferenciación celular y de macrófagos	Osteomalacia (adultos) Raquitismo (niños) Disminución de la inmunidad	5.0 µg Ergo-calciferol
Vitamina E Tocoferol	Antioxidante (Inactivación de radicales libres)	-Anemia hemolítica -Envejecimiento	10 mg (α-tocoferol)
Vitamina K	Síntesis de factores de coagulación Síntesis de osteocalcina (calcificación ósea) Cofactor de la y glutamil carboxilasa	-Trastornos de la coagulación -Osteoporosis	150 µg

Ref: (20, 33, 32, 35).

Cuadro 4

VITAMINAS HIDROSOLUBLES			
Sinonimia, función, mecanismo de acción, deficiencia y dosis recomendadas en NPT de adultos			
Vitamina y sinonimia	Funciones y mecanismo de acción	Signos de deficiencia	Dosis en NP
B₁ Tiamina Aneurina	Utilización de la energía Reacciones de descarboxidación oxidativa como TPP: Co-decarboxilasa, transcetolasa Transmisión nerviosa	Beri-beri con efectos cardíacos y neurológicos Síndrome de Wernicke Korsakoff	6.0 mg
B₂ Riboflavina Lactoflavina Ovoflavina	Flavoproteínas (Flavin adenina dinucleótido-FAD ó FMN) en reacciones de transferencia de H Dehidrogenasa, Aminoácido- oxidasas otras oxidasas	Lesiones en labios, lengua y piel (síndrome oro-óculo-genital)	3.6 mg
B₆ Piridoxina Adermina	Descarboxilasas no oxidativas Transaminasas Dehidrasas Trans sulfurasas	Anemia (niños) Dermatitis en labios y piel. Convulsiones	6.0 mg
Niacina Acido nicotínico Nicotinamida Factor PP	Coenzima de NAD/NADP Aceptor y dador de H	Pelagra: Diarrea, Dermatitis, Demencia	40 mg
B₁₂ Ciano-cobalamina	Transferencia de unidades de un C, coenzimas folato dependientes Síntesis de ácidos nucleicos Metabolismo de aminoácidos ramificados Coenzima de la metil-malonil-mutasa	Anemia megaloblástica o perniciosa Desmielinización	5.0 µg
Acido Fólico Folacina Factor antianémico	Transferencia de carbonos: Síntesis de purinas y pirimidinas	Anemia megaloblástica	600 µg
Biotina	Lipogénesis, Gluconeogénesis Reacciones de carboxilación	Dermatitis escamosa Pérdida de cabello	60 µg
Acido pantoténico	Utilización de la energía. Formación de la Coenzima A	Dermatitis	15 mg
Vitamina C	Reacciones de hidroxilación: Síntesis de colágeno (Hidroxiprolina, Hidroxilisina) de catecolaminas, etc. Antioxidante Absorción de Fe (reducción de Fe ³⁺ a Fe ²⁺)	Escorbuto Trastornos de cicatrización y de la función inmune.	200 mg

Ref: (20, 33, 32, 35).

Cuadro 5

Microminerales			
Función, mecanismo de acción, deficiencia y dosis en NPT de adultos			
Minerales	Función y mecanismo bioquímico de acción	Efectos de deficiencia	Dosis IV/día
Zinc	Cofactor enzimático Síntesis proteica Control de la diferenciación Estabilizante de proteínas, receptores y ADN "Zinc fingers"	Disminución del crecimiento Caída del cabello Rash cutáneo Reduce función inmune	2.5- 5 mg
Cobre	Componente de Ceruloplasmina y cuproproteínas con actividad enzimática en: Metabolismo del Fe, Síntesis de colágeno (Lisil-oxidasa) Antioxidante (Superóxido-dismutasa citosólica)	Sangrado subperióstico Arritmia cardíaca Anemia Neutropenia	0.3-0.5 mg
Selenio	Cofactor de: Glutacion-peroxidasa (Antioxidante) Tirosina deiodinasa (metabolismo de hormonas tiroideas)	Miocardiomopatía Miopatía esquelética Defectos en uñas Riesgo de neoplasia	20-60 µg
Manganeso	Cofactor de: Arginasa Superóxido-dismutasa mitocondrial (Antioxidante)	Anormalidades de mucopolisacáridos Cambia color del cabello	60-100 µg
Cromo	Componente del Factor de Tolerancia a la glucosa Metabolismo de carbohidratos, Actividad insulínica, Metabolismo lipoproteico Expresión genética	Intolerancia a la glucosa Pérdida de peso Neuropatía periférica	10-15 µg
Molibdeno	Metabolismo de aminoácidos, de purinas y del Fe Aldehído oxidasa Sulfito-oxidasa Xantino-oxidasa	Intolerancia a los aminoácidos azufrados Taquicardia Trastornos visuales	19-50 mcg
Yodo	Metabolismo energético Hormonas tiroideas	Hipotiroidismo	130 µg
Flúor	Mineralización de huesos/dientes (Fluoropatía ósea y dental)	Caries dentales	0,1-0,95 mg
Hierro	Transporte y almacenamiento de O ₂ (Hemoglobina y Mioglobina) Transporte de electrones (Citocromos)	Anemia microcítica hipocrómica Disminución de resistencia a infecciones	

Ref: (20, 41, 42, 43)

El papel del farmacéutico en el sistema de salud a través de la historia

The role of the pharmacist in the health system through history

Mariano Guillermo Blake, Mariano Martín Boccia,

María del Carmen Krawczyk, Carlos María Baratti

Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Tabla de contenidos

Resumen – Summary	1
La antigüedad.....	1
El boticario.....	1
La industrialización	1
La Atención Farmacéutica.....	1
Referencias bibliográficas	1

Resumen

Las sustancias químicas han sido siempre fundamentales para la terapéutica, y su uso ha evolucionado a través de la historia. Las farmacias han colaborado con la atención médica desde que fue creada la profesión del boticario hacia el siglo VIII en los países musulmanes. El hecho de que los médicos dejaran de preparar por sí mismos los medicamentos que prescribían, y debieran confiar esa tarea al boticario, representó la primera gran transición en la atención a los pacientes. En los primeros tiempos, las drogas administradas se obtenían de las plantas en forma de macerados, extractos, etc., y con el tiempo se fue incorporando una serie de productos minerales, que la farmacia clásica excluía por considerarlos excesivamente tóxicos. La aceptación del uso de productos químicos representó el segundo gran cambio en la terapéutica farmacológica. Con el correr del tiempo, la participación del boticario fue reduciéndose debido a la aparición de las compañías farmacéuticas, que comenzaron a preparar medicamentos a gran escala, y progresivamente dejaron de prepararse las fórmulas magistrales. En el presen-

te trabajo se tratan los aspectos de la historia de la terapéutica farmacológica que están estrechamente vinculados con los cambios que ha experimentado la participación del farmacéutico en el sistema de salud a través de la historia.

Summary

Chemicals have always been fundamental for medical treatment, and its use has evolved through history. Pharmacies have collaborated with health care since the profession of the apothecary was created, about the eighth century, in Muslim countries. The first major transition in patient care was the fact that the physicians stopped to prepare themselves their prescribed medications and entrusted this task to the apothecary. In the early days, the drugs were obtained from plants in the form of macerated, extracts, etc. Mineral products, excluded from the classic pharmacy for being considered excessive toxic, were eventually incorporated to therapy. This acceptance of the use of chemicals represented another major change in drug

therapy. The emergence of drug companies, which began to develop drugs to large scale, was progressively reducing the involvement of the apothecary, who progressively left to pre-prepare master formulas. The present paper discusses some aspects of the history of drug therapy that are closely linked to the changes that pharmacists experienced in their participation in the health system through history.

Palabras clave: boticario, farmacéutico, medicamento, atención farmacéutica, industria farmacéutica

Keywords: apothecary, pharmacist, drug, pharmaceutical care, pharmaceutical trade

La antigüedad

Desde tiempos remotos, el uso de sustancias químicas ha constituido uno de los pilares fundamentales en el tratamiento de las alteraciones de la salud.

Las civilizaciones antiguas consideraban que las enfermedades tenían un origen sobrenatural, ya sea debida a que el cuerpo del enfermo había sido invadido por espíritus malignos, o bien por castigos que los dioses infligían como consecuencia de alguna mala conducta efectuada por el enfermo o algún familiar cercano, etc. Por este motivo, las sustancias curaban debido a que poseían un "espíritu", y su administración siempre formaba parte de alguna clase de ritual, que estaba destinado a la expulsión del espíritu diabólico o a pacificar a los dioses que habían castigado al enfermo.

Fueron los presocráticos quienes intentaron desvincularse del pensamiento mágico y se propusieron conocer el origen de los fenómenos naturales [1]. Bajo esta perspectiva, atribuyeron a la enfermedad un origen relacionado con alguna clase de alteración orgánica, es decir, una alteración en la armonía de los constituyentes de los organismos,

y durante siglos la terapéutica se estableció, entre otras acciones, en la administración de sustancias (en aquellos tiempos representadas como infusiones, extractos y macerados de productos naturales) para lograr el alivio y la recuperación de la armonía perdida, es decir, de la salud. En este sentido, algunos pensadores presocráticos le atribuyeron a ciertas sustancias el papel de elemento primordial, del cual se derivaban todos los demás: Tales de Mileto (639-544 a.C.) consideró que era el agua, Anaximandro de Mileto (611-546 a.C.) creyó que era la tierra, Anaxímenes de Mileto (570-500 a.C.) hizo lo propio con el aire y Heráclito de Éfeso (556-460 a.C.) con el fuego. Sobre esta base, Empédocles de Agrigento (504-443 a.C.) introdujo la doctrina de los elementos y sostuvo que la composición de todas las cosas descansaba en esta pluralidad limitada de sustancias (agua, aire, tierra y fuego). De acuerdo con esta visión, el cuerpo humano, al igual que todas las cosas, está formado por estas sustancias primordiales; la salud es consecuencia del equilibrio y la enfermedad del desequilibrio entre ellas [2]. Esta concepción de la composición del mundo fue madurando a través de los siglos y constituyó la base de la doctrina humoral desarrollada más tarde por la escuela hipocrática, que vinculó cada uno de estos elementos con uno de los humores del cuerpo. El Corpus Hippocraticum (450-350 a.C.), que parece ser el resultado de aportaciones colectivas de diversos autores, más que la obra de un solo individuo, emplea el vocablo *pharmakon* para designar al medicamento, entendido como una sustancia exterior al cuerpo, capaz de producir una acción favorable o desfavorable sobre él [3]; el opio es uno de los más citados en esta obra.

Puesto que este mismo punto de vista formó parte de la visión aristotélica, que dominó el pensamiento durante la mayor parte de la historia de la humanidad, las concepciones acerca de la enfermedad y el tratamiento farmacológico tampoco cambiaron sustancial-

mente y el paso del tiempo sólo fue modificando y ampliando las utilidades terapéuticas atribuidas a los distintos minerales y plantas.

Inicialmente, la administración de sustancias con fines terapéuticos seguía un criterio puramente empírico. La escuela empirista de Cnido recopiló información sobre los efectos que las plantas tenían sobre los síntomas de los enfermos y aplicaban tratamientos similares a enfermos que presentaban los mismos síntomas, aunque no tenía ni buscaba explicación para los mecanismos por los cuales actuaban las sustancias administradas [2,3]. La cantidad de sustancias empleadas no fue muy amplia, pero las combinaron y suministraron de maneras muy diversas: fumigaciones, eméticos, purgantes, etc. A través del tiempo, el estudio de los usos terapéuticos de las sustancias naturales fue tornándose cada vez más serio y riguroso, siendo Teofrasto (372-288 a.C., una de las autoridades en la medicina de la época y discípulo de Aristóteles) quien escribió uno de los primeros estudios sistemáticos sobre las propiedades medicinales de los metales y minerales (*De lapidibus, que constituyó la base de todos los tratados posteriores dedicados al uso farmacéutico de los minerales*) y de las plantas (*el noveno tomo de su obra De historia plantarum, que constituye el herbario más antiguo que sobrevive, y que en realidad no es considerado como escrito por Teofrasto, sino una recopilación inspirada en fuentes alejandrinas posteriores*) [3].

Este cuerpo de doctrina guió la medicina europea por más de un milenio, sucesivamente adoptado por médicos famosos de la antigüedad, como Celso (25 a.C. – 50 d.C.) y Galeno de Pérgamo (130-216 d.C.), y descansaba sobre la base de la teoría humoral y el empleo de las plantas como fuente principal de medicamentos. En contraposición a estas ideas y utilizando como fuente primaria los compuestos quí-

micos, se desarrolló la farmacia alquímica [4]. Esta última constituyó una farmacia paralela a la galénica, que también empleaba compuestos químicos para el tratamiento de enfermedades pero los usaba con suma prudencia por considerarlos inusuales, tóxicos, absurdos y extravagantes. Estas diferencias comenzaron a ser zanjadas mucho más tarde con la aparición de Teophrastus Bombastus von Hohenheim (1493-1541), quien adoptó el nombre de Paracelso por considerar que había superado a Celso [5]. Los puntos de vista galénico y paracélsico fueron marcadamente opuestos, y los seguidores de cada escuela consideraban ineptos a los médicos de la otra. Los paracelsistas no sólo estimularon el uso de los compuestos químicos como medicamentos, sino que incluso promovieron el uso de la alquimia para obtener medicamentos nuevos. De este modo, Paracelso abrió el camino a la farmacia moderna, aunque de forma colateral, pues su concepción de la medicina no era enteramente racional (patrimonio de la escuela galénica), sino que tenía un marcado sesgo mágico y ocultista: de acuerdo con su punto de vista, los medicamentos curaban por su espíritu y no por sus principios activos [5].

Las farmacias galénica y alquimista permanecieron separadas durante toda la edad media y convergieron tardíamente, durante el Renacimiento [4]. La incorporación de los medicamentos químicos a las preparaciones magistrales habría sido más exitosa y rápida si su principal promotor (Paracelso) no hubiera sido considerado un individuo desequilibrado [5]. A pesar de ello, algunas escuelas los incorporaron de forma relativamente precoz, como la escuela inglesa, y con el correr del tiempo los medicamentos químicos pasaron a ser parte muy importante de las opciones terapéuticas. Sin embargo, la farmacia oficial estaba restringida a sectores de alto poder adquisitivo pues

los precios de las fórmulas magistrales eran muy elevados, y la mayor parte de la población recurría a la farmacia popular que continuaba empleando casi exclusivamente preparaciones extraídas de las plantas.

El boticario

Antes de la industrialización y aparición de las especialidades farmacéuticas, se empleaba mucho tiempo en la recolección y adquisición de los principios activos y el proceso de elaboración de las preparaciones magistrales era complejo y laborioso. Por este motivo, la preparación de las fórmulas magis-trales progresivamente fue dejando de ser realizada por el propio médico y en esta primera gran transición fue surgiendo otro profesional de la salud: el boticario (voz que proviene de la palabra griega apo-theuario). La evolución del boticario como un profesional independiente comenzó en Bagdad, ciudad en la que aparecieron las primeras boticas durante la Edad Media, la primera de las cuales se estableció a mediados del siglo VIII [6]. Allí es donde aparece el reconocimiento del boticario como un profesional calificado académicamente y diferente del médico y una clara separación entre ambas profesiones [7], a pesar de que recién a partir del siglo XV debió obtener el diploma de maestro para poder ejercer la profesión. Las descripciones que los árabes hicieron acerca de la medicina y de la preparación de drogas fue rápidamente aceptada como la norma de autoridad a lo largo de toda la Edad Media y sucesivamente fueron apareciendo numerosos escritos destinados a la recopilación y descripción de las propiedades y los usos terapéuticos de los productos empleados para el tratamiento de diversas enfermedades. Entre estas obras sobre farmacología, la más importante de la cultura musulmana fue escrita por Abú Mansur Muwaffaq a fines del siglo X: el "Kitab al-abniyia 'an Haqa'iq al-adwiya" (Los fundamentos de las verdaderas propiedades de los medicamentos), que describe 585 drogas (466 vegetales, 44 animales y

75 minerales). Un poco más adelante, Ibn Baitar (s.XIII) escribe el "Kitab al-Jamey fil Adwiya al-Mufrada", conocido como el Jami, que constituye una enorme recopilación que describe unas 1400 drogas ordenadas alfabéticamente [2]. En el período comprendido entre la publicación de estas dos obras aparece la que puede ser considerada la principal obra relacionada en forma directa con los orígenes de la farmacia: el "Grabadin", también conocido como Manual del boticario o Antidotarium, es-crito por el "seudo-Mesué", que es otro enorme compendio de drogas, el más popular en la Europa medieval, escrito en latín (que se cree que es una traducción de un original árabe que jamás pudo ser hallado) [2]. Así, los boticarios se constituyeron en especialistas del medicamento, ejercieron el arte de preparar, almacenar y conservar las drogas y sus boticas eran periódicamente inspeccionadas por oficiales de gobierno llamados Muhtasib, quienes amenazaban a los boticarios con castigos corporales humillantes si adulteraban las drogas, de modo que eran estos síndicos quienes habilitaban a los boticarios para que pudieran ejercer su profesión [7].

La medicina árabe descuidó la anatomía y la cirugía, ramas en las que no pudieron efectuar avances significativos debido a la idea oriental de que es pecaminoso tocar el cuerpo muerto con las manos, pero en su lugar la química era tenida en alta estima y fue la madre de la alquimia, fundada por Geber (702-765), quien describió algunas operaciones esenciales de los procedimientos químicos, como la destilación, la filtración, la sublimación y el baño maría [2]. A pesar de emplear los métodos que forman las bases para el nacimiento de la química, la alquimia era en realidad una corriente filosófica, cuya doctrina, el "ánima mundi", sostenía que en todas las cosas y sustancias moraban espíritus, esencias y quin-

taesencias que podían ser extraídos mediante el fuego. Los siete cuerpos celestes conocidos en la época (el Sol, la Luna, Marte, Mercurio, Júpiter, Venus y Saturno) se correspondían respectivamente con los siete días de la semana y con los siete metales conocidos (oro, plata, hierro, mercurio, estaño, cobre y plomo). Los alquimistas creían que estos siete metales se originaban en las entrañas de la Tierra, por lo que su finalidad principal era encontrar la “sustancia germinal”. En concordancia con esta idea, sostenían que los metales podían transmutarse unos en otros y tenían la noción de la existencia de un “elixir de la vida”, que se suponía que tenía la naturaleza del *aurum potable* (oro potable), cuya propiedad era la de curar todas las enfermedades y conferir la inmortalidad a quien lo bebiera [2].

Las estrategias llevadas a cabo para el tratamiento de las enfermedades en aquellos tiempos no se efectuaban sobre una ideología única, sino que eran practicadas sobre la base de una multiplicidad de tendencias diferentes, tan diferentes que a veces eran incompatibles entre sí. En este escenario conviven varios puntos de vista, todos ellos construidos, en mayor o menor medida, sobre la base de concepciones simbólicas, metafísicas o filosóficas, constituyendo un entramado de teorías que se disputaban la verdad y que continuamente se descalificaban utilizando argumentos, pero no pruebas [8,9,10]. Estos enfrentamientos persistieron sobre una base pseudocientífica hasta que Claude Bernard publicó su “Introducción al estudio de la medicina experimental”, en 1865 [11]. De estas corrientes de pensamiento, la homeopatía es la única de las orientaciones que ha perdurado hasta nuestros días. La discusión entre la homeopatía y la medicina convencional parece interminable. Los homeópatas sostienen que los médicos convencionales,

ignorando las leyes de la terapéutica, intoxican a los enfermos con dosis erróneas de sustancias tóxicas elegidas de forma desacertada. Por su parte, la medicina convencional sostiene que la homeopatía es dañina porque administra placebos a enfermos que precisarían un medicamento. Ambos sostienen posiciones globalmente incompatibles, y es notable la similitud existente entre las discusiones sostenidas entre los partidarios de las escuelas galénica y paracélsica, y las desarrolladas entre los homeópatas y los médicos convencionales.

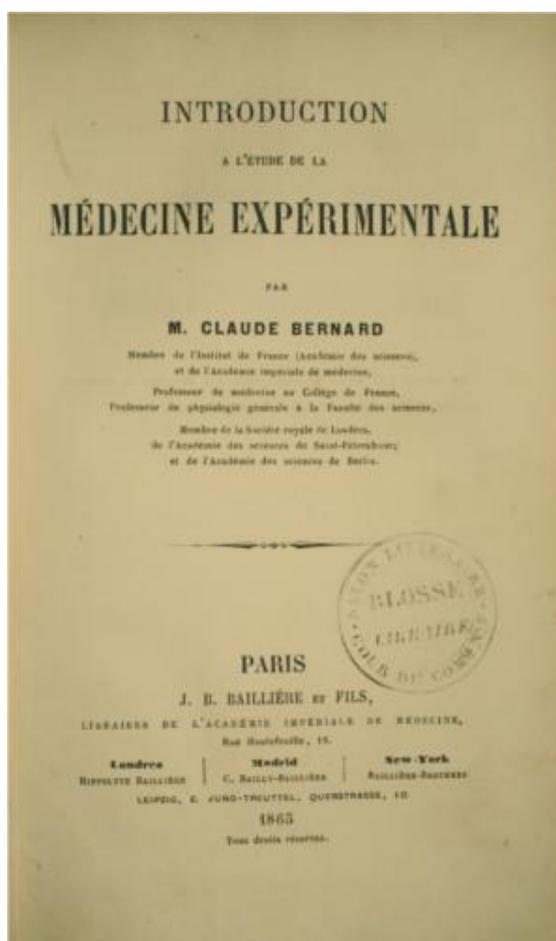


Fig. 1 – Primera página de la obra de Claude Bernard, Introducción al estudio de la Medicina Experimental.

La industrialización

El modelo mencionado anteriormente, en el que los médicos prescribían los medicamentos y los boticarios los elaboraban, persistió hasta que algunas droguerías (que hasta ese momento sólo eran los proveedores de las materias primas para que los boticarios elaboraran sus preparaciones magistrales), se transformaran en laboratorios que se lanzaron al desafío de la confección de los llamados “específicos” (preparaciones elaboradas por los laboratorios) y convirtió a las boticas en centros para la dispensación de medicamentos y a los laboratorios en sus productores. Esta segunda gran transición marcó el inicio de la industria farmacéutica, y

muchos boticarios se opusieron al cambio y a la difusión de los específicos. Con el tiempo, las especialidades farmacéuticas de los laboratorios terminaron imponiéndose por su bajo costo y por la facilidad de su expendio [12]. Los boticarios recibían los productos de manos de los drogueros, que además de entregarles los principios activos que los boticarios utilizaban para confeccionar las preparaciones magistrales, ahora también les entregaban los específicos ya elaborados. La empresa más antigua vinculada con la industria farmacéutica a escala industrial es Merck, cuyo origen se remonta a 1668, momento en que Friedrich Jacob Merck adquirió la Botica Angel (Engel-Apotheke).



Fig. 2 – Engel-Apotheke en la segunda mitad del siglo XVII, cuando fue adquirida por Friedrich Merck. Fuente:

“Von der Merckschen Engel-Apotheke zum pharmazeutisch-chemischen Großbetrieb”

Pocas decenas de años más tarde, ya en el siglo XVIII, en plena expansión de la industria farmacéutica, Félix Palacios publica su “Palestra Pharmaceutica, Chymico-Galenica”,

en la que se trata la elección adecuada de los principios activos, se mencionan recetas magistrales antiguas y otras más modernas, y se ordenan los métodos farmacéuticos de prepa-

ración y virtudes de los medicamentos [13]. Fue esta la obra de difusión más importante de su tiempo, “una obra muy útil y necesaria para todos los profesores de la Medicina, Médicos, Cirujanos y en particular Boticarios” [13], a tra-vés del cual estos últimos tuvieron acceso a los conocimientos químicos.

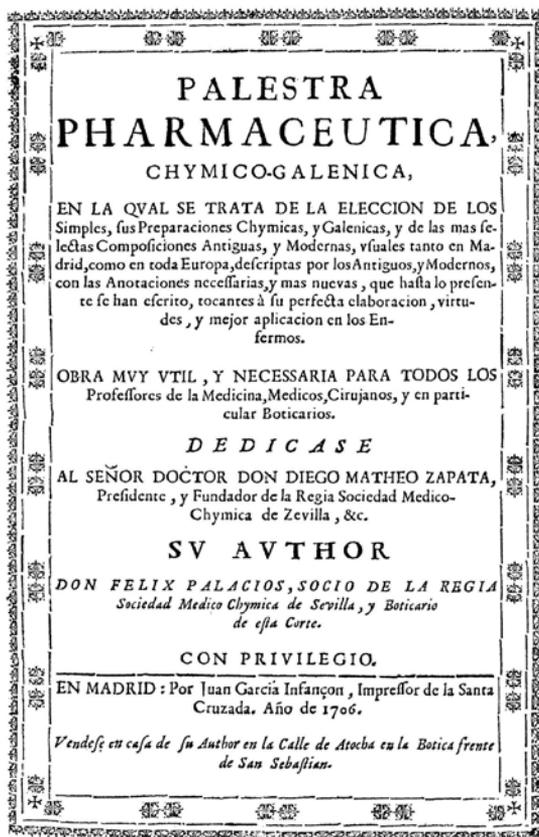


Fig. 3 – Primera página de la Palestra Farmacéutica, escrita por Félix Palacios.

América no era ajena a esa evolución, y recientemente se publicó una exhaustiva y cuidadosa revisión del desarrollo de la Farmacia en nuestro país [14].

La participación del Farmacéutico en nuestros días: Atención Farmacéutica

A pesar del enorme desarrollo que tuvo la industria farmacéutica, y al hecho de que la preparación de fórmulas magistrales fue reduciéndose progresivamente, la importante

participación del farmacéutico en el sistema de salud es incuestionable. El farmacéutico siguió y sigue estando bajo la demanda constante de los pacientes que los consultan acerca de los medicamentos que compran y consumen, de modo que su papel en el sistema de salud nunca se verá comprometido, pues por la altísima demanda que tienen nuestros hospitales, los farmacéuticos son, en muchos casos, el primer acercamiento del individuo al sistema sanitario.

En este contexto, en un necesario intento por formalizar esta participación en el sistema de salud, se institucionaliza el llamado "Consejo Farmacéutico" [15], que consiste en el acto de informar a las personas sobre medicamentos y otros aspectos relacionados con la salud. Si bien no representó un verdadero cambio en la participación del farmacéutico, sí lo representó en cuanto a que esta función se le reconoció en forma oficial. Se estableció, entonces, que el farmacéutico debía brindar consejo sobre el uso de los medicamentos y la automedicación, prestando especial atención a los grupos sociales en los que se debe insistir acerca de estos aspectos: consumidores de medicamentos de venta libre (por la ausencia de control médico y la incidencia de efectos adversos, específicamente las alergias), individuos polimedicados (por el mayor riesgo de interacciones medicamentosas), enfermos con patologías crónicas (hipertensos, diabéticos, bronquíticos, epilépticos, etc., especialmente en los casos en que los márgenes terapéuticos son reducidos), mujeres embarazadas y sujetos con edades extremas, como ancianos y niños; en estos últimos grupos las funciones se orientaron específicamente hacia la educación sanitaria y la conservación de la salud.

De este modo, el "consejo" torna oficialmente al farmacéutico en un participante activo del sistema sanitario, que se ocupa fundamentalmente de tres aspectos:

- el expendio de medicamentos
- la promoción de la salud y prevención de la enfermedad
- la detección de factores de riesgo para enfermedades crónicas

Luego de este reconocimiento del farmacéutico como un participante activo en el sistema de salud, Hepler y Strand introducen el concepto de "Atención Farmacéutica" en 1990,

que considera "la participación activa del farmacéutico para la asistencia del paciente en la dispensación de medicamentos y el seguimiento del tratamiento farmacológico, cooperando así con el médico para conseguir resultados que mejoren la calidad de vida del paciente" [16,17]. Incluye actividades que podrían enmarcarse en el ámbito de la clínica, como indicación de medicamentos de venta libre, prevención de la enfermedad, educación sanitaria, farmacovigilancia y toda otra actividad relacionada con el uso racional de los medicamentos. Además de dispensar medicamentos y dar consejo sobre los mismos cuando se le pide, el farmacéutico estaría asumiendo la responsabilidad de las necesidades del paciente relacionadas con el tratamiento farmacológico [15].

En los tiempos en que esta idea estaba surgiendo, la Organización Mundial de la Salud organizó dos congresos (en 1988 en Nueva Delhi y en 1993 en Tokio) con el objeto de definir "El papel del farmacéutico en el sistema de atención de salud" [18,19]. En estas reuniones se considera que la atención farmacéutica es aplicable en todos los países, independientemente de las diferencias en la evolución socioeconómica existentes entre ellos. La Atención Farmacéutica queda definida como "el compendio de las actitudes, los comportamientos, los compromisos, las inquietudes, los valores éticos, las funciones, los conocimientos, las responsabilidades y las destrezas del farmacéutico en la prestación de la farmacoterapia, con objeto de lograr resultados terapéuticos definidos en la salud y la calidad de vida del paciente" y se considera que "la Atención Farmacéutica es una actitud profesional a la que todo farmacéutico debe tender" [18,19].

Referencias bibliográficas

- [1] García Morente, M. (1994) Lecciones preliminares de Filosofía. 14ª ed. México, Editorial Porrúa.
- [2] Garrison, F.H. (1966) Historia de la Medicina. 4ª ed. México, Editorial E.C.L.A.L.S.A.
- [3] Esteva de Sagrera, J. (2008) La farmacia de las proporciones armónicas. De Tales a Hipócrates. *Offarm* 27:66-71.
- [4] Esteva de Sagrera, J. (2005) La farmacia alquimista. Metales sanadores. *Offarm* 24:84-9
- [5] Esteva de Sagrera, J. (2007) Paracélsica. Alquimia, magia y medicamentos. *Offarm* 26:108-14
- [6] Hadzović, S. (1997) Pharmacy and the great contribution of Arab-Islamic science to its development. *Medicinski arhiv* 51:47-50
- [7] Al-Ghazal, S.K. (2003) The valuable contributions of Al-Razi (Rhazes) in the history of pharmacy during the Middle Ages. *Jishim* 2:9-11
- [8] Ernst, E. (2005) Is homeopathy a clinically valuable approach? *Trends Pharmacol. Sci.* 26:547-8.
- [9] Esteva de Sagrera, J. (2006) La homeopatía. Interpretación histórica de un debate interminable. *Offarm* 25:86-91.
- [10] Reilly, D., Taylor, M.A., Beattie, N.G., Campbell, J.H., McSharry, C., Aitchison, T.C., Carter, R., Stevenson, R.D. (1994) Is Evidence for Homoeopathy Reproducible? *Lancet* 344:1601-16.
- [11] Bernard, C. (1865) *Introduction à l'étude de la médecine experimental*. París: Collège de France
- [12] Esteva de Sagrera, J. (2003) La farmacia, técnica y arte. *Offarm* 22:142-46, 2003.
- [13] Palacios, F. (1763) *Palestra Pharmaceutica, Chymico-Galenica*. Joachin Ibarra (Editor), Madrid.
- [14] Academias Nacionales. "En torno a 1810". Editorial AbeledoPerrot, Buenos Aires, 2010
- [15] Costas Lombardía, E. (2000) Análisis crítico de la atención farmacéutica. *Medicina General* 25:591-8
- [16] Hepler, C.D., Strand, L.M. (1990) Opportunities and responsibilities in pharmaceutical care. *Am. J. Hosp. Pharm.* 47(3), 533-43, 1990
- [17] Ministerio de Sanidad y Consumo (España). "Consensus on pharmaceutical care". *Ars Pharmaceutica*, 2001, 42: 221-241
- [18] World Health Organization. The role of the pharmacist in the health care system. Report of a WHO Consultative Group, New Delhi, India, 13-16 de diciembre de 1988
- [19] World Health Organization. The role of the pharmacist in the health care system. Report of a WHO Meeting, Tokyo, Japón, 31 de agosto-3 de septiembre de 1993

ADITIVOS ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EN ALIMENTOS, FÁRMACOS Y COSMÉTICOS. POSIBLES EFECTOS ADVERSOS

Acad. Miguel D'Aquino
Facultad de Farmacia y Bioquímica

Tabla de Contenidos:

Resumen - Summary

Introducción

Tipos: Sobre Alimentos

Sobre Fármacos

Sobre Cosméticos

Clasificación

Métodos de medición de eficacia

Características, propiedades de uso y

posibles reacciones adversas de algunas

sustancias Situación real en el uso de conservadores

Regulaciones

Conclusiones Referencias

bibliográficas

Resumen

Se realiza una revisión sobre los principales agentes antimicrobianos utilizados por diferentes vías como conservadores en los productos: alimentos, medicamentos y cosméticos.

Estos compuestos permitirán mantener la calidad desde el punto de vista microbiológico durante el almacenamiento, comercialización y uso de tales productos.

Se resaltan los tipos de riesgos que pueden dar lugar a la presencia de microorganismos:

Riesgos Sanitarios (con probabilidad de infección e intoxicación) y Económicos (con probabilidad de deterioros sobre el producto o principios activos).

Asimismo, se resaltan otros tipos de riesgos que son producidos por los compuestos conservadores, en especial, algunos de ellos.

Es importante remarcar que la clasificación de estos agentes químicos puede cambiar según nuevos estudios que se realicen sobre su seguridad de empleo.

De igual forma, se remarca la tendencia de hoy día a disminuir o anular la presencia de estas sustancias que podrían resultar un inconveniente para el organismo humano, reemplazándose por una tecnología limpia, extremándose el empleo de buenas

prácticas de elaboración y/o conocimiento adecuado de factores físicos o elementos naturales que tienden a disminuir dichos riesgos.

Se describen las características y propiedades de uso de dichas sustancias así como las regulaciones correspondientes.

Palabras clave

Aditivo antimicrobiano – conservador – preservación

Summary

This is a review on the main antimicrobial agents of external application, used as preservatives of products such as foods, medicines and cosmetics. These main antimicrobial compounds allow to keep the microbiological quality of the commercial products during storage, commercialization and general usage.

We stress on "Kind of Risks" that microorganisms may cause on products: 1. Sanitary Risks (intoxications and / or infections) and, 2. Economic

Risks (deterioration of the commercial products or even on the active components).

At the same time, the danger of the some preservatives on the human organism are described.

We also remark on the tendency of today to diminish (or even to avoid) the use of these antimicrobial chemical agents in such products, that may cause some symptoms in humans.

These chemicals may be substituted by a clean technology, maximizing the use of GMP in the elaboration, and a better knowledge of the physical factors (as well as on the natural materials to be used) with the aim to diminish the Risks of above. Finally, it is described the properties of use and characteristics of the antimicrobial agents ; as well as the effective-ness and the corresponding regulations.

Key Word

Antimicrobial aditive – preservative - preservation

Introducción

Desde el punto de vista técnico y según el Food Protection Committee of the Food and Nutrition Board, Natural Academy of Sciences, un aditivo es “ cualquier sustancia o mezcla de sustancias distintas a los componentes básicos”, que se hallan presentes en un fármaco, cosmético o en un alimento, como consecuencia de su producción, procesado, almacenamiento o envasado.

En el caso de fármacos, por ser éstos, medicamentos, debe tenerse en cuenta la ruta de administración, ya que no es lo mismo si el agente incorporado obre en forma tópica, en piel o mucosas, oralmente o en forma inyectable. Con los cosméticos, por ser éstos

Productos tópicos ó estéticos, obran principalmente por la epidermis. En cuanto a los alimentos, obran por vía oral, por lo que habrá que vigilar la toxicidad de los agentes que ingresen por esta vía.

Como aditivo antimicrobiano, se refiere a cualquier sustancia que se opone a la multiplicación de los microorganismos ya sea por una acción inhibitoria (microbiostática) o por una acción destructiva (microbicida). Ello se logra a través del uso de aditivos antimicrobianos llamados Conservadores, ó a

través de las Buenas Prácticas de Elaboración, esto último representa uno de los aspectos más importante de la garantía de calidad en la elaboración de los productos mencionados, ya que originarían un ambiente hostil al crecimiento microbiano. Ambas acciones permitirán sostener la calidad desde el punto de vista microbiológica durante el almacenamiento, comercialización y uso.

La presencia de microorganismos en uno de esos productos puede significar un riesgo sanitario por la probabilidad de una infección o intoxicación, o un riesgo económico por el deterioro que puede producir sobre el producto o sobre un principio activo. Por ello la preservación se hace necesaria, si bien hoy día existe una tendencia a disminuir o anular la presencia de distintos tipos de aditivos antimicrobianos químicos, que podrían resultar un inconveniente para el organismo humano, hay productos que resultan imposibles de obviar a este elemento. En el caso de obviarlos, se habla de una tecnología limpia, extremando las buenas prácticas, emplear diversos factores físicos que inciden sobre la vida microbiana, o utilizar agentes naturales.

Si la persistencia microbiana se mantiene puede dar lugar a todos esos inconvenientes señalados. La Farmacopea Europea establece límites de presencia de microorganismos en los medicamentos que varían con el tipo de producto (1) y el uso al que está destinado. Si bien se ha mejorado la situación con posterioridad a 1970 (2) el problema puede existir aún en los medicamentos sobre todo oculares en productos multidosis (3), así por ejemplo, en USA se han descrito daños microbiológicos por acumulación durante el uso de cosméticos (4) y en otros países europeos también hallaron lo mismo.

Los informes por lo general, describen como protagonistas principales a especies Gram negativas, como ser pseudomonas, así como esporas de bacterias y hongos; no obstante, otros tipos de bacterias fueron señaladas. Por lo general, los productos con tenor de agua, revelan a bacterias Gram negativas.

El significado clínico y farmacéutico de las contaminaciones de medicamentos ha sido estudiado por varios autores (5) y en los cosméticos por (6). La implicancia del deterioro en ambos tipos de productos fue informado por tales autores.

Se tendrá presente que en cualquiera de los productos, el riesgo que pueda ocurrir sea económico ó sanitario dependerá de la especie microbiana presente, dosis infectante, ruta, y resistencia del

huésped, sobre todo en el último tipo de riesgo, caso por ejemplo de personas inmunodeprimidas. En la presente revisión no se descuida otro tipo de riesgo que puede ser motivado por la misma sustancia conservadora y que ha dado lugar a numerosos debates sobre el empleo de la misma. No ha sido posible por lo extenso, tratar este aspecto con todas las sustancias utilizadas pero el enfoque principal se ha hecho con algunas de ellas muy comunes en los diferentes productos.

La incorporación de un conservador, no siempre puede ser deseable, si bien otorga una adecuada

protección, muchas veces se hace necesario reforzar la misma, por lo común, combinando o cambiando componentes de la formulación, a fin de disminuir o bloquear la multiplicación microbiana, esta acción forma parte de la protección de alimentos, donde el añadido de un conservador se halla rígidamente limitada.

Los aspectos básicos, como ser factores que condicionan la protección de alimentos, medicamentos y cosméticos fueron establecidos por diversos autores (9-14) remitiéndose a ellos para profundizar los mismos.

Tipos

Aditivos antimicrobianos utilizados sobre Alimentos:

Son compuestos añadidos voluntariamente para preservar un alimento, principalmente son agentes químicos, ya que la preservación podría realizarse por métodos físicos, desde tiempo remotos se han utilizado a elementos químicos, tal como sal común, vinagre, humo, etc. Pero hoy día se utilizan a algunos de estos agentes, como ser ácido cítrico o acético, que por sobre todo no deben aportar toxicidad y además se tiene en cuenta los niveles a los que el Hombre se halla expuesto así como su clasificación legal, no obstante, muchos podrían ser reconsiderados de acuerdo a nuevos estudios que aporten más datos sobre la inocuidad de los mismos. La FDA (Food and Drug Administration) considera a un subgrupo de sustancias que por lo general son seguras, se las denomina sustancias GRAS (Generalmente Reconocidas Como Seguras), (15) entre ellas se encuentran:

Ácido acético y su sal sódica, potásica y cálcica	Dióxido de azufre
Ácido benzoico y su sal sódica, potásica y cálcica	Dióxido de carbono
Ácido láctico	Glicoles
Ácido propiónico y su sal sódica, potásica y cálcica	Etanol
Ácido sórbico y su sal sódica, potásica y cálcica	Lisozima
Bacteriocinas	Metilparabeno
Butilhidroxianisol (BHA)	Propilparabeno
Butilhidroxitolueno (BHT)	Metabisulfito sódico
Bisulfito sódico	Natamicina
Bisulfito cálcico	Nisina

Aditivos antimicrobianos utilizados sobre fármacos y cosméticos

Muchos de ellos son comunes con los anteriormente mencionados, pero se añaden otros compuestos que se hallan prohibidos para una ingesta de alimento o medicamento, ya que no se consideran GRAS, y que por otra parte forman parte de formulaciones más complejas donde es necesario muchas veces combinarlos en un verdadero sistema preservativo, donde se involucran no solo la mezcla de agentes, sino el rol de diversos factores físicos y otros constituyentes de la formulación. Entre ellos tenemos:

Ácido benzoico y sus sales	Feniletanol
Ácido bórico	Fenilmercurio
Ácido dehidroacético	Fenoxietanol
Ácido sórbico y sus sales	Hexametilentetramina

Alcohol bencílico	Imidazolidinil urea
Aldehidos	Metilcloroisotiazolinona y metil-
Amonios cuaternarios	isotiazolinona (Kathón CG)
Biguánidos	Parabenos
Bronopol	Plata
Clorobutanol	Propilenglicol
Diazolidinil urea (Germal II)	Quaternium 15 (Dowicill 200)
Dimetiloldimetil hidantoina (Glydant)	Mercuriales
Etanol	Triclosan (Irgasan DP 300)
	Compuestos mezclas

Clasificación:

Sin tener en cuenta la finalidad de uso, pues ésta se basa en las características, pautas y reglamentación correspondiente, un intento de clasificación podría tener en cuenta su agrupación química, por lo que se clasificarían en:

Derivados alcohólicos: etanol, bencílico, fenoxietanol, etc.

Derivados de ácidos orgánicos e inorgánicos: benzoico, sórbico, bórico, etc. Derivados biguánidos: clorhexidina, derivados poliméricos, etc.

Derivados de amonio cuaternario: benzalconio, cetrimida, de 3ra. generación, 4ta. generación, etc. Derivados nitrogenados heterocíclicos: diazolidin urea, imidazolidin urea, etc.

Liberadores de formaldehído: dimetiloldimetilhidantoina, quaternium, etc. Derivados fenólicos: feniletanol, cresol, xilenol, etc.

Derivados biológicos : bacteriocinas, lisozima, antibióticos. Derivados azufrados: sulfitos, dióxido de azufre, etc. Derivados metálicos : plata, mercurio, etc.

Derivados ésteres de hidroxibenzoico : parabenos (p-hidroxibenzoato de metilo, de propilo, etc.)

Si bien los fármacos y cosméticos son diferentes en su accionar, poseen bastantes similitudes en su estructura y esto trae como consecuencia una manifestación de problemas microbiológicos que induce al añadido de aditivos antimicrobianos a fin de evitar deterioros o vehiculizar organismos patógenos.

La selección de estos agentes constituye un tema complejo ya que pocas sustancias poseen todas las características necesarias para esa finalidad.

Por otra parte la selección de un antimicrobiano, debe tener en cuenta consideraciones sobre las propiedades de la formulación, pues ésta por lo general puede atentar contra la eficacia de un agente conservador por lo que hay que tener muy en cuenta el diseño de una fórmula.

Se han realizado numerosos intentos para aumentar la eficacia de un conservador, ya sea por mezcla de los mismos aprovechando sus características antimicrobianas o a través del uso de agentes potenciadores.

También es posible modificar su coeficiente de reparto, reduciendo el alcance de la migración a regiones lipofílicas, lo que se consigue añadiendo cosolventes hidrofílicos a fin de modificar el coeficiente aceite:agua y distribución de micelas para favorecer la conservación de la fase acuosa. Tenemos el ejemplo de Blomfield que modificó la mejora de eficacia de los parabenos en una emulsión con pequeñas cantidades de etanol o glicoles como cosolventes hidrofílicos.

Otros ejemplos de mejora puede observarse con: Mezcla de parabenos

Imidazolidinlurea más parabenos

Parabenos más fenoxietanol

Clorocresol más fenoxietanol

Etilendiaminotetracético con compuestos cuaternarios, parabenos, ácido sórbico. Imidazolidinurea más lauricidina

De igual forma, las fragancias pueden incrementar el poder protector, así como la existencia de una acción sinérgica entre la mezcla de acetatos con lactatos y propionatos.

En cambio pueden existir empeoramientos en otras mezclas, como ser: Ácido sórbico con parabenos

Benzalconio con clorocresol

Como puede haber interacciones en una formulación compleja entre microorganismos y conservadores, no se puede predecir muchas veces el grado de precisión efectiva de un agente químico. Esto nos lleva a obtener alguna seguridad sobre la performance del compuesto, para ello debe realizarse un ensayo de efectividad microbiológica sobre la formulación completa ó el producto que debe ser conservado.

Métodos de medición de eficacia

Existen diversos ensayos para determinar eficacia de conservadores que comparten muchas características similares, no obstante varían significativamente la interpretación de los resultados.

Los productos son desafiados mezclándolos en forma homogénea con suspensiones de microorganismos, que pueden variar según la metodología e incubándolos a temperatura ambiente durante un tiempo determinado.

Para ello se pueden utilizar métodos oficiales, de Farmacopeas o Instituciones y procedimientos no oficiales de igual valor pero que permiten determinaciones en un tiempo más corto, lo que facilitaría realizar el estudio con numerosos productos simultáneamente.

Entre los primeros se encuentran los especificados por la Farmacopea de los Estados Unidos, Británica, Europea (UE), Argentina, CTFA (Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association) y ASTM (American Society for Testing Materials) (16) (17) (18) (19).

Entre los segundos se encuentran el método de Regresión Lineal (RL) y el Ensayo Presuntivo Acelerado (APT) (20) (21), ensayos que permiten obtener resultados dentro de las 48 horas y que resultan muy útiles en los diseños de productos, a fin de no dilatar los tiempos.

Los métodos recomiendan efectuar el ensayo con una concentración de 1×10^6 / g/ml para bacterias y 10^5 /g/ml para hongos.

Con respecto al tipo de cultivos, se realizan en general con cultivos puros, pero algunos como CTFA y ASTM, señalan que pueden efectuarse con cultivos mezclas, dado que en esta forma, pueden reflejar en forma más aguda la contaminación normal de un producto, no obstante, un cultivo puro puede exhibir mayor resistencia a un conservador.

En síntesis las diversas metodologías oficiales en su interpretación de reducción de microorganismos frente a un conservador incógnito, poseen un denominador común y es lo que ocurre en 7 días y 14 días, según las distintas categorías de formulación de fármaco ya sea oftálmico, tópico u oral según la tabla siguiente:

Interpretaciones de las diferentes Reglamentaciones

METODOLOGIA	BACTERIAS	HONGOS
USP Oftálmicos Tópicos Orales	3 log en 14 días 2 log en 14 días 1 log en 14 días	No > en 14 y en 28 días “ “ “ “
BP Oftálmicos Tópicos Orales	3 log en 6 h 3 log en 48 h 2 log en 7 días	2 log en 14 días 2 log en 14 días No > en 14 días
UE Oftálmicos y parent. Tópicos Orales	2 log en 6 h – 3 /24 h <i>(1 log en 24 h -3/7 días)</i> 2 log en 48 h 3 log 7 días <i>(3 log en 14 días)</i> 3 log en 14 días	2 log en 7 días <i>(1 log en 14 días)</i> 2 log en 14 días <i>(1 log en 14 días)</i> 1 log en 14 días
CTFA	3 log en 7 días	1 log en 7 días
ASTM	3 log en 7 días No incremento en tiempos sucesivos	Levaduras 3 log en 7 días Hongos 1 log en 28 días No incremento en tiempos sucesivos

Referencias: lo existente entre paréntesis y en itálica, significa satisfactoria cuando No puede hallarse la efectividad recomendada, sin paréntesis.

Por lo general, los productos deben ser preservados adecuadamente, sobre todo teniendo en cuenta el uso que se les va a dar. Las recomendaciones se hallan siempre en revisión

Características y propiedades de uso de algunos compuestos utilizados sobre todo en forma masiva; y posibles acciones adversas a tener en cuenta:

Se comentará a continuación los rasgos principales de algunas sustancias utilizadas en los diferentes productos, dado que no es motivo de esta revisión describir a todos ellos, por tal razón, se tomarán como modelos varias sustancias de los distintos derivados químicos. Algunos de ellos pueden utilizarse en cual-quier clase de productos (fármaco, cosmético o alimento) como los parabenos o benzoatos. Se describirán los más comunes:

Aditivos antimicrobianos de uso en fármacos y cosméticos:

Derivados catiónicos: amonio cuaternarios y biguánidos

El amonio cuaternario más común es el cloruro de benzalconio, (alquildimetilbencilamonio) (22) que es un compuesto de primera generación, surgiendo posteriormente otros derivados de estos compuestos y otras generaciones, como ser la segunda, (alquildimetiletilbencilamonio). la cuarta (didecildimetilamonio) y así se continúan las modificaciones, hasta siete. Cada una de esas generaciones dispone de mejor performance y ventajas en cuanto a incompatibilidades como ser el agua dura, ya que ésta antagoniza la acción de los compuestos catiónicos; también disminuyen la toxicidad y la sensibilidad al antagonismo de sustancias orgánicas. Como ejemplo de toxicidad en las nuevas generaciones (22) podemos apreciarla de acuerdo a su LD50 en la siguiente tabla:

Compuesto	Generación	LD50 mg/Kg ratas
Benzalconio	1°	300
BTC 2125	3°	700
Didecildimetilamonio	4°	500-700
Onámero M (poliquaternium 1)	7°	4.470
<i>Otros cuaternarios</i>		
Cetilpiridinio		200
Bencetonio		360
Dowicil 200		2.200
Cetavlon (Cetrimida)		44

El cloruro de benzalconio, posee la apariencia de un polvo blanquecino, pero comúnmente se lo encuentra al 80%, es muy soluble en agua y alcohol, su pH óptimo oscila de 4 a 10, pero obra mejor a pH alcalinos. Es un compuesto estable a temperatura elevada de 120° C por lo menos durante 30 minutos. Es incompatible con los compuestos aniónicos como los jabones, así como con los nitratos, citratos y elementos orgánicos como suero, sangre, proteínas que pueden inactivarlo, esta acción se logra también con lecitina y tensioactivos no iónicos como el Tween 80. Su actividad se manifiesta principalmente sobre las bacterias Gram positivas, su CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) para *S.aureus* es de 10 mg/Litro

Puede hacerla además sobre ciertas bacterias Gram negativas, por lo general en forma conjunta con un agente secuestrante como el EDTA; las concentraciones de uso van de 0.01 a 0.1% .

Biguanidos: son compuestos catiónicos con características similares a los amonios cuaternarios en cuanto a sus incompatibilidades, poseen mejores actividades antimicrobianas y se utilizan mucho como conservadores siendo su principal representante la clorhexidina que posee un alto espectro de actividad y baja toxicidad. (LD50 2.500 mg/kg), Son de acción rápida y duración prolongada. Su actividad resiste bastante en presencia de material orgánico. Se utilizan por otra parte, derivados poliméricos como el PHMB (polihexametilenbiguanido) y PHMG, (polihexametilenguaniidina) con muy buena actividad para los microorganismos
Ambos con toxicidad baja (LD50 5.000 mg/Kg el PHMB y mayor de 5000 mg la sol.1% del PHMG). El CIM para *S.aureus*, es de 20 mg/Litro

Liberadores de formaldehído: Si bien el formaldehído no se utiliza como conservador en los medicamentos, su uso como tal en los cosméticos es limitado a 0.2%, por sus acciones tóxicas, el CIM para *S.aureus*, es de 125 mg/Litro. Sin embargo se utilizan otros compuestos que gradualmente liberan al aldehído, pero en concentraciones más bajas, tal como la **Imidazolidinil urea (Germal 115)**, sustancia que es efectiva al 0.2%, tanto para bacterias Gram positivas como bacterias Gram negativas así como para determinados eumycetes (hongos y levaduras) **Diazolidinil Urea (Germall II)**, con actividad antibacteriana mayor que el Germall 115, al 0.2%, y con una actividad mejor para los eumycetes. **Dimetiloldimetil hidantoina**, de amplia actividad contra las bacterias, pero requiriéndose mayor concentración para eumycetes, dosis de 0.4 y 0.6% como máximo son las aconsejables.

Metilcloroisotiazolinona y metilisotiazllinona (Kathón CG), producto muy activo sobre bacterias y eumycetes en concentración de 0.05 y 0.15%. **Hexametilentetramina (Urotropina)**, que se utiliza en alimentos, sobre todo pescados en concentración de 0.02 y 0.03% pero su uso se sigue discutiéndose por la liberación del formaldehído.

2-bromo-2-nitropropano-1-3 diol (Bronopol), que es solamente activa sobre bacterias Gram positivas y se usa en cosméticos en dosis de 0.01 y 0.1%. El National Cancer Institute (NCI) llamó la atención sobre la imidazolidin urea como resultado de la liberación de formaldehído en un producto cosmético de uso dérmico, combinado con parabeno, sobre todo si la misma excede el 0.3% y presenta una exposición larga ó crónica. No hay estandar ó guía establecida por NIOSH (Nacional Institute for Occupational Safety and Health), ni OSHA (Occupational Safety

Health Association), ya que se encuentra en lista 3 (inertes de toxicidad), en la Unión Europea se permite hasta el 0.6% y en Japón hasta 0.3 %. En general no se encuentran estudios epidemiológicos sobre exposición y riesgos de cáncer. Investigaciones realizadas en el Reino Unido durante 10 años, sobre 5.000 productos, parece demostrarse una frecuencia de alergia dermatológica de 0.99%. Su LD50 oral es de 2.600 mg/kg y dérmica en conejo es mayor de 8.000 mg; el CIM de esta sustancia para *S.aureus* es de unos 1.000 mg/Litro. La mutagenicidad con el Test de Ames es positiva en algunos casos con concentraciones superiores, a las concentraciones de uso, con y sin sistema microsomal.

La liberación de formaldehído en cosméticos se produce entre 10 y 60 grados y a un pH aproximado de 6.

Con diazolidin urea ocurre algo similar su CIM es de 250 mg/Litro: pero aún se hallan en discusión estas acciones tóxico-genéticas.

Alcohol bencílico: líquido con aroma suave, puede hallarse en forma natural en flores y plantas. Su solubilidad en agua es baja hasta un 4%, mucho más miscible lo es en alcohol de alta graduación. Actúa óptimamente a pH ácido no mayor de 5. Lentamente se oxida a benzaldehído. Se inactiva con agentes no iónicos, dilución y agentes oxidantes; se lo utiliza en concentración entre 1 y 3 %. Es activo frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Su CIM para *S.aureus* es de 120 mg/ml. Se halla contraindicado en niños menores de 3 años.

2-Fenoxietanol: derivado fenólico alcohólico, líquido oleoso de aroma suave, miscible con alcohol y propilenglicol, poco soluble en agua (2.67%).

Su pH óptimo posee un amplio margen,. Muy estable aún calentado en autoclave, incompatible con agentes oxidantes y con elementos no iónicos; en cambio, es compatible con compuestos catiónicos y aniónicos. Se lo utiliza en

concentración de 0.5 a 2%. Muy activo frente a bacterias Gram negativos, por lo que puede combinarse con otros compuestos no tan activos frente a éstas. Su toxicidad es baja, y se lo ha propuesto como reemplazante del tiomerosal en vacunas, pero puede traer hipersensibilidad en la piel. En la piel de conejo la sensibilidad es baja en 24 hs, es de 500 mg dosis más elevada que lo que se utiliza como conservador, mientras que el ensayo de irritación ocular es leve, siendo de 0.25 mg en 24 hs. En general la DL50 oral en ratas es de 1,2 g/Kg.y su CIM para *S.aureus* es de 2.000 mg/Litro.

Algunas vacunas utilizan a esta sustancia como alternativa del timerosal.

Mercuriales: Solamente trataremos a estos compuestos como su uso en la conservación, ya que son compuestos que por sus propiedades tóxicas, han sido dejado de lado; no obstante se emplean algunos derivados en la antisepsia, como agentes de bajo nivel (23) Pero por la importancia que tienen en su relación con ciertas afecciones neurológicas, discutiéndose el pro y contra del empleo de estas sustancias en la conservación, la revisión se extenderá un poco.

De estos compuestos solamente los derivados orgánicos del mercurio en bajas concentraciones suelen emplearse como conservador en gotas oftálmicas ó en vacunas. Principalmente el agente más ampliamente utilizado es el timerosal que ha sido incorporado a vacunas sobre todo de multidosis desde 1930 (24), es el derivado etilmercurio, que posee aproximadamente un 50 % de mercurio; por lo tanto el timerosal se metaboliza a etilmercurio y tiosalicilato. Pero es interesante señalar que desde las últimas décadas, se ha cuestionado su uso por considerársele neurotóxico .

De los derivados orgánicos el metilmercurio es el más estudiado por sus acciones tóxicas en el sistema nervioso central sobre todo en niños pequeños.

Diferentes organismos internacionales han establecido límites máximos a esta sustancia en población adulta de 60 kg. de peso (25):

EPA (Environmental protection agency): 0.10 µg/kg/de persona/día

FDA (Food and Drug Administration) : 0.43 µg/kg/de persona/día

OMS (Organizacion Mundial de la Salud): 0.47 µg/kg/persona/día

Pero se ha establecido que la dosis establecida por EPA, es la más indicada sobre todo para mujeres embarazadas a fin de evitar riesgos tóxicos para el sistema nervioso central del feto.

Como se desconocen los niveles de etilmercurio, se suele homologar con los límites ya establecidos del metilmercurio.

En un estudio de revisión la Academia Americana de Pediatría (26) a fin de estudiar evidencias de toxicidad del timerosal como conservante de vacunas concluye que no hay evidencias de toxicidad; no obstante sugiere que la vacunación de niños con vacunas que poseen timerosal, podría dar lugar a niveles de acumulación que superan los niveles aconsejados por EPA. Se desconocen en general la acción de los niveles a largo plazo.

Según FDA y la Academia, los niveles alcanzados en el calendario de vacunas normal de un niño no serían tóxicos. No obstante la FDA insiste sobre los industriales la minimización ó eliminación de este conservador en las vacunas (27).

Muchos estudios se basan en investigaciones de laboratorio y epidemiología sobre metilmercurio, pero el timerosal por tratarse de etilmercurio es una entidad química diferente. El metilmercurio, que puede tener un origen natural, se acumula en el organismo y permanece largo tiempo, mientras que el etilmercurio no se acumula sino que se metaboliza, eliminándose más rápidamente; se tendrá en cuenta que el etilmercurio posee una vida media de 7 días comparada con la del metilmercurio que va de 20 a 70 días (28).

Dada la duda que se plantea en la valoración del riesgo, la FDA considera equivalente los estudios realizados con ambas sustancias.

De igual modo que FDA, CDC (Center for Diseases Control) urge por retirar el timerosal de las vacunas ó su reducción a trazas inferiores a 1 µg de Hg en las dosis.

Un problema que dio lugar a la consideración de riesgos del empleo del mercurio, es su relación con el **autismo**, el cual produjo diversos debates sobre toxicidad en niños, ya que existe una hipótesis que señalan la relación de esta afección con la presencia de este conservador; se recordará que el timerosal posee el 49,6% de mercurio.

En USA, la mayoría de niños que recibieron 4 dosis de vacunación DPT (difteria-tos ferina-tétano), 4

dosis de *Haemophilus influenzae* tipo b y 3 dosis de Hepatitis B, habían recibido habían recibido una dosis total de etilmercurio comprendida entre 187.5 y 237.5 µg en los primeros 6 meses hasta 2 años (29). Estudios epidemiológicos y farmacocinéticas publicados en 2004 por una serie de investigadores (30) sobre asociación entre el timerosal y autismo así como vinculaciones con otras patologías neuro-lógicas y concluyeron que epidemiológicamente no hay ninguna asociación y que la farmacocinética demuestra poco probable esta relación

Se podría sumar a esta información, los estudios llevados a cabo en Dinamarca en 4 años sobre una población elevada de niños (31), donde no detectaron relación alguna entre el uso del timerosal y el riesgo de adquirir síndromes autistas. No se detectó correspondencia entre dosis respuesta y exposición al etilmercurio; las tasas de riesgo obtenidas fueron iguales ó inferiores en niños expuestos al etilmercurio en comparación con los no expuestos.

Aditivos antimicrobianos de uso polivalente:

Etanol: líquido claro e incoloro de aroma característico, muy miscible con el agua, glicerina y otros solventes. Actúa óptimamente a pH ácido; es inflamable y volátil. Puede inactivarse con compuestos no iónicos, así como con los cloruros, proteínas y agentes oxidantes fuertes, metales alcalinos y alcalinos térreos, dilución y algunos antibióticos. Como conservador se lo utiliza en concentraciones no inferiores al 10%. Es activo frente a bacterias y hongos, no contra esporas.

Derivados de ácidos orgánicos y sus ésteres

Ácido benzoico y sus sales: polvo blanco poco soluble en agua bajo forma ácida (0.29%), mucho más su sal sódica (55%), posee una constante de disociación (pKa) de 4.2, lo que permite obrar bien en compuestos con pH ácidos menor de 5, resultando más estable (32). Pierde efectividad en presencia de compuestos no iónicos, tensoactivos catiónicos y sustancias proteicas. La actividad antimicrobiana se realiza en base a su forma no disociada, a pH 4.2, el 50% lo es, mientras que a pH 7 sólo lo es el 0.16%. Su actividad se manifiesta frente a bacterias Gram positivas, mohos y levaduras y la concentración de uso

varía del 0.1 al 0.5%. Es una de las sustancias más utilizadas en todo el mundo y especialmente eficaz en alimentos ácidos. En algunos países no está permitido su uso. La OMS considera aceptable la IDA (Ingesta Diaria Aceptable) de 5 mg/kg de peso corporal /día. Su CIM para *S.aureus* oscila entre 50 y 100 mg/Litro. Algunas legislaciones son más estrictas. Italia y Portugal prohíbe su uso en refrescos, se trata de sustituir por otras sustancias menos tóxicas como los derivados del ácido sórbico. Se lo considera como un potencial sensibilizador, tanto por vía oral como tópico, causando reacciones de intolerancia (33). El benzoico podría tener acción teratogénica, pero JECFA (Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios) mantiene el ya IDA establecido, demandando investigaciones mayores al respecto (34). En fármacos y cosméticos se utiliza en concentraciones de 0.1-0.5%.

Ácido sórbico y sus sales: Polvo cristalino de forma acicular. Poco soluble en agua (0.25% a 30° C y 3.8% a 100° C) a pH 4.7 su forma no disociada constituye el 50%. Pierde efectividad en presencia de compuestos no iónicos y por la dilución. Presenta poca actividad sobre las bacterias en cambio es más activo frente a mohos y levaduras. Las concentraciones de uso oscila de 0.1 a 0.3 %, y está permitido en todos los países. En presencia de oxidantes pierde estabilidad. Carece de acciones tóxicas ni mutágenas ni cancerígenas. La LD50 en rata es de 10.5 g/kg de peso, el CIM para *S.aureus* oscila entre 50 y 100 mg/Litro. Puede irritar mucosas en personas muy sensibles, es rápidamente biodegradable en suelo y aguas residuales.

Productos en ebullición, pueden perder parte de ácido sórbico y son algo sensibles a la oxidación (35).

Parabenos: Nombre genérico de un grupo de sustancias empleadas como conservadores en los tres tipos de productos que estamos tratando y en forma masiva y que merecen unas palabras por sus posibles inconvenientes ya que hoy día son motivos de muchos debates. Alrededor de 400 especialidades farmacéuticas muy comunes poseen a estos compuestos y también los productos cosméticos en especial cremas para bebés y cremas dérmicas para pechos o antitranspirantes que

son muy observados.(36). Es interesante señalar, que pese a su amplio uso en cosméticos, fármacos y alimentos, se está cuestionando el mismo principalmente en Europa, principalmente los derivados sintéticos. Éstos son considerados dentro de los productos xenoestrógenos por ciertas características tóxicas y carcinogénicas. Este tipo de sustancias destruyen la respuesta hormonal natural, bloquean a los receptores naturales y un elevado exceso de estrógenos conduce a disminución de progesterona pudiendo provocar síntomas premenstrual, alteración de espermatogénesis, cáncer de mamas y de útero, de igual forma que lo que ocurriría con otros tipos de sustancias tales como los ftalatos y ciertos plaguicidas empleados en productos masivos aún en los ecológicos.

Si bien los parabenos generalmente son considerados seguros, pues la DL50 para el ratón, como mutagénico es de 8 g/kg, el CIM para *S.aureus* es de unos 800 mg/Litro para el derivado metilado y de 150 mg/Litro para el derivado propílico; no se acumulan y eliminan por orina, siendo menos tóxicos que los benzoatos, recientes investigaciones sugieren que al ser considerados estrogénicos actúan en una variedad de líneas celulares de cáncer de pecho y también en ensayos sobre útero de ratas y ratones.

Se señala que los parabenos pueden alterar el comportamiento del estrógeno; pero no existen suficientes evidencias

La polémica sobre estas sustancias, consideradas interferentes endócrinos, se inició en el año 2004 (37) donde, en un estudio sobre 20 muestras se vio que el 90% de ellas acumuló parabenos en los tejidos de tumores de senos humanos (38) pero el estudio no probó que los parabenos originaron los tumores (39), ni se confirmó que el origen provino de los antitranspirantes, aún cuando en 2002 se habían informado sobre estudios de relación entre antitranspirantes y cáncer, pero tampoco se demostró un riesgo mayor entre las mujeres que usaban antitranspirantes sobre aquellas que no lo usan. Todo esto último ha dado lugar a un amplio debate desde ese año, que todavía no ha finalizado. También en UK (Reino Unido) advirtieron sobre el hallazgo de restos de parabenos en mujeres con cáncer de mama. Parece ser que estos compuestos pueden mimetizar la acción estrogénica, de acuerdo a la publicación de un estudio que indicaba

que se habían encontrado trazas de parabenos en tejidos cancerosos sobre todo de mamas. Esos agentes colocados en áreas adyacentes al pecho (axilas) como ser los compuestos antitranspirantes, se absorben por la piel, e interfieren con la circulación linfática pudiendo originar toxinas en los senos y promover crecimiento cancerígeno, principalmente en células dañadas. Algunos señalan la hipótesis de que la acción estrogénica de los parabenos, se efectúa elevando el nivel del estrógeno a través de la inhibición de sulfotransferasa estrogénica, al butilparabeno se le atribuye como el más poderoso para este fin. Pero no existen pruebas concluyentes al respecto (40)

. No obstante, la Asamblea Nacional Francesa ha aprobado una legislación que prohíbe la producción, importación y venta de productos que contienen parabenos. Pero las agencias de seguridad en salud, se hallan todavía considerando el tema y sus informes; se espera que sea para principios de 2012 ó antes. Por otra parte y en relación a la seguridad de productos cosméticos, el Parlamento Europeo publicó el Reglamento 1223/2009 que entró en vigor el 11 de enero de 2010 y será aplicable en julio de 2013 a fin de garantizar la seguridad de los productos cosméticos y sus ingredientes como ser los conservadores.

Si bien obran como estrógenos, la actividad es muy débil, son 10.000 veces más débiles que los fito-estrógenos y 100.000 veces más débiles que el estradiol. Los estudios realizados sobre animales se observaron con dosis muy elevadas (más que su uso con condiciones normales).

Pero se recordará que la FDA considera tanto al metil como propil parabeno, sustancias GRAS, es decir seguras para su uso. Estos compuestos se utilizan desde hace mucho tiempo y se hallan también en la naturaleza, arándanos, toronjas, etc.: son ésteres de ácido p-hidroxibenzoico: se conocen el metil, etil, propil, butil y sus sales sódicas. Los más comunes son el éster metílico (nipagín) y el éster propílico (nipasol). El metil y etil se utiliza en dosis límites de 0.4% y el propil y butil en dosis límites de 0.19% . (39) . También se encuentran los derivados iso (isobutil-isopropil) que no son seguros ya que requieren de mayores estudios antes de continuar con su uso. Cuando se emplean mezclas de ésteres en cosmética se acepta hasta un 0.8% en forma combinada total.

Se presentan como polvo blanco cristalino actuando en un amplio margen de pH (3-9.5): son sustancias estables, pero la estabilidad decrece cuando el pH aumenta, pueden hidrolizarse en pH fuertemente alcalino. En medio ácido resisten muy bien el calor de autoclave: son sensibles a la exposición intensa de luz.

Aún cuando la Comunidad Europea ha confirmado la seguridad de los parabenos. El SCCS (Comité Científico sobre la Seguridad del Consumidor), en su trabajo "Opinión sobre Parabenos" , (41) considera que el empleo del butilparabeno y propilparabeno son seguros como conservadores en cosméticos en las concentraciones señaladas con anterioridad.

Reducen su actividad con agentes aniónicos, no iónicos metilcelulosa , proteínas y povidona. Las sales de hierro incompatibilizan su acción.

Son activos principalmente frente a las bacterias Gram positivas, mohos y levaduras. Para Gram negativos es aconsejable compartir la acción con otro conservador como el fenoxietanol. Comercialmente se lo encuentra con el nombre de Phenopip, que es una mezcla de fenoxietanol con los cuatro ésteres. .

Aditivos antimicrobianos de uso en alimentos

Sulfitos: Como ejemplo de un conservador en alimentos, el empleo del dióxido de azufre fue una práctica común en la conservación desde la antigüedad, sobre todo en la elaboración del vino, pero también es el que tuvo muchos siglos de prohibiciones y limitaciones. Su uso puede hacerse bajo distintas formas tales como: sulfito de sodio anhidro (50.82% de SO₂), bisulfito sódico (61.56%), sulfito cálcico (64.00%), metabisulfito sódico (67.39%), y metabisulfito potásico (57.68%) (42) . Es eficaz en medios ácidos inhibiendo bacterias y mohos; se lo emplea en productos de panadería, jarabes, bebidas, cerveza, vinos, frutas secas, vegetales, fiambres, jugos, etc. Su uso requiere de control debido a que se le atribuyen diversos efectos adversos en humanos, sobre todo por su ingesta a personas sensibles, principalmente asmáticos y personas con trastornos del metabolismo de azufre (déficit sulfito oxidasa). Ocasiona dermatitis, cefalea, irritación del tracto gastrointestinal, puede ocasionar shock anafiláctico. Cuando el sulfito se añade al alimento, sufren una disociación según las condiciones existentes dando

un equilibrio de los diferentes componentes (43). El sulfito disociado (generalmente bisulfito) puede unirse a ciertos elementos del alimento en forma reversible o en forma irreversible; al conjunto total ingerido se lo llama sulfito combinado. El reversible se une a aldehídos, cetonas, quinonas, etc. Formando derivados hidroxisulfonados. El irreversible se une a compuestos aromáticos y forma ácidos sulfónicos. El que no se encuentra ligado al alimento es el sulfito libre que continúa estando disociado. Por lo tanto el sulfito total ingerido, es la sumatoria del libre y combinado.

Las dosis utilizadas depende de los productos, en vegetales es de 0.01 al 0.2%: en mostos de vinos de poca acidez es de 50 mg de SO₂/ litro. En Europa el IDA (Ingesta Diaria Aceptable) de sulfitos es de 0-0.7 mg/Kg de peso. La FAO y OMS desde 2009 se halla estudiando la ingesta de este elemento en algunos grupos de personas.

Algunos alimentos pierden su valor nutricional debido a la capacidad del sulfito en descomponer la tiamina (vit.B1) en sus componentes no activos pirimidínicos y tiazólicos, por tal razón debe añadirse el mínimo necesario en alimentos ricos en vitamina B1 (carne). Los sulfitos no poseen efectos carcino-génicos, ni teratogénicos. Pero podría tener efecto mutagénico en microorganismos.

La LD50 para un efecto agudo en ratas es de 1.000-2.000 mg SO₂/kg de peso

Legalmente el dióxido de azufre y sulfitos se hallan permitidos en todos los países para conservar alimentos, en especial vegetales y vino. La inhibición de bacterias puede lograrse con concentraciones de 500 a 1.000 ppm, a pH6 y según la especie bacteriana; las levaduras y mohos requieren entre 800 y 2.800 ppm a pH 3.5-4 . En mostos de uva para vino con poca acidez, se requiere entre 40 y 50 mg de SO₂/litro.

La FDA requiere que los alimentos como vegetales frescos sometidos a la acción de esta sustancia debe señalarlo en etiquetas, tolerándose hasta 10 ppm de SO₂

Ácido propiónico y sus sales sódica y cálcica:

Utilizados desde hace mucho tiempo como antimicrobiano en productos de panadería, su toxicidad es baja, la toxicidad aguda en base a LD50 en ratas es de 2.6 g/kg de peso y su CIM para *S.aureus* es de 2.000 mg/Litro. La concentración máxima permisible en un ambiente laboral de ácido propiónico es de 30 mg/m³. Según SCE (Comité Científico de

los Alimentos de la UE) se supone que los efectos sobre la salud humana, como aditivo alimentario en las cantidades normalmente empleadas, son improbables.

No existe riesgo de su acumulación corporal, puesto que se metaboliza en forma similar a la de los ácidos grasos. Todos los países que producen pan en forma industrial, así como productos horneados, permiten el empleo de esta sustancia (44), las dosis utilizadas son del 0.1 al 0.3% en la harina. Obra principalmente sobre mohos, levaduras y bacterias Gram negativas, pero su acción antimicrobiana es más débil que la de otros ácidos orgánicos. Se lo utiliza también en derivados lácteos

Situación real en el uso de conservadores

Aún cuando se ha hablado de posibles riesgos producidos por el empleo de estas sustancias, se deberá tener en cuenta que la problemática surge según las dosis y exposiciones a las mismas.. No se deberá olvidar lo señalado por Paracelso en 1567: "Cualquier sustancia puede ser tóxica, todo dependerá de las dosis".

Por lo general los conservadores como tal, se encuentran en concentraciones bajas, que pueden ser por ejemplo de 0.05 a 0.3%, si tenemos en cuenta que de los productos que contienen a estas sustancias, sean fármacos, cosméticos o alimentos solo se utiliza una pequeña porción, la concentración real del conservador que se encuentra en contacto con el organismo humano es muy pequeña y salvo una susceptibilidad muy grande a estos agentes químicos, tal concentración no alcanza a producir riesgo alguno. Con algunas sustancias se han colocado la LD50, a fin de tener una idea sobre su grado de toxicidad.

Lo visto en esta revisión señalan varias investigaciones que se abocaron a este problema, sin que todavía se han llegado a alguna conclusión negativa para el organismo humano.

No obstante los estudios deben continuarse, sobre todo por la aparición frecuente de nuevas sustancias que se promueven como "preservantes" y que se incorporan constantemente al mercado.

Regulaciones

Las reglamentaciones vigentes, señalan que el añadido de cualquiera de los aditivos antimicrobianos

en los diferentes productos, no deben dejar de lado la realización de las Buenas Prácticas de Manufactura, que serán las que garantizarán la calidad de los mismos. Asimismo solicitan las pruebas de eficacia de la conservación a través de ensayos de desafío microbiano, de acuerdo a lo establecido por las diversas Farmacopeas nacionales e internacionales y disposiciones de ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica). Regulándose las diferentes sustancias permisibles en la conservación de fármacos y cosméticos, como así también las permisibles en alimentos según el CAA (Código Alimentario Argentino).

Conclusiones: En la presente revisión, que dista mucho de ser completa, se han señalado los diversos factores que participan en la conservación de un producto como así también los distintos agentes que normalmente se utilizan en la preservación de fármacos, cosméticos y alimentos.

Se destaca que la integridad microbiológica de una formulación no se debe a la presencia de un agente determinado ya que éste no actúa independientemente del producto, que existen factores que pueden bloquear el efecto del mismo y que no solamente se tendrá en cuenta la efectividad de dicho agente, sino y esto es muy importante, sus características tóxicas, y otros efectos adversos a fin de evitar sorpresas sobre inconvenientes que surgen por el uso masivo de estas sustancias. Si bien es cierto que por lo general las concentraciones empleadas con los productos no alcanzarían a producir un efecto negativo, no se deberá descartar la acumulación que pueda producir en el organismo, aún con las sustancias que obran tópicamente. El estudio sobre tales características basado en informaciones o investigaciones, deberá ser continuo, aún con aquellas sustancias que se hallan ya asentadas por el uso de antigua data.

Referencias Bibliográficas

1. UE. Europea Pharmacopeia 3a-ed.2000
2. Ringertz O.&Ringertz (1982) The clinic significance of microbial contamination in pharmaceutic and allied products in *Advances in Pharm.Science* Vol.5 pp 201-226. London
3. Martone W.J. et al. (1987) The epidemiology of nosocomial epidemic. *P.cepacia* infection. *European Journal of Epidemiology* 3:222-32
4. Sharpell R.& Manowitz (1991) Preservation of cosmetics. in *Disinfection, Sterilisation and Preservation* (ed. Block.S.E.)pp.887-900 Lea &Febiger
5. Spooner D.F. (1996) Hazards associated with the microbiological contamination of cosmetics, toiletries, and non sterile medicines. in *Microbial Quality Assurance in Cosmetics, Toiletries and Non sterile Pharmaceuticals*.2nd ed.pp.9-27
6. Beveridge E.G. (1998) Microbial spoilage and preservatives of pharmaceutic products. in *Pharmaceutic Microbiology* 6th ed.Hugo W.B.&Russell A.D.pp355-374 Oxford
7. Verrips C.T. (1989) Growth of microorganism in compartmentalized product.in *Mechanism of action of food preservation procedures*. pp 363-99 London: Elsevier A.S.
8. Gould G.W. (1989) Drying, raised osmotic pressure and low water activity. In as above pp.97-117
9. Wiggins P.W.(1990) Role of water in some biological process. *Microbiol. Reviews* 54:432-49
10. Cundell A.M.(1998) Reducing testing in the Microbiology Laboratory. *PharMIG Annual Meeting* Nov.1998
11. Castro Sira N. De Curtis de Fernández M.L. (1997) Preservación en Cosméticos. *Pieza Clave de la Calidad* Fac.de Farmacia U.C.Venezuela
12. Morris C.&Leech R. (1996) Natural and physical preservative systems in *Microbioal Quality Assurance Cosmetic, Toiletries and Non sterile Pharm.* 2° ed.pp.69-97, Basingstoke: Taylor & Francis
13. Howard R. Roberts. *Food Safety* 1981. Wiley Interscience Publication
14. Preservation of cosmetics. in *Disinfection,*

- Sterilisation and Preservation ck.S.E.) pp.887-900 Lea &Febiger
15. Chirife J. & Fav ero G.L. (1992) Some physicochemical base of food preservation by combined methods. *Food Research Intern.*25:389-96
 16. Beveridge E.G. (1998) Microbiological spoilage and preservation of pharmacy products. *Pharmac.Microbiology* 6th ed.(Hugo W.B. & Russell A.D.) pp.355-374. Oxford
 17. Hiom S.J. Preservation of medicines and cosmetics,(2004) in *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization* (Russell, Hugo & Ayliffe's. Blackwell Publication,pp484-513
 18. ASTM. American Society for Testing and Materials, in *Annual Book of ASTM Standards*. Philadelphia,1991.
 19. USP 31 ed.2006
 20. BP 2000
 21. Orth D.S. (1979) Linear Resregion Method for rapid determination of preservativa efficacy. *J. Soc. Cosmet.Chem* 30:321-22
 22. Merianos J.J. Quaternary Ammonium Antimicrobial Compounds in *Disinfection, Sterilization and Preservation* 4th.ed.S.S.Block. 1991 Lea & Febiger
 23. D'Aquino M., Rezk R.,(1995) *Desinfección*. Ed.EUDEBA. Buenos Aires
 24. Muñoz A.y colab.(2007) Seguridad de las vacunas que tienen timerosal. *Revista Chilena de Infectologia* 24(5):372-76
 25. Food and Drug Administration, Center for Biological Evaluation and Research. *Thimerosal vaccine*.2006
 26. EMEA Public statement on thimeral in vaccine for human use. <http://www.emea.europa.eu/pdfr/human/press/pus/19404en.pdf>
 27. FDA. Center for Drug Evaluation and Research. *Mercury compounds in drug and food 2006* <http://www.fda.gov/cder/fdama/mercuryreport.htm>
 28. Pichichero M.E. et.al (2002) Mercury concentration in metabolism in infants receiving vaccines. *Lancet* 360:1737:41-49
 29. Bernard S.,Enayatis A.,Redwood L.et al. (2001), *Autism a novel form of mercury poisoning*. *Med. Hypotheses* 56:462-71
 30. Parker S.D. , Schwartz B.,Todd J. et al.(2004) Thimerosal containing vaccines and autistic spectrum disorder, a critical reviewd of published data. *Pediatric* 114 (3):793-804
 31. A.Hviid et al. (2003), *Association between thimerosal-containing vaccine and autism*, *JAMA*, 290:1763-66
 32. E.Lück & M.Jager 2° ed.1995 pp 217-226 *Conservación Química de los Alimentos*, 33.
 34. FAO/OMS Comité mixto de Expertod de Aditivos Alimentarios
 35. JECFA-WHO, Techn.Reports. Serie237 p.36
 36. Calvo M. *Bioquímica de Alimentos* 1995 Zaragoza España
 37. Mirick D.K.,Davis S.,Thomas D.B. (2002) *Antiperspirant use and the risk of breast cancer*. *J.Nat.Canc.Institute* 94(20)1578-80
 38. Darbre P.D. et al.(2003) *Undercream cosmetic and breast cancer* *J. Appl. Toxicol.*23(2):89-95
 39. Darbre P.D. et al.(2004) *Concentrations of parabenes in human breast tumours*. *J.Appl.Toxicol.*24(1):5-13
 40. Stjemschantz E., et al.(2010) *Comparision of murine and human estrogen sulfotransferase inhibition in vitro and in silico implications for differences inactivity*.*Mol.Cell Endocrinology*, 317 (1-2): 127-40
 41. SCCP *Opinion on parabenes*, COLIPA N° p 82 2006
 42. E.Lück & M.Jager 2° ed.1995 pp 125-141 *Conservación Química de los Alimentos*,
 43. <http://www.madridsalud.es/temas/aditivos.php>
 44. E.Lück & M.Jager 2° ed.1995 pp 181-188. *Conservación Química de los Alimentos*

Farmacoterapias actuales y futuras para el tratamiento del autismo

Current and future pharmacotherapy in the treatment of autism

Analia Gabriela Reinés

Instituto de Investigaciones Farmacológicas (NINFA, CONICET-UBA) y Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956 5to piso (1113) Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Tabla de contenidos:

Resumen-Summary

Introducción

Tratamientos farmacológicos actuales Nuevas terapias en estudio

Tratamiento de la causa de la enfermedad: Importancia de la información Conclusiones

Referencias Bibliográficas

Resumen

El autismo es una enfermedad neuropsiquiátrica que se manifiesta antes de los tres años de edad. Forma parte de un conjunto de enfermedades que se agrupan bajo el nombre de desórdenes del espectro autista. El desorden autista se diagnostica por la presencia de al menos tres características que indican: 1. alteraciones en la interacción social; 2. alteraciones en la comunicación; 3. intereses restringidos y patrones de comportamiento estereotipado. El tratamiento de primera línea de los pacientes con autismo es la implementación de una terapia psicossocial y de intervenciones educativas. Generalmente, los pacientes reciben concomitantemente un tratamiento farmacológico para tratar aquellos síntomas que impiden el funcionamiento del individuo y en general complican la implementación de las estrategias educativas y comportamentales de primera línea. En este trabajo analizaremos los fármacos más empleados para el tratamiento de los síntomas que acompañan al desorden autista y las evidencias disponibles que avalan dicha utilización. Ante la ausencia de medicación destinada al tratamiento de los síntomas que componen el núcleo de la patología, mencionaremos algunas direcciones futuras hacia donde la terapéutica actual esta orientando el tratamiento específico de estos desórdenes neurológicos.

Palabras Claves

Autismo- Antipsicóticos- Inhibidores Selectivos de la recaptación de serotonina- estimulantes

Summary

Autism is a neuropsychiatric disorder developing in early childhood before the age of three years. It is part of a group of conditions often referred as "autistic spectrum" disorders. Common features of autistics patients are impairment in several areas of functioning, such as social interaction, communication and the presence of repetitive behaviours and restricted interests. First line treatments for children with autism include psychossocial treatments and educational interventions. Generally, pharmacologic medications are concomitantly employed to target specific symptoms that accompany the core of the disease, severely impairing the individual's functioning and often not allowing for "first line" educational and behavioural interventions to take pace. In this work, pharmacological agents employed for symptomatic treatments of autistics patients will be revised as well as the available evidence that support their prescription. Since no treatment is currently available for the treatment of the core of this disease, future therapeutics directions will be mentioned in lights of the current hypothesis about autism neurobiology.

Key words

Autism- Antipsychotics- Selective Serotonin reuptake inhibitors- stimulants

Introducción

El autismo es una enfermedad neuropsiquiátrica que se manifiesta en la infancia temprana. Forma parte de un conjunto de desordenes que comúnmente se los conoce como "desordenes del espectro autista". Estas patologías se caracterizan por poseer alteraciones en la interacción social, en la comunicación y por presentar comportamientos repetitivos y áreas de interés restringidas. Frecuentemente, estas características pueden acompañarse de cierto grado de retraso mental. De acuerdo a la cuarta edición del Manual de Diagnóstico y Estadística de la Asociación Americana de Psiquiatría, esta clasificación incluye al autismo, a los síndromes de Rett y Asperger y a otros trastornos del desarrollo que no cumplen completamente con los criterios que definen a los desordenes anteriores, por ejemplo por presentar sintomatología leve o atípica o diferir en cuanto al momento de aparición de los síntomas (1).

El desorden autista se manifiesta tempranamente, antes de los 3 años de edad. Para su diagnóstico el paciente debe presentar alteraciones en tres aspectos: 1. Interacción social; 2. Comunicación; 3. Intereses restringidos y patrones de comportamiento estereotipado. El déficit social se manifiesta como ausencia de interés espontáneo en compartir placer, alteraciones en el empleo de la comunicación no verbal (lenguaje corporal, gestos, contacto visual, expresión facial) para regular la interacción social y fallas para desarrollar relaciones de acuerdo a la edad. Las alteraciones en la comunicación se manifiestan como ausencia o retraso en el lenguaje hablado. También podría aparecer lenguaje estereotipado y repetitivo que carece de intento de comunicación. Si hubiera desarrollado el lenguaje, generalmente se acompaña de falta de interés para iniciar y mantener una conversación. El juego está impedido. El juego imaginativo espontáneo y el juego imitativo social están ausentes o retrasados con respecto a la edad. Los intereses son restringidos y las actividades pueden involucrar una

preocupación acerca de uno o más tópicos, en general anormales en cuanto al foco y/o intensidad de las mismas. También es común la adherencia a rutinas no funcionales y la presencia de movimientos estereotipados.

Considerando su condición de enfermedad inhabilitante crónica y su elevada incidencia (1 en 100), el desorden autista acarrea serias consecuencias socio-económicas. En la actualidad no existen tratamientos efectivos definitivamente establecidos. Sin embargo existe un número elevado de terapéuticas con consenso limitado o empírico y un sin número de tratamientos alternativos sin sustento científico.

Sin embargo, existe consenso acerca de que el tratamiento de primera línea para niños con autismo consiste en la implementación de un tratamiento psicosocial e intervenciones educativas para maximizar la adquisición del lenguaje, para mejorar las habilidades sociales y de comunicación y eliminar los comportamientos inadecuados. En cuanto a los tratamientos farmacológicos, en la actualidad no existe ninguna medicación destinada a corregir o retrasar el curso de la enfermedad. Por ello, los tratamientos farmacológicos actualmente prescritos tienen como objetivo la corrección de síntomas específicos, que acompañan al núcleo de la enfermedad, y que impiden el funcionamiento del individuo y en general complican la implementación de las estrategias educativas y comportamentales de primera línea. Estos síntomas incluyen agresión, comportamiento de autodestrucción, rituales compulsivos, baja tolerancia a la frustración con reacciones explosivas, hiperactividad, entre otros.

El tratamiento farmacológico actual de ciertos síntomas del autismo toma prestado fármacos que se emplean para ciertas condiciones psiquiátricas y que, sin embargo, también pueden afectar un amplio rango de funciones neurológicas y cerebrales. Si bien la medicación puede mejorar la calidad de vida de

los pacientes, no debe minimizarse la posibilidad de aparición de efectos adversos. Además de la especificidad, otra limitación es la ausencia de previsibilidad en cuanto a la efectividad para cada paciente en particular en el marco de la gran heterogeneidad que presentan estas patologías y la ausencia de información acerca de los beneficios a largo plazo.

En la actualidad, los esfuerzos están destinados a evaluar la utilidad a largo plazo de los fármacos conocidos. Por otra parte, y en la medida en que se avanza en el conocimiento de la neurobiología del desorden autista, surgen posibles nuevos blancos terapéuticos, algunos de ellos se encuentran en fase preclínica y otros en fases clínicas avanzadas.

Tratamientos farmacológicos actuales

A continuación se resumirá la utilidad de diversos fármacos pertenecientes a las principales categorías empleadas y las evidencias que avalan su utilización.

A. Fármacos Antipsicóticos

Este grupo incluye fármacos originalmente desarrollados para el tratamiento de la esquizofrenia. Una nueva generación más segura y mejor tolerada de antipsicóticos, conocida como antipsicóticos atípicos, ha reemplazado el empleo de los fármacos originales como el haloperidol y la clorpromazina. Los antipsicóticos atípicos incluyen a la clozapina, risperidona, aripiprazol, entre otros. Se emplean para el tratamiento de síntomas como la agresión y las conductas de autodestrucción. Los antipsicóticos atípicos poseen un mejor perfil de efectos adversos, ya que presentan un menor riesgo de producir parkinsonismo en el corto plazo y disquinesias tardías en el largo plazo.

Es también conocido que los antipsicóticos atípicos son efectivos sobre los síntomas negativos de la esquizofrenia, lo que se ha relacionado con la posibilidad de que brinden beneficios sobre las alteraciones en el comportamiento social presentes en

pacientes autistas. Además, el empleo de estos fármacos para corregir tics (2) permite pensar que pueden ser efectivos sobre las conductas estereotipadas. El mecanismo de acción propuesto es la acción dual de estos fármacos como antagonistas serotoninérgicos y dopaminérgicos (3).

Existen datos en la literatura acerca del uso de la clozapina, olanzapina, aripiprazol, quetiapina y risperidona para el tratamiento del autismo y de otras enfermedades relacionadas. Entre ellas, la risperidona ha emergido como fármaco de primera línea. A continuación se detallan los datos más sobresalientes recogidos de estudios clínicos o reporte de casos.

1. Clozapina

Existen dos reportes que describen el empleo de clozapina, cada uno en dos pacientes autistas. De los cuatro pacientes analizados, se han observado mejorías en tres de ellos. Sin embargo, el alto riesgo de producir discrasias sanguíneas y convulsiones han limitado su uso, ya que además requeriría el monitoreo semanal para descartar la aparición de agranulocitosis (4).

2. Olanzapina

Existen algunos reportes de casos y ciertos estudios clínicos que indican resultados positivos en el tratamiento sintomático del autismo, aunque en la mayoría de los casos se acompaña de incremento de peso (5-8). Pese a ello, su empleo para el tratamiento sintomático del autismo se ha visto opacado por las evidencias que indican la aparición de diabetes en adultos tratados con olanzapina (9).

3. Quetiapina

Un estudio clínico indica baja tolerabilidad y ausencia de eficacia en pacientes autistas (10).

4. Aripiprazol

Este fármaco posee un mecanismo de acción diferente al de los otros antipsicóticos atípicos, ya que

actuaría como un agonista parcial dopaminérgico (11). Un estudio abierto con cinco pacientes indica su efectividad sobre los síntomas de agresión y auto-destrucción ya mencionados (12). Esto ha propiciado el desarrollo de nuevos estudios pilotos que se están llevando a cabo.

5. Risperidona

Múltiples estudios abiertos y reportes de casos así como estudios clínicos doble ciego, randomizados y controlados con placebo indican la eficacia de la risperidona para el tratamiento de síntomas como la agresión y comportamientos de autodestrucción en niños, adolescentes y adultos con autismo (13). Dicha eficacia se ha observado sin necesidad de aumentar la dosis de risperidona. Otra ventaja adicional de la risperidona es que también presenta beneficios sobre el comportamiento estereotipado y la hiperactividad, aunque no se han observado beneficios sobre el núcleo de la enfermedad. En la actualidad se están llevando a cabo estudios clínicos de largo plazo.

B. Fármacos Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina (ISRS)

Este grupo de fármacos incluye a la fluoxetina, fluvoxamina, sertralina, paroxetina, citalopram, entre otros. Estos fármacos inhiben selectivamente la recaptación presináptica de serotonina. Aunque de amplia implementación en la práctica clínica para el tratamiento de pacientes con autismo y desordenes relacionados, existen escasos estudios sistemáticos que avalen dicha práctica. Si bien se ha analizado su efecto sobre el comportamiento repetitivo y sobre el score global de la enfermedad, en general su utilización se basa en la búsqueda de una mejoría en las estereotipias.

1. Fluoxetina

Existen algunos estudios clínicos abiertos y algunos estudios más recientes controlados con pla-

cebo que indican su efectividad para reducir el comportamiento repetitivo en pacientes autistas (14-15). Sorprendentemente, el tratamiento con fluoxetina produjo una ligera mejoría en el score global de la enfermedad (14). Estos estudios muestran también la aparición de hiperactividad, irritabilidad e insomnio, efectos adversos que ameritan el análisis detallado de su implementación. Debido a la aparición de efectos adversos y a que otros estudios no han sido suficientemente robustos para evidenciar las posibles ventajas de la fluoxetina sobre el núcleo de la enfermedad, nuevos estudios clínicos se están llevando a cabo en la actualidad.

2. Fluvoxamina

Existen reportes de casos y estudios clínicos que muestran resultados encontrados (16-17). Si bien algunos de ellos evidencian mejorías principalmente sobre síntomas de agresión, en muchos pacientes las mismas se acompañan de activación que se manifiesta con insomnio, hiperactividad, irritabilidad y agresión. Esto ha desalentado la organización de estudios clínicos posteriores.

3. Sertralina

Algunos estudios clínicos abiertos apoyan su efectividad para el tratamiento de comportamientos repetitivos y de conductas agresivas y de autodestrucción en pacientes con autismo (18-19). Sin embargo, no existen en la actualidad estudios clínicos controlados.

4. Paroxetina

Se han publicado resultados similares a los obtenidos con sertralina (20-21).

5. Citalopram

Un estudio retrospectivo indica que el citalopram sería efectivo para reducir la ansiedad en los pacientes autistas, con el beneficio adicional de mejorar el score global de la enfermedad (22). Nuevos

estudios clínicos se están llevando a cabo para determinar su efectividad sobre el comportamiento re-petitivo.

C. Fármacos estimulantes

Los fármacos estimulantes como las anfetaminas y el metilfenidato se emplean como terapia establecida en pacientes diagnosticados con el desorden de hiperactividad con déficit de atención (ADHD). Coincidentemente, la hiperactividad y los comportamientos disruptivos son síntomas frecuentes en los pacientes diagnosticados con desordenes del espectro autista. Por ello, se ha postulado que estos fármacos podrían ser efectivos para el tratamiento de los mismos. Un estudio clínico multicéntrico indica resultados favorables con el empleo de estos fármacos (23), aunque el riesgo de aparición de efectos adversos es más elevado en estos pacientes que en aquellos con ADHD.

D. Otras terapias

1. Naltrexona

El empleo de este antagonista opioide para el tratamiento del autismo se basa en el papel que los opiodes endógenos desempeñan en el comportamiento social. Los primeros reportes han sido alentadores (24-25) y estudios subsiguientes han tenido efectos modestos sobre la hiperactividad pero carecieron de ventajas sobre el lenguaje y la comunicación (26-28).

2. Secretina

Este péptido gastrointestinal ha sido ampliamente estudiado para el tratamiento del autismo. Se han realizado estudios clínicos controlados con un número elevado de pacientes. Quizás sea el único compuesto del cual se disponga en la actualidad de un estudio sistemático pormenorizado (29, 30, 31, 32). Sin embargo, lamentablemente no se ha observado eficacia alguna (33).

3. Fármacos anticonvulsivantes

Estos fármacos se han empleado en pacientes autistas no solo por la alta frecuencia de convulsiones sino también para mejorar las alteraciones conductuales relacionadas con la agresión presente en estos pacientes. Por ejemplo, el empleo de divalproato de sodio mejora las conductas agresivas y el comportamiento repetitivo en niños y adultos con autismo (34). Por el contrario, el empleo de lamotrigina no ha mostrado ninguna eficacia (35).

Nuevas terapias en estudio

Los principales neurotransmisores excitatorios e inhibitorios del sistema nervioso son el glutamato y el ácido gamma-amino butírico (GABA), respectivamente. A pesar que ambos se encuentran ubicuamente distribuidos en el sistema nervioso central y ello podría indicar su participación en casi cualquier patología en estudio, no ha sido sino recientemente que se le ha prestado atención en el autismo. Se ha postulado que la neurotransmisión GABAérgica estaría disminuida en los pacientes autistas. Esta disminución eliminaría el tono inhibitorio sobre neuronas glutamatérgicas, que generarían una sobrestimulación de ciertas áreas cerebrales a través de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) y no NMDA (36). Esta hipótesis está basada en una serie de evidencias neuroanatómicas y neurobiológicas que explican la vulnerabilidad de ciertas áreas cerebrales tales como la corteza frontal, el hipocampo y el cerebelo (37).

Otra hipótesis acerca de los mecanismos neurobiológicos que subyacen al autismo involucra a la señalización intracelular mediada por el ion calcio. Dado que la etiología de la enfermedad tiene un fuerte componente genético y que diversos tipos de alteraciones cromosómicas deberían coincidir en algún punto que permitiera finalmente obtener un fenotipo autista característico, esta vía de señalización presenta un punto de convergencia importante

(38). Se han descrito en pacientes autistas diversas alteraciones en los cromosomas que codifican para los canales de calcio voltaje dependientes (39), para ciertas subunidades del receptor NMDA que es un canal de calcio (40) y proteínas que median la acción intracelular de dicho ion (41).

A partir de estas teorías que postulan como causa del autismo a la existencia de una hiperactivación glutamatérgica mediada por el receptor NMDA, se han estudiado algunos compuestos que podrían modular la actividad de dicho receptor.

1. Amantadina

Este antagonista no competitivo del receptor NMDA fue eficaz para reducir la irritabilidad y el lenguaje inapropiado en un estudio clínico doble cie-go controlado con placebo (42). Además, la droga ha sido bien tolerada.

2. D-cicloserina

Actúa como agonista parcial del sitio de glicina presente en el receptor NMDA. La glicina es un coagonista del receptor. Como agonista parcial, la D-cicloserina actuaría como antagonista en condiciones de hiperactivación glutamatérgica. Un estudio abierto piloto indica que este compuesto sería eficaz para aumentar la respuesta social de los pacientes con desorden autista (43). Solo a dosis elevadas se observaron efectos adversos.

Se sabe que fármacos como el ácido valproico, mencionado anteriormente, las benzodiazepinas y el estradiol, incrementan la neurotransmisión GABAérgica. Por ello se postula que puedan tener alguna utilidad potencial en el tratamiento del autismo.

Es importante resaltar que el tratamiento del autismo basado en la neurobiología de la enfermedad implicaría una intervención temprana, que permitiría interferir antes del establecimiento de las alteraciones del sistema nervioso, y esto a su vez implicaría

quizás la iniciación del tratamiento con anterioridad al diagnóstico. Considerando la imposibilidad de que ello ocurra, de lo dicho se desprende la importancia de encontrar marcadores biológicos que permitieran la implementación de esta estrategia. En ausencia de los mismos, se debe asumir cierta alteración del sistema nervioso al momento de iniciar la terapia, y por ende, el tratamiento debería corregir las mismas aún a expensas de activar mecanismos intracelulares diferentes a los responsables de desencadenar la patología (44). Una clara definición de las metas que se intenta alcanzar con el tratamiento y la estandarización de la manera de medirlas proporcionará y establecerá reglas claras comparables en todo lugar donde se midan.

Tratamiento de la causa de la enfermedad: Importancia de la información

Un estudio recientemente publicado pone en evidencia que además de avanzar en la determinación de las causas de la patología y en el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas es de fundamental importancia la educación e información de los padres de niños autistas. Este estudio muestra una clara relación entre el tratamiento que reciben los niños que padecen la enfermedad y las creencias que sus padres tienen acerca de cuales fueron las causas asociadas con el desarrollo de la misma. Por ejemplo, aquellos padres que creen que la enfermedad se debe a una experiencia traumática temprana poco probablemente recurren a la terapia comportamental. Aquellos que asocian a la enfermedad con un origen durante la gestación son los que menor número de tratamientos no convencionales emplean. Los que suponen una asociación con ciertas alergias alimentarias emplean mas frecuentemente tratamientos con agentes quelantes o vitaminas. Los padres que creen que la patología se asocia con anomalías cerebrales son más reticentes a emplear vitaminas (45).

Conclusiones

Los estudios clínicos que evalúan el empleo de fármacos antipsicóticos y de ISRS son escasos y de corta duración y en la mayoría de ellos las muestras poblacionales son pequeñas y los síntomas analizados carecen de una definición clara. Además, solo algunos estudios evalúan el efecto de estos fármacos sobre los síntomas que forman el núcleo de la enfermedad. Entre los antipsicóticos atípicos, la risperidona emerge como la más segura y efectiva para el tratamiento de la agresión. Entre los ISRS, varios de ellos podrían ser efectivos para el tratamiento de las conductas repetitivas, pero la fluoxetina y el citalopram parecen aventajarlos en cuanto a que además podrían mejorar el score glo-

bal de la enfermedad. En particular con los ISRS es fundamental la evaluación de la posible aparición de síntomas de activación reportados en algunos estudios, aunque las evidencias no son concluyentes. Estudios clínicos multicéntricos de largo plazo son necesarios para establecer certeramente la eficacia y la seguridad de los ISRS y de los fármacos estimulantes. El conocimiento de las alteraciones funcionales que subyacen a estas patologías permitirá el desarrollo de fármacos más específicos, tendientes a prevenir o retrasar la aparición de la patología. Nuevas terapias enfocadas a corregir el desbalance de las neurotransmisiones excitatoria e inhibitorias en el sistema nervioso central son el desafío actual al que se enfrenta la investigación clínica y preclínica.

Referencias Bibliográficas

1. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition*. Washington, DC: American Psychiatric Publishing Inc; 2000.
2. Scahill, L, Leckman, JF, Schultz, RT, Katsoyich, L, Peterson, BS., (2003) A placebo-controlled trial of risperidone in Tourette syndrome. *Neurology* 60(7):1130-1135.
3. Meltzer, HY., (1999) The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology* 21(2S):106S-115S.
4. Nikolov, R, Jonker, J, Scahill, L., (2006) Autistic disorder: current psychopharmacological treatments and areas of interest for future developments. *Rev Bras Psiquiatria* 28(Supl I):S39-46
5. Horrigan, JP, Barnhill, LJ, Courvoisie, HE., (1997) Olanzapine in PDD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36(9):1166-1167.
6. Heimann, SW., (1999) High-dose olanzapine in an adolescent. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38(5):496-498.
7. Potenza, MN, Holmes, JP, Kanes, SJ, McDougle, CJ., (1999) Olanzapine treatment of children, adolescents, and adults with pervasive developmental disorders: an open-label pilot study. *J Clin Psychopharmacol* 19(1):37-44.
8. Malone, RP, Cater, J, Sheikh, RM, Choudhury, MS, Delaney, MA., (2001) Olanzapine versus haloperidol in children with autistic disorder: an open pilot study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 40(8):887-894.
9. Bonanno, DG, Davydov, L, Botts, SR., (2001) Olanzapine-induced diabetes mellitus. *Ann Pharmacother* 35(5):563-565.
10. Martin, A, Koenig, K, Scahill, L, Bregman, J., (1999) Open-label quetiapine in the treatment of children and adolescents with autistic disorder. *Child Adolesc Psychopharmacol*. 1999;9(2):99-107.
11. Tamminga CA. Partial dopamine agonists in the treatment of psychosis. *J Neural Transm* 109(3):411-420.
12. Stigler, KA, Posey, DJ, McDougle, CJ., (2004) Aripiprazole for maladaptive behavior in pervasive developmental disorders. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 14(3):455-463.
13. McCracken, JT, McGough, J, Shah, B, Cronin, P, Hong, D, Aman, MG, Arnold, LE, Lindsay, R, Nash, P, Hollway, J, McDougle, CJ, Posey, D, Swiezy, N, Kohn, A, Scahill, L, Martin, A, Koenig, K, Volkmar, F, Carroll, D, Lancor, A, Tierney, E, Ghuman, J, Gonzalez, NM, Grados,

- M, Vitiello, B, Ritz, L, Davies, M, Robinson, J, McMahon, D., (2002) Risperidone in children with autism and serious behavioral problems. *N Engl J Med* 347(5):314-321.
14. Hollander, E, Phillips, A, Chaplin, W, Zagursky, K, Novotny, S, Wasserman, S, Iyengar, R., (2005) A placebo controlled crossover trial of liquid fluoxetine on repetitive behaviors in childhood and adolescent autism. *Neuropsychopharmacology* 30(3):582-589.
 15. Cook, EH, Jr., Rowlett, R, Jaselskis, C, Leventhal, BL., (1992) Fluoxetine treatment of children and adults with autistic disorder and mental retardation. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 31(4):739-745.
 16. McDougle, CJ, Naylor, ST, Cohen, DJ, Volkmar, FR, Heninger, GR, Price, LH., (1996) A double-blind, placebo-controlled study of fluvoxamine in adults with autistic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 53(11):1001-1008.
 17. Martin, A, Koenig, K, Anderson, GM, Scahill, L., (2003) Low-dose fluvoxamine treatment of children and adolescents with pervasive developmental disorders: a prospective, open-label study. *J Autism Dev Disord* 33(1):77-85.
 18. McDougle, CJ, Brodtkin, ES, Naylor, ST, Carlson, DC, Cohen, DJ, Price, LH., (1998) Sertraline in adults with pervasive developmental disorders: a prospective open-label investigation. *J Clin Psychopharmacol* 18(1):62-66.
 19. Steingard, RJ, Zimnitzky, B, DeMaso, DR, Bauman, ML, Bucci, JP., (1997) Sertraline treatment of transition-associated anxiety and agitation in children with autistic disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 7(1):9-15.
 20. Snead, RW, Boon, F, Presberg, J., (1994) Paroxetine for self-injurious behavior. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 33(6):909-910.
 21. Posey, DI, Litwiler, M, Koburn, A, McDougle, CJ., (1999) Paroxetine in autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38(2):111-112.
 22. Namerow, LB, Thomas, P, Bostic, JQ, Prince, J, Monuteaux, MC., (2003) Use of citalopram in pervasive developmental disorders. *J Dev Behav Pediatr* 24(2):104-108.
 23. A 14-month randomized clinical trial of treatment strategies for attention-deficit/hyperactivity disorder. The MTA Cooperative Group. *Multimodal Treatment Study of Children with ADHD. Arch Gen Psychiatry.* 1999 56(12):1073-1086.
 24. Panksepp, J, Lensing, P., (1991) Brief report: a synopsis of an open-trial of naltrexone treatment of autism with four children. *J Autism Dev Disord* 21(2):243-249.
 25. Campbell, M, Overall, JE, Small, AM, Sokol, MS, Spencer, EK, Adams, P, Foltz, RL, Monti, KM, Perry, R, Nobler, M., (1989) Naltrexone in autistic children: an acute open dose range tolerance trial. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 28(2):200-206.
 26. Campbell, M, Anderson, LT, Small, AM, Adams, P, Gonzalez, NM, Ernst, M., (1993) Naltrexone in autistic children: behavioral symptoms and attentional learning. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 32(6):1283-1291.
 27. Kolmen, BK, Feldman, HM, Handen, BL, Janosky, JE., (1997) Naltrexone in young autistic children: replication study and learning measures. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36(11):1570-1578.
 28. Feldman, HM, Kolmen, BK, Gonzaga, AM., (1999) Naltrexone and communication skills in young children with autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38(5):587-593.
 29. Horvath, K, Stefanatos, G, Sokolski, KN, Wachtel, R, Nabors, L, Tildon, JT., (1998) Improved social and language skills after secretin administration in patients with autistic spectrum disorders. *J Assoc Acad Minor Phys* 9(1):9-15.
 30. Adrian D. Sandler, AD, Sutton, KA, DeWeese, J, Girardi, MA, Sheppard, V, Bodfish, JW., (1999) Lack of Benefit of a Single Dose of Synthetic Human Secretin in the Treatment of Autism and Pervasive Developmental Disorder. *N Engl J Med* 341:1801-1806.
 31. Dunn-Geier, J, Ho, HH, Auersperg, E, Doyle, D, Eaves, L, Orrbine, E, Whiting, S., (2000) Effect of secretin on children with autism: a randomized controlled trial. *Developmental Medicine & Child Neurology* 42 (12), 796-802.
 32. Unis, AS, Munson, JA, Rogers, SJ, Goldson, E, Osterling, J, Gabriels, R, Abbott, RD, Dawson, G., (2002) A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of porcine versus

- synthetic secretin for reducing symptoms of autism.* *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 41(11):1315-1321.
33. Sturmeý, P., (2005) *Secretin is an ineffective treatment for pervasive developmental disabilities: a review of 15 double-blind randomized controlled trials.* *Res Dev Disabil.* 26(1):87-97.
 34. Hollander, E, Dolgoff-Kaspar, R, Cartwright, C, Rawitt, R, Novotny, S., (2001) *An open trial of divalproex sodium in autism spectrum disorders.* *J Clin Psychiatry* 62(7):530-534.
 35. Belsito, KM, Law, PA, Kirk, KS, Landa, RJ, Zimmerman, AW., (2001) *Lamotrigine therapy for autistic disorder: a randomized, double-blind, placebocontrolled trial.* *J Autism Dev Disord* 31(2):175-181.
 36. Farber, NB, Newcomer, JW, and Olney, JW., (1998) *The glutamate synapse in neuropsychiatric disorders.* In O. P. Ottersen, I. A. Langmoen, & L. Gjerstad (Eds), *Progress in brain research* (Vol. 116, pp. 421-437). Amsterdam: Elsevier.
 37. Hussman, JP., (2001) *Suppressed gabaergic inhibition as a common factor in suspected etiologies of autism.* *Journal of Autism and Developmental Disorders* 31, No. 2.
 38. Krey, JF and Dolmetsch, RE., (2007) *Molecular mechanisms of autism: a possible role for Ca²⁺ signalling.* *Current Opinion in Neurobiology* 17:112-119.
 39. Splawski, I, Timothy, KW, Sharpe, LM, Decher, N, Kumar, P, Bloise, R, Napolitano, C, Schwartz, PJ, Joseph, RM, Condouris, K et al., (2004): *CaV1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism.* *Cell* 119:19-31.
 40. Barnby, G, Abbott, A, Sykes, N, Morris, A, Weeks, DE, Mott, R, Lamb, J, Bailey, AJ, Monaco, AP, (2005): *Candidate-gene screening and association analysis at the autism-susceptibility locus on chromosome 16p: evidence of association at GRIN2A and ABAT.* *Am J Hum Genet* 76:950-966.
 41. Muhle, R, Trentacoste, SV, Rapin, I., (2004): *The genetics of autism.* *Pediatrics* 113:e472-e486.
 42. King, BH, Wright, DM, Handen, BL, Sikich, L, Zimmerman, AW, McMahon, W, Cantwell, E, Davanzo, PA, Dourish, CT, Dykens, EM, Hooper, SR, Jaselskis, CA, Leventhal, BL, Levitt, J, Lord, C, Lubetsky, MJ, Myers, SM, Ozonoff, S, Shah, BG, Snape, M, Shernoff, EW, Williamson, K, Cook, EH Jr., (2001) *Double-blind, placebo-controlled study of amantadine hydrochloride in the treatment of children with autistic disorder.* *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 40(6):658-665.
 43. Posey, DJ, Kem, DL, Swiezy, NB, Sweeten, TL, Wiegand, RE, McDougle, CJ., (2004) *A pilot study of D-cycloserine in subjects with autistic disorder.* *Am J Psychiatry* 161(11):2115-2117.
 44. Bethea, TC and Sikich, L., (2007) *Early pharmacological treatment of autism: a rationale for developmental treatment.* *Biol Psychiatry* 61(4): 521-537.
 45. Roland, M. Dardennes, RM, Al Anbar, NN, Prado-Netto, A, Kaye, K, Contejean, Y, Al Anbar, NN., (2011) *Treating the cause of illness rather than the symptoms: Parental causal beliefs and treatment choices in autism spectrum disorder.* *Research in Developmental Disabilities* 32:1137-1146.

BIOQUÍMICA DE LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN INSECTOS VECTORES DE ENFERMEDADES HUMANAS

BIOCHEMISTRY OF INSECTICIDE RESISTANCE IN HUMAN DESEASE VECTOR- INSECTS.

Pablo L. Santo Orihuela

Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CONICET/CITEDEF)

Juan Bautista de La Salle 4397. Villa Martelli. Buenos Aires. Argentina.

Cátedra de Química Analítica Instrumental. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junín 956. Capital Federal. Buenos Aires. Argentina.

porihuela@ffyb.uba.ar

Tabla de Contenidos:

Resumen-Summary

Introducción

Desarrollo

Control Químico

Resistencia a Insecticidas

Estudio de los mecanismos de resistencia: análisis toxicológico y bioquímico

- a) **Citocromo P450 (CYP): Mono-oxigenasas**
- b) **Glutación S-Transferasas**
- c) **Esterasas**

Técnicas de laboratorio para el análisis bioquímico

Análisis de resultados

Conclusiones

Referencias Bibliográficas

Agradecimientos

Resumen

El ser humano desde su existencia ha convivido con numerosas especies de insectos a los que se han denominado plagas, debido a sus participaciones activas en la transmisión de enfermedades y a las cuantiosas pérdidas en la producción de alimentos de origen vegetal o animal. Una de las formas de control es el denominado químico que consiste en el empleo de compuestos insecticidas de origen sintético

o natural. El uso prolongado de estos compuestos puede llevar al fenómeno de resistencia, mediante el cual se hace necesario incrementar paulatinamente la dosis de uso del insecticida hasta valores de riesgo toxicológico para otros organismos incluyendo al ser humano. El análisis bioquímico mediante la determinación de la actividad de los distintos grupos de las enzimas que participan en la degradación de estos compuestos (metabolismo del insecticida); uti-

lizando distintos sustratos de acuerdo al grupo; es de suma importancia debido a dos motivos. Por un lado porque permite dilucidar si se trata de uno de los más frecuentes causales de resistencia (ya sea en sus orígenes o una vez establecida) y por otro lado porque posibilita el empleo de estrategias alternativas de control, evitando riesgos toxicológicos y el incremento de la resistencia a valores incontrolables.

Palabras claves: *análisis bioquímico, insectos, resistencia, citocromos, esterasas, Tripanosomas*

Summary

The human being has coexisted with numerous species of insects since his origins. This kind of insects have been called pests because of their active participation in the transmission of human diseases and numerous losses in the food production from vegetables or animals. One form of management of this species is the

chemical control and it is the use of synthetic or natural insecticidal compounds. The prolonged use of these insecticides can lead to the resistance phenomenon, whereby it is necessary to gradually increase the insecticide dose to toxicological values for other organisms including humans. The biochemical analysis is the evaluation of the activity of different groups of enzymes involved in the degradation of these compounds (insecticide metabolism) using different substrates according to the enzymatic group, and it is very important for two reasons. On the one hand it allows to establish whether it is one of the most frequent causes of resistance (on the beginning or once established) and secondly because it allows the use of alternative control strategies, avoiding toxicological risks and the increased of resistance to uncontrollable values.

Keywords: *Biochemist analysis, insects, resistance.*

Introducción

El ser humano desde su existencia ha convivido con diferentes especies de insectos a los que se han denominado plagas, siendo este último concepto de origen exclusivamente antropocéntrico.

Algunas de estas especies han y continúan estando involucradas en la alteración de la vida humana y de sus ámbitos a lo largo de la historia, ejemplo de ello son sin dudas su participación activa en la transmisión de enfermedades y las cuantiosas pérdidas en la producción de alimentos de origen vegetal o animal (1).

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, se pueden clasificar entonces a estas especies de insectos en dos grupos: el primero denominado plagas sanitarias, si afectan a la salud humana, y el segundo en plagas agrarias o veterinarias, cuando involucran cultivos o

animales.

Analizando a las plagas sanitarias en particular, estas especies de insectos pueden ser en la mayoría de los casos vectores de otros organismos; un ejemplo lo constituye *Triatoma infestans*, conocido en Argentina con el nombre de "vinchuca", vector de *Tripanosoma cruzi* y responsable en la principal vía de transmisión de la Enfermedad de Chagas (2) o simplemente provocar una molestia por sí mismos sin ser vehículos de otros microorganismos (piojos de la cabeza; *Pediculus humanus capitis*) (3). Existen también numerosas especies de insectos capaces de comportarse como vectores mecánicos de un gran número de patógenos oportunistas, tal es el caso de diferentes especies de cucarachas (*Periplaneta americana*, *Blattella germanica*, etc.) (4-7).

Ya sea por incapacidad de controlar al microorganismo que transmite al vector (falta de terapias, fármacos o vacunas) o debido a que el propio insecto cause los daños, el hombre ha tratado de controlar a estos insectos de distintas maneras a lo largo de su historia. En la actualidad hay tres formas principales de control químico de insectos plaga las que se basan

en el empleo de insecticidas de origen natural, semi-sintético o sintético. Otras formas de control son el mecánico, que consiste en el diseño y empleo de todo tipo de trampas o barreras y por último el biológico, mediante el uso de organismos biológicos que permiten alterar las poblaciones de insectos considerados plagas.

Desarrollo

Control Químico

El mismo se basa en el uso de compuestos insecticidas y se han empleado diferentes familias de insecticidas a lo largo de la historia del control de plagas. Clasificados de acuerdo a la estructura química de los mismos, se han dividido en organoclorados (OCIs), cuyo principal y mejor conocido representante ha sido el DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), una familia actualmente prohibida en todo el mundo debido a su elevada persistencia en el medio ambiente y a su potencial riesgo toxicológico y ecotoxicológico (8). Posteriormente fueron introducidos los insecticidas organofosforados (OFs) y carbamatos (CBMs), de los cuales algunos son cuestionados actualmente y otros han sido prohibidos en ciertos tipos de aplicaciones como consecuencia de su elevada toxicidad y características organolépticas desagradables, y a partir de la década del 80 los insecticidas piretroides (Pyr) (9). Estos insecticidas han sido ampliamente utilizados en agricultura, veterinaria y salud con una importante tasa de éxito pero con la consecuente aparición de resistencia en numerosas especies de insectos debido a su prolongada aplicación.

Respecto del mecanismo de acción de estos insecticidas resulta de importancia aclarar que de manera general se pueden considerar como de acción neurotóxica a los insecticidas OCIs, OFs y Pyr.

Los OCIs, dependiendo del compuesto en particular, pueden tener como sitio blanco a los canales de sodio del axón, donde impiden el cierre de los mismos después de la activación y despolarización de la membrana, de lo que resulta un escape continuo de sodio a través de la membrana nerviosa (10) o al receptor de ácido γ -aminobutírico (GABA), inhibiendo el flujo del anión cloruro (Cl^-) dentro del axón e interfiriendo en el flujo de calcio (11).

Los OFs, denominados anticolinesterásicos al igual que los CRMs, actúan inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa (AChE) -enzima que hidroliza al neurotransmisor acetilcolina en el espacio intersináptico-, causando su acumulación e impidiendo la transmisión continua de impulsos nerviosos. Esto ocasiona la pérdida de coordinación muscular, convulsiones y finalmente la muerte (12).

Tanto en mamíferos como en insectos, la intoxicación con piretroides afecta la generación del impulso nervioso tanto en el sistema nervioso central como en el periférico (13). El sitio de acción primario de los piretroides es el canal de sodio dependiente de voltaje. La apertura y cierre del canal de sodio permite el ingreso a la célula de una corriente de sodio, principal componente en la generación del potencial de acción y en su propagación a lo largo del axón. Los piretroides prolongan en el tiem-

po la corriente de sodio alterando la cinética activación-inactivación-desactivación del canal de sodio (14).

Actualmente se han introducido algunos insecticidas pertenecientes a nuevas familias como los fenilpirazoles (Fipronil), neonicoti-

noides (Imidacloprid) y derivados de plantas (aceites esenciales) de aplicación agraria o veterinaria en la mayoría de los casos. La estructura química de algunos de ellos se puede ver en la Tabla 1.

Tipos de insecticidas de utilidad actual o pasada en el control de insectos que afectan la salud humana

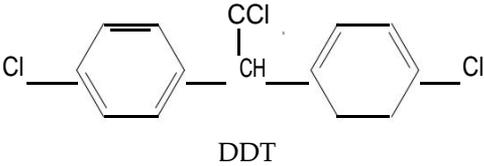
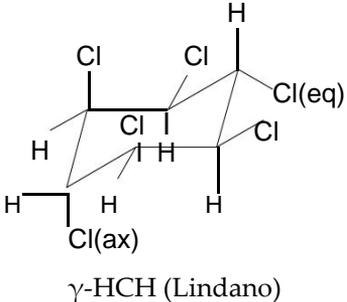
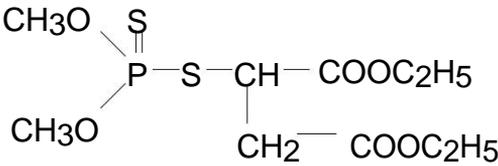
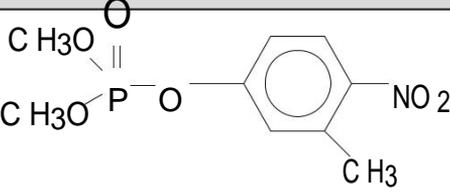
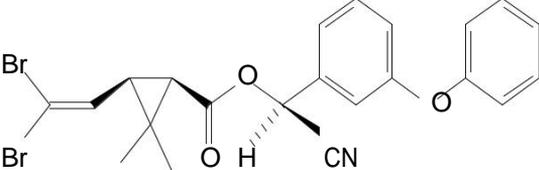
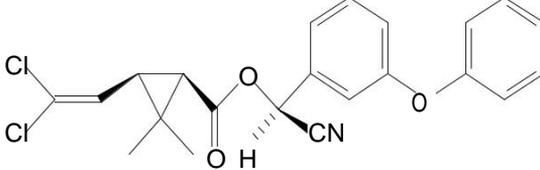
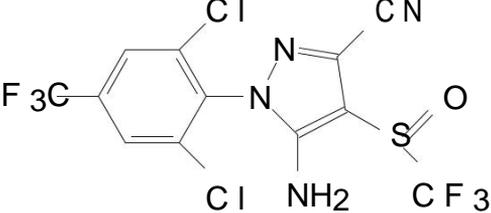
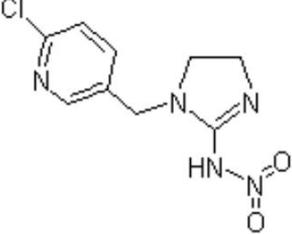
Organoclorados	
 <p>DDT</p>	 <p>γ-HCH (Lindano)</p>
Organofosforados	
 <p>Malatión</p>	 <p>Fenitrotión</p>
Piretroides	
 <p>Deltametrina</p>	 <p>Cipermetrina</p>
Fenilpirazoles y Neonicotinoides	
 <p>Fipronil</p>	 <p>Imidacloprid</p>

Tabla 1: Algunos ejemplos de compuestos pertenecientes a las distintas familias de insecticidas.

Resistencia a insecticidas

El prolongado y/o indiscriminado uso de un tipo de insecticida puede llevar al desarrollo de resistencia en las poblaciones de insectos a las cuales se les aplica. Este fenómeno, que se manifiesta con la aparición de individuos que toleran dosis letales para los individuos llamados sensibles en las primeras utilizaciones del producto, se basa en una evolución genética de las poblaciones (15,16) en las que sobreviven los resistentes que al reproducirse entre ellos generan un incremento del número de individuos resistentes. Dicha forma de evolución se visualiza en la Figura 1.

La Organización Mundial de la Salud definió este fenómeno en 1957 de la siguiente

forma: "Resistencia es la capacidad desarrollada por una población de insectos para tolerar dosis de compuestos tóxicos que serían letales para la mayor parte de los individuos de una población normal de la misma especie" (17).

Debido a este fenómeno, las poblaciones de insectos tratadas con cualquier tipo de insecticida deben ser monitoreadas en forma continua, de manera de detectar la aparición de resistencia con antelación y establecer las conductas apropiadas de cambio. Mediante el monitoreo se evita el uso innecesario de dosis y tipos de insecticidas inefectivos, protegiendo la salud humana y el ecosistema (18).

Generación del fenómeno de resistencia en una población de insectos como consecuencia del uso de insecticidas

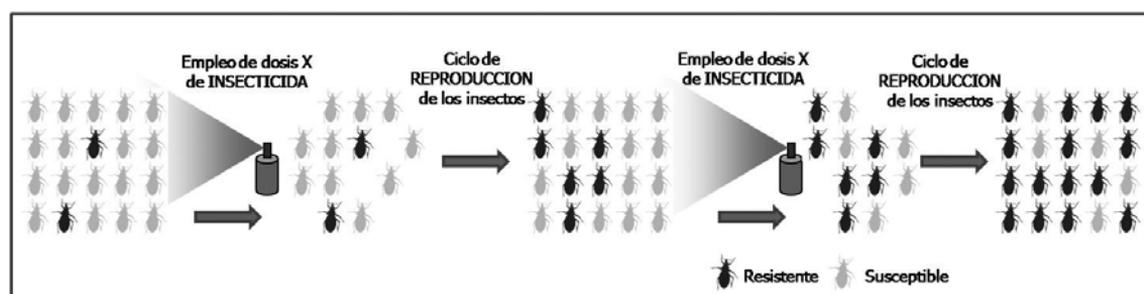


Figura 1: aumento del número de insectos resistentes a una dosis fija X de insecticida con el empleo prolongado del mismo en el control.

Estudio de los mecanismos de resistencia: análisis toxicológico y bioquímico empleando como modelo a *Triatoma infestans* (vinchuca).

El monitoreo de la resistencia en una determinada población de insectos tratada con insecticidas se realiza mediante un conjunto de análisis toxicológicos, bioquímicos y moleculares sobre muestras representativas de las poblaciones de insectos en estudio.

El análisis toxicológico se basa en la realización de los denominados bioensayos, que consisten en la exposición de los insectos de manera individual y mediante tópico a distintas dosis de insecticidas para determinar un parámetro estadístico de toxicidad siendo el ejemplo más común la Dosis Letal 50 (DL₅₀) entre otros.

Para este tipo de análisis se debe contar con una cepa susceptible de referencia. La misma puede ser una colonia de insectos estable-

cida en laboratorio por un lapso aproximadamente de 5 generaciones (5 años en el caso del ciclo de vida de *Triatoma infestans*) ó bien, una colonia iniciada por recolección de material de campo en zonas donde no hubo aplicación de insecticidas (en un lapso no menor a cinco años) (19) asegurando de esta manera la susceptibilidad de los mismos. También es necesaria una población susceptible de campo, con insectos provenientes de una población no expuesta a insecticidas como control de la cepa de referencia.

Los parámetros de toxicidad calculados para la cepa de referencia son contrastados con los parámetros de las poblaciones de campo de *T. infestans* sujetas a estudio. Los individuos seleccionados en condiciones estandarizadas (generación, estadio, tiempo de vida, condiciones ambientales, etc.) (19) de estas poblaciones son expuestos mediante la aplicación de tópicos a dosis crecientes del insecticida o formulado insecticida (principio activo + vehiculizador) permitiendo la realización de una curva de dosis de insecticida en función de la mortalidad de insectos.

Grafico de mortalidad en función de la dosis de insecticida

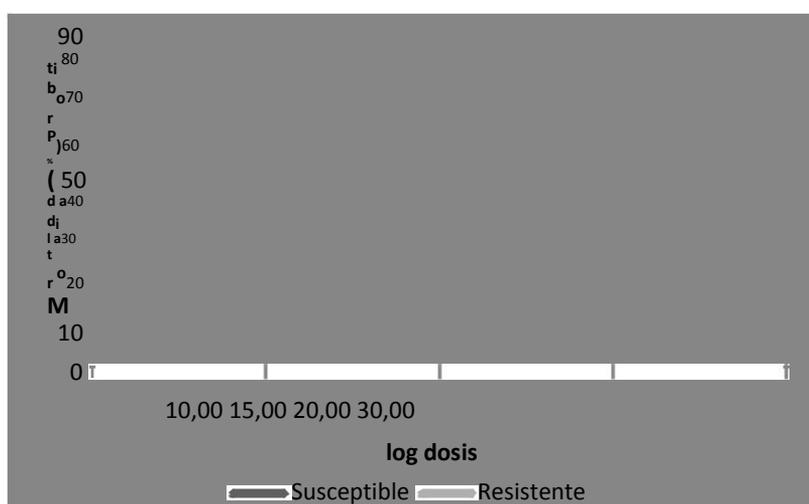


Figura 2. La curva de la población resistente se encuentra desplazada hacia valores de dosis mayores debido a que la cantidad de insecticida que se necesita aplicar es mayor que la cantidad de insecticida que se aplica a los insectos susceptibles.

Utilizando esta curva se calculan entonces los parámetros estadísticos de DL₅₀ (dosis que produce la mortalidad del 50% de la población expuesta) mediante el análisis de regresión Probit (20). A partir de los parámetros DL₅₀ estimados para la cepa susceptible y la población en estudio se calcula el Grado de Resistencia (GR) (21) según la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de Resistencia (GR)} = \frac{\text{DL}_{50} \text{ Población de Campo}}{\text{DL}_{50} \text{ Cepa Susceptible}}$$

El GR representa el factor por el que se debe multiplicar la dosis que produce una determinada mortalidad en los individuos susceptibles para producir una equivalente mortalidad en los individuos resistentes.

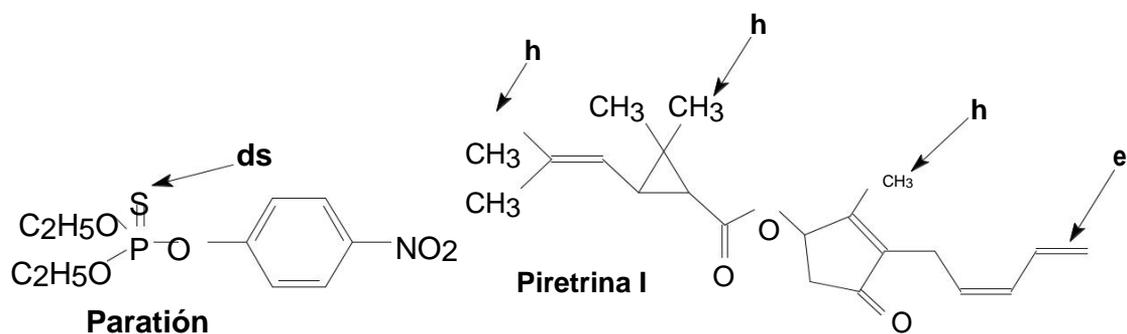
El análisis bioquímico se realiza en el laboratorio mediante evaluación de la actividad de distintos tipos de enzimas involucradas en el metabolismo (biotransformación) de compuestos insecticidas (22). Este es uno de los mecanismos que se presenta con mayor frecuencia en las poblaciones resistentes. Dentro de este tipo de análisis también se encuentran aquellos que evalúan cambios en la cutícula del insecto (barrera que evita principalmente la desecación de los insectos), la que puede presentar modificaciones que conllevan a la disminución de la permeabilidad de los formulados insecticidas y a la consecuente disminución del ingreso de los mismos al insecto (23,24).

Los principales tipos de enzimas vinculados a la degradación de insecticidas son los que se detallan a continuación:

a) Citocromo P450 (CYP): Mono-oxigenasas

Las mono-oxigenasas citocromo P450 (CYP) se encuentran presentes en prácticamente todos los tejidos de los insectos y están involucradas tanto en la síntesis y degradación de ecdisteroides y hormona juvenil como en el metabolismo de xenobióticos naturales y sintéticos (25). El número de P450s de insectos se aproxima a 200 e incluye miembros en las familias CYP 4, 6, 9, 12, 15, 18 y 28 (26). La importancia de las CYP y su rol en el metabolismo de insecticidas ha sido ampliamente demostrada en insectos (27,28). Presentan un alto grado de inespecificidad en cuanto a sustratos pero también preferencia por compuestos liposolubles. Metabolizan insecticidas a través de un gran número de reacciones como: hidroxilaciones aromáticas, alicíclicas y alifáticas, dealquilaciones de éteres y aminas sustituidas, oxidaciones de tioéteres a sulfoxidos y sulfonas, epoxidación de dobles enlaces y desulfuración (29). (Figura 3)

Sitios de acción de las mono-oxigenasas P450 sobre compuestos de las distintas familias de insecticidas



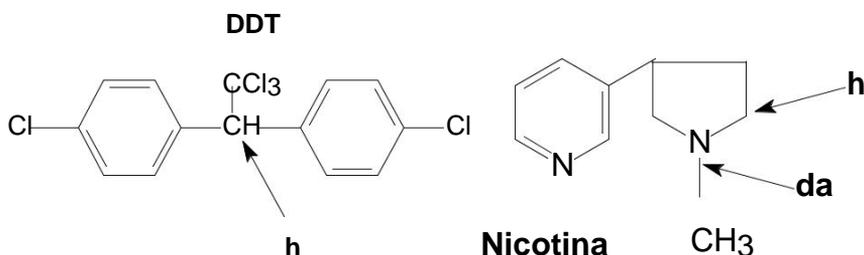


FIGURA 3. Algunas reacciones de citocromo P450 sobre insecticidas
h=hidroxilación, e=epoxidación, da=dealquilación, ds=desulfuración

El metabolismo de los insecticidas por monooxigenasas puede resultar en detoxificación o activación (25). La resistencia mediada por CYPs puede ser debida a una detoxificación incrementada (o a una activación disminuída) y podría ser el resultado de un cambio en la actividad catalítica de la monooxigenasa P450 involucrada o a un cambio en el nivel de expresión de la proteína (30). La aparición de cambios en el metabolismo oxidativo de los insectos ha conferido resistencia a carbamatos (CRB) (31) y principalmente a piretroides (32-39).

b) Glutación S-Transferasas

Cumplen dos roles en el metabolismo de xenobióticos: conjugación de compuestos electrófilos con el glutación endógeno, protegiendo así a moléculas biológicas como ácidos nu-

cleicos y proteínas; y proporción de una efectiva vía de excreción a través de un producto hidrosoluble (40). Este grupo de enzimas catalizan la conjugación de insecticidas tales como los organofosforados (OF), CRB y organoclorados (OCI) que dependen de la presencia de glutación (41,42).

c) Esterasas

Estas enzimas son de distribución ubicua y actúan sobre múltiples sustratos ya que hidrolizan la unión de tipo éster R-COO-R'. Según los tipos de sustratos sobre los cuales actúan y los compuestos que las inhiben se ha realizado una clasificación simplificada de las esterazas (43-45). (Tabla 2)

Tabla 2. Clasificación simplificada de esterazas de acuerdo al sustrato de preferencia.

Tipo de Esterasas	Sustrato preferencial
A- Esterasas (Arilesterasas)	Esteres Aromáticos
B- Esterasas (Carboxilesterasas) (Colinesterasas)	Esteres Alifáticos Esteres de colina
C- Esterasas (Acetilesterasas)	Acetil ésteres

Son proteínas de bajo peso molecular que se encuentran en su mayoría, solubles en la hemolinfa de los insectos y sólo una pequeña fracción se halla unida a algún tipo de membrana.

Tres de las principales familias de insecticidas neurotóxicos (los OFs, CRMs y Pyrs) son ésteres y pueden ser hidrolizados por esterasas. El aumento de la actividad degradativa mediada por esterasas es un mecanismo de resistencia muy importante en OFs, a veces importante en piretroides y poco importante en CRMs. La acción de esterasas conduce a productos menos tóxicos, más hidrosolubles y más fáciles de excretar (15). En más de 30 especies de insectos que son plagas de agricultura o de importancia médica y veterinaria, se ha desarrollado resistencia como resultado del aumento de la actividad de esterasas (33,46).

El análisis molecular se realiza mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (47) analizando las posibles modificaciones a nivel genético (secuencias de ADN) que codifican para las enzimas involucradas en la degradación de insecticidas y para los sitios de acción (receptores) de los insecticidas.

Técnicas de laboratorio para el Análisis Bioquímico

Como modelo para el desarrollo del tema se toma el estudio de la actividad enzimática en *Triatoma infestans* (vector principal en Argentina de la Enfermedad de Chagas), en la cual el laboratorio del CIPEIN tiene mayor experiencia.

Los insectos muestra pueden provenir del campo (poblaciones sujetas a estudios) y/o de cepas criadas en el laboratorio. En general se reciben provenientes insectos adultos (machos y/o hembras) del campo y se trabaja con la primera generación (F1) tanto para la realización del análisis toxicológico como del bioquímico (33,34).

Las actividades enzimáticas pueden determinarse en homogenatos de insectos ó bien en distintos componentes del cuerpo del insecto mediante disecciones de cabeza, tórax o abdomen. Este último procedimiento se elige en el caso de que se requiera conservar la estructura y cofactores enzimáticos (en general lábiles) de los órganos del insecto y es denominado como "técnica ex-vivo" (48).

En particular la determinación de mono-oxigenasas P450 se realiza utilizando a la 7-etoxicumarina como sustrato y se evalúa en abdómenes escindidos de insecto. Este sustrato es o-desetilado por acción de este grupo enzimático generando 7-hidroxi cumarina; compuesto con características fluorescentes que puede ser medido por espectrofluorometría punto final (λ excitación: 400 nm y λ emisión: 440) (35,49,48). (Figura 4)

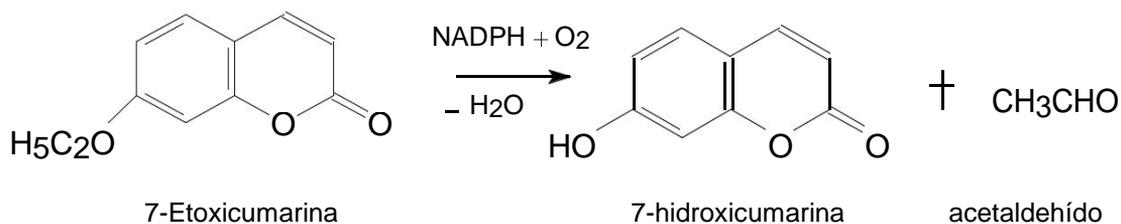


Figura 4: reacción de o-deetilación de la 7-etoxicumarina.

La medición de actividad de esterasas se realiza en la actualidad mediante el empleo de una gran variedad de sustratos debido a sus características de baja especificidad, por cuanto actúan sobre diversos tipo de uniones éster. Los sustratos más comunmete utilizados son el α y β naftil acetato (50,51), p-nitro fenil acetato (52); acetato de tiofenol (PTA) (53). Todos estos sustratos se evalúan espectrofotométricamente mediante técnicas cinéticas o de punto final.

En el Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN) se desarrolló un sustrato de medición cinética de esterasas, el 7-permetrato de cumarilo (7-CP) de mayor especificidad y sensibilidad debido a su analogía estructural con los piretroides y a que su producto de hidrólisis, la 7-hidroxicumarina, es detectable por espectrofluorometría en homogenatos individuales de insectos. (54). (Figura 5)

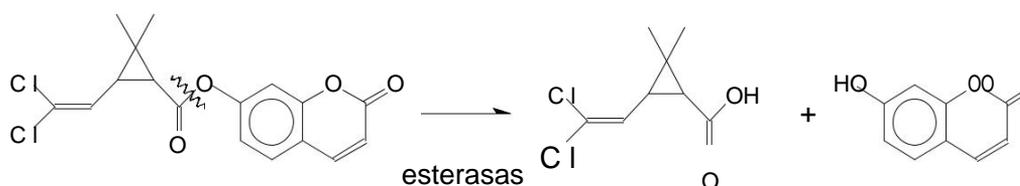


Figura 5: 7-permetrato de cumarilo y su producto de hidrólisis fluorescente la 7-OH cumarina.

El último grupo de enzimas involucradas son las Glutación S-transferasas, La actividad enzimática de este grupo se evalúa a mediante la técnica cinética espectrofotométrica descrita por Habig et al (55) empleando glutatión reducido sobre homogenatos individuales. (Figura 6).



Figura 6: Reacción utilizada para la determinación de la actividad de Glutacion S-transferasas

Análisis de resultados

Los resultados de las actividades enzimáticas se expresan como cantidad de producto formado en función del tiempo, por individuo y/o cantidad de proteína (56) (dependiendo si la técnica se realiza sobre un individuo o más por determinación). Se realiza la conversión de las respectivas unidades relativas de fluorescencia (RFU) o de absorbancia dependiendo de la técnica, y empleando estándares de los productos respectivos para realización de las curvas de calibración (57).

Los valores de actividad enzimática convertidos son representados mediante histogramas y analizados estadísticamente mediante métodos paramétricos (Análisis de la Varianza) o no paramétricos (Kruskal-Wallis). (Figura 7).

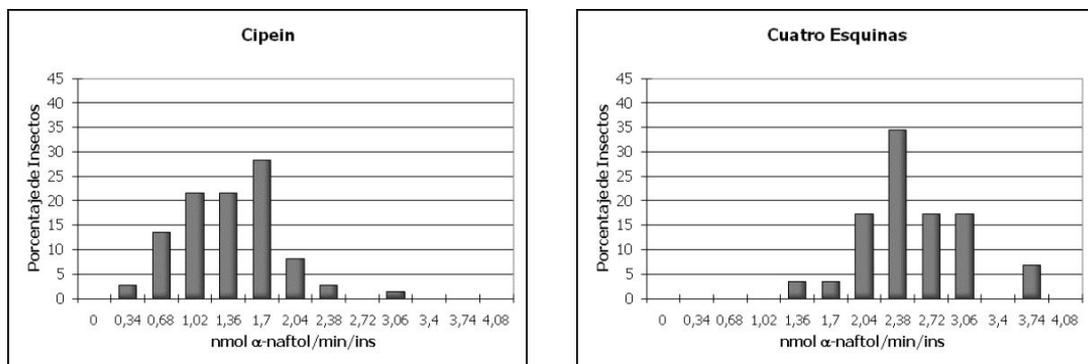


Figura 7: Ejemplo de representación con histogramas. Los valores de actividad de *p*-nitrofenil acetato esterasas son expresados en picomoles por minuto y por insecto y agrupados en rangos de valores de actividad mediante la construcción de histogramas. CIPEIN es una cepa de *T. infestans* criada en laboratorio susceptible a insecticidas mientras que Cuatro Esquinas (población domiciliada de origen riojano) presenta mayor cantidad de insectos con valores incrementados de actividad (57).

Conclusiones

El análisis bioquímico a través del estudio de las enzimas degradativas, permite dilucidar una de las principales causas de la resistencia a insecticidas en insectos vectores de enfermedades humanas.

En consecuencia, es posible detectar la aparición de resistencia con anticipación, evitando el uso indiscriminado de insecticidas y de esta manera evi-

tar tanto la exposición innecesaria de seres humanos y ecosistema a insecticidas, como el establecimiento de la resistencia.

Por otra parte es de utilidad para evaluar el empleo de estrategias alternativas, como por ejemplo el uso de otra clase de insecticidas con distinto modo de acción, y entonces efectuar un correcto y eficiente control de los insectos vectores.

Referencias Bibliográficas

1. van Emden HF and Service MW. (2004) Pest and vector control, Cambridge University Press, United Kingdom,.
2. Schofield CJ, Jannin J and Salvatella R, (2006) The future of Chagas disease control. Trends in Parasitology 22: 583-588.
3. Burgess IF, (2003) Human lice and their control. Annual Review of Entomology 49: 457-481.
4. Kinfu A and Erko B, (2008) Cockroaches as carriers of human intestinal parasites in two localities in Ethiopia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 102: 1143-1147.
5. Zarchi AAK and Vatani H, (2008) A Survey on Species and Prevalence Rate of Bacterial Agents Isolated from Cockroaches in Three Hospitals. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 9:197-200.
6. Fakoorziba MR, Eghbal F, Hassanzadeh J and Moemenbellah-Fard MD, (2010) Cockroaches (*Periplaneta americana* and *Blattella germanica*) as potential vectors of the pathogenic bacteria found in nosocomial infections. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 104: 521-528.
7. Oliva GR, Díaz C, Fuentes González O, Martínez MD, Fernández C, Cordoví R, Lago PM and Herrera N, (2010) *Blattella germanica* as

- a possible cockroach vector of microorgan-isms in a hospital. *Journal of Hospital Infection* 74: 93-95.
8. Zerba E, (1999) Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors. *Medicina* 59: 41-46.
 9. Barbera C. (1989) *Pesticidas Agrícolas, Ome-ga*.
 10. Coats JR. (1982) *Insecticide Mode of Action*, Academic Press, pp 3-24.
 11. Saunder and Harper. (1994) *Pesticides, in Principles and methods of toxicology*, Hayes A.W.(Ed). Raven Press Ltd. New York, pp 389-415.
 12. Hassall KA. (1982) *The Chemistry of pesticides: Their metabolism, Mode of Action and Uses*, in *Crop protection*, Verlagchemie,.
 13. Perry AS, Yamamoto I, Ishaaya I and Perry R. (1998) *Insecticides in agriculture and envi-ronmental. Retrospects and Prospects*.
 14. Bloomquist JR, (1999) *Insecticides: Chemistries and Characteristics*. University of Min-nesota.
 15. Oppenoorth FJ. (1985) *Biochemistry and Genetics of Insecticide Resistance*, in *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, ed by Kerbut GA and Gilbert LL, Pergamon Press, pp 731-773.
 16. Georghiou GP and Mellon RB. (1983) *Pesticide Resistance in Time and Space*, in *Pest Resistance to Pesticides*, ed by Georghiou GP and Saito T, pp 1-46.
 17. WHO. (1957) *Seventh report Expert Committee on insecticides*. Tech Report Ser: 125-137.
 18. Kuhr RJ and Motoyama N. (1998) *Pesticides and the Future*, IOS Press, Amsterdam, Netherlands.
 19. WHO, World Health Organization. (1994) *Protocolo de evaluación de efecto insecticida sobre Triatominos*. *Acta Toxicol Arg* 2: 29-32.
 20. Lichfield JT and Wilcoxon FJ. (1949) *A simplified method of evaluating dose-effect experiments*. *J Exp Ther* 96: 99-103.
 21. Robertson J and Preisler H. (1992) *Pesticide bioassays with arthropods*. CRC, Boca Raton, FL.
 22. Matsumura F. (1985) *Classification of insecticides*, in *Toxicology of insecticides*, Plenum Press, pp 45-107.
 23. Weling W and Paterson GD. (1985) *Toxicodynamics of insecticides*, in *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Pergamon Press, pp 603-645.
 24. Juarez MP and Calderon Fernandez GM. (2007) *Cuticular hydrocarbons of triatomines*. *Comp Biochem Physiol* 147: 711-730.
 25. Feyereisen R. (1999) *Insect P450 enzymes*. *Annu Rev Entomol* 44: 507-533.
 26. Fogleman JC, Danielson PB and MacIntyre RJ. (1998) *The molecular basis of adaptation in Drosophila: the role of cytochrome P450s*. *Evol Biol* 30: 15-77.
 27. Agosin M. (1985) *Role of microsomal oxidations in insecticide degradation*, in *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, ed by Kerkut G and Gilbert L, Pergamon, New York, pp 647-712.
 28. Scott JG, Liu N and Wen Z. (1998) *Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 121: 147-155.
 29. Wilkinson CF. (1983) *Role of mixed function oxidase in insecticide resistance*, in *Pest Resistance to Pesticide*, ed by Georghiou P and

- Saito T, Plenum Press., New York, United States of America, pp 175-207.
30. Oppenoorth FJ. (1984) Biochemistry of insecticide resistance. *Pestic Biochem Physiol* 22 :187-193.
 31. Rose RL, Barbhuiya L, Roe RM, Rock GC and Hodgson E. (1995) Cytochrome P450-Associated Insecticide Resistance and the Development of Biochemical Diagnostic Assays in *Heliothis virescens*. *Pestic Biochem Physiol* 51: 178-191.
 32. Yu SJ and Nguyen SN. (1992) Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the diamondback moth. *Pestic Biochem Physiol* 44: 74-81.
 33. Santo Orihuela PL, Vassena CV, Zerba EN, Picollo MI. (2008) Relative Contribution of Monooxygenase and Esterase to Pyrethroid Resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J Med Entomol* 45: 298-306.
 34. Picollo MI, Vassena CV, Santo Orihuela PL, Barrios S, Zaidemberg M and Zerba E. (2005) High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J Med Entomol* 42: 637-642.
 35. González Audino P, Vassena C, Barrios S, Zerba E and Picollo M. (2004) Role of enhanced detoxication in a deltamethrin-resistant population of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) from Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 335-339.
 36. Charani Ranasinghe BCA. (1998) Over-expression of cytochrome P450 CYP6B7 mRNA and pyrethroid resistance in Australian populations of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Pestic Sci* 54: 195-202.
 37. Shinji Kasai IS. (1998) P450 monooxygenases are an important mechanism of permethrin resistance in *Culex quinquefasciatus* Say larvae. *Arch Insect Biochem Physiol* 37: 47-56.
 38. Bartlett GR and Keil CB. (1997) Identification and Characterization of a Permethrin Resistance Mechanism in Populations of the Fungus Gnat *Lycoriella Mali* (Fitch) (Diptera: Sciaridae). *Pestic Biochemistry and Physiology* 58: 173-181.
 39. Sheppard RC. (1995) Oxidative metabolic resistance to cyanopyrethroids in the horn fly (Diptera: Muscidae). *J Econ Entomol* 88: 1531-1535.
 40. Sivori JL, Casabe N, Zerba EN and Wood EJ. (1997) Induction of Glutathione S-transferase Activity in *Triatoma infestans*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 92: 797-802.
 41. Lumjuan N, Stevenson BJ, Prapanthadara La, Somboon P, Brophy PM, Loftus BJ, Severson DW and Ranson H. (2007) The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochem Mol Biol* 37: 1026-1035.
 42. Hemingway J and Penilla RP. (1997) Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. A large-scale field trial in Southern Mexico. *Pestic Sci* 51: 375-382.
 43. Aldridge W.N. (1953) Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J* 53: 110-117.
 44. Guedes RNC, Zhu KY, Dover BA and Kambampati S. (1997) Partial Characterization of Phosphotriesterases from Organophosphate-Susceptible and -Resistant Populations of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Pestic Biochem Physiol* 57: 156-164.

45. Wheelock CE, Shan G and Ottea J. (2005) Overview of Carboxylesterases and Their Role in the Metabolism of Insecticides. *J Pes-tic Sci* 30: 75-83.
46. Hemingway J and Karunaratne S. (1998) Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol* 12: 1-12.
47. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
48. Desousa G, Cuany A, Brun A, Amichot M, Rahmani R and Berge JB. (1995) Microfluorometric Method for Measuring Ethoxycoumarin-O-deethylase Activity on Individual *Drosophila melanogaster* Abdomens: Interest for Screening Resistance in Insect Populations. *Anal Biochem* 229: 86-91.
49. Ullrich V and Weber P. (1972) The O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin by liver microsomes. A direct fluorometric test. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 353: 1171-1177.
50. Gomori G. (1953) Human esterases. *J Lab Clin Med* 42: 445-453.
51. van Asperen K. (1962) A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J Insect Physiol* 8: 401-414.
52. Wallace G, Casabé N, Wood E and Zerba E. (1988) Assay of pyrethroid-hydrolysing esterases using (1,R)-cis-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylates as substrates. *Xenobiotica* 18: 351-355.
53. Ellman GL, Courtney KD, Andres j and Featherstone RM. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88-95.
54. Santo Orihuela P, Picollo MI, Zerba E and Masuh H, (2006) The 7 cis- or trans- coumaryl permethrate esterases as a possible biochemical marker of pyrethroid resistance in *Pediculus humanus capitis*. Third International Congreso on Phthiraptera (ICP3). Ciudad de Buenos Aires. Argentina.
55. Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB. (1974) Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.
56. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
57. Santo Orihuela PL. (2008) Estudio de las enzimas detoxificantes relacionadas con la resistencia a insecticidas piretroides en *Triatoma infestans* (Klug) de la República Argentina y Bolivia. Tesis. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

Agradecimientos

La realización de este trabajo ha sido posible gracias al Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

PROTEÍNAS “DESESTRUCTURADAS”: ¿PATOLOGÍA O SALUD?

“UNSTRUCTURED” PROTEINS: PATOLOGY OR HEALTH?

Néstor O. Caffini

Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Calles 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina. E-mail: caffini@biol.unlp.edu.ar

Tabla de Contenidos

Resumen – Summary	83
El paradigma de la estructura proteica	84
Los precursores de la noción de estructura proteica	84
Proteínas desordenadas, proteínas promiscuas y cáncer	85
¿Cuál es la abundancia y distribución de las proteínas intrínsecamente desestructuradas? ...	86
Proteínas intrínsecamente desestructuradas y enfermedad	88
Referencias Bibliográficas	89

RESUMEN

El conocimiento que se poseía hasta hace poco tiempo de la estructura de las proteínas había llevado a la convicción de que éstas debían adoptar estructuras definidas y más o menos rígidas para cumplir con sus funciones, hecho que usualmente implica la unión con una o más moléculas blanco. Sin embargo, recientes estudios parecen indicar que alrededor de un tercio de las proteínas que se encuentran en los seres humanos están parcial o completamente desestructuradas. A pesar de que la carencia de un determinado esquema de plegamiento de una proteína estuvo usualmente asociada a una condición patológica, es por el contrario un hecho crucial para el funcionamiento de ciertas proteínas. Por otra parte, las “proteínas desestructuradas” pueden haber jugado un importante rol durante la evolución, por lo que una mejor comprensión de su verdadera naturaleza podría incluso conducir al diseño de nuevas drogas.

SUMMARY

Until recently, the knowledge that scientists had about protein structure agreed with the concept that they should adopt defined and more or less rigid structures to perform their functions, a fact that usually involved the binding with one or more target molecules. However, recent studies suggest that about one third of the proteins found in humans are partially or completely unstructured. Despite the lack of a specific folding of a protein was usually associated with a pathological condition, is instead a fact crucial to the functioning of certain proteins. Moreover, the “unstructured proteins” may have played an important role during evolution, so a better understanding of their true nature could even lead to the design of new drugs.

El paradigma de la estructura proteica

La posesión de una estructura más o menos rígida y estable fue considerada desde hace mucho tiempo como una condición *sine qua non* para que una proteína fuera funcional, aseveración en parte basada en que la pérdida de aquélla debido a factores tales como altas temperaturas, algunos solventes orgánicos y otros reactivos químicos conllevaba la pérdida de la funcionalidad de la proteína.

Metafóricamente hablando, las proteínas funcionan como los ojos, manos y piernas de las células vivas. Incluso el ADN, la molécula bio-lógica más icónica, debe su importancia esencialmente al hecho de contener genes que a su vez constituyen los “mapas” de cada una de las proteínas que puede fabricar una célula. En última instancia, la aparición de diferentes tipos celulares, desde neuronas hasta células óseas, es simplemente el resultado de la expresión de determinados genes en cada uno de ellos, con la concomitante producción de proteínas que definen cada clase de célula.

De este modo y dada la importancia de las proteínas, tanto en la generación de los diversos tejidos como en el cumplimiento de sus muy variadas funciones en las células, podría pensarse que los biólogos conocen perfectamente cómo es su estructura y de qué manera ejercen tales funciones. Se sabe que están constituidas por un número variable de aminoácidos ordenados como las cuentas de un collar y se aceptaba que para cumplir acabadamente sus funciones tenían que poseer una estructura determinada, adoptando una conformación espacial más o menos rígida. Sin embargo, ahora está surgiendo claramente la evidencia de que muchas proteínas llevan a cabo sus tareas sin estar totalmente plegadas y que otras se pliegan sólo cuando lo necesitan. De hecho, quizás un tercio de las proteínas presentes en los seres humanos están “intrínseca-

mente desordenadas”, contando al menos con algunas zonas no plegadas (“desordenadas”) ^{1,2}.

Se conoce que muchas enzimas, tales como las polimerasas que duplican (replican) las cadenas de ADN o las que transcriben partes de una cadena de ADN en ARN para comenzar la síntesis proteica, son complicadas nanomáquinas compuestas de muchas partes móviles, con “bisagras” que permiten a los diferentes segmentos de una proteína pivotar alrededor de otros. Estas proteínas usualmente se describen como combinaciones de partes rígidas, tal como las secciones de una silla plegable, pero por el contrario, las proteínas “intrínsecamente desordenadas” se asemejan más a los spaghetti parcialmente cocidos en una olla con agua hirviendo ³. Pocos años atrás este concepto hubiera resultado herético, pero hoy los proteólogos han comenzado a considerar que este tipo de estructuras flexibles probablemente jugaron un rol importante en la evolución y que aún hoy siguen resultando importantes en algunos procesos, tales como la división celular y la activación de los genes. Y esta nueva visión de las estructuras proteicas ha sugerido incluso variadas alternativas para el tratamiento de ciertas enfermedades, incluido el cáncer ¹.

Los precursores de la noción de estructura proteica

La noción de que una estructura tridimensional rígida determina la función de una proteína fue establecida por Emil Fischer, un químico de la Universidad de Berlín, que hace casi ciento veinte años ⁴ propuso que las enzimas (proteínas que catalizan las reacciones bioquímicas) interactúan con otras moléculas (“sustratos enzimáticos”) mediante encajes tridimensionales complementarios, como ocurre entre una llave y la correspondiente cerradura. Lo admirable es que en esa época la naturaleza de las proteínas

era desconocida, situación que persistió hasta alrededor de mitad del siglo pasado, cuando se comprobó que estaban compuestas por cadenas de aminoácidos y que para poder funcionar adecuadamente necesitaban contar con una estructura adecuada, hecho que ya había sido sugerido en 1931 por el bioquímico chino Hsien Wu ⁵.

De todos modos los científicos de esa época sospechaban que no todas las proteínas poseían una estructura rígida y que no siempre funcionaban de acuerdo al esquema de "llave-cerradura", entre ellos Linus Pauling, quien especulaba que ciertos anticuerpos podían adoptar diversas formas para adaptarse a sus moléculas blanco ⁶. Por su parte en 1952 Meekin ⁷ demostró, en base a estudios de rotación óptica, que la caseína de la leche tenía una estructura desordenada similar a la que resultaba de tratar a las proteínas globulares con agentes desnaturalizantes fuertes. A comienzos de 1970 también se sabía que la molécula del fibrinógeno tenía una considerable región desestructurada ⁸ y que junto con otra sección más pequeña estudiada posteriormente jugaban un rol esencial en el proceso de la coagulación sanguínea. Años más tarde la proteína que constituye la envoltura ("cápside") del virus del mosaico del tabaco ofreció otro ejemplo ⁹: cuando la cápside está vacía presenta varias regiones desestructuradas, colgando hacia el interior, lo que permite que el nuevo ARN viral formado en una célula infectada se empaquete correctamente; cuando ello finalmente ocurre la proteína se asocia al ARN y adopta una estructura rígida. En 1996 la información provista por la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) puso en evidencia que la proteína p21, involucrada en la división celular, se encontraba totalmente desordenada, donde los aminoácidos rotaban libremente alrededor de las uniones químicas que los unían, no man-

teniendo la conformación durante más de una fracción de segundo¹⁰; aún así la proteína p21 podía ejercer su función regulatoria, aportando la primera demostración convincente de que la carencia de una estructura definida no implicaba la inutilización funcional de la proteína.

Proteínas desordenadas, proteínas promiscuas y cáncer

La proteína p27 (también llamada "inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina") suele ser denominada "proteína inhibidora del ciclo celular", debido a que su principal función es frenar o lentificar el ciclo de división celular en la etapa G1 (previa a la duplicación del ADN). La mayoría de las células cancerosas en tejidos humanos contienen cantidades reducidas de p27 y cuanto menor sea su porcentaje peor es el pronóstico de supervivencia del paciente ^{11,12}. Los espectros de RMN evidenciaron que la estructura de p27 es altamente flexible, con secciones que rápidamente se pliegan o despliegan en alfa-hélices o láminas beta. Gracias a esta flexibilidad la proteína p27 puede inhibir al menos seis diferentes tipos de quinasas, por lo que es considerada dentro del tipo de las "proteínas promiscuas" o "proteínas multipropósito".

Dentro del amplio espectro de proteínas que van desde el desorden total (proteínas total o casi totalmente desestructuradas) al orden total (proteínas con una rígida estructura de plegamiento), la p27 se encuentra dentro de los casos más extremos de "desorden". Por su parte la calcineurina, una fosfatasa involucrada en la respuesta inmune y que es el blanco de drogas utilizadas en la terapia inmunosupresora, constituye un ejemplo de proteínas parcialmente desestructuradas: posee dos subunidades diferenciadas, la subunidad A que es catalítica y la subunidad B que proporciona a la enzima sensibilidad frente al calcio; entre ambas subu-

nidades dse extiende una región desordenada de 95 aminoácidos (totalmente desestructurada) que finaliza en un péptido autoinhibitorio que impide la acción catalítica cuando se dispone sobre el sitio activo ¹³. De este modo la calcineurina se comporta como dos proteínas en una: la región estructurada cataliza la defosforilación, mientras que la región no estructurada regula la actividad catalítica (Fig. 1).

El gen que provoca la supresión de tumores es uno de los que mutan con más frecuencia

en diversos tipos de cáncer. Su activación provoca la síntesis de una proteína (p53) que cumple múltiples funciones, entre ellas la de coordinar la reparación del ADN dañado. También en este caso estamos frente a una proteína con un alto porcentaje de estructura desordenada: los primeros 93 aminoácidos (23,7 del total de la cadena polipeptídica) conforman una región intrínsecamente desestructurada ¹⁴.

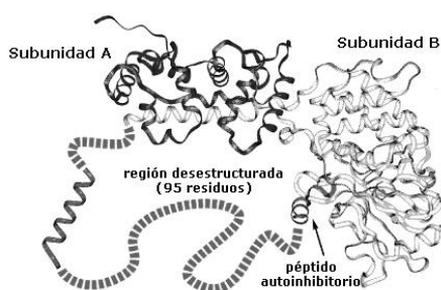


Figura 1. Estructura de la calcineurina. La subunidad A es responsable de la catálisis y la subunidad B le otorga sensibilidad frente al calcio. La región desestructurada es reguladora de la actividad catalítica (adaptado de Kissinger et al. ¹³).

¿Cuál es la abundancia y distribución de las proteínas intrínsecamente desestructuradas?

Actualmente, numerosas proteínas parcial o totalmente desestructuradas han sido claramente identificadas y sus funciones estudiadas en diversos laboratorios. El conocimiento creciente que se tiene de este tipo de proteínas sugirió la necesidad de la construcción de una base de datos específica (Database of Protein Disorder, <http://www.disprot.org>) ¹⁵, donde a la fecha hay identificadas 643 proteínas, resultado de la colaboración del Centro de Biología Computacional y Bioinformática de la Facultad de Medicina de la Universidad de Indiana y del Centro para la Información

en Ciencia y Tecnología de la Universidad de Temple, EE.UU.

La información bioinformática provista por los primeros estudios teóricos sobre la composición de las proteínas sugirieron que la forma en la que la cadena polipeptídica se pliega depende fuertemente de la clase de aminoácidos presentes; así, los aminoácidos voluminosos e hidrofóbicos ocupan posiciones más internas, en tanto que los que se encuentran en la periferia son usualmente más pequeños y de naturaleza hidrofílica. Sobre la base de esta información se desarrollaron algoritmos computacionales que demostraron que las proteínas intrínsecamente desordenadas eran más ricas en aminoácidos hidrofílicos

cuando se las comparaba con proteínas “rígidas”, de modo que el balance de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos puede predecir si una proteína podrá plegarse total o sólo parcialmente, e incluso carecer de plegamiento ¹⁶.

Para explorar la implicancia biológica de estos hechos se realizó una comparación a través de diferentes reinos de organismos vivos. En los organismos más simples, los comprendidos dentro de los dominios *Bacteria* y *Archaea*, aparecieron muy pocas proteínas intrínsecamente desordenadas. Pero en los eucariotes más utilizados para estudios genómicos, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y *Arabidopsis thaliana*, las proteínas desestructuradas resultaron ser mucho más prevalentes¹⁷.

El estudio fue extendido algunos años más tarde a otros grupos de organismos, revelando que segmentos desordenados mayores de 30 residuos aminoácídicos se encuentra sólo en un 2% de los casos en arqueobacterias, pero se incrementa a un 4,2% en eubacterias, para llegar a un 33.0% en el caso de las proteínas de células de eucariotes ¹⁸. Las razones para esta divergencia no resultan claras, pero es posible que las proteínas altamente estructuradas (con modelo tipo llave-cerradura) sean responsables de actividades catalíticas, en tanto que las que poseen algún grado mayor de desestructuración resulten estar involucradas en procesos de señalamiento y regulación. Debe tenerse en cuenta que los procariotes poseen un único compartimiento, pero en los eucariotes la aparición de diversos orgánulos, tales como el núcleo, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y las mitocondrias (más los cloroplastos en las células vegetales) hacen necesario refinados sistemas de señalamiento y regulación de la actividad celular ³.

La escasez de proteínas intrínsecamente desestructuradas en los procariotes podría sugerir que aparecieron tardíamente durante la evolución. Sin embargo recientes investigaciones ¹⁹ han demostrado que la estructura de viejas máquinas moleculares tal como el espirosoma o complejo de corte y empalme, responsable de eliminar los intrones (secuencias no codificantes) de los precursores del ARN mensajero inmaduro, contiene diversas proteínas con alto grado de desestructuración.

Las investigaciones sobre el origen de la vida reafirman la antigüedad de las proteínas desestructuradas. Una de las hipótesis prevalentes sugiere que los primeros organismos estuvieron basados en el ARN, que cumplía la doble función de actuar como catalizador de las reacciones químicas y como depositario de la información genética, funciones luego transferidas a las enzimas y al ADN, respectivamente. Una de las debilidades de esta teoría es que el ARN se pliega con muy poca eficiencia para cumplir con su función catalítica, problema que en las células modernas está resuelto por proteínas “chaperonas” que favorecen su plegamiento. Sin embargo un hecho notable y que apoyaría la idea de la antigüedad de las proteínas desestructuradas es que las proteínas chaperonas del ARN carecen de una estructura estable antes de unirse al ARN ²⁰.

Otro soporte a la idea de la antigüedad de las proteínas intrínsecamente desestructuradas proviene de analizar el origen del código genético (serie de reglas utilizadas para descifrar la información contenida en un ácido nucleico, ya sea ARN o ADN, que permite construir una determinada proteína). Se cree que ciertos aminoácidos fueron codificados tempranamente durante el proceso de la evolución, mientras que otros lo hicieron tardíamente. Los aminoácidos grandes, hidrofóbi-

cos, que propician el plegamiento estable de una proteína, habrían aparecido tardíamente en el curso de la evolución, por lo que las primeras proteínas carecían de plegamiento o estaban pobremente plegadas ²¹. Por el contrario, la aparición posterior de aminoácidos hidrofóbicos habría permitido que las proteínas adquirieran estructuras más rígidas y estables, proveyendo las bases para la generación de sitios activos del sistema llave-cerradura y favoreciendo el reemplazo del ARN autocatalítico en las células vivas más evolucionadas.

Proteínas intrínsecamente desestructuradas y enfermedad

Dado el rol central que juegan las proteínas en los organismos vivos, no debe sorprender que muchas de ellas estén involucradas en la aparición de diversas enfermedades. El nuevo paradigma del desorden intrínseco en las proteínas debería en consecuencia afectar profundamente nuestra comprensión y el tratamiento de las enfermedades en los seres humanos. Por empezar, la carencia de estructura de una proteína puede ser peligrosa: si una célula las produce en exceso, ciertas proteínas desestructuradas podrían reunirse y formar placas. En el cerebro, la formación de placas de esta naturaleza puede dar lugar a patologías neurodegenerativas de acción devastadora, incluyendo enfermedades tales como Alzheimer, Parkinson y Huntington. Por otra parte, las proteínas desestructuradas deberían ser chequeadas con mayor cuidado, como demuestra un estudio reciente realizado

sobre levaduras, ratas y seres humanos, que reveló que las células regulan la producción de proteínas desestructuradas mucho más estrechamente que las proteínas con plegamiento normal ²².

El hecho de haber asumido que las proteínas intrínsecamente desordenadas pueden estar involucradas en ciertas enfermedades está generando nuevas ideas para sus potenciales tratamientos. Las interacciones proteína-proteína están presentes prácticamente en todo proceso celular y han sido blancos atractivos para el descubrimiento de nuevas drogas, pero con escaso suceso hasta ahora, comparado con los éxitos obtenidos en el desarrollo de medicamentos basados en la acción de pequeñas moléculas sobre ciertas enzimas. No obstante, las proteínas que interactúan con proteínas desestructuradas ofrecen sitios de acción que pueden ser explotados para la inserción de nuevas drogas, como ha ocurrido en el caso del retinoblastoma, un tipo especial de cáncer que afecta esencialmente a niños ²³.

Los científicos están reconociendo ahora que algunas funciones biológicas son mejor desempeñadas por proteínas con estructuras rígidas, en tanto que algunas otras tienen lugar mediadas por proteínas que son (total o parcialmente) intrínsecamente desestructuradas. La aparición de una nueva etapa en el conocimiento de la relación entre estructura y función proteica, además de poseer la virtud potencial de transformar nuestra comprensión de la vida, es de esperar que adicionalmente ayude a salvar algunas de ellas ³.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dyson, H.J. & P.E. Wright (2005) "Intrinsically unstructured proteins and their functions", *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 197-208.
2. Dunker A.K., C.J. Brown, J.D. Lawson, L.M. Iakoucheva & Z. Obradović (2002) "Intrinsic Disorder and Protein Function", disponible en <http://www.dabi.temple.edu/~zoran/papers/Dunker_TPT.pdf> [Consultado el 18 de junio de 2011].
3. Dunker, A.K. & R.W. Kriwacki (2011) "The orderly chaos of proteins", *Sci. Am.* **304**: 48-53.
4. Fisher, E. (1894) "Einfluss der configuration auf die wirkung den enzyme", *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **27**: 2985-2993.
5. Edsall, J. T. (1995) "Hsien Wu and the first theory of protein denaturation (1931)", *Adv. Protein Chem.* **46**, 1-5.
6. Pauling, L. & R.B. Corey (1951) "Configurations of Polypeptide Chains With Favored Orientations Around Single Bonds. Two New Pleated Sheets", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **37**: 729-740.
7. Meekin, T.J. (1952) "Milk Proteins", *J. Food Protect.* **15**: 57-63. 8. Söderqvist, T. & B. Blombäck (1971) "Fibrinogen structure and evolution", *Naturwissenschaften* **58**: 16-23.
9. Hiebert, E. & J.G. McDonald (1976) "Capsid protein heterogeneity in turnip mosaic virus", *Virology* **70**: 144-150.
10. Kriwacki, R.W., L. Hengst, L. Tennant, S.I. Reed & P.E. Wright (1996) "Structural studies of p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} in the free and Cdk2-bound state: Conformational disorder mediates binding diversity", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 11504-11509.
11. Kapranos, N., G.P. Stathopoulos, L. Manolopoulos, E. Kokka, C. Papadimitriou, A. Bibas, J. Yiotakis, G. Adamopoulos (2001) p53, p21 and p27 protein expression in head and neck cancer and their prognostic value, *Anticancer Res.* **21**(1B): 521-528.
12. Borriello, A., D. Bencivenga, M. Criscuolo, I. Caldarelli, V. Cucciolla, A. Tramontano, A. Borgia, A. Spina, A. Oliva, S. Naviglio & F. Della Ragione (2011) "Targeting p27^{Kip1} protein: its relevance in the therapy of human cancer", *Expert Opin. Ther. Targ.* **15**: 677-693
13. Kissinger, C.R. H.E. Parge, D.R. Knighton, C.T. Lewis, L.A. Pelletier, A. Tempczyk, V.J. Kalish, K.D. Tucker, R.E. Showalter, E.W. Moomaw, L.N. Gastinel, N. Habuka, X. Chen, F. Maldonado, J.E. Barker, R. Bacquet & J.E. Villafranca (1995) "Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex", *Nature* **378**: 641-644.
14. Rajagopalan S., A. Andreeva, T.J. Rutherford & A.R. Fersht (2010) "Mapping the physical and functional interactions between the tumor suppressors p53 and BRCA2", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**: 8587-8592.
15. Sickmeier, M., J.A. Hamilton, T. LeGall, V. Vacic, M.S. Cortese, A. Tantos, B. Szabo, P. Tompa, J. Chen, V.N. Uversky, Z. Obradovic & A.K. Dunker (2007) "DisProt: the Database of Disordered Proteins." *Nucleic Acids Res.* **35** (Database issue):D786-793.
16. Xie, Q., G.E. Arnold, P. Romero, Z. Obradovic, E. Garner & A.K. Dunker (1998) "The Sequence Attribute Method for Determining Relationships Between Sequence and Protein Disorder", *Genome Informatics Workshop* **9**: 193-201.
17. Dunker, A.K., Z. Obradovic, P. Romero, E.C. Garner & C.J. Brown (2000) "Intrinsic protein disorder in complete genomes". *Genome*

- Inform. Ser. Workshop Genome Inform.*, **11**, 161–171. Disponible en <<http://www.dabi.temple.edu/~zorant/papers/dunker00.pdf>>. Consultado el 26 de junio de 2011.
18. Ward, J.J., J.S. Sodhi, L.J. McGuffin, B.F. Buxton and D.T. Jones (2004) "Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life". *J. Mol. Biol.* **337**: 635-45.
19. Wahl, M.C., C.L. Will & R. Lührmann (2009) "The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine", *Cell* **136**, 701–718.
20. Semrad, K. (2011) "Proteins with RNA Chaperone Activity: A World of Diverse Proteins with a Common Task—Impediment of RNA Misfolding", *Biochem. Res. Int.* 2011: Article ID 532908, doi:10.1155/2011/532908
21. Liu, X., J. Zhang, F. Ni, X. Don, B. Han, D. Han, Z. Ji & Y. Zhao "Genome wide exploration on the origin and evolution of amino acids", *BMC Evolution. Biol.* **10**: 77.
22. Gsponer, J, M.E. Futschik, S.A. Teichmann & M.M. Babu. (2008) "Tight regulation of un-structured proteins: from transcript synthesis to protein degradation", *Science* **322**: 1365-1368.
23. Wallick, C.J., I. Gamper, M. Thorne, D.J. Feith, K.Y. Takasaki, S.M. Wilson, J.A. Seki, A.E. Pegg, C.V. Byus & A.S. Bachmann (2005) "Key role for p27^{Kip1}, retinoblastoma protein Rb, and MYCN in polyamine inhibitor-induced G1 cell cycle arrest in MYCN-amplified human neuroblastoma cells", *Oncogene* **24**, 5606–5618.

INFLUENCIA DE LA PROTEÍNA DE RESISTENCIA DEL CÁNCER DE MAMA (BCRP) EN LA FARMACOCINÉTICA DE LOS ANTIRRETROVIRALES

Roxana Noemí Peroni

Instituto de Investigaciones Farmacológicas, CONICET-UBA

Cátedra de Farmacología, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

rperoni@ffyub.uba.ar

Tabla de contenidos

Resumen.....	91
Summary.....	92
Introducción.....	92
Estudios en líneas celulares que sobreexpresan BCRP.....	94
Estudios en el tracto gastrointestinal.....	95
Estudios en linfocitos.....	96
Estudios en barrera hemato-encefálica.....	97
Estudios en placenta.....	98
Conclusiones.....	98
Bibliografía.....	99

Resumen

La terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) es la terapia de elección en las personas portadoras del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La seguridad y la eficacia de la TARGA se enfrentan tanto a los mecanismos de resistencia del virus como a la frecuente aparición de interacciones medicamentosas que limitan el acceso de estos medicamentos a los sitios de destino. La complejidad de los regímenes con ARV y la necesidad de otros medicamentos para tratar las comorbilidades conducen a un alto riesgo de interacciones droga-droga en pacientes infectados con VIH (1,2). Dentro de los mecanismos que conducen al fracaso de la TARGA se encuentra el eflujo activo de los ARV que

afecta la acumulación de estos fármacos dentro de las células diana o de compartimentos donde se anida el virus que, como consecuencia, continúa replicándose. En el eflujo de los ARVs participan varios miembros de la superfamilia de transportadores ABC (ATP-binding cassette) como la BCRP. Este trabajo de revisión resume el conocimiento actual acerca de la influencia de la BCRP en los parámetros farmacocinéticos de los ARVs, y su posible papel en las interacciones droga-droga que disminuyen la eficacia y la seguridad de la TARGA.

Palabras clave: BCRP, VIH, biodisponibilidad de antirretrovirales

Summary

INFLUENCE OF THE BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN OF (BCRP) ON THE PHARMACOKINETICS OF ANTIRETROVIRALS

The highly active antiretroviral therapy (HAART) is the therapy of choice for people living with human immunodeficiency virus (HIV). The safety and efficacy of HAART face both resistance mechanisms of the virus as the frequent occurrence of drug interactions that limit the access of these drugs to target sites. The complexity of ARV regimens and the need for other drugs to treat comorbidities leads to a high risk of drug-drug interactions in patients infected with HIV (1,2).

Among the mechanisms that lead to failure of HAART is the active efflux of ARVs that affects the accumulation of these drugs within the target cells or compartments where the virus is nested, therefore, continues to replicate. The efflux of ARVs involved several members of the superfamily of ABC transporters (ATP-binding cassette) as the BCRP. This review summarizes current knowledge about the influence of BCRP in the pharmacokinetics of ARVs, and their possible role in drug-drug interactions that decrease the efficacy and safety of HAART.

Keywords: BCRP, HIV, antiretroviral bioavailability

Introducción

Se han caracterizado 49 genes ABC en humanos, que pueden clasificarse en siete subfamilias basándose en sus características filogenéticas y su secuencia de aminoácidos (3).

Además de la glicoproteína-P (P-gp, MDR1/ABCB1) y de las proteínas relacionados con la resistencia a múltiples fármacos (MRPs / ABCCs), que han sido bien analizadas en los últimos años, la proteína de resistencias del cáncer de mama (BCRP) también ha demostrado estar relacionada con la resistencia a múltiples drogas (3). La BCRP, de 72-kDa, es el segundo miembro de la subfamilia G y por tanto también se la denomina ABCG2.

La mayoría de las proteínas ABC están formadas por cuatro dominios, dos dominios transmembrana y dos dominios de unión a nucleótidos ("Nucleotide-binding domains"). Mientras que los dominios de unión a nucleótidos son responsables de la unión e hidrólisis del ATP, y consecuentemente responsables de generar la fuerza motriz para el transporte, los dominios transmembrana median el transporte vectorial de los sus-tratos a través de las membranas celulares. Como muestra la Figura 1, a diferencia de la glicoproteína-P y el Mrp1, que poseen esta estructura, BCRP es un medio transportador ("half transporter") que consta de un dominio de unión a nucleótidos y de un dominio que atraviesa la membrana (4).

Figura 1

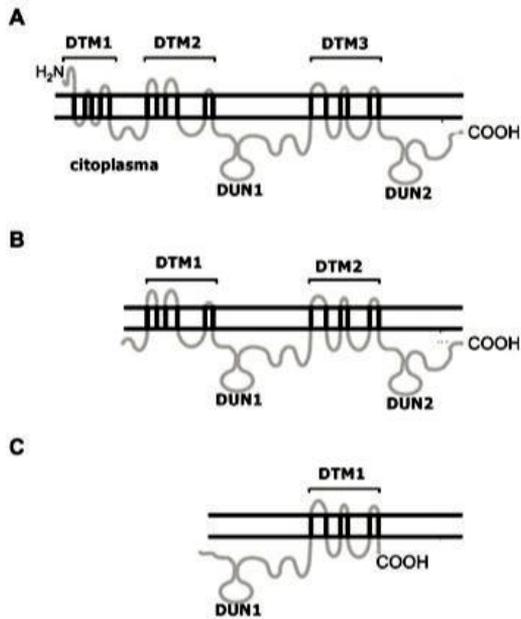


Fig. 1. Estructuras secundarias esquemáticas de los transportadores ABC que confieren resistencia a los medicamentos mejor caracterizados. Se muestran los modelos topológicos de (A) MRP1 y MRP2, (B) P-gp y (C) BCRP. DTM: dominio transmembrana; DUN: dominio de unión a nucleótidos.

El Bcrp1/Abcg2 murino comparte el 81% identidad de aminoácidos y confiere resistencia al mismo espectro de agentes contra el cáncer que la BCRP/ABCG2 humana (5,6). También se ha clonado el Bcrp1/Abcg2 de rata que comparte el 82% de aminoácidos con la proteína humana (7,8). Dos laboratorios han desarrollado de manera independiente ratones Bcrp1/Abcg2^{-/-} y han demostrado que estos animales son viables, sanos y fértiles (9,10). Estos animales knock-out han proporcionado una herramienta valiosa para determinar el papel fisiológico de Bcrp1/Abcg2 y sugieren que tiene un papel importante en la protección de los tejidos contra los componentes tóxicos de los alimentos y los xenobióticos (9-11). El ratón knockout Bcrp1/Abcg2 es extremadamente sensible al producto del clivaje de la clorofila dietario feoforbide A, lo que resulta en graves lesiones fo-

tóxicas en la piel expuesta a la luz y esto se debe a que Bcrp1/Abcg2 es importante para reducir la acumulación celular de feoforbide A (12).

La sobreexpresión de la BCRP está asociada con altos niveles de resistencia a una variedad de agentes contra el cáncer, incluyendo antraciclinas, mitoxantrona y camptotecinas. Sin embargo, su expresión no se limita a las células de cáncer de mama, también está presente en otros tipos de tumores y en varios tejidos normales como los sincitiotrofoblastos de la placenta, los enterocitos, la membrana canalicular del hígado, los conductos y los lóbulos mamarios, los vasos sanguíneos, las células mononucleares de la sangre y en alta concentración en poblaciones de células madre hematopoyéticas (13). Esta localización generalizada, en su mayoría superpuesta con la de P-gp, indica que la

BCRP interviene en los procesos fisiológicos de transporte que protegen a los tejidos de los xenobióticos y de las toxinas endógenas (9, 14).

Dos características de la BCRP la hacen relevante para el campo de la farmacocinética. Por un lado, el tratamiento con fármacos que son sustratos o inhibidores puede modificar sus niveles de expresión y/o su funcionalidad y por otro lado, se han reportado hasta el momento más de 80 variantes polimórficas de nucleótido único (SNP) en el gen que codifica para BCRP (15). Algunas de estas variantes polimórficas ocurren con alta frecuencia en la mayoría de las poblaciones y generan alteraciones en la expresión y en la actividad del transportador, tal como ocurre con el polimorfismo C421A (16) o incluso pueden alterar el espectro de sustratos de transportador, como es el caso de las mutaciones en el aminoácido R482 (17). Por ello, estos fenómenos que ocurren a nivel intra e interindividual generan variaciones en la acumulación intracelular y en el pasaje de los compuestos sustrato de la BCRP a través de barreras fisiológicas.

La TARGA es una combinación de tres o cuatro medicamentos antirretrovirales (ARV) entre los que se encuentran los inhibidores de la proteasa del VIH (IP), los inhibidores nucleósidos y no-nucleósidos de la transcriptasa reversa (INTR y INNTR, respectivamente), los inhibidores nucleótidos de la transcriptasa inversa (NtRTI) y los inhibidores de la fusión (IF). Como es de esperar entonces, aquellas terapias como la TARGA, en las cuales el paciente recibe varias drogas concomitantemente, son susceptibles de sufrir modificaciones en su eficacia y en su seguridad debido a la aparición de interacciones medicamentosas

de tipo farmacocinéticas producidas por modificaciones en la actividad de la BCRP (18). Este trabajo muestra una visión general del estado de conocimiento acerca de la influencia de la BCRP en la TARGA en tejidos de relevancia para la infección por VIH.

Estudios en líneas celulares que sobreexpresan la proteína BCRP

Los primeros estudios que analizaron la interacción entre los ARVs y los transportadores ABC se desarrollaron *in vitro* sobre líneas celulares transfectadas. Así, en células que sobreexpresan transportadores ABC, se ha observado que los IP se comportan como potentes bloqueantes pero como pobres sustratos tanto de la P-gp como de la Mrp1 y de la BCRP. En consecuencia, es poco probable que estos transportadores desempeñen un papel importante en el fracaso terapéutico de los IP, pero la acción inhibitoria de los mismos podría estar relacionada con las interacciones droga-droga que sufre este grupo de fármacos (19). En este sentido, en líneas celulares de adenocarcinoma de colon, se observa que el tratamiento crónico con los IP saquinavir y darunavir produce la inducción sustancial de los transportadores ABC, entre ellos la BCRP, que disminuye la acumulación de los ARV y de otros medicamentos usados para tratar la co-morbilidad que se comporten como sustrato de los transportadores afectando la eficacia terapéutica (20).

Un análisis exhaustivo acerca de la capacidad de los ARVs para inhibir el transporte de feoforbida mediado por la BCRP fue realizada en células de riñón canino y demostró que los IP lopinavir y nelfinavir son los ARV de mayor potencia inhibitoria seguidos por los INNTR efavirenz y delavirdina, mientras

que los INRT ejercen pobre inhibición (zidovudina) o directamente carecen de acción inhibitoria sobre la BCRP (lamivudina y zalcitabina). Este estudio dio fuerza a la hipótesis de que una inhibición significativa de la BCRP por muchos medicamentos anti-VIH podría contribuir a las interacciones fármaco-fármaco observadas durante la TARGA en vivo y posiblemente también afectaría la eficacia de la terapia antirretroviral combinada (21).

En paralelo, otro estudio realizado en células de riñón canino muestra que la BCRP media el transporte polarizado de los INTR abacavir y zidovudina (22). Recientemente, se ha demostrado que INNTRs de última generación como la etravirina es un potente inhibidor de la BCRP. De igual modo, pero con menor potencia, este transportador de eflujo es inhibido por el elvitegravir, que actúa como inhibidor de la integrasa del virus (23, 24).

En su conjunto, estos estudios sugieren que la expresión funcional de BCRP en barreras críticas, tales como los enterocitos, el en-

dotelio capilar del cerebro, los linfocitos y la placenta podría influir en la biodisponibilidad y en la distribución selectiva de varios tipos de ARVs hacia los sitios santuario del virus (22).

Estudios en el tracto gastrointestinal

El tracto gastrointestinal representa la primera línea de defensa del cuerpo contra la exposición oral a las toxinas y a las drogas. Las vellosidades altamente diferenciadas de los enterocitos tienen una función de absorción y los transportadores ABC están presentes en este tejido para prevenir y/o modular el paso de ciertos xenobióticos o de sus metabolitos desde el intestino hacia la circulación, como se observa en la Figura 2. La BCRP se expresa de forma constante en la superficie apical de las células epiteliales que recubren el intestino delgado y del colon en humanos, mientras que los niveles de expresión de la Bcrp1 van aumentando hacia la porción distal del yeyuno y el íleon en la rata (24-28).

Figura 2

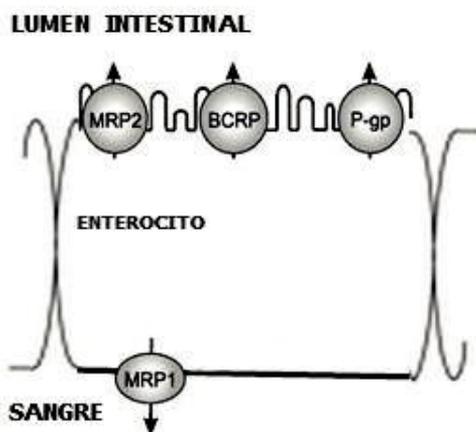


Fig. 2. Diagrama esquemático de la localización y distribución de MRP1, MRP2, P-gp y BCRP en el intestino.

Recientemente, hemos demostrado que la BCRP es capaz de expulsar al INNTR efavirenz hacia el lumen intestinal modulando negativamente la absorción de la droga en ratas (29). Por su parte, la administración crónica por vía oral de efavirenz induce, aproximadamente al 100%, la expresión intestinal de BCRP y esto se acompaña de una disminución marcada de la permeabilidad intestinal del ARV, sin embargo, regresa a valores similares a los controles a las 24 horas de la última administración de efavirenz. Estos resultados, sumados a los ensayos *in vitro* que mostraban una potente capacidad del efavirenz para inhibir a la BCRP, sugieren la posibilidad de que el ARV compita con otros sustratos de la BCRP pudiendo reflejarse este fenómeno en cambios en la acumulación de efavirenz que contribuirían con las variaciones de la biodisponibilidad intraindividual que se han observado para esta droga.

Estudios en linfocitos

Los estudios en líneas celulares parecen mostrar que los transportadores ABC, incluida la BCRP, podrían impactar en la farmacocinética de los ARVs y, como consecuencia, en la eficacia y en la seguridad de la TARGA. La predicción de la susceptibilidad del paciente VIH a estos fármacos, así como a los fármacos administrados conjuntamente para tratar la comorbilidad asociada a esta patología, y la individualización de la terapia farmacológica sería posible, si contásemos con una prueba sencilla plausible de realizarse en humanos para una fácil detección de la expresión de la BCRP. Sin embargo, un estudio en humanos mostró que los niveles de expresión del ARN mensajero (ARNm) de los transportadores ABC y del receptor X de embarazo, un regulador clave en el metabolismo y la expulsión de drogas, no guardan correlación

entre las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y las muestras de hígado e intestino delgado correspondientes, con excepción de MRP1 en el intestino sugiriendo que los niveles de BCRP en las CMSP no pueden considerarse como marcadores de lo que ocurre en los demás tejidos. Sin embargo, las variaciones de los niveles de expresión de los transportadores en las CMSP son relevantes *per se* en la TARGA dado que estas células son el principal blanco de acción de los ARVs (30). En este sentido, ensayos realizados en linfocitos T CD4+ resistentes a mitoxantrona, un sustrato específico de la BCRP, han demostrado que la sobreexpresión del transportador que presentan estas células, disminuye drásticamente la capacidad de inhibir la replicación del VIH que poseen los INTR zidovudina y lamivudina debido a una disminución marcada de la acumulación intracelular de estos sustratos. Este fenómeno se revierte completamente cuando se inhibe la BCRP y por lo tanto, se considera que este transportador es un factor celular que modula la actividad anti-VIH-1 de los INTR en los linfocitos T CD4 + (31, 32). Por otro lado, evidencias de nuestro grupo de trabajo muestran una inducción de la BCRP en las CMSP luego del tratamiento oral crónico con el efavirenz, en igual sentido que lo que ocurre en intestino, con lo cual, para esta droga en particular podría haber un correlato entre distintos tejidos respecto de la modulación de la BCRP (28).

Además, aun cuando no ha observado que la infección por VIH ni que las terapias con ARV modulan los perfiles de expresión génica de los transportadores ABC, los niveles de expresión del gen de BCRP en linfocitos son altos al momento del nacimiento y decaen significativamente al primer mes de vida. Por ello, es posible que sustratos de la BCRP, como la zidovudina, puedan tener una eficacia alterada en el recién nacido (33).

Estudios en la barrera hemato-encefálica

Las interface primaria entre la circulación periférica y el sistema nervioso central es la barrera hemato-encefálica (BHE). La BHE se compone de una monocapa de células capilares del cerebro que se fusionan por las zonulae occludens y las uniones estrechas para formar una barrera continua impermeable a todo exceptuando los pequeños compuestos lipofí-

licos, tales como los ARVs. Como se muestra en la Figura 3, el ARNm y la proteína de BCRP se expresan predominantemente en la superficie luminal de los capilares cerebrales (34-37). Curiosamente, los niveles de ARNm y la funcionalidad de la Bcrp1 fueron más altos en los ratones carentes del gen de la P-gp en comparación con los ratones de la cepa salvaje, lo cual sugiere una compensación sobre la regulación de la Bcrp1 en ausencia de la P-gp (34).

Figura 3

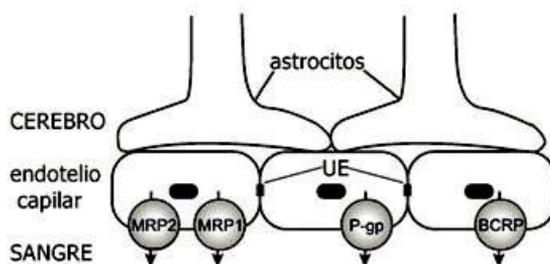


Fig. 3. Diagrama esquemático de la localización y distribución de MRP1, MRP2, P-gp y BCRP en la barrera hemato-encefálica. UE: uniones estrechas.

Además, se ha propuesto recientemente que las células gliales pueden contribuir, también, a disminuir la distribución y bajar la acumulación de los compuestos terapéuticos en el sistema nervioso central, funcionando como una "barrera secundaria". De hecho, algunos estudios han demostrado que los transportadores ABC funcionales se expresan en las células gliales. La infección por VIH-1 es una enfermedad crónica caracterizada por la exposición prolongada de los compartimentos celulares del cerebro a los viriones y a las proteínas solubles virales. Tanto los factores patológicos asociados con la infección por VIH-1 como los factores relacionados con el tratamiento farmacológico

prolongado pueden alterar la expresión de los transportadores ABC y conducir a cambios la captación y/o distribución de los propios ARVs en el sistema nervioso central (38).

Por otro lado, utilizando un modelo in vitro de barrera hemato-encefálica humana, se ha evidenciado que los transportadores ABC, entre ellos la BCRP, previenen el pasaje del IP atazanavir y por lo tanto disminuyen su llegada al sistema nervioso central (39). Otra evidencia que apoya la participación de la BCRP en la distribución de los ARVs al cerebro ha sido evaluada en estudios in vivo en ratas, en los que se demostró que el INNTR efavirenz, de forma similar a lo descrito en in-

testino delgado, es sustrato de la BCRP y que el tratamiento oral prolongado con este ARV induce la expresión del transportador en los capilares de la barrera hemato-encefálica con la consecuente disminución de su llegada al sistema nervioso central, siendo este fenómeno revertido a las 24 hs luego de la última administración (40).

Estudios en placenta

Fisiológicamente, la placenta es un tejido con altos niveles de expresión de la BCRP tanto en humanos como en ratones y en ratas (9,41). El transportador de eflujo se localiza en las membranas del borde de ribete en cepillo del sincitiotrofoblasto (Figura 4).

Figura 4

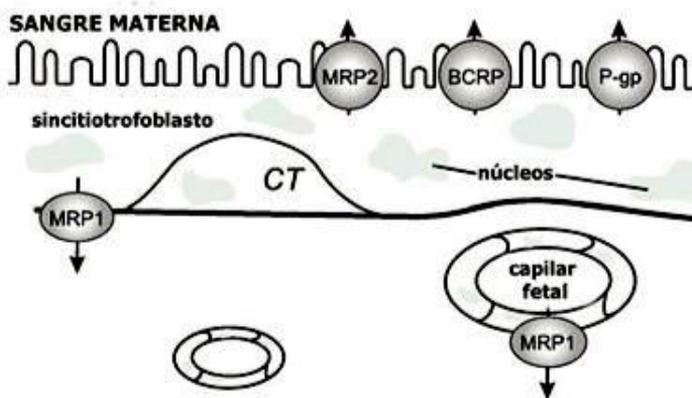


Fig. 4. Diagrama esquemático de la localización y distribución de MRP1, MRP2, P-gp y BCRP en la placenta. CT: citotrofoblastos.

Estudios recientes de nuestro laboratorio muestran que existe un aumento de la expresión de la BCRP en la placenta y en el hígado fetal de rata como consecuencia del tratamiento oral crónico con el INTR zidovudina. Por otro lado, los niveles de BCRP permanecen inalterados en ambos tejidos cuando los animales son tratados con otro fármaco de este grupo, la lamivudina (41). Este fenómeno podría estar asociado al hecho de que la zidovudina, a diferencia de la lamivudina, es sustrato y además es un potente inhibidor de la BCRP (21) y sugiere que los niveles de la BCRP aumentarían como un mecanismo de protección del pasaje de zidovudina al compartimento fetal. En este sentido, los fetos de ratas tratadas con lamivu-

dina tienen menor peso al nacer que en las ratas tratadas con el vehículo correspondiente y se observa un número significativamente mayor de resorciones fetales, mientras que luego del tratamiento con zidovudina no se encuentran diferencias con respecto a los controles (resultados no publicados).

Conclusiones

Las especificidades de sustrato y de tejidos y células específicas de patrones de expresión de BCRP, combinado con la evidencia experimental de animales genéticamente revisados aquí, dejan pocas dudas de que esta proteína de transporte desempeña un

papel fundamental tanto en la farmacocinética como en la toxicocinética de xenobióticos. Cada vez se reconoce más ampliamente que este transportador tiene un impacto de importancia en la absorción, distribución, metabolismo y excreción de varios fármacos y de sus metabolitos así como también toxinas endógenas y es por ello que debe ser tenido en cuenta en aquellas circunstancias en que el esquema terapéutico puede presentar fallas debidas a interacciones droga-droga o, más simple aún, en aquellas terapias a largo plazo en las que los parámetros farmacocinéticos parecen alterarse con el tiempo.

En la actualidad, los aumentos de la toxicidad o la exposición a niveles sub-terapéuticos de las drogas que son frecuentemente observados en la TARGA y que pueden producirse por interacciones farmacológicas en los sitios de transporte son probablemente subestimadas y podrían ser causa de alteraciones en las concentraciones sistémicas de los fármacos anti-VIH o de los medicamentos conjuntamente administrados para disminuir la comorbilidad. Como fue descrito anteriormente, tanto las interacciones droga-droga como los polimorfismos de nucleótido único que se traducen en alteraciones de la expresión y/o función del transportador puede resultar en un aumento

de la susceptibilidad de los individuos a los efectos adversos de la exposición a ARV. En la actualidad, nuestro conocimiento con respecto a las consecuencias funcionales de los polimorfismos específicos es relativamente limitada y es claramente de gran interés para toxicólogos, farmacólogos y médicos tanto en las comunidades académicas como en las empresas farmacéuticas y ocupa un volumen importante de las publicaciones actuales en el campo de la farmacogenómica.

El desafío de la comunidad científica en cuanto a este particular es la posibilidad de desarrollar una prueba sencilla en sangre periférica que actúe como marcador predictivo de lo que ocurrirá potencialmente luego de recibir la TARGA en cada paciente individualizado.

Es en este sentido, que nuestros estudios en cuanto a la relación entre la BCRP y los ARVs, sumados a los de nuestros colegas en el campo, tienen el objetivo de colaborar con la búsqueda de parámetros que permitan completar el perfil de cada paciente VIH+. La terapéutica de tipo individualizada en los enfermos de SIDA, cada vez más asoma como la única alternativa para conseguir óptimos resultados, en cuanto a eficacia y a seguridad, que mejoren la calidad de vida de los pacientes.

Bibliografía:

1. de Maat .M, Ekhart GC, Huitema AD, Koks CH, Mulder JW, Beijnen JH. (2003) Drug in-teractions between antiretroviral drugs and comedicated agents. Clin Pharmacokinet. 42:223-282
2. Piscitelli SC, Gallicano KD. (2001) Interactions among drugs for HIV and opportunistic infections. N Engl J Med. 344:984-996
3. Dean M. (2005) The genetics of ATP-binding cassette transporters. Methods Enzymol. 400:409-429
4. Ni Z, Bikadi Z, Rosenberg MF, Mao Q. (2010) Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ ABCG2). Curr Drug Metab. 11:603-617
5. Allen JD, Schinkel AH. (2002) Multidrug resistance and pharmacological protection

- mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Mol Cancer Ther.* 1:427-434
6. Allen JD, Brinkhuis RF, Wijnholds J, Schinkel AH. (1999) The mouse *Bcrp1/Mxr/ Abcp* gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res.* 59:4237-4241
 7. Hori S, Ohtsuki S, Tachikawa M, Kimura N, Kondo T, Watanabe M, Nakashima E, Terasaki, T. (2004) Functional expression of rat ABCG2 on the luminal side of brain capillaries and its enhancement by astrocyte-derived soluble factor(s). *J. Neurochem.* 90:526–536
 8. Shimano K, Satake M, Okaya A, Kitanaka J, Kitanaka N, Takemura M, Sakagami M, Terada N, Tsujimura T. (2003) Hepatic oval cells have the side population phenotype defined by expression of ATP-binding cassette transporter ABCG2/BCRP1. *Am. J. Pathol.* 163:3–9
 9. Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, van der Valk M, Scheffer GL, Scheper RJ, Plosch T, Kuipers F, Oude Elferink RPJ, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH. (2002) The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:15649–15654
 10. Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, Lan L, Schuetz JD, Sorrentino BP. (2002) *Bcrp1* gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:12339–12344
 11. Sarkadi B, Ozvegy-Laczka C, Nemet K, Varadi A. (2004) ABCG2—A transporter for all seasons. *FEBS Lett.* 567:116–120
 12. Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, Sarkadi B, Sorrentino BP, Schuetz JD. (2004) The stem cell marker *Bcrp/ABCG2* enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J. Biol. Chem.* 279:24218–24225
 13. Mao Q, Unadkat JD. (2005) Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J.* 7:E118-133
 14. van Herwaarden AE, Jonker JW, Wagenaar E, Brinkhuis RF, Schellens JH, Beijnen JH, Schinkel AH. (2003) The breast cancer resistance protein (*Bcrp1/Abcg2*) restricts exposure to the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Res.* 63:6447–6452
 15. Lepper ER, Nooter K, Verweij J, Acharya MR, Figg WD, Sparreboom A. (2005) Mechanisms of resistance to anticancer drugs: the role of the polymorphic ABC transporters ABCB1 and ABCG2. *Pharmacogenomics.* 6:115–138
 16. Imai Y, Nakane M, Kage K, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Miki Y, Sugimoto Y. (2002) C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. *Mol Cancer Ther.* 1:611–616
 17. Honjo Y, Hrycyna CA, Yan QW, Medina-Pérez WY, Robey RW, van de Laar A, Litman T, Dean M, Bates SE. (2001) Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res.* 61:6635-6639
 18. Breedveld P, Pluim D, Cipriani G, Wielinga P, van Tellingen O, Schinkel AH, Schellens JH. (2005) The effect of *Bcrp1* (*Abcg2*) on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of imatinib mesylate (Gleevec):

- implications for the use of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in patients. *Cancer Res.* 65:2577-2582
19. Bierman WF, Scheffer GL, Schoonderwoerd A, Jansen G, van Agtmael MA, Danner SA, Scheper RJ. (2010) Protease inhibitors atazanavir, lopinavir and ritonavir are potent blockers, but poor substrates, of ABC transporters in a broad panel of ABC transporter-overexpressing cell lines. *J Antimicrob Chemother.* 65:1672-1680
20. König SK, Herzog M, Theile D, Zembruski N, Haefeli WE, Weiss J. (2010) Impact of drug transporters on cellular resistance towards saquinavir and darunavir. *J Antimicrob Chemother.* 65:2319-2328
21. Weiss J, Rose J, Storch CH, Ketabikiyavash N, Sauer A, Haefeli WE, Efferth T. (2007) Modulation of human BCRP (ABCG2) activity by anti-HIV drugs. *J Antimicrob Chemother.* 59:238-245
22. Pan G, Giri N, Elmquist WF. (2007) Abcg2/Bcrp1 mediates the polarized transport of antiretroviral nucleosides abacavir and zidovudine. *Drug Metab Dispos.* 35:1165-1173
23. Zembruski NC, Büchel G, Jödicke L, Herzog M, Haefeli WE, Weiss J. (2011) Potential of novel antiretrovirals to modulate expression and function of drug transporters in vitro. *J Antimicrob Chemother.* 66:802-812
24. Zembruski NC, Haefeli WE, Weiss J. (2011) Interaction potential of etravirine with drug transporters assessed in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:1282-1284
25. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg ACLM, Schinkel AH, van de Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JHM. (2001) Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* 61:3458-3464
26. Dietrich CG, Geier A, Oude Elferink RP. (2003) ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut* 52:1788-1795
27. MacLean C, Moenning U, Reichel A, Fricker G. (2008) Closing the gaps: a full scan of the intestinal expression of p-glycoprotein, breast cancer resistance protein, and multi-drug resistance-associated protein 2 in male and female rats. *Drug Metab Dispos.* 36:1249-1254
28. Peroni RN, Rubio MC, Bramuglia GF. (2009) Modulation of the efflux transporter BCRP (ABCG2) expression by anti-HIV drugs in rats. *Biocell* 33:A36
29. Peroni RN, Di Gennaro SS, Hocht C, Chiappetta DA, Rubio MC, Sosnik A, Bramuglia GF. (2011) Efavirenz is a substrate and in turn modulates the expression of the efflux transporter ABCG2/BCRP in the gastrointestinal tract of the rat. *Biochem Pharmacol.* [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21803024
30. Janneh O, Chandler B, Hartkoorn R, Kwan WS, Jenkinson C, Evans S, Back DJ, Owen A, Khoo SH. (2009) Intracellular accumulation of efavirenz and nevirapine is independent of P-glycoprotein activity in cultured CD4 T cells and primary human lymphocytes. *J Antimicrob Chemother.* 64:1002-1007
31. Wang X, Baba M. (2005) The role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antivir Chem Chemother.* 16:213-216
32. Wang X, Furukawa T, Nitanda T, Okamoto M, Sugimoto Y, Akiyama S, Baba M. (2003) Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-

- 1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Mol Pharmacol.* 63:65-72
33. Giraud C, Manceau S, Declèves X, Goffinet F, Morini JP, Chappuy H, Batteux F, Chouzenoux S, Yousif S, Scherrmann JM, Blanche S, Tréluyer JM. (2010) Influence of development, HIV infection, and antiretroviral therapies on the gene expression profiles of ABC transporters in human lymphocytes. *J Clin Pharmacol.* 50:226-230
34. Cisternino S, Mercier C, Bourasset F, Roux F, Scherrmann JM. (2004) Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrugresistance protein *abcg2* at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res.* 64:3296-3301
35. Cooray HC, Blackmore CG, Maskell L, Barrand MA. (2002) Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *NeuroReport* 13:2059-2063
36. Eisenblatter T, Huwel S, Galla HJ. (2003) Characterization of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood-brain barrier. *Brain Res.* 971:221-231
37. Zhang W, Mojsilovic-Petrovic J, Andrade MF, Zhang H, Ball M, Stanimirovic DB. (2003) The expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels. *FASEB J.* 17:2085-2087
38. Ronaldson PT, Persidsky Y, Bendayan R. (2008) Regulation of ABC membrane transporters in glial cells: relevance to the pharmacotherapy of brain HIV-1 infection. *Glia.* 56:1711-1735
39. Bousquet L, Roucairol C, Hembury A, Nevers MC, Creminon C, Farinotti R, Mabondzo A. (2008) Comparison of ABC transporter modulation by atazanavir in lymphocytes and human brain endothelial cells: ABC transporters are involved in the atazanavir-limited passage across an in vitro human model of the blood-brain-barrier. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 24:1147-1154
40. Peroni RN, Hocht C, Chiappetta DA, Di Gennaro SS, Rubio MC, Sosnik A, Bramuglia GF. (2010) The anti-HIV drug EFAVIRENZ is substrate and modulates the expression of the efflux transporter BCRP (ABCG2) in rats. First World Conference on Nanomedicine and Drug Delivery, Abril de 2010, Kottayam, India
41. Filia M, Di Gennaro SS, Rubio MC, Peroni RN. (2010) Aumento de la expresión del transportador de eflujo BCRP en placenta por el tratamiento crónico con el antirretroviral AZT. *MEDICINA* 70:220

Las β -lactamasas como ejemplo de versatilidad al servicio de la resistencia bacteriana.

Pablo Power, José Di Conza, Gabriel Gutkind*

Laboratorio de Resistencia Bacteriana, Cátedra de Microbiología, Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires Junín 956 (1113), Buenos Aires, Argentina

Resumen – Summary	103
Introducción – Aspectos históricos y primeros reportes:	104
Los antibióticos β -lactámicos: el blanco molecular de las β -lactamasas	105
Estructura y clasificación de los β -lactámicos de interés médico:	105
Mecanismo de acción de los β -lactámicos:	106
Mecanismos de resistencia a β -lactámicos:	
Inactivación enzimática de los antibióticos β -lactámicos.....	108
Las β -lactamasas.....	109
Clasificación y diversidad de las β -lactamasas:	109
Estructura molecular de las serino- β -lactamasas:.....	112
Mecanismo de acción de las serino- β -lactamasas:	114
Algunas consideraciones sobre las propiedades cinéticas de las serino- β -lactamasas y su relación con la estructura:.....	115
Breve reseña sobre la prevalencia y epidemiología de las β -lactamasas en Argentina en la actualidad	117
Referencias	119

Resumen

La presencia de β -lactamasas con capacidad hidrolítica de antibióticos β -lactámicos constituye el mecanismo de resistencia a dichas drogas más frecuentemente encontrado en aislamientos clínicos. Con más de 900 variantes descritas, distribuidas en 4 clases moleculares (A, C y D: serino- β -lactamasas; B: metalo- β -lactamasas) y diversos grupos funcionales, hidrolizan diferentes tipos de antibióticos β -lactámicos con eficiencias hidrolíticas variables de acuerdo a sus estructuras y variabilidad por acumulación de mutaciones, diferentes tipos de expresión, etc. Entre las β -lactamasas de importancia clínica se destacan las β -lactamasas de espectro extendido (β LEE) y las carbapenemasas. Entre las primeras, la producción de enzimas tipo CTX-M (clase A) constituye el principal mecanismo de resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación en enterobacterias en la actualidad, siendo CTX-

M-2 y variantes recientemente emergentes como CTX-M-15 las prevalentes en Argentina. Las segundas están representadas por KPC, que constituyen las carbapenemasas de clase molecular A más ampliamente diseminadas en el mundo; en Argentina, KPC-2 ha sido reportada en *P. aeruginosa*, y es a su vez la variante prevalente en el mundo.

Palabras clave:
CTX-M-2; β LEE; carbapenemasas

Summary

β -Lactamases with hydrolytic activity on β -lactam antibiotics represents the most frequent resistance mechanism among clinical isolates of bacteria. Having more than 900 representatives distributed in 4 molecular classes (A, C and D: serine- β -lactamases; B: metallo- β -lactamases) and diverse functional groups, they hydrolyze

different β -lactam drugs with different hydrolytic efficiencies according to their structures and variability due to accumulation of mutations, diverse expression types, etc. Among the β -lactamases with clinical relevance, we highlight the extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and carbapenemases. Within the first group, production of CTX-M-derived enzymes (class A) currently represents the main mechanism of third and fourth generation cephalosporins among enterobacteria, being CTX-M-2 and recently emergent variants like CTX-M-15 the most prevalent in Argentina. Among the second group, KPC are the class A carbapenemases most widely disseminated around the world; in Argentina, KPC-2 has been reported in *P. aeruginosa*, being at the same time the most prevalent worldwide.

Keywords:
CTX-M-2; ESBL; carbapenemases

Introducción – Aspectos históricos y primeros reportes:

Cuando el químico alemán Paul Ehrlich propusiera en el siglo XIX la búsqueda de una “*bala mágica*” que fuera capaz de destruir organismos infecciosos sin dañar los tejidos del huésped, se refería a lo que un siglo después los **antibióticos β -lactámicos** representarían mejor que cualquier otra droga antimicrobiana (1).

Hoy, los β -lactámicos representan el grupo de drogas antimicrobianas más ampliamente utilizado (y por esto, muchas veces abusado) en la práctica médica para el tratamiento de un gran número de infecciones bacterianas, tanto intrahospitalarias como de la comunidad.

Esta familia comprende principalmente a las penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, monobactámicos y carbapenemes, además de inhibidores de β -lactamasas, y se destacan por poseer una elevada **toxicidad selectiva**, ya que interfieren en la última etapa de la biosíntesis de una estructura única y esencial, entrecruzada a

modo de malla, que mantiene la integridad celular de muchas bacterias, y que está ausente en las células animales: el **peptidoglicano** (PG) de la pared bacteriana (2).

Estos antibióticos se unen covalentemente, y compitiendo por el sitio de unión con el sustrato natural, a las **penicillin-binding proteins** (PBP) o proteínas que unen penicilina, enzimas responsables de catalizar el entrecruzamiento que otorga la estabilidad necesaria al peptidoglicano (2, 3). Como esa etapa de la biosíntesis ocurre asociada a la cara externa de la membrana citoplasmática de las bacterias, resulta un blanco muy conveniente para dirigir drogas con potenciales propiedades antimicrobianas (4).

A nivel celular, la unión del β -lactámico a las PBP susceptibles, principalmente las que tienen función de transpeptidasas, lleva a su inactivación, la interrupción de la síntesis de pared, y la activación de diferentes sistemas que generalmente llevan a la muerte bacteriana (5, 6).

Entre las estrategias desarrolladas por diferentes bacterias para “sobrevivir” a un antibiótico, podemos tener microorganismos que “modifican” el blanco de acción de la droga y de ese modo disminuyen su capacidad por inhibir ese blanco (7). También, existen bacterias que “hacen más difícil” el acceso del fármaco al blanco molecular, ya sea porque “impiden” el ingreso adecuado o porque adquieren “sistemas de desagote” para eliminarlo (8).

Finalmente, la estrategia más importante y relevante es la de aquellas bacterias que son capaces de inactivar o degradar la molécula del antibiótico. Para el caso de los β -lactámicos, esta estrategia es llevada a cabo gracias a la producción de unas enzimas, denominadas **β -lactamasas**, que hidrolizan al antibiótico, inactivándolo irreversiblemente (2, 3).

El primer indicio reportado de la existencia de estas enzimas tuvo lugar casi al mismo tiempo en el que la penicilina comenzaba a ser ensayada. En 1940, Chain y Abraham fueron los primeros en describir una enzima bacteriana capaz de destruir a la penicilina (9).

El auge de la penicilina nuevo inmediatamente a su uso irracional y desmedido (situación que lamentablemente poco ha cambiado en nuestros días), al punto que hasta mediados de los 50' era de venta libre y se la utilizaba hasta en preparaciones que no eran destinadas al tratamiento anti-infeccioso. Pronto comenzaron a aislarse cepas de estafilococos resistentes a penicilina, y cuyo mecanismo de resistencia consistía en la producción de β -lactamasas que degradaban al antibiótico. Además, la resistencia por β -lactamasas rápidamente se diseminó a diferentes especies patógenas, lo que sugirió que la información genética para la síntesis de las enzimas era capaz de transferirse.

Este temprano hallazgo de bacterias resistentes a la penicilina, y a cada nuevo antibiótico que aparecía en el mercado, condujo a los científicos a buscar y desarrollar nuevos antimicrobianos para el tratamiento incluso de aquellas bacterias resistentes a los ya disponibles. Es allí donde comienza la aún hoy no ganada guerra contra los microorganismos resistentes, en especial de aquellos productores de β -lactamasas.

La industria farmacéutica constantemente ha desarrollado nuevas drogas, estables frente a las primeras enzimas estafilocócicas (*penicilinasas*), pero esto fue superado por la aparición de microorganismos con la capacidad de elaborar nuevas enzimas o nuevas formas de las ya descriptas. Esto se conoce como **ciclo de las β -lactamasas**, donde la tarea de los científicos parece ser continuamente contrarrestada por las bacterias, que siempre parecen resultar victoriosas (10). Además, son ayudadas por la constante **presión selectiva** que ejerce el uso abusivo e indiscriminado de los β -lactámicos (y de otros antibióticos), lo cual juega también un papel decisivo en la evolución, diseminación y el establecimiento de los elevados niveles de resistencia que existen actualmente en todo el mundo. Nuestro país no escapa a esta realidad, y en los últimos años se observó un vertiginoso aumento de los niveles de resistencia bacteriana mediada por la producción de β -lactamasas (11, 12).

Los antibióticos β -lactámicos: el blanco molecular de las β -lactamasas

Estructura y clasificación de los β -lactámicos de interés médico:

A partir de la elucidación de la estructura química de la penicilina en 1940 y la obtención de cefalosporinas (1950), comenzó la era de producción de un amplio rango de tipos estructurales de antibióticos β -lactámicos. En 1970 se aislaron componentes estables frente a la β -lactamasa, las *cefamicinas*, rápidamente seguido por el descubrimiento de fuentes naturales de una variedad de nuevos β -lactámicos, estructuralmente diferentes a las penicilinas y cefalosporinas. Ellos fueron el *ácido clavulánico* (1976), los *carbapenemes* (como la tienamicina en 1977) y, más tarde, los *monobactámicos* (1981). Los antibióticos β -lactámicos comprenden principalmente a penicilinas (amino-, carboxi-, ureido- e isoxazolil-penicilinas), cefalosporinas (primera a quinta generación), cefamicinas (incluidas a menudo dentro de las cefalosporinas de segunda generación), carbapenemes, monobactámicos e inhibidores de β -lactamasas (figura 1).

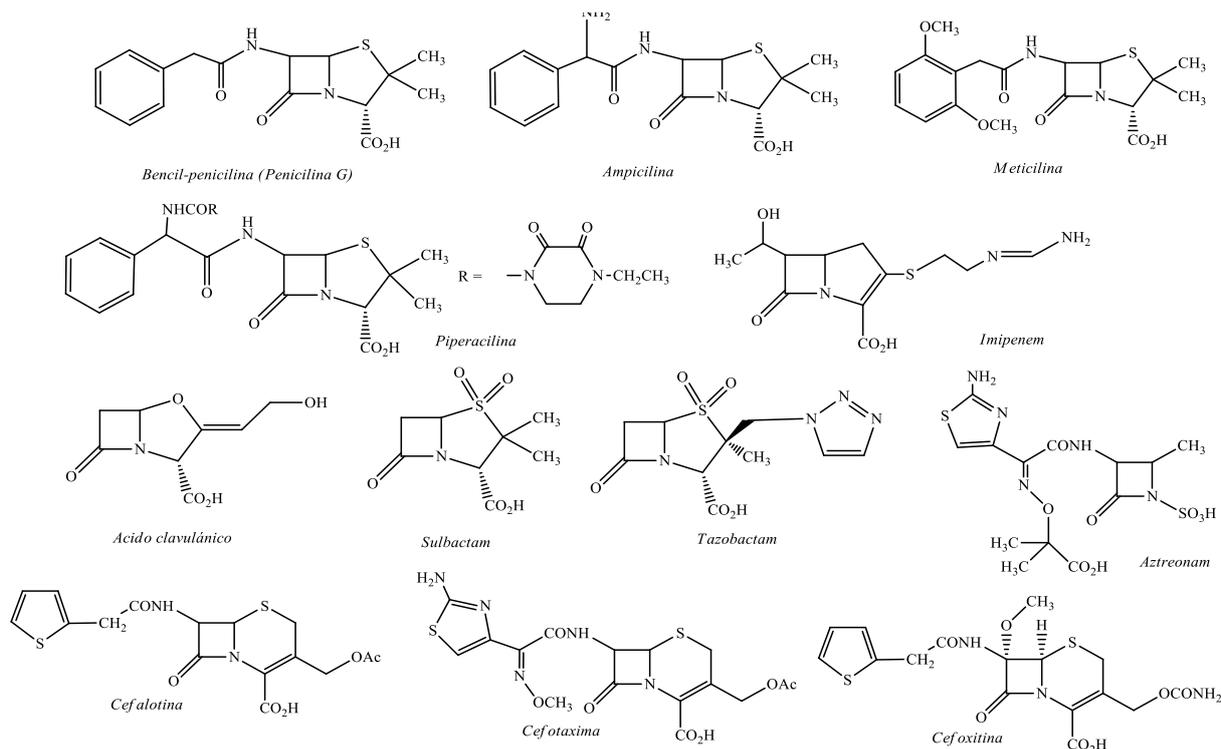


Figura 1. Algunos ejemplos de antibióticos β -lactámicos. Penicilinas: bencil-penicilina, ampicilina (amino-penicilina), meticilina (oxazolil-penicilina), piperacilina (ureído-penicilina); carbapenemes: imipenem; inhibidores de β -lactamasas: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam; monobactámicos: aztreonam; cefalosporinas: cefalotina (primera generación), cefotaxima (tercera generación); cefamicinas: cefoxitina.

Mecanismo de acción de los β -lactámicos:

Los antibióticos β -lactámicos inhiben PBPs que poseen actividades de D,D-transpeptidasa y D, D-carboxipeptidasa, ya que actúan como análogos de precursores de pared celular o sustratos competitivos (en algunos casos), inhibiendo la síntesis de peptidoglicano, y suelen producir la muerte celular (5).

Algunas de las posibles estructuras conformacionales del extremo C-terminal D-

Ala-D-Ala de las hebras de peptidoglicano naciente tienen analogía estructural con la molécula del β -lactámico (figura 2). Existe una superposición coplanar entre la "entidad de unión" de bencil-penicilina y la conformación extendida más estable del grupo terminal D-Ala-D-Ala, aunque el isosterismo es parcial, debido a una orientación diferente del resto de los aminoácidos del pentapéptido y la cadena lateral del β -lactámico (2, 3, 6).

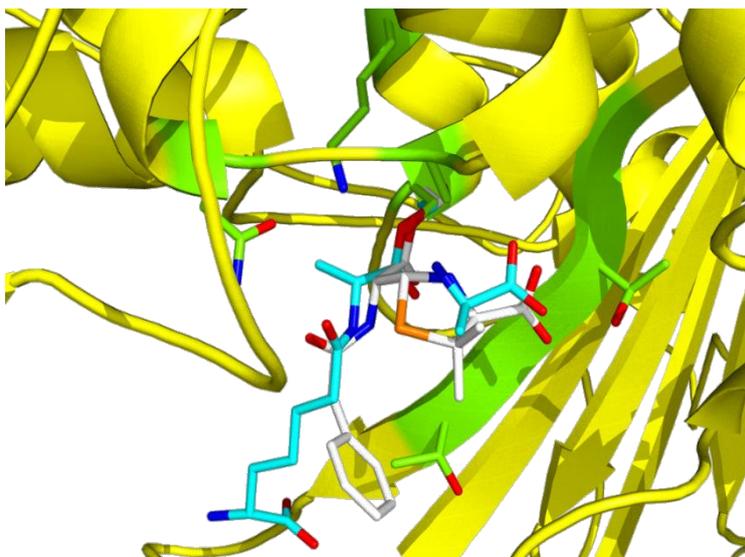


Figura 2. Similitud conformacional entre el terminal D-Ala-D-Ala del peptidoglicano (celeste) y bencilpenicilina (blanco) que resulta en la competencia de unión al sitio activo (en verde) de una PBP de *E. coli* (amarillo). Átomos: rojo (O), azul (N), amarillo (S).

Cinéticamente, la reacción entre una D,D-peptidasa (por ejemplo, una PBP con función de transpeptidasa) y un β -lactámico se puede esquematizar de la siguiente manera (figura 3):

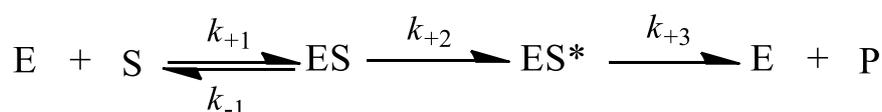


Figura 3. E, D,D-peptidasa (PBP transpeptidasa, carboxipeptidasa); S, antibiótico β -lactámico; ES, complejo no covalente de Henri-Michaelis; ES*, complejo acilado estable; P, producto(s); K (k_{-1}/k_{+1}), constante de disociación de ES; k_{+2} y k_{+3} , constantes de primer orden de acilación y desacilación, respectivamente.

Una eficiente inactivación de la enzima dependerá de un buen reconocimiento del antibiótico (baja K), una rápida formación de ES* (alta k_{+2}) y/o una lenta degradación del aducto covalente (baja k_{+3}). La constante de segundo orden k_{+2}/K es una medida de la formación del complejo acilado ES*, y refleja usualmente la sensibilidad de una PBP por diferentes antibióticos β -lactámicos (a menor k_{+2}/K , menor sensibilidad), ya que k_{+3} suele ser tan baja para las PBP que es irrelevante (13).

Biológicamente, esto se traduce en una inactivación de la enzima, lo que lleva finalmente a la inhibición de la síntesis de peptidoglicano (2, 14).

Al ocurrir esta reacción, el intermediario ES* que se forma es mucho más estable que el formado cuando la PBP reacciona con su sustrato natural (el extremo D-Ala-D-Ala del peptidoglicano), y los productos de la reacción se liberan más lentamente. Los β -lactámicos se comportan por lo tanto como sustratos “suicidas”, inmovilizando la serina activa por formación de una enzima esterificada estable, y la molécula del antibiótico pierde su integridad por hidrólisis del enlace amida del anillo β -lactámico.

Mecanismos de resistencia a β -lactámicos: Inactivación enzimática de los antibióticos β -lactámicos

Los mecanismos generales de resistencia a drogas antimicrobianas pueden ser clasificados en varios modelos básicos, siendo relevantes para los antibióticos β -lactámicos la alteración de sus blancos moleculares, la dificultad en el acceso de la droga a ellos (ya sea por disminución en la entrada a la célula o bien por una expulsión activa), y la síntesis de enzimas que hidrolizan al antibiótico (15-19).

La presencia de **β -lactamasas** con capacidad hidrolítica de antibióticos β -lactámicos constituye el mecanismo de resistencia a dichas drogas más frecuentemente encontrado en aislamientos clínicos (13, 20-22).

Junto a las PBPs, la mayoría de las β -lactamasas pertenece a una gran familia de proteínas cuya actividad es dependiente de un residuo de serina en su sitio activo, y por su afinidad por los antibióticos β -lactámicos se denominan peniciloil-serino-transferasas. La mayor diferencia radica en que, mientras las PBPs son inactivadas por los β -lactámicos (por similitud estructural entre la droga y el sustrato natural), las β -lactamasas hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico, inactivándolo (2, 13).

Las β -lactamasas pueden ser tanto de codificación plasmídica como cromosómica. En general se acepta que los genes codificantes de las β -lactamasas son, casi con seguridad, de origen cromosómico, pero se encuentran mayormente en elementos extracromosómicos como plásmidos, trasposones, secuencias de inserción e integrones. Estas enzimas generalmente son producidas en mayor cantidad, debido a que se encuentra un mayor número de copias del

gen codificante. Además, muchos de estos genes se encuentran regulados por promotores más potentes (21, 23).

Muchas especies bacterianas producen, naturalmente, β -lactamasas cromosómicas (tabla 1). Un ejemplo lo representan las β -lactamasas cromosómicas de enterobacterias y otros gram negativos, denominadas AmpC, que podrían haber evolucionado a partir de las PBPs, adquiriendo funciones que parecen estar asociadas (por lo menos en algunos casos) al metabolismo del peptidoglicano, ya que la regulación de estas enzimas está íntimamente ligada al reciclaje de los muropéptidos (24-27).

Existen evidencias concretas que demuestran que las β -lactamasas extracromosómicas derivarían de enzimas progenitoras de localización cromosómica, que en algún momento, y por diferentes eventos de reclutamiento y movilización, fueron transferidos a elementos capaces de diseminar estos genes mucho más rápida y eficientemente a un gran número de especies bacterianas.

La primera β -lactamasa plasmídica descrita en microorganismos gram negativos fue encontrada en un aislamiento clínico de *Escherichia coli* en Grecia, en los años 60', aunque ya existían indicios de una "resistencia transferible" a partir de unas cepas de *Shigella dysenteriae* aisladas entre 1955-1959 en Japón. A aquella enzima descrita se la llamó TEM-1, en "honor" a la pequeña paciente (de nombre Temoniera) de donde se aisló el microorganismo productor (28). Por tratarse de una enzima portada por un transposón localizado en un plásmido conjugativo, rápidamente se diseminó virtualmente a todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y otros no fermentadores, y muchas otras (29).

Las β -lactamasas

Clasificación y diversidad de las β -lactamasas:

El número actual de secuencias proteicas pertenecientes a la super-familia de las β -lactamasas excede los 900 (www.lahey.org/studies/webt.htm).

Tradicionalmente, la clasificación de las β -lactamasas se basó en las características funcionales de las enzimas o en la estructura primaria de la proteína, propuesta por Ambler a comienzos de los 90' (30). En base a esta simple clasificación las β -lactamasas se dividieron en cuatro clases moleculares: A, B, C y D, basada en los motivos de aminoácidos conservados.

Las enzimas de clase A, C y D incluyen a las serino- β -lactamasas, que hidrolizan sus sustratos formando una acil-enzima a través del residuo serina del sitio activo. Las de clase B son

las denominadas metalo- β -lactamasas ya que utilizan de uno a dos átomos de zinc en su sitio activo para facilitar la hidrólisis de la molécula de β -lactámico (tabla 1).

Como esta clasificación, si bien es muy estable debido a que se basa exclusivamente en la comparación de secuencias aminoacídicas y propiedades estructurales, no contempla el comportamiento de las enzimas frente a sus sustratos e inhibidores, existe una clasificación consensuada, primero propuesta por Bush-Jacoby-Medeiros (31), y recientemente actualizada por Bush-Jacoby (32), que incluye varias propiedades de las β -lactamasas.

Tabla 1: Clasificación de β -lactamasas según Bush-Jacoby (32).

Grupo funcional	Clase molecular	Sustrato distintivo	Inhibición por		Características diferenciales	Enzimas representantes
			AC o TZB	EDTA		
1	C	Cefalosporinas	No	No	Mayor hidrólisis de cefalosporinas que de bencil-penicilina. Hidrolizan cefamicinas	AmpC de <i>E. coli</i> , P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cefalosporinas	No	No	Hidrólisis aumentada de ceftazidima y algunos otros oximino- β -lactámicos	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilinas	Si	No	Mayor hidrólisis de bencil-penicilina que de cefalosporinas	PC1
2b	A	Penicilinas y cefalosporinas	Si	No	Similar hidrólisis de bencil-penicilina que de cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	Si	No	Hidrólisis aumentada de oximino- β -lactámicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1

Tabla 1: Clasificación de β -lactamasas según Bush-Jacoby (32).

2br	A	Penicilinas	No	No	Resistencia a ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-30 SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	No	No	Hidrólisis aumentada de oximino- β -lactámicos combinado con resistencia a ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-50
2c	A	Carbenicilina	Si	No	Hidrólisis aumentada de carbenicilina	PSE-1 CARB-3
2ce	A	Carbenicilina, cefepime	Si	No	Hidrólisis aumentada de carbenicilina, cefepime y ceftiprome	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variable	No	Hidrólisis aumentada de cloxacilina u oxacilina	OXA-1 OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de espectro extendido	Variable	No	Hidrólisis cloxacilina u oxacilina y oximino- β -lactámicos	OXA-11 OXA-15
2df	D	Carbapenemes	Variable	No	Hidrólisis cloxacilina u oxacilina y carbapenemes	OXA-23 OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	Si	No	Hidroliza cefalosporinas, inhibible por ác. clavulánico pero no por aztreonam	CepA
2f	A	Carbapenemes	Variable	No	Hidrólisis aumentada de carbapenemes, oximino- β -lactámicos y cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B (Subclase B1) (Subclase B3)	Carbapenemes	No	Si	Hidrólisis de espectro ampliado, incluyendo carbapenemes pero no monobactámicos	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B (Subclase B2)	Carbapenemes	No	Si	Hidrólisis preferencial de carbapenemes	CphA, Sfh-1
NI	No conocida					

Referencias: AC, ácido clavulánico; TzB, tazobactam; EDTA, ácido etilen-diamino tetraacético; NI, no incluidas.

Las β -lactamasas del grupo 1 son las cefalosporinas de clase C de Ambler, denominadas AmpC, cuyos genes codificantes son tanto de localización cromosómica en muchas enterobacterias y algunos otros microorganismos gram

negativos como pseudomonas, como también variantes plasmídicas diseminadas principalmente entre enterobacterias. Son más activas frente a cefalosporinas que a bencil-penicilina y usualmente son resistentes a la inhibición por ácido clavulánico. Actúan

también sobre cefamicinas (cefexitina). En muchos microorganismos, incluyendo *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa*, la expresión de AmpC es baja pero inducible en presencia de ciertos β -lactámicos como cefexitina e imipenem. Otros microorganismos, incluyendo *E. coli* y *Acinetobacter baumannii*, carecen de uno o más componentes del sistema de inducción. Cuando estas enzimas se producen en grandes cantidades, especialmente ante la presencia de baja concentración del β -lactámico, pueden otorgar resistencia a carbapenemes. Las enzimas plasmídicas de este grupo son: CMY, ACT, DHA, FOX y MIR.

Las enzimas pertenecientes al subgrupo 1e son una variante del grupo 1 que poseen mayor actividad frente a ceftazidima y otros oximino- β -lactámicos como resultado de sustituciones aminoacídicas, inserciones o deleciones. Han sido llamadas β -lactamasas AmpC de espectro extendido (ESAC por “Extended Spectrum AmpC”) e incluyen GC1 en *E. cloacae* y la plasmídicas CMY-10, CMY-39, CMY-37, entre otras. Otorgan resistencia clínicamente importante en aquellos microorganismos en los cuales existe otro mecanismo de resistencia a β -lactámicos (33).

Las enzimas del grupo 2 son serino- β -lactamasas e incluyen las clases moleculares A y D.

El subgrupo 2a son penicilinasas que poseen un espectro limitado de actividad hidrolítica, preferentemente sobre bencilpenicilina y otros derivados de la penicilina con una escasa hidrólisis de cefalosporinas, carbapenemes o monobactámicos. La mayoría de estas enzimas son de codificación cromosómica, aunque hay penicilinasas estafilocócicas de codificación plasmídica.

El subgrupo 2b incluye a las β -lactamasas de espectro ampliado (β LEA), que hidrolizan eficientemente cefalosporinas de primera generación como cefaloridina y cefalotina (y también penicilinas clásicas) y son fuertemente inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam. Incluyen a las enzimas

plasmídicas TEM-1, TEM-2, TEM-13 y SHV-1.

El subgrupo 2be está conformado por las β -lactamasas de espectro extendido (β LEEs). Poseen la actividad de las β -lactamasas del subgrupo 2b, extendida a la hidrólisis de diferentes oximino- β -lactámicos como cefotaxima y ceftazidima. A este subgrupo pertenecen las enzimas derivadas de TEM-1, TEM-2 y SHV-1, y familias como CTX-M, PER, VEB, además de otras menos comunes. Estas enzimas son eficientemente inhibidas por ácido clavulánico y otros inhibidores relacionados.

El subgrupo 2br comprende a enzimas de espectro ampliado (con el mismo espectro de actividad que las enzimas del subgrupo 2b) que además han adquirido resistencia a los inhibidores de β -lactamasas, como el ácido clavulánico. Son enzimas derivadas de las familias TEM y SHV, por ejemplo TEM-30 y TEM-31 (denominadas IRT-2 e IRT-1, respectivamente, por “inhibitor resistant TEM”).

El subgrupo 2ber incluye enzimas de la familia TEM con espectro extendido que además poseen una relativa resistencia a la inhibición por ácido clavulánico, también conocidas como CMT (Complex Mutant TEM). Pertenecen a este subgrupo TEM-50 (CMT-1).

El subgrupo 2c son penicilinasas con capacidad de hidrolizar carbenicilina o ticarcilina al menos un 60% más rápido que bencilpenicilina.

El subgrupo 2ce contiene a la carbenicilinasas de espectro extendido (RTG-4 o CARB-10) con actividad expandida frente a cefepime y ceftipime.

El subgrupo 2d incluye a las β -lactamasas capaces de hidrolizar oxacilina o cloxacilina más rápidamente que bencilpenicilina. Son las enzimas per
Muchas de las
subgrupo sufren inhibición por NaCl.

El subgrupo 2de son enzimas tipo OXA con espectro extendido hacia oximino- β -lactámicos, a excepción de carbapenemes.

El subgrupo 2df comprende las β -lactamasas OXAs con actividad frente a carbapenemes.

El subgrupo 2e son cefalosporinasas con capacidad de hidrolizar cefalosporinas de espectro extendido y son inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam. A este subgrupo pertenecen las cefalosporinasas cromosómicas inducibles de la tribu *Proteae*. La única diferencia con la mayoría de las AmpC del grupo 1 o las β LEEs, es su escasa afinidad por aztreonam.

El subgrupo 2f son las serino-carbapenemasas. Sus sustratos específicos son los carbapenemes. Se inhiben mejor por tazobactam que por ácido clavulánico. Las cefalosporinas de espectro extendido como la ceftazidima no son bien hidrolizadas, pero sí aztreonam. A este subgrupo pertenecen algunas enzimas de las familias SME, GES, IMI, KPC.

El grupo 3 son las metalo- β -lactamasas (MBLs). Estas enzimas difieren estructuralmente de otras β -lactamasas por el requerimiento de iones zinc en su sitio activo. Hidrolizan eficientemente carbapenemes, pero a diferencias de las serino- β -lactamasas, no hidrolizan, o lo hacen escasamente, monobactámicos y no sufren inhibición por tazobactam o ácido clavulánico. Se las divide, estructuralmente, en tres subclases (B1, B2 y B3) o funcionalmente, en dos subgrupos (3a y 3b).

El subgrupo 3a incluye a las MBLs plasmídicas de las familias IMP y VIM. Generalmente se encuentran en bacterias no fermentadoras de glucosa, pero también en algunas enterobacterias. Hidrolizan cefalosporinas, penicilinas y carbapenemes, pero no monobactámicos.

El subgrupo 3b es un pequeño grupo de MBL que hidrolizan preferentemente carbapenemes a diferencia de penicilinas y cefalosporinas.

El grupo 4 comprende aquellas enzimas que no fueron completamente caracterizadas y que por ende no encajan en ninguno de los grupos definidos.

La diversidad de β -lactamasas es muy grande, debido a diferentes factores, como ser

medio ambiente de la bacteria que la posee que está sujeto a diferentes presiones selectivas, entre otros. Esto hace difícil establecer una clasificación definitiva que pueda abarcar a todas las enzimas presentes y futuras (33).

Estructura molecular de las serino- β -lactamasas:

La estructura de las β -lactamasas de clase A se determinó por estudios de difracción por rayos X. Todas las enzimas de esta clase comprenden un dominio estructuras “todo- α ” y otro dominio “ α/β ” con el sitio activo situado en la interface entre estos dos dominios. El residuo serina activo se encuentra en la región N-terminal de primera hélice (larga e hidrofóbica) del dominio “todo- α ” (hélice α_2 ; figura 4).

Diversos elementos y residuos altamente conservados fueron identificados en la vecindad del residuo de serina del sitio activo, por convención, y de acuerdo a la nomenclatura de Ambler, denominada S70 (30), a los cuales se le otorga funciones involucradas, directa o indirectamente, con el proceso catalítico y/o reconocimiento del sustrato (no son responsables de la exacta especificidad de las enzimas). En conjunto forman la cavidad del sitio activo.

Elemento 1: el motivo “S-X-X-K”

El primer elemento conservado constituye el “fondo” de la cavidad del sitio activo. Contiene el residuo S70 y, una vuelta de hélice corriente abajo, a K73 cuya cadena lateral apunta hacia el interior del sitio activo. El residuo de serina es el único de todos los aminoácidos c para el cual h Rev. Farm. vol. 153 n° 1-2: 113-122 - Power - Di Conza catalítica inequívoca.

La proximidad de las cadenas laterales de los residuos de serina y lisina, las cuales están unidas por puentes de hidrógeno, sugieren que la lisina también tiene participación en el proceso catalítico. Se postula que la lisina contribuye a orientar el protón del grupo hidroxilo de la S70 facilitando su transferencia al átomo de nitrógeno del β -lactámico durante el ataque nucleofílico,

teniendo un rol importante durante el proceso de acilación (34).

Elemento 2: el motivo “S-X-N”

Este segundo elemento se ubica en el “bucle” (*loop*) del dominio “todo- α ”, formando una de las paredes de la cavidad catalítica. Está formado por un primer aminoácido hidroxilado, que en β -lactamasas de clase A es casi exclusivamente serina (S130), y el tercero casi siempre es asparagina (N132); por lo tanto, en enzimas de clase A este motivo se llama “*bucle SDN*”. Los residuos laterales del primer y tercer aminoácido apuntan al interior del sitio activo, mientras que el del segundo residuo (generalmente D131) lo hace hacia el interior o “core” de la proteína, probablemente cumpliendo un importante papel estructural.

El residuo de serina podría participar en la “movilización” del protón del grupo hidroxilo de la serina activa hacia el átomo de nitrógeno del anillo β -lactámico; N132 sería un dador de puentes de hidrógeno hacia el grupo carbonilo de la cadena lateral del antibiótico, facilitando el adecuado posicionamiento del sustrato para el ataque nucleofílico por el oxígeno de la cadena lateral de S70, siendo importante en la estabilización del estado de transición hacia el paso de acilación.

Las cadenas laterales de S130 y K234 están unidas por puentes de hidrógeno, uniendo a los dominios “todo- α ” y “ α/β ” y estabilizando el sitio activo de la enzima (34).

Elemento 3: el motivo “K(H)-T(S)-G”

Este elemento se sitúa enfrentando al elemento 2, en la más interna de las hojas β (β_3) del dominio “ α/β ”, formando la pared opuesta de la cavidad catalítica. El primero de los residuos (K c *Rev. Farm.* vol. 153 n° 1-2: 114-122 - Power - Di Conza - Gutkind (2011

Las β -lactamasas de clase A, como TEM-1, comprenden un grupo muy numeroso y heterogéneo desde el punto de vista funcional. Al parecer sólo *nueve* aminoácidos se encuentran estrictamente conservados, de los cuales cuatro son esenciales para la catálisis (S70, K73, S130, E166) y forman parte de tres de los elementos conservados; los otros cinco

aminoácido con cadena lateral positiva, seguido por uno con grupo hidroxilo. El tercer residuo debe estrictamente carecer de cadena lateral, ya que, de lo contrario, impediría el acercamiento del sustrato. La cadena lateral de K234 (o H234) forma un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo del residuo serina del elemento 2 (S130), y contribuye también a estabilizar el sustrato por formación de un puente de hidrógeno con el grupo carboxilo libre del β -lactámico (34, 35).

Elemento 4: “ Ω -loop”

Este cuarto elemento contiene un residuo cargado negativamente que, en las enzimas de clase A, lleva a cabo una función catalítica. Se encuentra situado en un *loop* de 16 residuos (R164-D179). En la mayoría de los casos, el “bucle omega” contiene la secuencia E166-X-E-L-N170, en la cual los residuos E166 y N170 parecen ser esenciales para el correcto posicionamiento de la molécula conservada de agua muy cerca de la serina activa. La posición estratégica del E166, cerca de S70, convierte a este residuo en un candidato para cumplir un rol crítico en el mecanismo catalítico. Se acepta que este residuo de E166 (ausente en PBPs) actuaría como una base general (secuestrador de protones), incrementando primero la nucleofilicidad de la serina activa permitiendo la acilación de la proteína, y luego activando la molécula de agua (W_1) durante el paso de hidrólisis del intermediario acilado entre el β -lactámico y la enzima (acil-enzima). Por lo tanto, su presencia sería imprescindible para que una β -lactamasa pueda llevar a cabo eficientemente el proceso de desacilación (34).

residuos (G45, P107, D131, A134, G236) cumplirían un papel estructural importante. Las β -lactamasas de clase C, enzimas producidas exclusivamente por bacterias gram negativas, forman una familia mucho más homogénea desde el punto de vista cinético, con cerca de 60 aminoácidos estrictamente conservados (22).

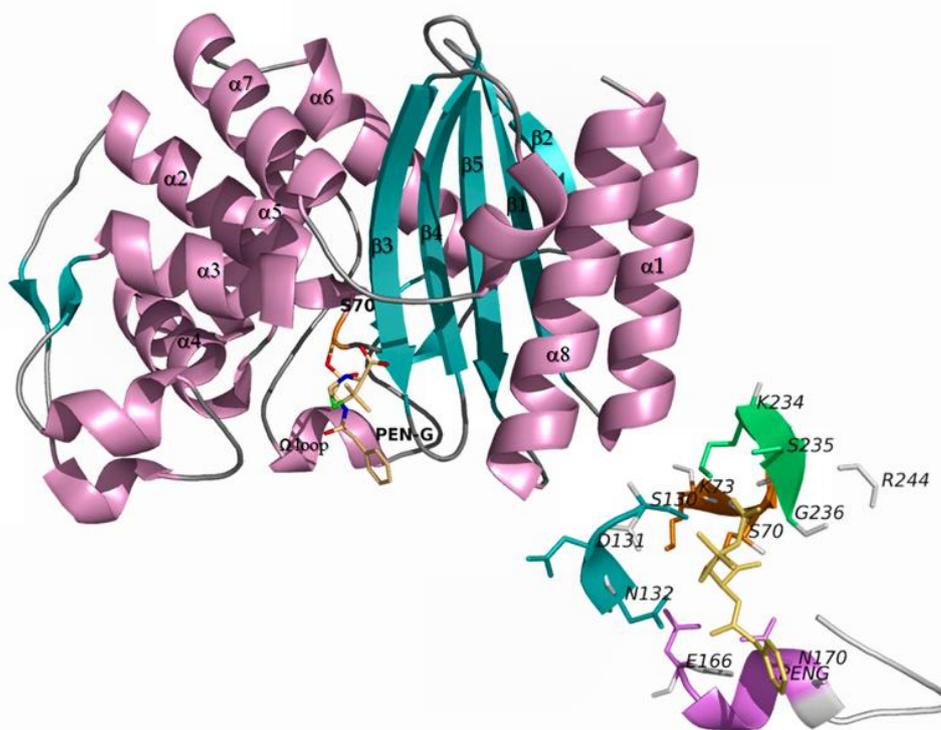


Figura 4. Arriba a la izquierda: Modelo de estructura terciaria de la β -lactamasa TEM-1 complejada con penicilina-G o bencil-penicilina (PEN-G) como ligando. En violeta claro se esquematizan las hélices α ; con turquesa las hojas β . El residuo serina 70 (S70) del sitio activo se esquematiza en naranja. Abajo a la derecha: sitio activo de TEM-1, con los principales residuos de aminoácidos implicados en la interacción enzima- β -lactámico (penicilina-G). En amarillo la molécula de penicilina-G unida a S70.

Mecanismo de acción de las serino- β -lactamasas:

Tanto las PBPs como las β -lactamasas que poseen serina en el sitio activo tienen actividad de peniciloil-transferasas. La diferencia principal es que, mientras que las PBPs son inactivadas por los β -lactámicos, las β -lactamasas hidrolizan al antibiótico (figura 5).

En realidad, el mecanismo involucra los mismos tres pasos para ambas clases de enzimas, con formación de un intermediario acilado, pero varían los parámetros cinéticos que marcan la diferencia “mecanística” de ambos tipos de enzimas (3).

La primera etapa de la reacción consiste en el ataque nucleofílico del hidroxilo de S70 del sitio activo sobre el grupo carbonilo del anillo β -lactámico, formándose el intermediario acilado, con la ruptura del

enlace amida de la droga. Finalmente, por hidrólisis del intermediario, se liberan los productos (β -

Rev. Farm. vol. 153 nº 1-2: 115-122 - Power - Di Conza - regenerada (1, 2, 3).
El ataque nucleofílico de S70 únicamente puede ocurrir en presencia de algún residuo que funcione como una base general, aumentando la nucleofilicidad de ese residuo para permitir que la reacción de acilación tenga lugar. Como se discutiera anteriormente, ese papel lo llevaría a cabo E166 en las β -lactamasas de clase A, pero requeriría la presencia de una molécula de agua (W1) para formar un puente entre ambos residuos (ya que se encuentran alejados en la estructura terciaria de la proteína), permitiendo el “transporte” del protón desde S70 a E166. Luego, por acción de una segunda molécula de agua (W1’), se “devuelve” el protón a la serina activa y se

libera la enzima y el producto de la hidrólisis:
el β -lactámico inactivo (34).

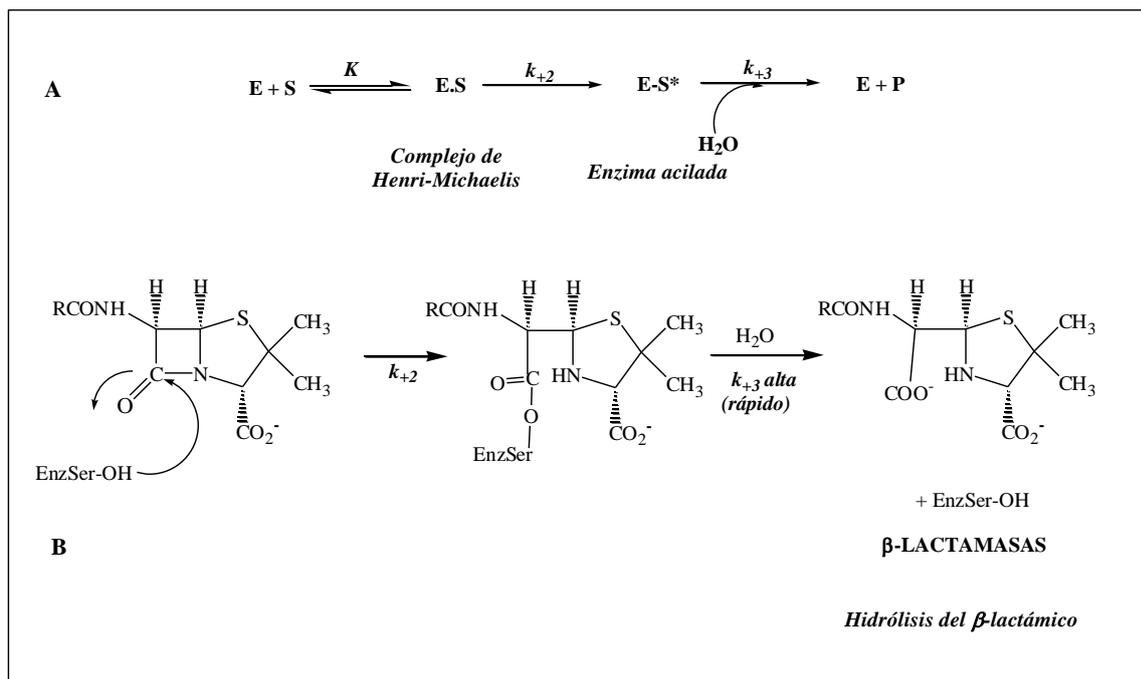


Figura 5. A: Reacción general entre una serino- β -lactamasa y un antibiótico β -lactámico. E, β -lactamasa; S, β -lactámico; P, antibiótico hidrolizado; K (k_{-1}/k_{+1}), constante de disociación del complejo de Henri-Michaelis; k_{+2} , constante de acilación; k_{+3} , constante de desacilación. B: Mecanismo de acción de las β -lactamasas. EnzSer-OH, serino- β -lactamasa. Adaptado de (36).

Algunas consideraciones sobre las propiedades cinéticas de las serino- β -lactamasas y su relación con la estructura:

De acuerdo a la clasificación de Bush y colaboradores (32), y siguiendo una denominación “tradicional” o de fácil implementación en un ámbito más clínico, se conoce a las β -lactamasas según los sustratos a los cuales hidrolizan “preferencialmente”. Así, dentro de las β -lactamasas de clase A se conocen las “penicilinasas” y las de “amplio espectro” o “espectro extendido”; dentro de las de clase C las “cefalosporinasas”, y las de clase D como las “oxacilinasas”; a las metaloenzimas, por su capacidad de hidrolizar carbapenemes, se las llama “carbapenemasas”.

Observando en detalle los datos cinéticos que se van colectando, surge que esta

clasificación es bastante equívoca, existiendo en muchos casos enzimas que no se ajustan estrictamente con la función atribuida; p.e., muchas β -lactamasas de clase A hidrolizan mucho más eficientemente a las cefalosporinas clásicas “cefalosporinasas” de clase C (20).

En las β -lactamasas, generalmente se observa que tanto la acilación (k_{+2}) como la desacilación (k_{+3}) son rápidas (valores altos), resultando en un alto recambio y eficiencia hidrolítica. El número de recambio se representa por la constante catalítica k_{cat} ($k_{cat} = k_{+2} \cdot k_{+3} / (k_{+2} + k_{+3})$). La eficiencia de hidrólisis se refleja normalmente por medio de los parámetros cinéticos k_{cat} y la constante de segundo orden k_{cat}/K_m (K_m es la constante de afinidad de Michaelis-Menten). En las PBPs las k_{+3} son insignificantes (valores muy bajos), por lo que biológicamente se traduce en la inactivación de la enzima por el

antibiótico. Las β -lactamasas son enzimas que, para sus sustratos preferidos, se acercan a la perfección catalítica, con valores de k_{cat}/K_m que se aproximan al límite máximo teórico de 10^8 a 10^9 $M^{-1}\cdot\text{seg}^{-1}$, con un control de la velocidad de difusión, ya sea de los sustratos dentro del sitio activo, o de los productos hacia fuera (20, 37, 38).

Hay que observar que los inhibidores de β -lactamasas originan intermediarios que son muy estables, con constantes de desacilación muy bajas, llevando a la inactivación de la β -lactamasa. Este comportamiento es similar a la inactivación de las PBPs por los β -lactámicos. La inactivación de las β -lactamasas se expresa por el parámetro k_{+2}/K , reflejo del paso de acilación de la enzima (22, 39, 40).

Las β -lactamasas de clase A generalmente no interactúan significativamente con sus sustratos más pobres, mostrando bajas eficiencias de hidrólisis (bajo valor de k_{cat}/K_m), mientras que las de clase C sufren acilación rápida (alto valor de k_{cat}/K_m), pero se mantienen aciladas por más tiempo, debido a una desacilación lenta (bajo valor de k_{+3} , por lo tanto baja k_{cat}) (20).

Frente a sus mejores sustratos, las enzimas de clase A (por ejemplo, TEM-1 frente a ampicilina) se pueden considerar como enzimas “perfectas”, donde la reacción ocurre bajo condiciones de saturación, y está limitada sólo por la difusión del antibiótico dentro del sitio activo ($k_{+2} \approx k_{+3}$). El “precio que debe pagar” la enzima por esa perfección catalítica es tener un perfil de sustratos reducido, ya que a menor cantidad de antibióticos procesados, mayor especificidad en la interacción de la molécula con los residuos del sitio activo (20, 41).

Muchos de los residuos que se modifican en las β LEE se encuentran en la proximidad del sitio activo. Ninguno de ellos está relacionado directamente con las propiedades catalíticas, sino con un remodelamiento de la cavidad catalítica que permite “acomodar” moléculas de β -lactámicos con sustituyentes más grandes (cefalosporinas de tercera generación, etc). El resultado es la expansión del espectro de sustratos de la enzima, pero

una disminución de la eficiencia de hidrólisis de aquellos antibióticos que eran buenos sustratos de las enzimas parentales de donde se originaron (20, 42).

También existen β -lactamasas de clase A que son menos sensibles a la inactivación por inhibidores como ácido clavulánico (derivadas de TEM-1 y TEM-2), producto de cambios aminoacídicos en otras posiciones, que también reducen la eficiencia de hidrólisis de sus sustratos clásicos (42-44).

Por el contrario, las β -lactamasas de clase C reconocen naturalmente una mayor cantidad de sustratos, pero parecen ser mucho menos eficientes en “desprenderse” de los antibióticos una vez acilado el sitio activo ($k_{+2} \gg k_{+3}$), resultando la desacilación el paso limitante de estas reacciones. Sin embargo, por poseer altas afinidades por el sustrato (bajas K_m), suelen hidrólisis, con v Rev. Farm. vol. 153 nº 1-2: 117-122 - Power - Di Conz (20, 45).

Existen varias evidencias que soportan la hipótesis de que las β -lactamasas de clase C serían las más antiguas, y de las cuales se originaron las “más modernas” enzimas de clase A: (i) las β -lactamasas de clase C demuestran un mecanismo de desacilación limitante para algunos sustratos y catalizan reacciones de *acil-transferasas*, al igual que las DD-peptidasas; (ii) el sitio activo de las enzimas de clase C es más abierto, acorde a su capacidad de acomodar los sustituyentes de las cefalosporinas modernas; (iii) en las enzimas de clase A existe un residuo, R244, importante para la función de los inhibidores tipo clavulanato, que no está presente en las de clase C, lo cual explicaría la ausencia de inhibición por esos compuestos; (iv) el plegamiento de las cefalosporinas es semejante al de las DD-peptidasas, más que al de las β -lactamasas de clase A.

Por lo tanto, se sugiere que las enzimas de clase C son una forma “primitiva”, evolutivamente más cercanas a las DD-peptidasas que a otras serino- β -lactamasas, y en las cuales fue necesario un remodelado del sitio activo, más que mutaciones puntuales, para generar las β -lactamasas de clase A, con actividades más “refinadas” (46). Algunas

evidencias demuestran que, al menos en algunas especies, la producción de estas enzimas está conectada al reciclaje del peptidoglicano en bacterias gram negativas, pero todavía es incierto el papel real de las enzimas en estos sistemas (25, 47).

En este grupo, usualmente no se originan β LEE por mutaciones que originen cambios aminoacídicos, sino que la expansión de la resistencia, principalmente a cefalosporinas de tercera generación, ocurre cuando las mutaciones se originan en genes que regulan la síntesis de la β -lactamasa, como *ampD*, llevando a una mayor producción enzimática y dando a ese microorganismo resistencia a esas drogas, o sea, un perfil “*símil β LEE*”. Existen muy pocos reportes acerca de β -lactamasas de clase C de espectro extendido que hubieran surgido por mutaciones en el gen *ampC*. Un ejemplo es el de una enzima de *Enterobacter cloacae* con un espectro extendido debido a una inserción (duplicación) de un tripéptido en la secuencia “original” de la enzima (48, 49).

Otra particularidad es que las β -lactamasas de clase C son aciladas por cefamicinas (cefoxitina), a las que pueden hidrolizar, aunque lentamente. Las enzimas de clase A no tienen buena afinidad por cefoxitina, debido a que el grupo α -metoxi de las cefamicinas desplaza a la molécula de agua (W1) del sitio activo, importante para la catálisis. Además, las β -lactamasas de clase C usualmente son mucho menos sensibles a la inactivación por los inhibidores de las enzimas de clase A (clavulanato, sulbactam), debido a una muy lenta acilación (muy bajos valores de k_{+2}/K) (34).

Breve reseña sobre la prevalencia y epidemiología de las β -lactamasas en Argentina en la actualidad:

En la mayor parte del mundo, las β LEE prevalentes derivaron de variantes de espectro reducido parentales como TEM-1, TEM-2 y SHV-1, donde unas pocas sustituciones de aminoácidos ampliaron el perfil de sustratos; sin embargo, otros grupos enzimáticos (como las β -lactamasas tipo CTX-M y PER) han emergido como enzimas de espectro extendido.

En la actualidad, la producción de enzimas tipo CTX-M constituye el principal mecanismo de resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación en enterobacterias (32). Alrededor de 120 enzimas de tipo CTX-M, pertenecientes a cinco grupos genéticamente distintos, han sido identificadas en todo el mundo (50).

Desde su emergencia a fines de la década de los '80 y hasta los primeros años de la década pasada, nuestro país presentaba una situación endémica donde sólo habían sido reportadas enzimas pertenecientes al grupo CTX-M-2, siendo absolutamente prevalente la variante alélica *bla*_{CTX-M-2} (12). Desde su primera detección en nuestro país, CTX-M-2 ha sido identificada no sólo en todos los miembros enterobacterias resistentes a oximino-cefalosporinas, sino también en *Vibrio cholerae* y *Aeromonas hydrophila* y *Pseudomonas aeruginosa* (51-53).

Sin embargo, nuevas variantes alélicas de CTX-M continuaban emergiendo en distintas partes del mundo, incluso en países limítrofes como Uruguay.

Esto motivó a realizar un nuevo estudio prospectivo, luego de casi diez años (12), a partir del cual observamos que la prevalencia casi absoluta de CTX-M-2 encontrada previamente ha sido desplazada por la emergencia y remarcable diseminación de CTX-M-15 y en menor medida, de otras cefotaximasas de otros grupos. Probablemente, la diseminación de CTX-M-15 esté siendo mediada por *E. coli* tal como

ha sido sugerido para *E. coli* ST 131 (54) adquirido en áreas altamente endémicas.

El otro problema actual en nuestro país está representado por las β -lactamasas KPC. Las enzimas KPC constituyen las carbapenemasas de clase molecular A más ampliamente diseminadas en el mundo. Han sido descritas en enterobacterias y en menor medida en bacilos gram negativos no fermentadores (BGNNF) (55). Actualmente existen 10 variantes alélicas siendo KPC-2 y KPC-3 las más prevalentes.

Estas enzimas fueron descritas inicialmente en *K. pneumoniae* en 2001 en EEUU (56), y rápidamente se diseminaron en el mundo, en Europa, Asia, Medio Oriente y América (55, 57, 58). Su amplia diseminación responde a la dispersión de un clon de *K.*

pneumoniae altamente exitoso, ST 258, y a la asociación del *bla*_{KPC} al transposón Tn4401. Este elemento fue descrito tanto en enterobacterias como en *P. aeruginosa* mostrando un amplio rango de huésped (59).

KPC-2 fue reportada por primera vez en Argentina en el año 2006 (60), sin embargo en el año 2010 se observó un sustancial aumento en su detección en Buenos Aires (www.ine.gov.ar/publi_pdfs/Carbapenemasas.pdf).

La enzima KPC-2 fue descrita en *P. aeruginosa* recién en 2007 (61) y a diferencia de las enterobacterias son escasos los reportes en BGNNF. En Argentina se describió sólo un brote de *P. aeruginosa* en la Ciudad de Bariloche, en el año 2008; el mismo correspondió a la diseminación de dos clones, ST 654 y 162 (62).

Referencias

1. Brock, T. D., (1999) Milestones in Microbiology: 1546 to 1940. ASM Press.
2. Frère, J. M., Nguyen-Distèche, M., Coyette, J. and Joris, B. (1992), Mode of action: interaction with the penicillin-binding-proteins. In: Page, M. I., ed. *The Chemistry of b-lactams*. Glasgow, U.K.: Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall; 148-197.
3. Ghuysen, J. M. and Dive, G. (1994), Biochemistry of the penicilloyl serine transferases. *Bacterial Cell Wall*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers; 103-130.
4. Ayala, J. A. and Pedro, M. A. d. (1994), Genética molecular de la pared microbiana. Nuevos blancos susceptibles de inhibición. In: Vicente, M., ed. *Avances en Ingeniería Genética*. Madrid, España: Serie Nuevas Tendencias; 191-224.
5. Tipper, D. J. and Strominger, J. L., (1965) Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54: 1133-1141.
6. Tomasz, A., (1979) The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillin., *Ann Rev Microbiol*, 33: 113-137.
7. Hakenbeck, R. and Coyette, J., (1998) Resistant penicillin-binding proteins. *Cell Mol Life Sci*, 54: 332-340.
8. Nikaido, H., (1998) Multiple antibiotic resistance and efflux., *Current Opinion in Microbiology*, 1: 516-523.
9. Abraham, E. P. and Chain, E., (1940) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin., *Nature*, 146: 837.
10. Coyette, J., Nguyen-Distèche, M., Lamotte-Brasseur, J., Joris, B., Fonzé, E. and Frère, J.-M. (1994), Molecular adaptations in resistance to penicillins and other b-lactam antibiotics. In: Heidelberg, ed. *Advances in Comparative and Environmental Physiology*. Berlin: Springer-Verlag; 233-267.
11. Bantar, C., Famiglietti, A., Goldberg, M., Committee, T. A. and Group., T. N. S. P. S. P., (2000) Three-Year Surveillance Study of Nosocomial Bacterial Resistance in Argentina., *International Journal of Infectious Diseases*, 4: 85-90.
12. Quinteros, M., Radice, M., Gardella, N., Rodríguez, M. M., Costa, N., Korbenfeld, D., Couto, E., Gutkind, G. and Group, T. M. S., (2003) Extended-spectrum b-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, public hospitals., *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 47: 2864-2869.
13. Ghuysen, J. M., (1991) Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol*, 45: 37-67.
14. Hayes, M. V. and Ward, J. B. (1988), The role of penicillin-binding-proteins in the antibacterial activity of b-lactam antibiotics. In: Lorian, V., ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*: Williams & Wilkins; 722-756.
15. Davies, J., (1994) Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes., *Science*, 264: 375-382.
16. Hakenbeck, R. and Coyette, J., (1998) Resistant penicillin-binding proteins., *Cell Mol Life Sci*, 54: 332-340.
17. Neu, H. C. (1988), Antibiotic inactivating enzymes and bacterial resistance. In: Lorian, V., ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*: Williams & Wilkins; 757-789.
18. Nikaido, H., (1994) Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux., *Science*, 264: 382-388.
19. Spratt, B. G., (1994) Resistance to antibiotics mediated by target alterations., *Science*, 264: 388-393.
20. Frere, J. M., (1995) Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol Microbiol*, 16: 385-395.
21. Livermore, D. M., (1995) b-Lactamases in laboratory and clinical resistance., *Clin Microbiol Rev*, 8: 557-584.
22. Matagne, A., Dubus, A., Galleni, M. and Frere, J. M., (1999) The beta-lactamase cycle: a tale of selective pressure and bacteriæ

24. Ghuysen, J.-M. (1988), Evolution of DD-peptidases and b-lactamases. In: Actor, P., Daneo-Moore, L., Higgins, M. L., Salton, M. R. J. and Shockman, G. D., eds. *Antibiotic inhibition of bacterial cell surface assembly and function*. Washington, D.C.: ASM Press; 268-284.
25. Jacobs, C., (1997) Pharmacia Biotech & Science prize. 1997 grand prize winner. Life in the balance: cell walls and antibiotic resistance., *Science*, 278: 1731-1732.
26. Massova, I. and Mobashery, S., (1998) Kinship and diversification of bacterial Penicillin-Binding-Proteins and b-lactamases., *Antimicrob Agents Chemother*, 42: 1-17.
27. Park, J. T., (1995) Why does *Escherichia coli* recycle its cell wall peptides?, *Mol Microbiol*, 17: 421-426.
28. Datta, N. and Kontomichalou, P., (1965) Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature*, 208: 239-241.
29. Bradford, P. A., (2001) Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*, 14: 933-951.
30. Ambler, R. P., Coulson, A. F., Frere, J. M., Ghuysen, J. M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R. C., Tiraby, G. and Waley, S. G., (1991) A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J*, 276 (Pt 1): 269-270.
31. Bush, K., Jacoby, G. A. and Medeiros, A. A., (1995) A functional classification scheme for b-lactamases and its correlation with molecular structure., *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 39: 1211-1233.
32. Bush, K. and Jacoby, G. A., Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54: 969-976.
33. Bush, K. and Jacoby, G., (2009) An Update Functional Classification of b-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54: 969-976.
34. Matagne, A. and Frere, J. M., (1995) Contribution of mutant analysis to the understanding of enzyme catalysis: the case of class A beta-lactamases. *Biochim Biophys Acta*, 1246: 109-127.
35. Lenfant, F., Labia, R. and Masson, J.-M., (1991) Replacement of lysine 234 affects transition state stabilization in the active site of b-lactamase TEM1., *The Journal of Biological Chemistry*, 266: 17187-17194.
36. Ghuysen, J. M., (1991) Serine b-lactamases and penicillin-binding-proteins., *Annual Review of Microbiology*, 45: 37-67.
37. Bulychev, A. and Mobashery, S., (1999) Class C b-lactamases operate at the diffusion limit for turnover of their preferred cephalosporin substrates., *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 1743-1746.
38. Lamotte-Brasseur, J., Knox, J. R., Kelly, J. A., Charlier, P., Fonze, E., O., D. and Frere, J. M., (1994) The structures and catalytic mechanisms of active-site serine b-lactamases., *Biotechnol Genet Engin Rev*, 8: 189-230.
39. Matagne, A., Ghuysen, M. F. and Frere, J. M., (1993) Interactions between active-site-serine beta-lactamases and mechanism-based inactivators: a kinetic study and an overview. *Biochem J*, 295 (Pt 3): 705-711.
40. Waley, S. G. (1988), b-Lactamases: mechanism, inhibition, and role. In: Actor, P., Daneo-Moore, L., Higgins, M. L., Salton, M. R. J. and Shockman, G. D., eds. *Antibiotic inhibition of bacterial cell surface assembly and function*. Washington, D.C.: ASM Press; 453-467.
41. Matagne, A., Misselyn-Bauduin, A. M., Joris, B., Erpicum, T., Granier, B. and Frere, J. M., (1990) The diversity of the catalytic properties of class A beta-lactamases. *Biochem J*, 265: 131-146.
42. Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J. and Frere, J. M., (1998) Catalytic properties of class A beta-lactamases. *Rev. Farm.* vol. 153 n° 1-2: 121-122 - Power - Di Conza - diversity. *BIOCHEM J*, 330 (1998): 501-506.
43. Rostschaefer, J. C. and Ostergaard, B. E., (1995) Combination of b-lactam and b-lactamase inhibitor products: Antimicrobial activity and efficiency of enzyme inhibition., *Am J Health-Syst Pharm*, 52: 15-22.
44. Imtiaz, U., Billings, E., Knox, J. R., Manavathu, E. K., Lerner, S. A. and

- Mobashery, S., (1993) Inactivation of class A b-lactamases by clavulanic acid: the role of arginine-244 in a proposed nonconcerted sequence of events., *J Am Chem Soc*, 115: 4435-4442.
45. Galleni, M. and Frere, J. M., (1988) A survey of the kinetic parameters of class C beta-lactamases. *Penicillins. Biochem J*, 255: 119-122.
46. Lobkovsky, E., Moews, P. C., Liu, H., Zhao, H., Frere, J. M. and Knox, J. R., (1993) Evolution of an enzyme activity: crystallographic structure at 2-A resolution of cephalosporinase from the *ampC* gene of *Enterobacter cloacae* P99 and comparison with a class A penicillinase., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 11257-11261.
47. Jacobs, C., Frère, J.-M. and Normark, S., (1997) Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible b-lactam resistance in Gram-negative bacteria., *Cell*, 88: 823-832.
48. Crichlow, G. V., Kuzin, A. P., Nukaga, M., Mayama, K., Sawai, T. and Knox, J. R., (1999) Structure of the extended-spectrum class C b-lactamase of *Enterobacter cloacae* GC1, a natural mutant with a tandem tripeptide insertion., *Biochemistry*, 38: 10256-10261.
49. Nukaga, M., Haruta, S., Tanimoto, K., Kogure, K., Taniguchi, K., Tamaki, M. and Sawai, T., (1995) Molecular evolution of a class C b-lactamase extending its substrate specificity., *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 5729-5735.
50. Rossolini, G. M., D'Andrea, M. M. and Mugnaioli, C., (2008) The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*, 14 Suppl 1: 33-41.
51. Arduino, S. M., Catalano, M., Orman, B. E., Roy, P. H. and Centrón, D., (2003) Molecular epidemiology of orf513-bearing class 1 integrons in multiresistant clinical isolates from Argentinean hospitals., *Antimicrob Agents Chemother*, 47: 3945-3949.
52. Radice, M., Power, P., Di Conza, J. and Gutkind, G., (2002) Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrob Agents Chemother*, 46: 602-604.
53. Soler Bistue, A. J., Martin, F. A., Petroni, A., Faccione, D., Galas, M., Tolmasky, M. E. and Zorreguieta, A., (2006) *Vibrio cholerae* InV117, a class 1 integron harboring *aac(6')-Ib* and *blaCTX-M-2*, is linked to transposition genes. *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 1903-1907.
54. Peirano, G., Costello, M. and Pitout, J. D., Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from the Chicago area: high prevalence of ST131 producing CTX-M-15 in community hospitals. *Int J Antimicrob Agents*, 36: 19-23.
55. Nordmann, P., Cuzon, G. and Naas, T., (2009) The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*, 9: 228-236.
56. Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., Alberti, S., Bush, K. and Tenover, F. C., (2001) Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45: 1151-1161.
57. Villegas, M. V., Lolans, K., Correa, A., Suarez, C. J., Lopez, J. A., Vallejo, M. and Quinn, J. P., (2006) First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50: 2880-2882.
58. Walsh, T. R., Emerging carbapenemases: a global perspective. *International Rev. Farm.* vol. 153 nº 1-2: 122-122 - Power - Di Conza - 2010: 36 Suppl 3: 58-14.
59. Naas, T., Cuzon, G., Villegas, M. V., Lartigue, M. F., Quinn, J. P. and Nordmann, P., (2008) Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *bla* KPC gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52: 1257-1263.
60. Pasteran, F. G., Otaegui, L., Guerriero, L., Radice, G., Maggiora, R., Rapoport, M., Faccione, D., Di Martino, A. and Galas, M., (2008) *Klebsiella*

pneumoniae carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis*, 14: 1178-1180.

61. Villegas, M. V., Lolans, K., Correa, A., Kattan, J. N., Lopez, J. A. and Quinn, J. P., (2007) First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 1553-1555.

62. Pasteran, F., Veliz, O., Faccone, D., Guerriero, L., Rapoport, M., Mendez, T. and Corso, A., A simple test for the detection of KPC and metallo-beta-lactamase carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. (2011). *Clin Microbiol Infect*. 17:1438-1441.

BACTERIAS Gram (+) PROBIOTICAS: INFLUENCIA SOBRE EL SISTEMA INMUNE

Carolina, Maldonado Galdeano^{1,2} y Gabriela Perdigón^{1,2} *

1-Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET). Chacabuco 145, San Miguel de Tucumán (T4000ILC) Tucumán. Argentina.

2-Cátedra de Inmunología. Instituto de Microbiología. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.

Tabla de contenidos

RESUMEN-SUMMARY.....	123
INTRODUCCIÓN.....	124
PROBIOTICOS.....	125
- SISTEMA INMUNE MUCOSO. GENERALIDADES.....	125
- INFLUENCIA DE BACTERIAS PROBIÓTICAS Y LECHE FERMENTADAS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE.....	126
- ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LOS PROBIOTICOS Y LECHES FERMENTADAS	129
- MECANISMOS IMPLICADOS EN LA IMMUNOESTIMULATION POR LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS	130
- PERSPECTIVAS FUTURAS PARA VALIDAR EL EMPLEO DE MICRO- ORGANISMOS PROBIÓTICOS COMO ADYUVANTES ORALES.....	132
- REFERENCIAS	133
AGRADECIMIENTOS	136

RESUMEN

La microbiota intestinal juega un papel importante en el desarrollo y maduración del sistema inmune de mucosas. Entre la gran población de bacterias que forman parte de la misma, se encuentran las bacterias ácido lácticas y las bifidobacterias, las cuales son usadas frecuentemente como probióticos debido a los beneficios sobre la salud atribuidos a las mismas.

Para mantener la homeostasis intestinal es imprescindible el balance de esta microbiota, el cual puede ser afectado por una gran cantidad de factores como tratamiento con antibióticos, stress, quiomoterapia y por la dieta entre otros. De allí que surge la posibilidad de emplear a los microorganismos probióticos presentes en

muchos alimentos para mejorar el balance intestinal y actuar como adyuvantes del sistema inmune.

Conocer el mecanismo por el cual estas bacterias pueden tener efecto sobre el sistema inmune es de importancia para poder utilizarlos de modo correcto. Los estudios realizados muestran que dichos microorganismos ayudan a reforzar las defensas naturales a nivel de mucosas para mantener en estado de alerta permanente al sistema de defensa, de manera que la respuesta frente a un estímulo sea rápida y controlada.

PALABRAS CLAVES: *microbiota intestinal, probióticos, sistema inmune intestinal*

SUMMARY

PROBIOTICS GRAM (+) BACTERIA: INFLUENCE ON THE IMMUNE SYSTEM

The intestinal microbiota plays an important role in the development and maturation of the mucosal immune system. Lactic acid bacteria are constituents of the microbiota and they are frequently used as probiotics due of the health benefits attributed to them.

To maintain intestinal homeostasis is essential the balance of this microbiota. This balance can be affected by many factors such as antibiotics, stress, diet quiomoterapia and others. Hence arises the possibility of using

the probiotic microorganisms present in many foods to improve intestinal balance and act as immune adjuvants.

The Knowledge the mechanism by which these bacteria may have an effect on the immune system is important to use them correctly. Studies show that these organisms help reinforce the natural defenses at mucosal to maintain constant alertness to the defense system, so that the response to a stimulus is rapid and controlled manner.

KEY WORDS: *microbiota intestinal, probiotics, immune system*

INTRODUCCIÓN

El tracto gastrointestinal puede considerarse un complejo ecosistema que alberga una gran cantidad de microorganismos aerobios y anaerobios que coexisten de manera simbiótica y conforman lo que se conoce con el nombre de microbiota.

Al nacer el intestino es estéril y a medida que transcurren las horas comienza el proceso de colonización bacteriana del tracto intestinal. Este proceso es el resultado de la compleja interacción entre el huésped y los microorganismos del medio externo (1). Los primeros microorganismos en colonizar el intestino son aerobios facultativos, pero a medida que el oxígeno es consumido, comienzan a crecer microorganismos anaerobios estrictos (2). Así la composición de la microbiota en los recién nacidos estará determinada por diversos factores en el momento del nacimiento.

La microbiota intestinal tiene un importante papel en el desarrollo y funcionalidad del sistema inmune, el cual fue demostrado mediante el uso de animales gnotobioticos y libres de gérmenes. Estudios realizados usando ratones como modelo experimental muestran que el número de células IgA+ en la lámina

propia de las vellosidades era significativamente menor en animales libres de gérmenes en comparación con los animales convencionales, sugiriendo estos resultados la importancia del establecimiento de la microbiota en el normal desarrollo del sistema inmune intestinal (3). Estudios similares usando animales gnotobioticos colonizados con bacterias Gram (+) o con bacterias Gram (-) mostraron que el número de células IgA+ es dependiente también de la cepa bacteriana que coloniza el intestino (4).

Se ha sugerido recientemente que varias enfermedades complejas y multifactoriales como alergia, periodontitis, artritis reumatoidea y cáncer de colon tienen como mecanismo etiopatogénico, el desbalance de la microbiota intestinal (5). Por otro lado, la microbiota posee bacterias con propiedades beneficiosas para el huésped entre ellas las bacterias ácido lácticas y las bifidobacterias, algunas de ellas con propiedades probióticas.

Se sabe que la composición de la microbiota intestinal, puede modificarse por varios factores externos como la dieta, el uso de antibióticos, la quimioterapia, la tensión, el stress,

etc. (6, 7), en este sentido el consumo de suplementos probióticos nos ofrece la posibilidad de mejorar el desbalance de la microbiota y ayudar de ese modo a mantener un buen estado de salud del huésped.

PROBIOTICOS

La palabra probiótico relacionada a suplementos alimentarios fue utilizada por Parker en 1974 (8), no obstante la historia de los suplementos microbianos vivos y el concepto de probióticos adicionados a leches fermentadas ha continuado evolucionando hasta nuestros días. Recientemente la FAO definió a los probióticos como microorganismos vivos que cuando se administran en dosis apropiadas, confieren un beneficio en la salud a quien lo recibe (9).

Los efectos beneficiosos del yogur fueron demostrados a principios del siglo pasado por Ellie Metchnikoff, quien desempeñó un papel dominante en este proceso, a través de su libro "la prolongación de la vida" publicada en 1907 (10). Los beneficios atribuidos a los probióticos son numerosos, entre ellos se incluyen, resistencia a enfermedades infecciosas, prevención de cáncer, disminución de los síntomas de la intolerancia a la lactosa y disminución de la respuesta inflamatoria. (11, 12). Los microorganismos considerados probióticos pertenecen en su mayoría a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, donde los lactobacilos juegan un papel preponderante. En la mayoría de los efectos atribuidos a los probióticos, el sistema inmune juega un papel dominante, y puesto que estas bacterias se ingieren generalmente como parte de la dieta diaria, empleando ratones BALB/c como modelo experimental, se estudió el efecto de las mismas sobre el sistema inmune sistémico y de mucosas, para establecer las bases científicas del uso de probióticos.

Aunque no todos los resultados de los modelos animales se pueden extrapolar al ser humano, la mayor parte de ellos son útiles en la comprensión de los diversos procesos donde está implicado el sistema inmune. En este sentido el valor de los estudios hechos en animales de experimentación es innegable.

Si los probióticos tienen potencial para prevenir enfermedades donde el sistema inmune desempeña un papel fundamental, la pregunta fue: ¿estos microorganismos pueden influenciar el comportamiento del sistema inmune?. Esta pregunta surge a raíz del conocimiento de que, la administración oral de un antígeno puede inducir o inhibir la respuesta inmune de mucosa (activación o tolerancia). Por otra parte un inmunomodulador oral, no debe inducir un efecto inflamatorio intestinal o alterar el balance de la microbiota intestinal, hecho que podría llevar a la translocación de bacterias más allá del intestino. Es imprescindible conocer el funcionamiento del Sistema Inmune Mucoso (SIM) para sugerir el empleo de microorganismos probióticos como adyuvantes orales.

SISTEMA INMUNE MUCOSO.

GENERALIDADES

Las superficies mucosas están en contacto directo con el ambiente externo y son por ende altamente vulnerables a la penetración, colonización e invasión de microorganismos particularmente patógenos. Sin embargo la entrada de antígenos es regulada por mecanismos inmunológicos inespecíficos en el tracto gastrointestinal así como la estructura física del propio epitelio. Las primeras barreras que actúan cuando ingresa un antígeno extraño por vía oral son la microbiota intestinal y el epitelio. Las células epiteliales permanecen unidas mediante uniones estrechas y forman

una barrera que impide el paso de los microorganismos nocivos. Las secreciones intestinales: enzimas, bacteriocinas, e inmunoglobulinas, están implicadas en la defensa del huésped conjuntamente con la microbiota y el peristaltismo intestinal que hacen dificultosa la adhesión de los microorganismos al epitelio, paso fundamental en toda invasión (13). El intestino tiene además un sistema inmune complejo asociado a mucosas que es capaz de tolerar la carga masiva de antígenos dietarios y de los microorganismos comensales que colonizan el aparato gastrointestinal, al mismo tiempo que puede reconocer y rechazar los microorganismos enteropatógenos que desafían las defensas del cuerpo. Este tejido linfoide está organizado en sitios inductores de la respuesta inmune (placas de Peyer (PP) en intestino delgado y nódulos linfoides en intestino grueso) y por sitios efectores (lámina propia y criptas), donde se encuentran todas las células del sistema inmune.

Para que las células inmunes asociadas a intestino se activen, éstas deben tomar contacto con el antígeno, el cual puede ingresar a través de diferentes vías, enterocitos, células M de PP (14), células dendríticas, para ponerse en contacto con las células del sistema inmune intestinal.

Una de las principales inmunoglobulinas que se producen a nivel de mucosas en respuesta al antígeno es la IgA secretoria. Se ha demostrado que la resistencia a la infección está relacionada directamente con la producción de anticuerpos IgA secretoria (15). Las células B IgA+ estimuladas por los antígenos pueden migrar por vía linfática al nódulo mesentérico y de allí pasar a vía sanguínea por el conducto torácico. Esta migración celular constituye el ciclo de la IgA, donde los LB IgA+ pueden repoblar, además de la lámina propia

del intestino, otros tejidos mucosos distantes (bronquios y glándulas mamarias) (16).

INFLUENCIA DE BACTERIAS PROBIÓTICAS Y LECHE FERMENTADAS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE

Considerando estos conocimientos, se estudió la influencia de la administración oral de diferentes cepas consideradas probióticos (*Lactobacillus (L) casei* CRL 431, *Lactobacillus (L) acidophilus* CRL 724, *Lactobacillus (L) delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 423 y *Streptococcus thermophilus* CRL 412) y de leches fermentadas conteniendo probióticos sobre el sistema inmune, no solo a nivel de mucosa intestinal sino también se evaluó el efecto de los mismos sobre el sistema inmune sistémico.

En primer lugar se determinó si la administración oral de estos microorganismos produce efectos secundarios, tales como la inducción de una respuesta inflamatoria intestinal o translocación bacteriana a hígado y bazo. También se evaluó el efecto de estos probióticos sobre el sistema inmune de mucosas en huéspedes normales e inmunosuprimidos por desnutrición. Por otro lado, para medir el efecto sobre la mucosa intestinal se estudió el perfil de citoquinas inducido por las bacterias ensayadas y las células IgA+ en la lámina propia del intestino y en otros sitios mucosos distantes como bronquios y glándulas mamarias, para determinar la capacidad de estas bacterias de inducir el ciclo de la IgA. También se evaluó si estas poseen efecto protector frente a una infección con enterobacterias.

Se estudió la actividad antitumoral de la cepa de *L. casei* en un tumor no-intestinal (fibrosarcoma) y la actividad anti carcinogénica de leches fermentadas: como yogur, en un modelo de cáncer intestinal y se determinaron los posibles mecanismos involucrados.

Se realizaron estudios en ratones normales, sin patología de base, tendientes a determinar los mecanismos por los cuales las bacterias probióticas activan las células inmunes asociadas a intestino. Esto incluyó el estudio de la interacción de probiótico con la célula epitelial intestinal y con las células inmunes intestinales, las señales biológicas que se inducen como consecuencia de la interacción, tiempo de permanencia de las bacterias en el intestino, importancia de la especificidad de especie y de la viabilidad de la bacteria probiótica en dicha estimulación.

Considerando que el consumo de probióticos y leches fermentadas es propuesto actualmente como parte de la dieta diaria, se evaluó la influencia de la administración de probióticos durante períodos prolongados sobre el SIM.

Se realizaron estudios para determinar la importancia de la administración de probióticos y una leche fermentada en la prevención frente a una infección con *Salmonella* entérica serovar. Typhimurium.

Los resultados obtenidos demostraron la inocuidad del consumo de bacterias probióticas o leches fermentadas ya que no hubo traslocación a hígado y bazo así como hepatomegalia o esplenomegalia, sin embargo se observó aumento de la respuesta inmune humoral y celular (17, 18, 19, 20).

La administración oral de las bacterias ácidos lácticas (*L. casei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. termophilus*) produjo activación de los macrófagos peritoneales y aumentó la respuesta inmune humoral y celular, evidenciada por la activación de linfocitos T y B (17, 18). Estos estudios concuerdan con otros autores (21).

Estudios histológicos realizados en intestino delgado de ratones sanos que recibieron

la administración oral de *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. termophilus* mostraron aumentos en la celularidad en lámina propia del intestino, siendo ese aumento predominantemente de células mononucleadas, sin embargo los aumentos observados no modificaron la histología normal del intestino. (19, 22). Estudios realizados con anticuerpos específicos para determinar que células estaban aumentadas, mostraron incrementos importantes en el número de células productoras de citoquinas y de IgA. Todo esto estuvo acompañado de elevados niveles de Bcl2, proteína responsable de la activación celular (23).

Todas las bacterias estudiadas indujeron un perfil de citoquinas diferente, en donde se observaron aumentos en el número de células positivas tanto de citoquinas reguladoras (IL-4 e IL-10) como pro-inflamatorias (IL-12, IL-6 IFN γ TNF α). Sin embargo, la producción de citoquinas proinflamatorias estuvo siempre regulada por IL-10 e IL-4, mientras que no se observaron aumentos en el número de células IL-2+ (23, 24, 25). Para otras bacterias probióticas también se ha descrito que las mismas aumentan el número de células secretoras de citoquinas asociadas a lamina propia del intestino (26).

Se estudió la influencia de la administración del probiótico *L. casei* en el equilibrio Th1/Th2 para un antígeno protéico (ovoalbúmina), en donde los resultados mostraron un claro balance hacia la respuesta Th2 (23). El balance Th2 también fue influenciado por otras bacterias probióticas (27).

La administración oral de *L. casei* indujo aumentos en el número de células IgA+ en lamina propia de intestino y en bronquios; el efecto fue siempre dependiente de la dosis. Esta bacteria además fue capaz de aumentar el número de células IgA+ en glándulas mama-

rias. Esta evidencia demuestra que la administración oral de bacterias probióticas aumenta la inmunidad de las mucosas no sólo a nivel intestinal sino también a nivel de bronquios y de glándulas mamarias, es decir inducen el ciclo de la IgA (28, 29).

En un modelo experimental de desnutrición inducido en ratones BALB/c por una dieta carente de proteína (PEM), se demostró que la administración de yogur convencional o de una cepa probiótica (*L. casei*), pueden mejorar la estructura histológica del intestino evitando la traslocación bacteriana y mejorando la resistencia frente a una infección con enteropatógenos como *Salmonella* y *Escherichia coli*. También se induce la recuperación de la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales (30, 31).

Con respecto a este último punto, se sabe que las infecciones entéricas con etiología bacteriana son un problema de salud mundial, y son la causa principal de mortalidad infantil en países subdesarrollados constituyendo un riesgo permanente para el viajero. El uso extenso de antibióticos en salud pública no es recomendado debido a las complicaciones que ello puede traer posteriormente, como droga-resistencia y toxicidad crónica. Actualmente no hay vacunas orales eficaces que protejan contra diarreas de etiología diversa. Es por ello que la administración oral de las bacterias probióticas para prevenir estas enfermedades, resulta una posibilidad atractiva. Los lactobacilos y las bifidobacterias tienen una larga historia como agentes bioterapéuticos seguros y siguen siendo las bacterias más comunes usadas como suplementos dietarios. Los mecanismos sugeridos por el cual los probióticos pueden ejercer su efecto protector o terapéutico contra los enteropatógenos incluyen, la competición por sitios de adhesión, la producción de metabolitos inhibitorios, agentes anti-

microbianos contra patógenos, la modulación de la producción de la toxina o la modulación de la respuesta inmune del huésped (32). Este conocimiento llevó a estudiar el efecto de la administración de probióticos en una infección entérica causada por *Escherichia coli* enteroinvasiva y por *Salmonella Typhimurium*. Se realizaron estudios *in vitro* y *ex vivo* para tratar de dilucidar los mecanismos implicados en la capacidad preventiva observada contra las bacterias enteropatógenas. Los resultados demostraron que la administración oral de *L. casei* o de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* durante 7 días, protegió a los ratones contra la infección con *Salmonella* (33, 34). *L. casei* fue el único en prevenir la infección con *E. coli*, siendo uno de los mecanismos involucrados en este proceso el aumento de los niveles de IgA-secretoria específica para la bacteria patógena. Este efecto protector fue dosis dependiente. Igual efecto se observó cuando se administró una leche fermentada con la cepa probiótica *L. casei* (35). La actividad protectora de probióticos frente al patógeno *Salmonella Typhimurium* también ha sido descrita por otros autores (36).

Entre los mecanismos más importantes observados en la protección frente a *Salmonella* ejercida por *L. casei* se puede mencionar una mayor activación de las células epiteliales de intestino, evidenciadas por un aumento tanto *in vitro* como *ex vivo* en la producción de IL-6 y MCP-1 por estas células. Esto va acompañado de un aumento en la actividad fagocítica de células presentadoras de antígenos (macrófagos y células dendríticas) en el sitio inductor de la respuesta inmune (placa de Peyer), y de aumentos en la producción de IgA específica para el patógeno *Salmonella*, esto ayuda a la resistencia contra la infección observada en los ratones tratados con la cepa probiótica (34).

Las diferencias encontradas con otros autores en relación al efecto protector frente a enterobacterias son debidas en gran parte a que la biología de la infección es característica para las distintas bacterias enteropatógenas. *Salmonella* demuestra mayor afinidad para las células M de las placas de Peyer del intestino delgado, que son la puerta principal de entrada. La capacidad de *Salmonella* de sobrevivir dentro de las células fagocíticas permite que el patógeno evada al sistema inmune del huésped e invada tejidos más profundos. Los macrófagos y los neutrófilos mueren por apoptosis. Este último proceso es un paso importante en la patogénesis de la infección por *Salmonella*.

Los mecanismos implicados en este proceso (además de la s-IgA secretoria específica) fueron dependientes de la cepa empleada. Así entre ellos se pueden mencionar la inhibición celular de la apoptosis de macrófagos infectados, en el caso de animales que recibieron *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* o *S. thermophilus* pero no con *L. casei*. Otro de los mecanismos involucrados es la liberación de radicales oxidantes, como el peróxido de hidrógeno, por los macrófagos peritoneales estimulados con cualquiera de las tres cepas antes mencionadas (33, 37).

ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LOS PROBIOTICOS Y LECHE FERMENTADAS.

Los mecanismos implicados en el crecimiento tumoral son muy complejos y escapan a la vigilancia inmunológica, es por ello que las terapias adyuvantes preventivas son más importantes que su empleo como terapéutico. El uso de bacterias probióticas o leches fermentadas con capacidad inmunomoduladoras en la prevención o en el retraso del crecimiento tumoral, son una posibilidad atractiva de

reducir el riesgo de cáncer. Sobre este aspecto numerosos autores han publicado sobre los efectos beneficiosos de los probióticos en diferentes tipos de cánceres (38).

En el laboratorio se usó un modelo experimental y considerando la capacidad inmunomoduladora de *L. casei*, se determinó el efecto de este microorganismo sobre la inhibición de un tumor no-intestinal inducido químicamente con metilcolantreno (fibrosarcoma). También se analizó el efecto inhibitorio del yogur en la iniciación o en la promoción de un cáncer de colon químicamente inducido con dimetilhidrazina (DMH) y estudiamos los posibles mecanismos implicados en la actividad antitumoral.

La administración oral de *L. casei* fue capaz de inhibir el crecimiento del fibrosarcoma inducido con metilcolantreno. El mejor efecto fue alcanzado con las dosis más bajas (2×10^9 células). Los estudios realizados concluyeron en que la actividad antitumoral observada con *L. casei* fue debida a que esta cepa es capaz de activar al sistema inmune, hecho que se vio reflejado en una mayor actividad de los macrófagos infiltrados al tumor, los cuales mostraron altos niveles en la producción de TNF α con disminución de la capacidad citotóxica (39).

El efecto negativo observado con altas dosis de *L. casei* pudo ser debido a una autorregulación de los mecanismos inmunes a nivel intestinal como consecuencia de un estímulo excesivo con disminución de la actividad inmune y la consecuente progresión tumoral.

Para estudiar la capacidad antitumoral del yogur, se determinó previamente el efecto de su administración en la mucosa intestinal (40, 41). El yogur fue administrado durante 10 días consecutivos antes de la inducción con el carcinógeno, y su administración continuó después de la inducción del tumor, es decir se

realizó una alimentación cíclica con yogur por períodos de 10 días seguidos de un descanso de una semana, esto se repitió durante 6 meses consecutivos (período en el que se desarrolla el tumor). En los animales control del tumor se observó una fuerte respuesta inmune inflamatoria, causada por el agente carcinogénico, con aumento significativo en el número de células IFN γ + de TNF α +, de linfocitos B y de linfocitos T CD8+. La alimentación con yogur inhibió el desarrollo del tumor disminuyendo la respuesta inmune inflamatoria con aumentos en el número de células IgA+, de linfocitos T CD4+, y aumento de la apoptosis celular con niveles elevados de IL-10, también se observó una disminución de radicales oxidantes (42, 43).

Los mecanismos inmunes usados por el yogur para disminuir la respuesta inflamatoria causada por el agente carcinogénico fueron diferentes a los observados con la droga antiinflamatoria indometacina. La diferencia principal fue que la indometacina no producía aumentos de la actividad infiltrativa de las células inmunes en el intestino grueso y se detectaban niveles bajos de citoquinas. La actividad antitumoral del yogur estaba mediada por su capacidad inmunomoduladora y por la disminución de las enzimas microbianas asociadas a carcinogénesis. Se determinó que la sola suplementación con yogur no podía inhibir el desarrollo del tumor en la etapa de la iniciación, no obstante la administración cíclica del yogur después de la inducción del tumor, inhibía la promoción y la progresión del tumor (40, 44).

A través de estos estudios se demostró que, la capacidad antitumoral del yogur estaría mediada por el aumento de células IgA+, linfocitos T CD4+ no así de los linfocitos T CD8+, por niveles elevados de IL-10, es decir a través de una respuesta antiinflamatoria (45).

En el análisis de la capacidad antitumoral

mediada por yogur convencional, sin el agregado de otra bacteria probiótica seleccionada no existen antecedentes previos a nuestros estudios.

MECANISMOS IMPLICADOS EN EL IMMUNOSTIMULATION POR LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS

Los estudios anteriores son la prueba científica del papel importante de las bacterias probióticas y/o de leches fermentadas que contienen estos microorganismos en la activación del sistema inmune de mucosas y sistémico. Estos resultados llevaron a analizar los mecanismos implicados en la activación inmune observada y a determinar cuáles son las células más involucradas en dicha activación.

Existen muchos estudios tendientes a explicar la inmunostimulación de células inmunes intestinales por bacterias patógenas; pero hay pocos estudios que expliquen como el sistema inmune de mucosas responde frente a la entrada de microorganismos no patógenos. Uno de los principales desafíos es tratar de comprender cómo las bacterias comensales se comunican entre sí y con las células del huésped y cómo las células inmunes pueden discriminar cuando las señales microbianas provienen de un patógeno o no, llevando a la activación de las células inmunes intestinales o, a la no respuesta considerada como tolerancia oral.

En el microambiente intestinal, existe una compleja red de señales enviadas entre bacteria-bacteria y entre bacteria-célula epitelial. En este complejo ecosistema ¿cómo se genera una respuesta mucosa frente a microorganismos no patógenos? Y ¿cómo y cuáles son las células del sistema inmune que responden frente a la estimulación con bacterias probióticas?. Otras preguntas que surgen al respecto son si

la interacción de la bacteria probiótica se limita solo a la célula epitelial del intestino o si existe interacción directa entre la bacteria y las células inmunes del intestino. Si esto es así, y se estimula la célula epitelial y las inmunes asociadas, debería haber una respuesta por parte del sistema inmune mucoso, ¿cómo sería esa respuesta? y ¿Cuáles son las señales inducidas por el probiótico?.

Debido a que muchos alimentos que son promovidos actualmente en la industria contienen microorganismos probióticos, como éstos estimulan el SIM, es importante poder determinar si el consumo prolongado de los mismos podrían tener algún efecto adverso en el consumidor, ello es debido a que para poder tener un efecto, las bacterias probióticas necesitan adherirse al epitelio y permanecer durante un tiempo en el intestino, pero ¿cuál es el tiempo real de permanencia de las mismas en el intestino? ¿En este sentido, el uso de bacterias indígenas sería más recomendable que la administración de bacterias exógenas?

Con motivo de contestar los interrogantes planteados, se estudió la interacción de bacterias probióticas con las células epiteliales e inmunes, marcando a las bacterias con una sustancia fluorescente de manera de poder seguir la trayectoria de la misma luego de su administración, paralelamente se realizaron estudios con microscopía electrónica de transmisión y se detectó la bacteria probiótica administrada mediante técnicas de inmunomarcación usando oro coloidal. Los resultados mostraron que la bacteria probiótica entera puede interactuar directamente con las células epiteliales intestinales a los 5 minutos de su administración a nivel de las microvellosidades de las mismas. Solo fragmentos bacterianos fueron encontrados en el interior de las células epiteliales y posteriormente de las células

inmunes (25, 46). También se observó que los macrófagos y las células dendríticas asociadas a intestino pueden fagocitar a la bacteria entera o a sus fragmentos. Esto puede ser debido a la internalización de las bacterias por las células M de placa de Peyer o de las vellosidades. En estos estudios, el grupo de trabajo fue el pionero en obtener la prueba científica sobre la vía de internalización de estas bacterias no patógenas.

Los receptores involucrados en la activación de células epiteliales e inmunes por la interacción con las bacterias probióticas son los receptores toll (TLR2) y el receptor (CD206) de macrófagos. Como consecuencia de la interacción bacteriana con los TLR-2 de la célula epitelial, estas células, producen citoquinas principalmente IL-6 a diferencia de los microorganismos patógenos que inducen producción de IL-8. Se observó que luego de que las bacterias probióticas interactúan con el epitelio, algunas de ellas o sus fragmentos entran en contacto con las células fagocíticas, macrófagos o células dendríticas, por medio de los receptores de membrana TLR-2 y el receptor CD-206. Como consecuencia de dicha interacción se producen mediadores químicos que van a permitir la comunicación entre las células, como son las citoquinas, también se incrementaron el número de células IgA+, pero no hubo proliferación de la población de linfocitos T CD4+ y CD8+ (47).

Se determinó la importancia de la viabilidad de la bacteria probiótica para poder evocar una respuesta inmune a nivel intestinal, sin embargo no es una condición indispensable ya que algunos de los lactobacilos administrados (*L. bulgaricus*) produjeron una buena respuesta inmune a nivel de intestino delgado aunque no comparable con la obtenida con la cepa viva. También se demostró que el tiempo de

permanencia de las bacterias probióticas en el intestino es similar al de cualquier antígeno particulado (72 hs) (46), y que el consumo de los mismos durante tiempos prolongados no produce efectos adversos (48, 49). Estos resultados muestran que el consumo continuo o diario de probióticos o leches fermentadas que lo contienen mantendrían al sistema inmune en estado de vigilancia de manera de responder rápidamente frente a un estímulo o agresión antigénica (bacteria patógena, células tumorales).

Si bien el probiótico produce una estimulación de las células inmunes en el intestino, la respuesta inmune innata es la más involucrada, manteniendo la homeostasis intestinal. No se obtuvo respuesta con producción de anticuerpos para los antígenos de la bacteria probiótica administrada, con lo cual podemos concluir que no hubo presentación antigénica a nivel de placa de Peyer (50).

En relación a la importancia de la especificidad del huésped en la selección de bacterias probióticas para obtener una buena respuesta inmune intestinal, se demostró que ello no es necesario, luego de comparar bacterias probióticas con no-probióticas comensales y no-comensales (51). Las bacterias comensales están implicadas más en la regulación de la homeostasis intestinal, mientras que las bacterias probióticas están involucradas en la activación regulación del sistema inmune (52).

Fuimos los primeros en establecer la hipótesis de que las bacterias probióticas estimulan la respuesta inmune innata. Actualmente hay trabajos de otros autores que han profundizado en las vías de señalización a nivel celular (53).

PERSPECTIVAS FUTURAS PARA VALIDAR EL EMPLEO DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS COMO ADYUVANTES ORALES

Es de importancia determinar las señales biológicas inducidas por los probióticos a las células de la inmunidad innata y adaptativa, a través del análisis de diversos factores transcripcionales (NFκB, NFAT, PKC) o enzimas (calcineurina) implicadas en la activación inmune, para establecer cuál de ellos es el más relacionado al estímulo inmune inducido por el probiótico en forma comparativa con patógenos intestinales. Este estudio será un paso importante para seleccionar el marcador inmune diferencial en la selección de cepas probióticas. También sería de gran valor evaluar porque no todos los lactobacilos son probióticos y determinar cuáles son los epitopes de la pared celular de estas bacterias que están involucrados en la activación inmune observada. ¿Puede la administración de un probiótico influenciar la maduración temprana de las células inmunes asociadas a la mucosa intestinal?, ¿por qué no inducen tolerancia oral?, ¿cuál es el mecanismo diferencial de los lactobacilos por los cuales algunos inducen tolerancia y otros activación inmune? Contestar estos interrogantes permitirá validar el empleo de los lactobacilos probióticos como adyuvantes orales del SIM.

REFERENCIAS

1. Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P., Vigi, V. (2003) "Intestinal microflora in early infancy: composition and development.". *Acta Pediatr Suppl.* 91, pags. 48-55.
2. Bezirtzoglou (1997) "The intestinal microflora during the first weeks of life." *Anaerobe* 3, pags. 173-177.
3. Moreau, M.C., Raibaud, P., and Muller, M.C. (1982) "Relationship between the development of the intestinal IgA immune system and the establishment of microbial flora in the digestive tract of young holoxenic mice". *Ann Immunol (Paris)* 133, 29-39.
4. Moreau, M.C., Ducluzeau, R., Guy-Grand, D., and Muller, M.C. (1978) "Increase in the population of duodenal immunoglobulin A plasmacytes in axenic mice associated with different living or dead bacterial strains of intestinal origin". *Infect Immun* 21, pags. 532-539.
5. Zhu, Y., Michelle Luo, T., Jobin, C., Young, HA. (2011) "Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis." *Cancer Lett.* 309, pags. 119-127.
6. Bailey MT, Dowd SE, Galley JD, Hufnagle AR, Allen RG, Lyte M. (2011) "Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation". *Brain Behav Immun.* 25, pags. 397-407.
7. Antunes LC, Finlay BB. (2011) "A comparative analysis of the effect of antibiotic treatment and enteric infection on intestinal homeostasis." *Gut Microbes.* 2, pags. 105-108.
8. Parker, R.B. (1974) "Probiotics, the other half of the antibiotic history. *Anim Nutr Helath.* 29, pags. 4-8.
9. FAO, W. (2001) "Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria." Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report Available from www.fao.org/es/ESN/probio/probio.htm
10. Metchnikoff, E. (1908) "The prolongation of life." G.P.Putnam and Sons ed. New York.
11. de Vrese, M., Schrezenmeir, J. (2008) "Probiotics, prebiotics, and synbiotics." *Adv Biochem Eng Biotechnol.*; 111, pags. 1-66.
12. Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, AM., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., Poli, A., Pregliasco, F., Salvini, F., Zuccotti, GV. (2011) "Probiotics and health: an evidence-based review." *Pharmacol Res.* 63, pags. 366-376.
13. Vereecke, L.; Beyaert, R.; van Loo, G. (2011) "Enterocyte death and intestinal barrier maintenance in homeostasis and disease". *Trends Mol Med.* 17(10) pags. 584-93.
14. Jang, M., Kweon, M.N.; Iwatani, K.; Yamamoto, M.; Terahara, K.; Sasakawa, C.; Suzuki, T.; Nochi, T.; Yokota, Y.; Rennert, P.D.; Hiroi, T.; Tamagawa, H.; Iijima, H.; Kunisawa, J.; Yuki, Y. and Kiyono, H. (2004) "Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 pags. 6110-6611
15. Fagarasan, S. and Honjo, T. (2003) "Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences." *Nat. Rev. Immunol.* 3, pags. 63-72.
16. Macpherson, A.J.; McCoy, K.D.; Johansen, F.E. and Brandtzaeg, P. (2008) "The immune geography of IgA induction and function." *Mucosal Immunol.* 1, 11-22.
17. Perdigón, G., Nader de Macías, M.E, Alvarez, S., Oliverand, G. and de Ruiz Holgado, A.P. (1987) "Enhancement of immune response in mice fed with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*" *Journal of Dairy Science.* 70, pags. 919-926.
18. Perdigón, G., Nader de Macías, M.E, Alvarez, S., Oliverand, G. and de Ruiz Holgado, A.P. (1988) "Systemic augmenta-

- tion of immune response in mice by feeding fermented milk with *L. casei* and *L. acidophilus*" Immunology. 63, pags. 17-24.
19. Vintiñi E., Alvarez S., Medina M., Medici M., V. de Budeguer M. and Perdígón G. (2000) "Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria." Biocell 24, pags. 223-232.
 20. Perdígón, G.; Fuller, R. and Raya, R. (2001) "Lactic acid bacteria and their effect on the immune system." Current Issues Intest. Microbiol. 2, pags. 27-42
 21. Vidal K, Benyacoub J, Moser M, Sanchez-Garcia J, Serrant P, Segura-Roggero I, Reuteler G, Blum S. (2008) "Effect of *Lactobacillus paracasei* NCC2461 on antigen-specific T-cell mediated immune responses in aged mice." Rejuvenation Res. 11, pags. 957-964.
 22. Perdígón, G., Alvarez, S., Vintiñi, E., Medina, M. and Medici, M. (1999). "Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria." Journal of Dairy Science. 82, pags. 1108-1114.
 23. Perdígón, G., Maldonado-Galdeano, C., Valdez, J.C. and Medici, M. (2002) "Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system." European Journal of Clinical Nutrition. 56, Supl. 4, pags. S21-S26
 24. Perdígón, G., Alvarez, S., Rachid, M., Agüero, G. and Gobbato, N. (1995) "Immune system stimulation by probiotics." Journal of Dairy Science. 78, pags. 1597-1606
 25. Perdígón, G., Maldonado-Galdeano, C., de Moreno de LeBlanc, A., Vinderola, C.G., Medici, M. and Bibas Bonet, M.E. (2004) "Immunomodulation of mucosal immune response by probiotics." Current Trends in Immunology. 6, pags. 69-85.
 26. Maassen, C.B., van Holten-Neelen, C., Balk, F., den Bak- Glashouwer, M.J., Leer, R.J., Laman, J.D., Boersma, W.J., and Claassen, E. (2000) Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. Vaccine 18 pags. 2613-2623.
 27. Cross, M.L., Mortensen, R.R., Kudsk, J., Gill, H.S. (2002) "Dietary intake of *Lactobacillus rhamnosus* HNOO1 enhances production of both Th1 and Th2 cytokines in antigen-primed mice." Med Microbiol Immunol. 191, pags. 49-53.
 28. de Moreno de LeBlanc, A., Maldonado Galdeano, C., Chaves, S. and Perdígón G. (2005). "Oral administration of *L. casei* increases immunity in bronchus and mammary glands." European Journal of inflammation. 3, pags. 25-30.
 29. Perdígón, G., Alvarez, S., Medina, M., Vintiñi, E. and Roux, E. (1999). "Influence of the oral administration of lactic acid bacteria on IgA producing cells associated to bronchus." International Journal of Immunotherapy and Pharmacology. 12, pags. 97-102
 30. Roux E.; Slobodianik, N.; Gauffin Cano, P. and Perdígón, G. (2003) "Mucosal Immune System and Malnutrition" edited by Fuller R. and Perdigon G., Blackwell publishing. UK. Chapter 7, pags. 155-168
 31. Perdígón G. y Gauffin Cano, Paola. (2003). "El yogurt como Agente Paliativo en Situaciones de Malnutrición". Malnutrición en el mundo. Como encontrar soluciones en el siglo XXI. Capítulo XIII. Pp 177-182. Editado por: Ascensión Marcos. Editec@red, Madrid.
 32. Liu, G., Griffiths, M. W., Wu, P., Wang, H., Zhang, X., and Li, P. (2011) "Enterococcus faecium LM-2, a multi-bacteriocinogenic strain naturally occurring in "Byaslag", a traditional cheese of Inner Mongolia in China." Food Control, 22, pags. 283-289.
 33. Gobbato, N., Maldonado Galdeano, C., and Perdígón, G. (2008). "Study of some of the mechanisms involved in the preven-

- tion against *Salmonella* enteritidis serovar Typhimurium infection by lactic acid bacteria". Food and Agricultural Immunology. 19, pags. 11-23
34. de Moreno de LeBlanc, A.; Castillo N.A.; Perdigon, G. (2010) "Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella* enterica serovar Typhimurium infection." International Journal of Food Microbiology. 138, pags. 223-231
 35. de Moreno de LeBlanc, A.; Maldonado Galdeano, C.; Dogi, C.A.; Carmuega, E.; Weill, R.; Perdigon, G. (2010). "Adjuvant effect of a probiotic fermented milk in the protection against *Salmonella* enteritidis serovar Typhimurium infection: mechanisms involved." International Journal of Immunopathology and Pharmacology. 23, pags. 1235-1244
 36. Canani, R. B., Cirillo, P., Terrin, G., Cesarano, L., Spagnuolo, M. I., De Vincenzo, A., et al. (2007) "Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: Randomised clinical trial of five different preparations." BMJ, 335, pags. 340-347.
 37. Valdez J., Rachid M., Gobbato N. and Perdígón G. (2001) "Lactic acid bacteria induce apoptosis inhibition in *Salmonella* Typhimurium infected macrophages." Food and Agricultural Immunology. 13, pags. 189-197.
 38. Deshpande, G., Rao, S., Patole, S. (2011) "Progress in the field of probiotics: year 2011." Curr Opin Gastroenterol. 27, pags.13-18.
 39. Perdígón, G., Medici, M., de Jorrat, M., de Budeguer, M and de Ruiz Holgado, A.P. (1993) "Immunomodulation effect of lactic acid bacteria on mucosal and tumour immunity". Int. Journal of Immunotherapy. IX, pags. 29-52.
 40. Rachid, M., Gobbato, N., Valdez, J.C., Vitalone, H. and Perdígón, G. (2002) "Effect of yogurt in the inhibition of an intestinal carcinoma by increasing in the cellular apoptosis." International Journal of Immunopathology and Pharmacology. 15, pags. 209-216.
 41. Guarner, F., Perdígón, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B. and Morelli, L. (2005) "Should yoghurt cultures be considered probiotics?" British Journal of Nutrition 93, pags. 783-786
 42. Valdez, J., Rachid, M., Bru, E and Perdígón, G. (1997) "Cytotoxic activity of peritoneal macrophages of mice fed with yogurt in an intestinal tumour process." Food Agricultural Immunology. 9, pags. 299-308.
 43. Perdígón, G., Valdez, J. y Rachid, M. (1998) "Antitumor activity of yogurt. Study of the possible involved immune mechanisms". Journal Of Dairy Research. 65, pags. 129-138.
 44. de Moreno de LeBlanc, A. and Perdígón, G. (2004) "Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer." Medical Science Monitor 10, pags. 96-104.
 45. de Moreno de LeBlanc, A., Valdez, J.C. and Perdígón, G. (2004). "Regulatory effects of yoghurt on intestinal inflammatory immune response." European journal of inflammation. 2, pags. 21-31.
 46. Galdeano, C.M. and Perdígón, G. (2004). "Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation." Journal of Applied Microbiology. 97, pags. 673-681
 47. Maldonado Galdeano, C. and Perdígón, G. (2006) "The probiotic bacteria *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through the innate immunity." Clinical and Vaccine Immunology. 13, pags. 219-226.
 48. de Moreno de Leblanc, A., Chaves, S., Carmuega, E., Weill, R., Antóine, J., Perdígón, G. (2008) "Effect of long-term continuous consumption of fermented milk containing probiotic bacteria on mu-

- cosal immunity and the activity of peritoneal macrophages." *Immunobiology*. 213, pags. 97-108.
49. Bibas Bonet, M.E., Chaves, A.S., Mesón, O. and Perdigón, G. (2006) "Immunomodulatory and anti-inflammatory activity induced by oral administration of a probiotic strain of *Lactobacillus casei*." *Europ J of Inflamm*. 4, pags. 31-34.
50. Galdeano, C. M., de Moreno de LeBlanc, A., Vinderola, G., Bonet, M. E., and Perdigón, G. (2007) Proposed model: Mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14, pags. 485-492
51. Dogi, C. A. and Perdigón, G. (2006) "Importance of the host specificity in the selection of probiotic bacteria." *Journal of Dairy Research*. 73, pags. 357-366.
52. Dogi, C.A; Maldonado Galdeano, C and Perdigón, Gabriela. (2008) "Gut immune stimulation by non pathogenic Gram(+) and Gram(-) bacteria. Comparison with a probiotic strain." *Cytokine*. 41, pags. 223-231.
53. Ng, S.C., Hart, A.L., Kamm, M.A., Stagg, A.J., Knight, S.C. (2009) "Mechanisms of Action of Probiotics: Recent Advances". *Inflamm Bowel Dis*. 15, pags. 300-310.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al soporte económico de diferentes subsidios CONICET-PIP, CIUNT (Universidad Nacional de Tucumán) y FONCYT.

**SE AGRADECE ESPECIALMENTE LA COLABORACIÓN
PRESTADA POR EL LABORATORIO MONSERRAT Y ECLAIR S.A
EN LA DISTRIBUCIÓN DE ESTE NÚMERO EN TODO EL PAÍS.**

COOPERARON PARA LA EDICION DE ESTE VOLUMEN 2011

Laboratorios ABBOTT S.A

Laboratorios BAGO S.A

Laboratorios BALIARDA S.A

Laboratorios BRITANIA S.A

CAMARA ARGENTINA DE ESPECIALIDADES
MEDICINALES (CAEME)

Laboratorio CASASCO S.A

Laboratorio GADOR

Droguería del Sur

Novo Nordisk Pharma Argentina S.A

Laboratorios ROUX-OCEFA

ASOCIACIÓN ARGENTINA DE FARMACIA Y
BIOQUIMICA INDUSTRIAL (SaFyBI)

Laboratorios WIENER S.A