

ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

# REVISTA FARMACEUTICA

REVIEWS



Rev. Farm. 156 – 2014 ISSN 0034-9496

BUENOS AIRES - ARGENTINA

**Volumen 156  
Nº 1-2  
2014**



**Fundada 1858**

**COMITÉ DE PUBLICACIÓN  
EDITORIAL BOARD**

**Coordinador:**

**Acad. Modesto C. Rubio**

**Miembros:**

**Acad. Alfredo Hager**

**Acad. Mario A. Los**

**Acad. Marcelo C. Nacucchio**

**Acad. Maria Luz Pita Martín**

**Acad. Alfredo Salibian**

**Acad. Marta Salseduc**

Editada por la

**Academia Nacional  
de Farmacia y Bioquímica**

Junín 956 - P.P.

Tel./fax: (011) 4964-8213

Buenos Aires

E-mail: acad@ffyb.uba.ar

Dirección Postal:

Junín 956 P.P.

1113 Buenos Aires - Argentina

<http://www.anfyb.com.ar>

La presente edición de  
se terminó de imprimir en  
Noviembre de 2014

**REVISTA  
FARMACÉUTICA**  
REVIEWS

Editada por la

**Academia Nacional de Farmacia y  
Bioquímica**

Personería Jurídica Resol. Nº 1762-30/8/1968

**CONSEJO DIRECTIVO 2014-2016**

**Presidente**

Acad. Manuel R. Limeres

**Vice-Presidente**

Acad. Miguel Ángel Caso

**Secretario General**

Acad. Gabriel Mato

**Prosecretario**

Acad. Marta M. Salseduc

**Tesorero**

Acad. Alfredo Salibian

**Protesorero**

Acad. Miguel D' Aquino

**Vocales Titulares**

Acad. Carlos A. Gotelli

Acad. Juan Pablo F.C. Rossi

**Vocales Suplentes**

Acad. Carlos M. Baratti

Acad. Modesto C. Rubio

**Revisores de Cuentas**

Acad. Alfredo A. Hager

Acad. Osvaldo Cascone

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 Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica.*

# ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

## ACADÉMICOS TITULARES

---

Acad. María Cristina Añón	Acad. Eduardo Diaz †	Acad. Marco Pizzolato
Acad. Carlos M. Baratti	Acad. Carlos H. Gaozza	Acad. Edgardo Poskus
Acad. Mirta J. Biscoglio	Acad. Hector I. Giuliani	Acad. Otmaro E. Roses
Acad. Alberto A. Boveris	Acad. Gabriel O. Gutkind	Acad. Juan Pablo F.C. Rossi
Acad. Carlos Bregni	Acad. Carlos A. Gotelli	Acad. Modesto C. Rubio
Acad. Rodolfo Brenner	Acad. Alfredo A. Hager	Acad. José Alberto Santomé
Acad. Nestor O. Caffini	Acad. Silvia Hajos	Acad. Marta M. Salseduc
Acad. Clyde N. Carducci	Acad. Mario A. Los	Acad. Alfredo Salibian
Acad. Ricardo A. Caro	Acad. Manuel Limeres	Acad. Francisco J.E. Stefano
Acad. Osvaldo Cascone	Acad. Horacio José Gabriel Mato	Acad. María Guillermina Volonté
Acad. Miguel A. Caso	Acad. Marcelo C. Nacucchio	Acad. Regina L. W. de Wikinski
Acad. Miguel D' Aquino	Acad. María Luz Pita Martín de Portela	

## ACADÉMICOS EMÉRITOS

---

Acad. Sem M. Albonico	Acad. Hector M. Chechile †	Acad. Ronaldo Meda
Acad. Arnaldo L. Bandoni	Acad. Mateo Chekherdemian	Acad. Horacio B. Rodríguez
Acad. Jorge D. Coussio	Acad. Enrique Iovine	Acad. Antonio F. Somaini †

## ACADÉMICOS CORRESPONDIENTES

---

### ARGENTINA

Acad. Marcelo O. Cabada  
Acad. Jorge Errecalde  
Acad. Oscar H. Fay  
Acad. Raul C. Fazio  
Acad. Aida Pesce de Ruiz  
Holgado  
Acad. Guillermo R. Lossa  
Acad. Ruben H. Manzo  
Acad. Modesto P. Montecchia  
Acad. Aldo D. Mottino  
Acad. Elsa M. Nadalin  
Acad. Jorge O. Nicolini  
Acad. Otto A. Orsingher  
Acad. Ana Maria Pechen  
D'Angelo

Acad. Gabriela Del Valle  
Perdigón  
Acad. Hugo G. Pérez †  
Acad. Clelia M. Riera  
Acad. Daniel O. Sordelli  
Acad. Marcelo D. Squassini  
Acad. Alberto Diaz

### ALEMANIA

Acad. Pablo Steinberg

### BRASIL

Acad. Aluísio Pimenta  
Acad. Caio Romero Cavalcanti

### CHILE

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

### COLOMBIA

Acad. Fleming Martínez  
Rodríguez

### CUBA

Acad. Ricardo Galvis  
Acad. Héctor Zayas Bazan y  
Perdomo

---

**ECUADOR**

Acad. Julio F. Araoz  
Acad. Eduardo Goetchel

**ESPAÑA**

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

**ESTADOS UNIDOS**

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

**FRANCIA**

Acad. Jean Marc Aïache  
Acad. Paul Fleury  
Acad. Carlos Soto

**ITALIA**

Acad. Stefano Govoni

**MEXICO**

Acad. Pedro Joseph Nathan

**PANAMA**

Acad. Ceferino Sánchez

**PARAGUAY**

Acad. Luis H. Berganza

**PERU**

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

**VENEZUELA**

Acad. José Luis Andrade

**URUGUAY**

Acad. Jorge Ares Pons  
Acad. Cayetano Cano Marotta  
Acad. Cosme de los Santos  
Carvallido  
Acad. Uberfil Delbene Garate  
Acad. Pietro Fagiolino  
Acad. Raquel Lombardo de  
Bertolaza  
Acad. Justo Emilio Menes  
Acad. Patrick Moyna  
Acad. Anibal Alberto Olmos  
Ferreira  
Acad. Oscar Polla Bermudez  
Acad. Joaquin E. Royer Meicoso

---

**ACADÉMICOS HONORARIOS**

---

**ARGENTINA**

Acad. Juan Carlos Bagó

**BRASIL**

Acad. Evaldo de Oliveira

**ESPAÑA**

Acad. Benito del Castillo García  
Acad. María Teresa Miras Portugal  
Acad. Federico Mayor Zaragoza

**ITALIA**

Acad. Rodolfo Paoletti

# ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



## REVISTA FARMACEUTICA REVIEWS

VOLUMEN 156 N° 1-2 – Año 2014

### SUMARIO

<b>AREAS NO ESPECÍFICAS EN LAS CARRERAS DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA: PARTICIPACIÓN EN EL SANEAMIENTO PUBLICO.....</b>	<b>2</b>
Miguel D'Aquino	
<b>FÓRMULAS INFANTILES: UNA REVISIÓN DE SU COMPOSICIÓN NUTRICIONAL Y DE LOS DISTINTOS TIPOS PRESENTES EN EL MERCADO .....</b>	<b>10</b>
Patricia Ana Ronayne de Ferrer, Carola Beatriz Greco	
<b>EFFECTO DEL BENZNIDAZOL SOBRE ENZIMAS DE BIOTRANSFORMA- CIÓN Y TRANSPORTADORES DE DROGAS QUE AFECTAN SU PROPIA BIODISPONIBILIDAD .....</b>	<b>21</b>
Juan P. Rigalli, Virginia G. Perdomo, Aldo D. Mottino, María L. Ruiz y Viviana A. Catania.	
<b>SURFACTANTE PULMONAR: DE SUS COMIENZOS HASTA NUESTROS DÍAS (PARTE I) .....</b>	<b>39</b>
María Margarita Martínez Sarrasague; Alejandra Noemí Cimato; Alfredo Adolfo Hager	
<b>GENETICA Y EPIGENETICA DE LAS ADICCIONES.....</b>	<b>54</b>
Carlos M. Baratti, Mariano M Boccia, Mariano G. Blake, María C. Krawczyk	
<b>ENVEJECIMIENTO: UN DESAFÍO .....</b>	<b>68</b>
Susana E. Sommer	
<b>LOS FARMACOS COMO CONTAMINANTES EMERGENTES DE LOS AMBIENTES ACUÁTICOS .....</b>	<b>76</b>
Alfredo Salibián	

## AREAS NO ESPECÍFICAS EN LAS CARRERAS DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA: PARTICIPACIÓN EN EL SANEAMIENTO PUBLICO

Miguel D’Aquino

Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA

### CONTENIDOS

.....	
Resumen: .....	2
Summary: .....	2
Introducción:.....	3
Desarrollo.....	3
Campos diversos: .....	4
Regulaciones y características de los diferentes campos: .....	4
Desinfectantes: .....	5
Aguas recreacionales: .....	6
Desinfestantes: .....	6
Registros:.....	7
Cosméticos y Materiales biomédicos:.....	8
Conclusiones: .....	9
Referencias bibliográficas: .....	9

### RESUMEN:

Se plantea la labor que ejercen los Farmacéuticos y/o Bioquímicos, sobre diferentes elementos y áreas no específicas de sus campos profesionales. Tales aspectos se encuadran sobre productos como: alimentos, cosméticos, productos domésticos, materiales biomédicos, aguas recreacionales, ambiente en general. El enfoque se realiza no solo desde el punto de vista del control químico biológico, sino también en cuanto a los tratamientos (esterilización, desinfección, desinfestación) ó como sus elaboraciones.

Importa que este problema atenta en general en la salud humana con frecuencia en forma indirecta, pudiéndolo hacer otras veces en forma directa.

Dado que la sanidad actúa sobre factores que inciden negativamente en el individuo, de nada serviría proclamar el papel de estos profesionales en el campo de la salud si no se tienen en cuenta todos los aspectos de riesgo que se focalizan en esta temática.

**Palabras claves: Productos domisanitarios – desinfectantes – piscinas-materiales biomédicos**

### SUMMARY:

## NON SPECIFIC AREAS IN THE PHARMACY AND BIOCHEMISTRY PROFESSION: PARTICIPATION IN THE PUBLIC SANITARY

We have been focusing in the performance on objectives such as chemical and biological control and also in others non traditional treatments e.g.:foods, cosmetics, household sanitary products, biomedical materials, recreational waters, and what involves the general environmental.

We argue that the labor that pharmacy and biochemistry profession do on works out of their specific fields, can not be proclaimed as absolutely safe.

This view is focalized not only from the point of view of chemical and biological control, but also on the possible risks that implies the use of modern treatments and methods e.g.: disinfection, disinfestation, sterilization or production.

It is important that this problem on human health, be caused even indirectly. Since sanitary activities may work negatively on the people health, we can not proclaim ourselves as workers on sanitary activities without having in count all aspects of risks that are focalized in this subject.

**Key words: Domisanitary products – disinfectants – piscines-biomedical materials**

## INTRODUCCIÓN:

Por áreas no específicas se entiende aquellas, así como elementos que por lo general no incursionan los farmacéuticos o bioquímicos y que sin embargo poseen una gran importancia para el saneamiento humano principalmente en forma indirecta, pudiendo también serlo en forma directa. Por otra parte el control de todo ese campo se halla regido por ANMAT (específicamente por INAL Y TECNOLOGÍA MÉDICA)

Mucho se ha proclamado sobre la participación de estos profesionales en el área de la salud, pero en que aspecto nos referimos? En el caso del farmacéutico: como el preparador, (oficial, hospitalario o industrial) del medicamento, así como la dispensación del mismo, y también como informador sanitario, acciones que fueron ampliadas con numerosos hechos valiosos, como ser, atención farmacéutica, controles de calidad, estudios farmacológicos, etc. En el caso del bioquímico: en estudios clínicos, epidemiológicos y biológicos en general. Pero todos estos aspectos, tienen como punto de vista central al medicamento y al individuo.

Si se tiene en cuenta que la salud no enfoca solo al individuo en forma directa, sino también en forma indirecta a través de los diversos elementos que atentan sobre ella, tales como el mismo medicamento, alimentos o compuestos que se hallan en contacto con el cuerpo humano incluyendo el ambiente, **vana sería nuestra proclama si no tenemos en cuenta a los mismos.**

## DESARROLLO

Recordemos que la sanidad, acciona sobre las causas o factores que inciden negativamente sobre el individuo. No obstante, muy poco o nada se habla de ello, siempre el enfoque se dirige específicamente al fármaco o a estudios clínicos.

Por su formación sanitaria, los campos de la actividad de estos profesionales fueron ampliados más allá de su actividad específica, habiéndose creado otras especialidades donde estos profesionales pueden participar y muchos de ellos lo hacen exitosamente.

Hoy día, y sobre todo en nuestro país, existen en estas carreras, especialidades no atinentes solamente a los fármacos en sí, ó análisis clínicos, sino relacionadas más que nada a la **prevención**, de manera que de esta forma, se ha ampliado enormemente la función social de estos graduados.

¿Quiénes tienen los conocimientos que permitan determinar el estado de saneamiento de los diversos elementos utilizados en los servicios asistenciales? o por la

población?

¿Quiénes son los profesionales que se hallan capacitados para vigilar las diferentes áreas de trabajo, sobre todo hospitalarias e industriales de fármacos y alimentos?

¿Quiénes son los profesionales que poseen los conocimientos necesarios para destruir el nexo entre una fuente de infección y las personas?

¿Quiénes son los profesionales que pueden conocer y vigilar la efectividad de compuestos hogareños utilizados masivamente por la población como preventivos de infección?

Es indudable que surge la figura de nuestro profesional, pero de todo este aspecto se habla muy poco o nada.

**CAMPOS DIVERSOS:**

Se tendrá en cuenta que entre los problemas farmacéuticos considerados por la OMS, a través de sus informes técnicos, además de las tareas específicas relacionadas a los medicamentos, dicho profesional posee una participación activa en los problemas ocasionados por el medio ambiente, sean tóxicos, contaminaciones biológicas, químicas, etc. la misma se concentra principalmente en los controles de efectividad, determinaciones de principios activos, de contaminaciones y de sanidad en general. Por otra parte, puede obrar en la confección de productos destinados a ese fin.

Una función propia de este profesional dentro de las actividades que están contempladas con la salud, es la relacionada al control de elementos masivos utilizados por la población, principalmente en su hogar o instituciones y es lo referente al uso empírico de compuestos para prevenir infecciones, a través de agentes limpiadores, desinfectantes, desodorizantes, higienización, etc. que se emplean para el ambiente, incluyéndose además diversas superficies, utensilios, aguas de consumo sean de bebida ó recreacional, donde, nuestros profesionales actúan en la determinación real de la efectividad de la función de estas sustancias, sea química, antimicrobiana y toxica, previamente a la autorización para su venta a través de las regulaciones oficiales de las autoridades sanitarias sobre estos productos, llamados en general: “ **domisanitarios**”.

**REGULACIONES Y CARACTERÍSTICAS DE LOS DIFERENTES CAMPOS:**

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT 7592/98 y sus disposiciones), regula los diferentes usos de los compuestos que estamos tratando así como sus registraciones según el riesgo que representan (cuadro 1)

Cuadro 1

ANMAT REGULACIONES

INAME	INAL	TECNOLOGIA MÉDICA
Medicamentos Cosméticos	Domisanitarios Res.7292/98  Alimentos  Productos ambientales	Materiales y dispositivos biomédicos

**DESINFECTANTES:**

Un grupo importante de compuestos que permiten incursionar en su análisis son los desinfectantes que se hallan en estos productos y que se usan sobre todo para las diferentes áreas no críticas.

Pueden apreciarse las diversas áreas para estos compuestos según disposiciones de la Dirección de Vigilancia de los Productos de la Salud perteneciente al ANMAT, que pueden ser aplicados y controlados. Hoy día, también se incluyen en esta Dirección, los productos Cosméticos y de Higiene General. (cuadro 2)

Cuadro 2

DESINFECTANTES		
AMBIENTE GENERAL	AGUAS DE CONSUMO HUMANO	INDUSTRIA ALIMENTARIA
compuestos activos: a) en dilución de uso b) para diluir No tóxicos, autorizados por FDA, EPA y CE  Para áreas no críticas de hospitales  Ausencia de Aldehidos	para ingesta: ozono, cloro, hipoclorito, cloro estabilizado para piscinas: cloro, hipocloritos, cloro estabilizado, persulfatos, cuaternarios, polímeros, peróxidos	cloro, de 50 a 200 ppm dióxido de cloro de 100 a 200 ppm yodo, de 125 a 250 ppm cuaternarios, máximo 200 ppm peróxidos de 100 a 2.500 ppm

También se deja asentado los tipos de organismos que por Disposición de INAL, deben utilizarse para evaluar a los diferentes antimicrobianos especificados en los productos que se encuadran dentro de los llamados: domisanitarios. (cuadro3).

Nuestros graduados, participan en el control de la seguridad de todos estos elementos a través de la enseñanza que se dictan en diversas asignaturas que se desarrollan en la Facultad.

Cuadro 3

EVALUACIÓN DE DESINFECTANTES EN DOMISANITARIOS	
USOS	MICROORGANISMOS
General y desodorizantes	S. aureus – S. cholerasuis
Ind. alimentaria y lactarios	S.aureus – S.cholerasuis- E. coli
Hospitalario	S.aureus-S.cholerasuis-P.aeruginosa
Aguas de consumo	S.faecium-E. coli
Piscinas	S.faecium-E. coli

**AGUAS RECREACIONALES:**

Otro aspecto participativo interesante lo ofrece el estudio de aguas recreacionales, como ser las piscinas. Estas aguas, juegan un rol importante no solamente por el bienestar general sino sanitariamente, por las patologías que pueden transmitir, las que habrá que vigilar muy bien en los diversos parámetros solicitados, desde la limpieza fisicoquímica, tipos y dosis de sustancias que se utilizan como biocida, choque de cloro y cloro residual.

No se descuida en estos casos, los análisis de Estabilidad que se realizan según lo dispuesto por Normas CIPEC M 47: sometiendo los productos a 54+/-2°C C durante 14 días y observar los cambios que pueden producirse en sus funciones. (cuadro 4)

Cuadro 4

<b>AGUAS RECREACIONALES (Piscinas-tanques-SPAS)</b>
<p>ESTUDIOS A CONTROLAR CON LOS PRODUCTOS</p> <p>poder alguicida                      poder bactericida                      poder funguicida                      poder clarificante                      alcalimetría                      acidimetría                      principio activo                      Estabilidad de los mismos</p>

**DESINFESTANTES:**

Este estudio refleja otro enfoque importante a tener en cuenta; ya que los “**desinfestantes**”, son sustancias que combaten la presencia de plagas, tanto a insectos como roedores en diferentes ámbitos, sean industriales, asistenciales, institucionales o domésticos, y que constituyen un serio problema por el papel de vectores de agentes infecciosos que cumplen, transmitiendo por diferentes mecanismos, microorganismos capaces de ocasionar infecciones y parasitosis, así como intoxicaciones alimentarias. No nos detendremos sobre esta importante área, que se puede profundizar en diferentes textos, pero especificaremos que el rasgo más importante solicitado para la registración de los diversos compuestos para combatir a estos elementos, se hallan en el cuadro 5 , hallándose prohibido el empleo de sustancias clasificadas como grupo I de IARC/WHO (carcinógenos para el ser humano), permitiéndose en general las sustancias incluídas en las clases II (moderadamente peligrosas) y III (poco peligrosas) de la OMS. por lo que es necesario su vigilancia, recordando además, que las moderadas deben llevar una banda de color amarilla, mientras que las que representan poco peligro, una banda de color azul (cuadro 5)

Cuadro 5

<b>DESINFESTANTES</b>
<p>CONDICIONES</p> <p>DL50 en ratas via oral / líquidos &gt;2000 mg/kg</p> <p>DL50 en ratas via oral /sólidos &gt;500 mg/kg</p>

**REGISTRACIONES:**

En síntesis, a los efectos del registro de todos estos compuestos ante la Autoridad Sanitaria, los productos deben ser evaluados en función del riesgo, tipo de formulación, modo de empleo, vías de exposición y ámbito de aplicación.

A tal efecto, los requisitos que deben cumplimentar a fin de garantizar su calidad y seguridad, los mismos se han clasificado de acuerdo a los riesgos que podrían ocasionar.

En los cuadros 6 y 7, se señalan dichas características:

Cuadro 6

<b>TIPOS DE RIESGO</b>	
RIESGO I	<p><b>GRUPO A:</b> Muy escasa probabilidad (sahumerios, Velas aromáticas, jabones en panes)</p> <p><b>GRUPO B:</b> Probabilidad de riesgo (aerosoles aromatizantes, acondicionadores y lavado de ropa, alfombras, insecticidas, desincrustantes)</p>
RIESGO II	<p><b>GRUPO A:</b> De menor riesgo; uso directo sin dilución. Insecticidas, repelentes</p> <p><b>GRUPO B:</b> De mayor riesgo: uso con dilución previa. Cáusticos con pH &lt;2 ó &gt;13. Productos con bacterias, insecticidas, desinfectantes de aguas de bebida, piscinas, filtros, clarificantes</p>

Cuadro 7

<b>REGISTRACIONES</b>	
RIESGO I	<p><b>GRUPO A:</b> No requieren de Dirección Técnica</p> <p><b>GRUPO B:</b> Requieren de Dirección Técnica</p>
RIESGO II	<p><b>GRUPO A y GRUPO B:</b> Requieren de Dirección Técnica</p>

Los productos del grupo A son de muy escaso riesgo y no requieren de Dirección Técnica, tales como: aromatizantes de ambientes, jabones, pastas de limpieza, trampas adhesivas para insectos.

Los productos del grupo B, poseen mayor probabilidad de riesgo y su confección requieren de Dirección Técnica, tales como: aromáticos en aerosol, aceites esenciales concentrados, productos para lavado y acondicionador de ropa, aprestos en aerosol, desincrustantes, limpia pisos-sanitarios, alfombras, autos, etc.

Los riesgos de tipo II, presentan un aumento de la toxicidad y pueden producir intoxicación fatal.

El grupo A de este tipo es de menor riesgo y es debido a menor toxicidad y/o menor concentración del activo presente, además presentan envases más seguros; por lo general se preparan listos para usar, sin dilución previa, entre ellos se encuentran ciertos insecticidas líquidos ó en aerosol y desodorizantes de ambiente.

El riesgo del grupo B incrementa y es debido a mayor y/o mayor concentración de activos y son de uso profesional, con diluciones previas al uso, entre ellos, productos cáusticos y corrosivos, como los señalados en el cuadro, también se encuentren las formulaciones de bacterias para ser utilizadas en pozos ciegos a fin de biodegradar residuos, también determinados desinfectantes, secuestrantes de aguas de procesos industriales, y productos para piscinas.

Los registros de productos son regulados por el Decreto 17057/97 y Resolución GMC 25/96.

### **COSMÉTICOS Y MATERIALES BIOMÉDICOS:**

Nos referiremos brevemente a estas áreas, dado que la Facultad de Farmacia y Bioquímica dispone de especialidades que tratan las mismas en la especialidad de "Producción de Cosméticos" y de "Esterilización" respectivamente. No obstante, es interesante señalar que las mismas brindan oportunidades profesionales que a excepción de la primera, no son incursionadas frecuentemente por nuestros graduados.

Aún cuando los cosméticos forman parte de la currícula del farmacéutico, el avance que experimentó esta ciencia, ha obligado a capacitar a este profesional y también a los bioquímicos, en los adelantos tecnológicos y científicos experimentados, con un racional enfoque en el diseño de estos productos y permitiendo una incursión de estos profesionales que buscan el mejoramiento de sus conocimientos. Esta especialidad, se comparte con otros profesionales que no son del área farmacéutica, no solo desde el punto de vista productivo sino también analítico, efectuándose una adecuada inserción en la sociedad.

Los cosméticos son preparados destinados a ser colocados en contacto con diferentes partes del cuerpo, por lo que a nivel internacional son elementos que se hallan relacionados a la salud, si bien no específicamente en afecciones dérmicas, sí, principalmente en las características estéticas y/o preventivas; es decir que se los puede considerar en un contexto sanitario. Por lo tanto habrá que garantizar la eficacia y seguridad de los mismos.

En cuanto a los Materiales Biomédicos, su contenido se realiza en la especialidad de "Esterilización", se tendrá en cuenta que en esta temática convergen dos líneas de trabajo, y que son de ingeniería y biología. Son materiales diseñados para evaluar, tratar, reemplazar y actuar con sistemas biológicos. Farmacológicamente son inertes pero requieren de controles que garanticen su inocuidad, ofreciendo por lo tanto otro campo

interesante de acción profesional.

Todas estas diferentes actividades que no se relacionan con el medicamento, se diligencian, hacia la promoción de la salud ya que se centran en mejorar el bienestar de las personas en general, principalmente en forma preventiva, por lo que se encuadrarían dentro de la expansión de los roles del farmacéutico y del bioquímico.

El caudal de conocimientos que poseen, les permite dar información apropiada y participar en situaciones de emergencia durante períodos críticos, a fin de lograr una rápida y eficaz organización sanitaria.

## **CONCLUSIONES:**

De todo lo dicho podemos concluir diciendo que nuestra participación en toda esta temática que incide indirectamente sobre la Salud, nos brinda una orientación que amplía el papel de nuestra ciencia en la cultura nacional, para cualquier área que abarca la misma, emitiendo las recomendaciones que procedan. También se contribuye a la difusión de los procedimientos y avances científicos en la sociedad local o que van más allá de las fronteras nacionales, promoviendo la introducción de estos conocimientos en la educación general y popular.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

- ANMAT. Disposición 7292/98
- Resol. Mercosur 28/2002. Acción antimicrobiana para productos domisanitarios
- Clasificación toxicológica según OMS: [www.carremaque.com.ar/clasetoxi.htm](http://www.carremaque.com.ar/clasetoxi.htm)
- Registro de productos domisanitarios, Resol. GMC 25/96 Decreto 17057/97  
[www.infojus.gov.ar](http://www.infojus.gov.ar)
- Registro de productos de riesgo ANMAT Disposición N° 1112/13
- Prohibición de sustancias IARC/OMS o sustancias prohibidas por la directiva CEE 67/548 y sus actualizaciones
- Establecimientos de registros en ANMAT <[www.mercosur.int](http://www.mercosur.int) GMC Resol. N° 122/94>
- ANMAT Disposición 2320/2002 <[www.anmat.gov.ar/web\\_anmat/comunicados](http://www.anmat.gov.ar/web_anmat/comunicados)>
- ANMAT. Inscripción de  
domisanitarios: <[www.anmat.gov.ar/formularios/domisanitarios](http://www.anmat.gov.ar/formularios/domisanitarios)>
- Control de plagas y generación de residuos peligrosos.  
[CAESAR.org.ar/editoriales/06.htm](http://CAESAR.org.ar/editoriales/06.htm)
- Materiales biomédicos.: <[nanoudla.blogspot.com/2009](http://nanoudla.blogspot.com/2009)>

## FÓRMULAS INFANTILES: UNA REVISIÓN DE SU COMPOSICIÓN NUTRICIONAL Y DE LOS DISTINTOS TIPOS PRESENTES EN EL MERCADO

Patricia Ana Ronayne de Ferrer(1)\*,Carola Beatriz Greco(1)

(1) Cátedra de Bromatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956, 2° piso, CABA, CP (1113).

(\*) Autor a quien dirigir la correspondencia: Prof. Dra. Patricia Ana Ronayne de Ferrer. Cátedra de Bromatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956, 2° piso, CABA, CP (1113). TELEFAX: 54 11 49648243. Mail: pferrer@ffybu.uba.ar.

CONTENIDOS.....	
Resumen .....	10
Summary .....	11
Introducción.....	11
Tipos De Fórmulas.....	12
Aspectos Nutricionales.....	12
Fracción Nitrogenada.....	12
Proteínas .....	12
Nitrógeno No Proteico .....	13
Carbohidratos .....	13
Grasas.....	14
Minerales .....	15
Vitaminas .....	16
Fórmulas Presentes En El Mercado.....	17
Agradecimientos .....	18
Referencias Bibliográficas .....	18

### RESUMEN

La lactancia natural es la forma óptima de alimentación del recién nacido. La Organización Mundial de la Salud recomienda la lactancia exclusiva durante los primeros 6 meses de vida. Cuando es necesario recurrir a sucedáneos como las fórmulas infantiles, éstas deben ser diseñadas para cubrir los requerimientos del lactante. En el mercado existe una gran diversidad de fórmulas; las elaboradas a base de leche de vaca constituyen el grupo mayoritario. Durante los primeros 6 meses se utilizan las de “inicio”, y luego las de “seguimiento” y “continuación”. También existen fórmulas de inicio para prematuros con características particulares. La mayoría de las fórmulas de inicio tienen una relación caseína/proteínas del suero 40:60, mientras que en las de seguimiento y continuación es 80:20. Se destaca el agregado de taurina, carnitina y nucleótidos. La lactosa es el carbohidrato predominante y en algunos casos se la combina con maltodextrina. Además, en algunas fórmulas se incorporan galactooligosacáridos, fructooligosacáridos y/o inulina como ingredientes prebióticos y, en algunos casos, bacterias probióticas. Las fórmulas de inicio deben aportar entre 40 y 55% de calorías grasas y las restantes entre 35 y 55%. La relación ácido linoleico/ácido  $\alpha$ -linolénico debe encontrarse entre 5:1 y 15:1 y el ácido linoleico entre 300 y 1200 mg/100 kcal. También se adicionan ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y  $\beta$ -palmitato. Los minerales magnesio, hierro, cobre y zinc se agregan a las fórmulas en concentraciones que aseguren un aporte adecuado a las necesidades del lactante, al igual que las vitaminas. En especial, debe existir un equilibrio entre los niveles

de vitamina E y de ácidos grasos poliinsaturados.

Otras fórmulas especiales destinadas a usos particulares son: a base de proteína de soja, sin lactosa, hipoalergénicas, anti-reflujo o anti-regurgitación, anti-estreñimiento, anti-cólico y formulaciones especialmente diseñadas para individuos con errores congénitos de metabolismo de los aminoácidos.

**Palabras clave: fórmulas infantiles - composición nutricional - tipo de fórmulas**

## **SUMMARY**

### **INFANT FORMULAS: A REVIEW ON NUTRITIONAL COMPOSITION AND DIFFERENT TYPES PRESENT IN THE MARKET**

Breastfeeding is the optimal way of feeding infants. The World Health Organization recommends exclusive breastfeeding during the first 6 months of life. When milk substitutes are needed, they have to be designed in order to meet all infant requirements. There is a great diversity of infant formulas in the market; those based on cow milk are the most abundant.

During the first 6 months “starting” formulas are used and then “follow-up” formulas. There are also starting formulas for preterm infants, with particular characteristics. Most starting formulas have a casein/whey protein ratio of 40:60, while the follow-up formulas have a ratio of 80:20. The addition of taurine, carnitine and nucleotides should be noted. Lactose is the main carbohydrate; sometimes it is combined with maltodextrin. Besides, in some formulas prebiotic ingredients such as galacto-oligosaccharides, fructo-oligosaccharides and/or inulin are added, and in some cases, probiotic bacteria. Starting formulas should provide between 40 and 55% of energy as fat calories, and the remaining formulas, between 35 and 55%. Linoleic acid/ $\alpha$ -linolenic acid ratio should be between 5:1 and 15:1 and linoleic acid levels between 300 and 1200 mg/100 kcal. Long chain polyunsaturated fatty acids and  $\beta$ -palmitate are added as well. The minerals magnesium, iron, copper and zinc, and the vitamins are added in enough quantities to assure that infant requirements are met. It is important to attain a balance between the levels of vitamin E and long chain polyunsaturated fatty acids.

Other special formulas aimed at particular purposes are: those based on soy protein, those without lactose, hypoallergenic, anti-reflux or anti-regurgitation, anti-constipation, anti-colic and formulations especially designed for individuals with congenital errors of amino acids metabolism.

**Key words: infant formulas - nutritional composition - formula type**

## **INTRODUCCIÓN**

La lactancia natural es la forma óptima de alimentación del recién nacido y ha sido la principal, casi única, forma de alimentar al neonato desde los inicios de la historia de la humanidad. La leche materna constituye una fuente económica e importante de nutrientes esenciales en la etapa neonatal; la Organización Mundial de la Salud recomienda la lactancia exclusiva durante los primeros 6 meses de vida (1).

En ciertas circunstancias es necesario recurrir a sucedáneos como las fórmulas infantiles. Teniendo en cuenta que en los primeros meses de vida el lactante depende para su alimentación de un único alimento que debe necesariamente cubrir todos sus requerimientos, cuando la leche materna es reemplazada o suplementada con un sucedáneo, éste debe ser un alimento cuidadosamente diseñado para tal propósito.

Las formas alternativas de alimentación infantil casi no existieron hasta fines del siglo XIX, cuando aparecieron alimentos preparados a base de leche de vaca combinada con cereales o azúcar. La historia de las actuales fórmulas infantiles comenzó en 1915 con el desarrollo de una fórmula artificial con una composición similar a la de la leche humana (2).

A medida que se avanzó en el conocimiento sobre la composición de la leche humana, se trató de elaborar productos que se le asemejaran cada vez más, lo que llevó a formulaciones con modificaciones en la relación caseína/proteínas del suero (CAS/PS) de 80:20 a 40:60, cambios en las grasas utilizadas y adición de sustancias ausentes o presentes en muy baja cantidad en leche de vaca, tales como taurina, carnitina, nucleótidos y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, y en los últimos años, componentes prebióticos y probióticos.

## **TIPOS DE FÓRMULAS**

En el mercado existe una gran diversidad de fórmulas para lactantes. Aquellas en las que la base es leche de vaca se elaboran con sólidos no grasos de leche y una mezcla de diversas grasas (generalmente aceites vegetales), hidratos de carbono, vitaminas, minerales, y otros componentes. Según la fase de la lactancia, durante los primeros 6 meses se utilizan las de "inicio", mientras que a partir de esa edad se utilizan las de "seguimiento" y "continuación". Por otra parte, existen fórmulas de "inicio" para prematuros, las que habitualmente presentan un mayor contenido de proteínas y de minerales (excepto hierro) y también una mayor densidad energética, con agregado de parte de las grasas en forma de triglicéridos de cadena media (3).

Es importante destacar que el Código Alimentario Argentino (Art. 1351) establece, en concordancia con el Código Internacional de Comercialización de Sucédáneos de Leche Materna, que en las etiquetas de estos alimentos: "No deben utilizarse términos como "humanizado", "maternalizado" o términos análogos".

Además, existen otras fórmulas especiales destinadas a usos particulares, que se discutirán más adelante.

## **ASPECTOS NUTRICIONALES**

El diseño de las fórmulas infantiles se realiza tomando como modelo la composición de la leche humana. En primer término, se describirán en detalle las características de las fórmulas para niños sanos que predominan en el mercado, que son las elaboradas a base de leche de vaca.

## **FRACCIÓN NITROGENADA**

### **Proteínas**

La mayoría de las fórmulas de inicio son "adaptadas", es decir, con una relación caseína/proteínas del suero (CAS/PS) 40:60, mientras que luego se utilizan las de seguimiento y continuación, con una relación CAS/PS 80:20. Las fórmulas para prematuros

deben tener una relación CAS/PS 40:60, a fin de disminuir el riesgo de lactoabezoar. El lactoabezoar es un coágulo de leche sin digerir que puede causar una obstrucción gastrointestinal (4).

Recientemente se ha propuesto el uso de la alfa-lactalbúmina bovina en la elaboración de fórmulas para lactantes, en un intento de lograr una mayor semejanza con el perfil de aminoácidos de la leche humana. Ello se debe particularmente a su aporte de triptofano, dado que las fórmulas a base de leche bovina presentan a este aminoácido como limitante (5, 6).

Otra opción adoptada por la industria se basa en el fraccionamiento de las proteínas del suero que logra un aumento de la proporción de alfa-lactalbúmina por la eliminación del Glicomacropéptido (GMP) proveniente de la kappa-caseína. El GMP es rico en treonina y los lactantes alimentados con fórmulas con predominio de suero lácteo presentan concentraciones de treonina plasmática más elevadas que los bebés amamantados (6). En lactantes prematuros alimentados con una fórmula libre de GMP se observó una disminución en los niveles plasmáticos de este aminoácido (7).

### **Nitrógeno no proteico**

En esta fracción, se destacan la taurina, la carnitina y los nucleótidos (8). La deficiencia temprana de taurina, presente en el sistema nervioso central, puede afectar la función retinal. La carnitina es esencial para el transporte de ácidos grasos de cadena larga a las mitocondrias para su beta-oxidación. Los nucleótidos actúan como inmunomoduladores, mejorarían la maduración y proliferación gastrointestinal y promoverían el crecimiento de las Bifidobacterias (9, 10). Su adición no entraña riesgos pero aún algunos resultados de diversos estudios resultan controvertidos (11).

### **CARBOHIDRATOS**

La lactosa es el carbohidrato único o predominante en la mayoría de las fórmulas para lactantes; en algunos casos se la combina con maltodextrina. Además de lactosa, la leche materna contiene cantidades apreciables de oligosacáridos, a los que se atribuye un efecto prebiótico (12). Los prebióticos son componentes no digeribles que promueven selectivamente el crecimiento y la actividad de un número limitado de especies bacterianas beneficiosas para la salud. En algunas fórmulas se incorporan galactooligosacáridos (GOS), fructooligosacáridos (FOS) y/o inulina con el objetivo de estimular el desarrollo de una microbiota intestinal similar a la del bebé amamantado (13, 14).

Recientemente, distintos grupos de investigadores han sido capaces de detectar, aislar, caracterizar y seleccionar bacterias probióticas procedentes de la leche materna, considerada hasta el momento una fuente estéril por la comunidad científica (15-17). A raíz de estos descubrimientos, se han desarrollado algunas fórmulas que contienen probióticos, microorganismos vivos cuya ingestión favorecería el predominio de una microbiota semejante a la de los lactantes amamantados. Entre los probióticos añadidos a fórmulas infantiles, ya sea aislados o combinados, pueden mencionarse *Bifidobacteriumlactis*, *Streptococcusthermophilus*, *Lactobacillushelveticus*, *Bifidobacteriumlongum*, *Lactobacillusrhamnosus* (18). Asimismo, se ha desarrollado en España una línea de ProbióticosHereditum®, constituida por una serie de cepas protegidas por diversas

patentes, que han sido aisladas originalmente a partir de leche materna.

Existen también productos que contienen probióticos y prebióticos simultáneamente a los que se denomina simbióticos.

Una revisión recientemente realizada por la ESPGHAN (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) indica que la administración de fórmulas suplementadas con probióticos y/o prebióticos no implica riesgos relativos al crecimiento normal de los niños ni efectos adversos. Sin embargo, se considera que la información es insuficiente como para recomendar el uso rutinario de tales fórmulas y que se necesita un mayor número de estudios para ello (18). También la Academia Americana de Pediatría se había pronunciado de similar manera (19).

## GRASAS

Durante el primer año de vida, la ingesta de grasas es fundamental no sólo para cubrir las necesidades de energía, sino también como fuente de ácidos grasos esenciales y como vehículo de las vitaminas liposolubles, cuya absorción favorecen. En este sentido, la leche materna aporta una proporción de calorías grasas entre 40 y 60% del total (20), en tanto que, según las cifras recomendadas por la ESPGHAN, las fórmulas de inicio deben aportar entre 40 y 55%, mientras que las de seguimiento y las elaboradas con soja entre 35 y 55% (21, 22).

En cuanto a las fuentes de lípidos utilizadas, se suele sustituir la grasa láctea o mezclarla con aceites vegetales y/o triglicéridos de cadena media, para asemejar el perfil de ácidos grasos de la leche de vaca al de la leche humana, en la cual predominan los ácidos grasos insaturados (23, 24).

Las series  $\omega$  6 y  $\omega$  3, esenciales para el ser humano, deben encontrarse equilibradas, pues compiten por las mismas enzimas y el exceso de una serie podría provocar déficits relativos de la otra. En la leche humana la relación ácido linoleico/ácido  $\alpha$ -linolénico es de alrededor de 10 y se recomienda que en las fórmulas se encuentre entre 5:1 y 15:1. Asimismo, la ESPGHAN recomienda un contenido de ácido linoleico en las fórmulas entre 300 y 1200 mg/100 kcal (21) y entre 350 y 1400 mg/100 kcal para los prematuros (25).

Por otra parte, debe recordarse que las grasas también constituyen una parte estructural de ciertos tejidos. En particular, los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPCL), el ácido araquidónico (AA; 20:4 $\omega$  6) y el ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6,  $\omega$  3), son importantes para el desarrollo neurológico y de funciones visuales. Ambos AGPCL son componentes importantes de los fosfolípidos de membrana y predominan a nivel del sistema nervioso central y de la retina. Su acumulación se produce principalmente en la etapa de mayor crecimiento cerebral, entre el tercer trimestre del embarazo y los dos años de vida (9). Además, participan en la modulación de la respuesta inmunológica del lactante. Al respecto, existen evidencias de que su agregado en las fórmulas para prematuros induce poblaciones linfocitarias CD4/CD8 similares a las de los lactantes alimentados con leche materna (8). Los niños recién nacidos así como, en especial, los neonatos prematuros presentarían un riesgo elevado de padecer un déficit de AGPCL, pues si bien son capaces de sintetizar AA y DHA a partir de sus precursores, el grado de conversión sería insuficiente para proveer las cantidades requeridas para sus funciones específicas; por lo tanto es fundamental en esta etapa que los incorporen a través de la dieta (9, 26-28). Varios organismos internacionales recomiendan el agregado de AGPCL a las fórmulas infantiles, entre ellos el Comité de Expertos de FAO/OMS (29) y la ESPGHAN(21).

Algunos autores recomiendan en las fórmulas para neonatos de término, niveles de DHA entre 0,20 y 0,50% de la grasa total y que el AA sea también adicionado en una cantidad mínima equivalente para evitar un desequilibrio entre las series  $\omega$  3 y  $\omega$  6, siendo por lo tanto la relación entre ambos ácidos grasos de al menos 1:1 (30, 31).

Con respecto a la alimentación de los neonatos prematuros, el Comité de Nutrición de la ESPGHAN (25) recomienda hasta 0,50% de DHA y 0,70% de AA de la grasa total y una relación AA:DHA 1-2:1. Es importante también considerar el contenido en las fórmulas del ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5,  $\omega$  3), cuyos niveles elevados podrían inducir descenso de AA y una disminución en la velocidad de crecimiento (32). Por ende, el aporte de EPA debe ser como máximo 30% del DHA (25).

Otro aspecto a considerar se refiere a la posibilidad de que la adición de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga a las fórmulas infantiles, llevara a un incremento en el daño oxidativo. Dado que una disponibilidad suficiente de vitamina E es fundamental para una respuesta adecuada frente al stress oxidativo, existen recomendaciones referidas a los niveles a agregar, los cuales se detallan en el apartado de Vitaminas.

Un punto en discusión es la forma óptima de adición de los AGPCL. Existen diversas fuentes a partir de las cuales pueden incorporarse los AGPCL: lípidos de yema de huevo, aceites de pescado de contenido variable de EPA y aceites obtenidos a partir de microalgas y hongos (23). Los ácidos provenientes de lípidos de yema de huevo se encuentran formando parte de fosfolípidos, mientras que en los aceites forman parte de triglicéridos (33).

Al evaluar la influencia de las fuentes utilizadas en la biodisponibilidad de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, un estudio demostró que la adición a partir de fosfolípidos o triglicéridos no tendría ninguna influencia sobre sus concentraciones plasmáticas (8). En cuanto a los aceites de pescado, es indispensable considerar el aporte de EPA: actualmente existen aceites de pescado de bajo contenido de EPA.

Por último, es importante considerar la importancia nutricional que puede tener la posición relativa de los ácidos grasos en los triglicéridos. En la leche materna, el ácido palmítico constituye alrededor de un 25% de los ácidos grasos totales y aproximadamente el 60% está esterificado principalmente en la posición 2 (o posición beta) de la molécula del triglicérido. Durante la digestión de las grasas, los ácidos grasos en posiciones 1 y 3 de los triglicéridos quedan libres a nivel del lumen intestinal. Esto resulta desfavorable debido a la tendencia de los ácidos grasos libres a coprecipitar con el calcio presente en el tracto digestivo, formando jabones de calcio insolubles, los cuales no pueden ser absorbidos por el lactante. Por el contrario, cuando el ácido palmítico se encuentra en posición  $\beta$ , es absorbido rápidamente en forma de  $\beta$ -monoglicérido, sin formar los mencionados jabones cálcicos insolubles. La presencia de  $\beta$ -palmitato en las fórmulas puede lograrse o bien a través de la incorporación de manteca de cerdo como ingrediente o bien por el agregado de lípidos estructurados con ácido palmítico (16:0) en posición 2. Ello mejora la absorción total y digestibilidad de las grasas y la absorción y biodisponibilidad del calcio y del magnesio. Asimismo, favorece la formación de heces más blandas, efecto beneficioso para el tratamiento del estreñimiento en los lactantes (8,34).

## MINERALES

El aporte total de minerales en la leche humana es bajo, lo cual favorece el funcionamiento renal del lactante. En las fórmulas infantiles, a fin de evitar el riesgo de una

carga renal excesiva, se disminuyen las concentraciones de electrolitos (sodio, potasio, cloruro y fósforo) que junto con la urea proveniente de las proteínas constituyen más del 90% de la carga renal total de solutos.

En cuanto a la relación calcio/fósforo lo ideal es que la misma se asemeje a la presente en la leche humana, que es de 2 a 1 (35-37). Técnicamente resulta difícil modificarla en fórmulas a base de leche de vaca, porque viene dada por su proporción en la caseína; por otra parte, el agregado de sales acarrea problemas de solubilidad, aumento de la osmolaridad y de la carga renal de solutos (38). A pesar de ello, las recomendaciones internacionales sugieren que la relación calcio/fósforo esté comprendida entre 1:1 y 2:1 (21).

Un aspecto importante de resaltar es la alta biodisponibilidad de los minerales presentes en la leche humana, en comparación con la leche de vaca o las fórmulas comerciales, en particular de los elementos magnesio, hierro, cobre y zinc. Estos tres últimos minerales se encuentran, en la leche humana, principalmente ligados a las proteínas del suero, al citrato o a la membrana del glóbulo de grasa, a diferencia de la leche bovina, donde la caseína presenta la mayor proporción de los mismos. Estas particularidades podrían incidir en la absorción de estos nutrientes y explicar su mayor disponibilidad en la leche humana (39). Por ello, se agregan a las fórmulas en concentraciones que aseguren un aporte adecuado a las necesidades del lactante.

En fórmulas a base de soja, es importante resaltar que la presencia de fitatos puede disminuir la absorción de minerales como calcio, hierro, fósforo y magnesio, pero principalmente tiene un efecto negativo sobre el zinc. En consecuencia, las recomendaciones establecen que en este tipo de fórmula el contenido de fitatos debe reducirse eficazmente (21).

Otro aspecto a tener en cuenta es la fortificación de las fórmulas con hierro, lo cual ha contribuido a la prevención de la anemia ferropénica. Además, la adición de ácido ascórbico mejora notablemente su absorción. Por otra parte, se ha planteado la importancia de no agregar hierro en exceso (25), pues los oligoelementos que comparten vías comunes de absorción compiten entre sí y el desequilibrio en sus proporciones en las fórmulas podría dificultar su utilización (por ej., hierro/zinc, zinc/cobre, hierro/manganeso). Actualmente, existen ciertas controversias respecto de cuáles son los niveles de hierro adecuados a adicionarse a las fórmulas; por lo cual resultan necesarios más estudios que permitan determinar si cantidades inferiores a las recomendaciones actuales son apropiadas (40).

## VITAMINAS

Ya se ha hecho referencia a la importancia de que exista un equilibrio entre los niveles de vitamina E y de ácidos grasos poliinsaturados.

En las fórmulas para neonatos de término se recomiendan niveles de equivalentes de  $\alpha$ -tocoferol (TE) entre 0,5 y 5 mg/100 kcal, y no menos de 0,5 mg por gramo de ácidos grasos poliinsaturados, con cifras que van aumentando a medida que lo hacen los dobles enlaces (21). Debe tenerse en cuenta, por lo tanto, que las concentraciones mínimas de vitamina E varían de acuerdo a la cantidad y tipo de ácidos grasos poliinsaturados presentes en las fórmulas infantiles.

En las fórmulas para prematuros las recomendaciones indican entre 2 y 10 mg de TE/100 kcal y una relación superior a 1,5 mg de TE/g PUFA (25, 41).

En términos generales, puede decirse que las fórmulas incorporan las vitaminas, tanto hidro como liposolubles, en las cantidades adecuadas como para cubrir los requerimientos de los lactantes.

## FÓRMULAS PRESENTES EN EL MERCADO

Las fórmulas disponibles en el mercado están diseñadas para aportar los nutrientes necesarios, con una tolerancia gastrointestinal adecuada, si bien su costo limita su uso en poblaciones de bajos recursos. En general, estos productos se venden en polvo y, mediante el agregado de agua, permiten reconstituir un producto similar a la leche. Las que se expenden en forma fluida deben ser esterilizadas. Otro aspecto a tener en cuenta es que deben ser preparadas en condiciones higiénicas, a fin de evitar el riesgo de infecciones gastrointestinales.

Se ha mencionado que la mayoría de las fórmulas son las elaboradas en base a leche de vaca, las cuales de acuerdo a la edad a la cual están destinadas se clasifican como de "inicio" (para neonatos de término o de pretérmino), de "seguimiento" y de "continuación". Estas últimas, están destinadas a niños mayores de 1 año. En la elaboración de las mismas, se utiliza en general leche entera con agregado de azúcares, mezcla de aceites vegetales con crema o grasa láctea como fuente de materia grasa, vitaminas y minerales (3).

Cuando los lactantes presentan intolerancia a la leche de vaca o a la lactosa, galactosemia o en situaciones con hábitos especiales de alimentación (como quienes practican una dieta vegana o vegetariana) existen otras alternativas. Una de ellas es la de las fórmulas que utilizan proteína de soja aislada, suplementada con L-metionina, debido a que la soja tiene como limitantes a los aminoácidos azufrados (24). En estas fórmulas se adiciona taurina y carnitina, la lactosa se reemplaza por otros carbohidratos y como fuente de materia grasa se emplean aceites vegetales. Su uso no está recomendado durante los primeros 6 meses en niños con alergia a la leche de vaca. Para utilizarse en estos casos, luego de los 6 meses, debido a su menor costo y a tener una buena aceptación, primero debe determinarse que el niño posee tolerancia a la proteína de soja, dado que se han observado casos de asociación de alergia a la leche de vaca y a la soja (22).

También, hay otras **fórmulas sin lactosa** (con caseinato como fuente proteica) que están destinadas a niños con intolerancia a este azúcar, los cuales deberán ser alimentados con un alimento libre del mismo. Se suele reemplazar a la lactosa por maltodextrinas como único componente, o bien en mezclas con sacarosa o glucosa (42). Las maltodextrinas aumentan mucho menos la presión osmótica que los mono o disacáridos; por lo tanto, inhiben la producción de diarrea asegurando así la retención normal de agua. Además, son bien digeridas, pues la glucoamilasa de la mucosa intestinal mantiene su actividad aun cuando haya daños en la misma y deficiencias de lactasa y sacarasa. En la elaboración de estas fórmulas, también se utilizan aceites vegetales como materia grasa (24).

Las fórmulas designadas como "hipoalérgicas" o HA, son aquellas donde la fuente proteica está constituida por proteínas parcial o extensamente hidrolizadas (de caseína o proteínas del suero) y que están destinadas a individuos alérgicos. Las extensamente hidrolizadas o SHE son las de mayor uso en la alimentación de niños alérgicos a la proteína de leche de vaca (APLV), ya sea mediada por IgE, IgG o inmunidad celular (43). Además, estas fórmulas se elaboran con aceites vegetales y/o agregado de triglicéridos de cadena media y pueden tener agregado de ácidos grasos esenciales (24).

En los últimos años, han aparecido en el mercado otras fórmulas para lactantes destinadas a situaciones particulares, denominadas AR, AE y AC, las cuales se describen a continuación:

**Fórmulas AR (anti-reflujo o anti-regurgitación):** su característica principal consiste en el agregado de un espesante, a fin de aumentar la viscosidad del producto. Los espesantes suelen ser almidones de maíz o de arroz pregelatinizados, o bien goma de semilla de algarrobo. En general, la relación caseína/proteínas del suero es similar a la de la leche de vaca (80:20) pues la precipitación de la caseína en el estómago da una mayor viscosidad a su contenido. En la actualidad, se acepta el uso de estas fórmulas en la alimentación de lactantes con retraso del crecimiento causado por la excesiva pérdida de nutrientes, asociada a las regurgitaciones; sólo deberían usarse bajo supervisión médica junto con otras medidas de tratamiento. Esta es la postura de la ESPGHAN que no recomienda utilizarlas en lactantes sanos con regurgitación que crecen normalmente (24, 42, 44). Otro aspecto relacionado con estas fórmulas, se refiere al efecto que pueden causar los espesantes utilizados como ingredientes sobre la biodisponibilidad mineral y de otros micronutrientes. Al respecto, una revisión de González-Bermúdez y col. (45) muestra que si bien hay algunos autores que sugieren que tal efecto puede ser negativo, otros no encontraron tales resultados; por lo tanto, los estudios realizados al momento actual resultan escasos y debe profundizarse la investigación en este tema.

**Fórmulas AE (anti-estreñimiento):** aportan un alto porcentaje de ácido palmítico en posición beta (beta-palmitato). Esto favorece la absorción de la grasa de la leche y del calcio, minimizando así la formación de jabones cálcicos en el intestino, principales causantes de la dureza de las heces. En algunos casos, también contienen mayor cantidad de magnesio, que tiene un efecto laxante, en parte debido al estímulo de la motilidad intestinal a través de la colecistocinina (34, 42).

**Fórmulas AC (anti-cólico):** contienen proteínas parcialmente hidrolizadas para facilitar su digestión, bajo contenido en lactosa (con adición de maltodextrina) y agregado de oligosacáridos con efecto prebiótico (tipo GOS/FOS), que promueven selectivamente el crecimiento y la actividad de bacterias beneficiosas para el organismo, principalmente *Bifidobacterias*. Su fermentación produce ácidos grasos de cadena corta que estimulan el peristaltismo por efecto osmótico, mejorando también la flora intestinal (34). Además, pueden estar enriquecidas con beta-palmitato y poseer triglicéridos de cadena media (43). En este sentido, las fórmulas AC pueden presentarse como una conjunción de AC/AE. Aquellas que reúnen algunas características comunes a estos tipos de fórmulas pueden aparecer en el mercado como "Comfort".

Por último, otro caso particular es el de formulaciones especialmente diseñadas para individuos con errores congénitos de metabolismo de los aminoácidos. Para estas situaciones, existen fórmulas especiales a base de mezclas de L-aminoácidos en proporciones similares a las de la leche humana, carentes del aminoácido no metabolizable, con el agregado de carbohidratos, vitaminas y minerales. Por ejemplo, para fenilcetonuria, homocistinuria, tirosinemia, hiperlisinemia, etc.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el marco del Proyecto UBACYT 20020100100166.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1) World Health Organization. (2001) The optimal duration of exclusive breastfeeding. Report of an expert consultation, World Health Organization Geneva. Disponible en: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO\\_NHD\\_01.09.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_NHD_01.09.pdf). Consulta: Noviembre 2013.

- 2) Ronayne de Ferrer PA. (1995) Pasado y presente en el diseño de fórmulas infantiles. ArchLatinoamerNutr; 45:265-73.
- 3) Greco C, Ronayne de Ferrer P. (2014) Composición nutricional de fórmulas infantiles. En: Setton D y Fernández A. Nutrición en Pediatría. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; pp. 127-33.
- 4) Heinz-Erian P, Gassner I, Klein-Franke A, Jud V, Trawoeger R, Niederwanger C, Mueller T, Meister B, Scholl-Buergi S. (2012) Gastric lactobezoar - a rare disorder? Orphanet Journal of Rare Diseases; 7:3-8.
- 5) Lien EL. (2003) Infant formulas with increased concentrations of  $\alpha$ -lactalbumin. Am J ClinNutr; 77(suppl):1555S-8S.
- 6) Sandström O, Lönnerdal B, Graverholt G, Hernell O. (2008) Effects of  $\alpha$ -lactalbumin-enriched formula containing different concentrations of glycomacropeptide on infant nutrition. Am J Clin Nutr; 87:921-28.
- 7) Rigo J, Boehm B, Georgi G, Jelinek J, Nyambugabo K, Sawatzki G, Studzinski F. (2001) An Infant Formula free of Glycomacropeptide prevents hyperthreoninemia in formula-fed preterm infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr; 32:127-30.
- 8) Rivero Urgell M, Santamaría Orleans A, Rodríguez-Palmero Seuma M. (2005) La importancia de los ingredientes funcionales en las leches y cereales infantiles. NutrHosp; 20:135-46.
- 9) Carver JD. (2003) Advances in nutritional modifications of infant formulas. Am J ClinNutr; 77(suppl):1550S-54S.
- 10) Singhal A, Macfarlane G, Macfarlane S, Lanigan J, Kennedy K, Elias-Jones A, Stephenson T, Dudek P, Lucas A. (2008) Dietary nucleotides and fecal microbiota in formula-fed infants: a randomized controlled trial. Am J Clin Nutr; 87:1785-92.
- 11) Cilla A, Lacomba R, García-Llatas G, Alegría A. (2012) Prebióticos y nucleótidos en alimentación infantil; revisión de la evidencia. NutrHosp; 27(4):1037-48.
- 12) Bode L. (2009) Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond. Nutrition Reviews; 67(Suppl. 2):183S-91S.
- 13) Boehm G, Moro G. (2008) Structural and functional aspects of prebiotics used in infant nutrition. J Nutr; 138 (Suppl.):1818S-28S.
- 14) Chirido FG, Menéndez AM, Pita Martín de Portela ML, Sosa P, Toca MC, Trifone L, Vecchiarelli C. (2011) Prebióticos en salud infantil. ArchArgentPediatr; 109:49-55.
- 15) Novak FR, Guerra de Almeida JA, Vieira GO, Borba LM. (2001) Colostró humano: fonte natural de probióticos? J Pediatr(Rio J.); 77:265-70.
- 16) Heikkilä MP, Saris PEJ. (2003) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. J Appl Microbiol; 95:471-8.
- 17) Martin R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM. (2003) Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. J Pediatr 143:754-8.
- 18) European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. (2011) Supplementation of Infant Formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN Committee on Nutrition. J PediatrGastroenterolNutr; 52: 238-50.
- 19) Thomas DW, Greer FR, Committee on Nutrition; Section on Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. (2010) Probiotics and prebiotics in pediatrics. Pediatrics; 126: 1217.
- 20) Macías SM, Rodríguez S, Ronayne de Ferrer PA. (2006) Leche materna: composición y factores condicionantes de la lactancia. Arch Argent Pediatr; 104 (5):423-30.
- 21) European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. (2005) Global standard for the composition of Infant Formula: recommendations of an ESPGHAN Coordinated International Expert Group. J PediatrGastroenterolNutr; 41:584-99.
- 22) European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. (2006) Soy protein infant formulae and follow-on formulae: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr; 42:352-61.
- 23) Greco C, Ronayne de Ferrer P. (2006) Fórmulas infantiles: composición de su fracción lipídica. Actualización en Nutrición; 7 (1):50-6.

- 24) Hernández V. (2011) Fórmulas Infantiles. Revista Gastrohnutp; 13 (2) Suplemento 1: 31S-6S.
- 25) European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. (2010) Enteralnutrientsupply for preterm infants: commentary from the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. J PediatrGastroenterolNutr; 50:85-91.
- 26) Uauy R, Peirano P, Hoffman D, Mena P, Birch D, Birch E. (1996) Role of essential fatty acids in the function of the developing nervous system. Lipids; 31(suppl):167S-76S.
- 27) Carnielli VP, Wattimena DJL, Luijendijk IHT, Boerlage A, Degenhart HJ, Sauer PJJ. (1996) The very low birth weight premature infant is capable of synthesizing arachidonic and docosahexaenoic acids from linoleic and linolenic acids. Pediatr Res; 40:169-74.
- 28) Vega S, Gutiérrez R, Radilla C, Radilla M, Ramírez A, Pérez JJ, Schettino B, Ramírez ML, Ortiza R, Fontechac J. (2012) La importancia de los ácidos grasos en la leche materna y en las fórmulas lácteas. Grasas y Aceites; 63 (2):131-142.
- 29) FAO/WHO Expert Committee. (1995) Fats and oils human nutrition.FAO.Food and Nutrition Paper; 57:49-55.
- 30) Koletzko B, Lien E, Agostoni C, Böhles H, Campoy C, Cetin I, Decsi T, Dudenhausen JW, Dupont C, Forsyth S, Hoesli I, Holzgreve W, Lapillonne A, Putet G, Secher NJ, Symonds M, Szajewska H, Willatts P, Uauy R. (2008) The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. J Perinat Med; 36:5-14.
- 31) Qawasmi A, Landeros-Weisenberger A, Leckman JF, Bloch MH. (2012) Meta-analysis of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of formula and infant cognition. Pediatrics; 129 (6):1140-50.
- 32) Carlson SE, Cooke RJ, Rhodes PG, Peeples JM, Werkman SH. (1992) Effect of vegetable and marine oils in preterm infants formulas on blood arachidonic and docosahexaenoic acids. J Pediatr; 120 (suppl):159S-67S.
- 33) Craig-Schmidt MC, Huang M-C. (1998) Interaction of n-6 and n-3 fatty acids: implications for supplementation of infant formula with long-chain polyunsaturated fatty acids. En: Huang YS, Sinclair AJ, Lipids in infantnutrition:63-84.
- 34) Pérez Benajas MA, Vázquez Medem M, Honrrubiasaez JJ, Álvarez Sánchez E, Valle Carceren E. (2010) El estreñimiento infantil, una visión desde la farmacia comunitaria. FarmacéuticosComunitarios; 2 (2):62-66.
- 35) Barltrop D, Hillier R. (1974) Calcium and phosphorus content of transitional and mature human milk. ActaPaediatrScand; 63:347-50.
- 36) Atkinson SA, Radde IC, Chance GW, Bryan MH, Anderson GH. (1980) Macro-mineral content of milk obtained during early lactation from mothers of premature infants. Early Hum Dev; 4:5-14.
- 37) Caulfield L, Himes J, Rivera J. (1995) Nutritional supplementation during early childhood and bone mineralization during adolescence. J Nutr; 125 (suppl):1104S-10S.
- 38) Greer FR. (1989) Calcium, phosphorus, and magnesium: how much is too much for infant formulas? J Nutr; 119:1846-51.
- 39) Fransson GB, Lonnerdal B. (1983) Distribution of trace elements and minerals in human and cow's milk. Pediatr Res; 17:912-15.
- 40) European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. (2014) Iron requirements of infants and toddlers. J PediatrGastroenterolNutr; 58:119-29.
- 41) Klein CJ. (2002) Nutrient requirements for preterm infant formulas. J Nutr; 132 (suppl):1395S-577S.
- 42) FerrerLorente B, Vitoria Miñana I, Dalmau Serra J. (2009) Indicaciones para las fórmulas lácteas especiales: fórmulas para problemas «menores», fórmulas sin lactosa y fórmulas de proteína de soja. Acta PediatrEsp; 67 (7):333-7.
- 43) García-Onieva Artazcoz M. (2007) Lactancia artificial: técnica, indicaciones, fórmulas especiales. Pediatr Integral; XI (4):318-26.
- 44) European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. (2002) Antireflux or antiregurgitation milk products for infants and young children: a comentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. J PediatrGastroenterolNutr; 34:496-8.
- 45) González-Bermúdez CA, Frontela-Saseta C, Peso-Echarri P, López-Nicolás R, Martínez-Graciá C. (2011) Empleo de fórmulas infantiles antirregurgitación en lactantes. Efecto sobre la disponibilidad mineral. RevChilNutr; 38 (4):482-90.

## EFECTO DEL BENZNIDAZOL SOBRE ENZIMAS DE BIOTRANSFORMACIÓN Y TRANSPORTADORES DE DROGAS QUE AFECTAN SU PROPIA BIODISPONIBILIDAD

**Juan P. Rigalli, Virginia G. Perdomo, Aldo D. Mottino, María L. Ruiz y Viviana A. Catania\*.**

Instituto de Fisiología Experimental-Área Fisiología (CONICET-UNR), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Suipacha 570, 2000-Rosario, Santa Fe, Argentina.(\*) E-mail: vcatania@fbioyf.unr.edu.ar

### CONTENIDOS:

Resumen .....	21
Summary .....	22
Introducción.....	22
Sistemas De Biotransformación Y Transporte. Su Regulación. ....	22
Regulación Transcripcional. Receptor Nuclear De Pregnanos X (Pxr).....	25
Interacciones droga-droga. ....	25
Benznidazol (BZL). ....	26
Efecto del BZL sobre enzimas de biotransformación y transportadores de drogas en Células HEPG2. ....	27
Activación de PXR por BZL en un Modelo Celular. ....	28
Eflujo De Bzl En Células HEPG2. Rol De P-GP. ....	29
Efecto del BZL sobre enzimas de biotransformación y transportadores de drogas en un modelo <i>in vivo</i> . ....	30
Determinación De Parámetros Farmacocinéticos De Una Dosis Testigo De Bzl En Ratas. ....	32
Efecto del pretratamiento con BZL sobre su propia absorción intestinal. ....	33
Posibles Implicancias Clínicas.....	33
Referencias.....	34
Conclusiones. ....	35
Referencias.....	35

### RESUMEN

La única droga disponible para el tratamiento de la enfermedad de Chagas en áreas endémicas y en su fase aguda es el benznidazol (BZL). Durante el tratamiento pueden ocurrir efectos no deseados como interacciones droga-droga, generación de derivados tóxicos, o cambios en su propio metabolismo y farmacocinética, los cuales a la fecha están pobremente caracterizados. En esta revisión aportamos evidencia demostrando los efectos del BZL sobre la expresión y actividad de enzimas de biotransformación de fase I y II y sobre bombas exportadoras de drogas, mayormente consistentes en inducción de expresión y actividad de estos sistemas, tanto a nivel hepático como intestinal. Dichos efectos permitirían predecir interacciones droga-droga con otros fármacos coadministrados con BZL, así como una disminución de la eficiencia terapéutica del propio BZL, particularmente ante tratamientos prolongados.

**Palabras clave:** Enfermedad de Chagas, benznidazol, metabolismo de drogas.

## SUMMARY

### EFFECT OF BENZNIDAZOL ON DRUG BIOTRANSFORMATION AND EXCRETION SYSTEMS AFFECTING ITS OWN METABOLISM.

Benznidazole (BZL) constitutes the therapeutic agent of choice for treatment of Chagas disease in endemic regions and during its acute phase. During BZL therapy, drug-drug interactions, generation of BZL toxic metabolites, or changes in BZL metabolism or pharmacokinetics may occur. These undesirable effects are poorly characterized at present. We here reviewed most relevant data demonstrating up-regulation of expression and activity of phase I and II biotransformation systems and drug export pumps, which take place either in liver or intestine. Based on these effects it is possible to predict the occurrence of drug-drug interactions with therapeutic agents coadministered with BZL, as well as a decrease in BZL therapeutic efficacy, particularly under chronic treatment conditions.

**Key words:** Chagas disease, benznidazole, drug metabolism.

## INTRODUCCIÓN.

La enfermedad de Chagas, cuyo agente etiológico es el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), es una infección endémica en América Latina que afecta a más de 8 millones de personas (1). La morbilidad es relativamente alta: 17-30 % de los pacientes en la fase crónica exhiben manifestaciones clínicas como miocardiopatía y megavísceras (megaesófago y megacolon). Actualmente, en la mayoría de las zonas endémicas la única droga disponible para el tratamiento en la fase aguda es el benznidazol (BZL), activo contra todas las formas del parásito (intra o extracelular) (2). Sin embargo, los efectos tóxicos son frecuentes y llevan, en algunos casos, a suspender el tratamiento. La dosis recomendada es de 5-7 mg/kg/día p.o. La duración promedio del tratamiento es de aproximadamente 60 días, pero puede prolongarse por 5 meses o más cuando la enfermedad se reactiva durante la fase crónica (por ej. en pacientes con inmunodeficiencia inducida o adquirida) (3). El BZL actúa a través de la formación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos que probablemente se unen a macromoléculas del parásito (3-5). Los mecanismos de defensa del *T. cruzi* contra el estrés oxidativo son deficientes (6). En contraste, las células de los mamíferos cuentan con sistemas capaces de contrarrestar el desafío provocado por los radicales libres (mecanismos enzimáticos: glutatión S-transferasas, superóxido dismutasa, glutatión reductasa, etc. y mecanismos no enzimáticos: alfa-tocoferol, ascorbato, beta-carotenos y glutatión reducido) (7). Sin embargo a pesar de estos mecanismos, los derivados de BZL pueden producir efectos citotóxicos, descritos por ejemplo en hepatocitos de rata (8).

## SISTEMAS DE BIOTRANSFORMACIÓN Y TRANSPORTE. SU REGULACIÓN.

Los seres humanos están expuestos a lo largo de su vida a una amplia variedad de xenobióticos, incluyendo drogas de uso terapéutico, contaminantes ambientales y toxinas. La concentración plasmática de un compuesto depende de su absorción, distribución, metabolismo y eliminación. El hígado es el principal órgano involucrado en la biotransformación de compuestos endógenos (bilirrubina, sales biliares, hormonas, etc.) y

exógenos (fármacos, toxinas, etc.). El intestino, reconocido por su importancia en la absorción de nutrientes, toxinas o fármacos, está dotado con los mismos sistemas de metabolización y transporte que el hígado y es también responsable del efecto de primer paso que sufren compuestos administrados oralmente. El metabolismo enzimático involucra:

**a- reacciones de Fase I** (oxidación, reducción, hidrólisis) catalizadas, en su mayoría, por miembros de la familia del citocromo P-450 (siendo CYP3A4 la isoforma más abundante y la que metaboliza el 60% de las drogas de uso terapéutico) (9), y **b- reacciones de Fase II** (conjugación con grupos endógenos como ácido glucurónico o glutatión) catalizadas por isoformas de glutatión S-transferasa (GST) y UDP-glucuronosiltransferasa (UGT), entre otras

Si bien todos estos sistemas se expresan en forma significativa también en riñón, el hígado y el intestino constituyen los órganos de primer paso cuando la incorporación de un xenobiótico o droga de uso terapéutico ocurre por vía digestiva. Los productos resultantes del metabolismo hepático e intestinal son excretados al canalículo biliar o a la luz intestinal, respectivamente. La excreción a través de la membrana apical de estos compuestos es mediada por proteínas pertenecientes a la familia ATP-binding cassette (proteínas ABC). Entre ellas pueden citarse como muy relevantes: **a- P-glicoproteína** (P-gp, MDR1 o ABCB1) que posee afinidad por una amplia variedad de fármacos incluidos digoxina, atenolol, losartán, nifedipina, antibióticos, agentes retrovirales, etc., y **b- la proteína asociada a resistencia a multidrogas 2** (MRP2 o ABCC2) que posee afinidad por compuestos conjugados con ácido glucurónico, glutatión o sulfato, incluyendo glucurónidos de bilirrubina, estradiol, paracetamol, etc., mayormente derivados del metabolismo de fase II (10, 11).

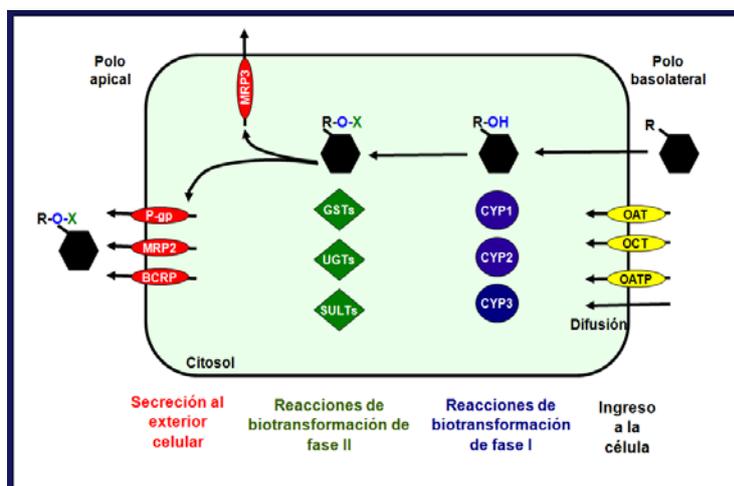


Fig. 1. **Acción coordinada de los sistemas celulares de biotransformación y transporte de xenobióticos.** El esquema representa una célula polarizada (ej. hepatocito, enterocito, etc), donde el ingreso de un xenobiótico ocurre a nivel basolateral por mecanismo difusivo simple o mediado por proteínas como el transportador de aniones orgánicos (OAT), de cationes orgánicos (OCT), o polipéptido transportador de aniones orgánicos (OATP). Una vez dentro de la célula, el xenobiótico puede sufrir reacciones de fase I, mayormente protagonizadas por miembros de la familia de citocromos 1, 2 o 3, siendo un ejemplo importante el CYP3A4 perteneciente a la última familia. El compuesto derivado (ej. hidroxilado), puede adicionar grupos polares (ej. ácido glucurónico, glutatión o sulfato) representado por la letra 'X' a través de enzimas de fase II, para finalmente excretarse a través de la membrana apical por transportadores dependientes de ATP como MRP2, P-gp o BCRP, o bien a través del polo basolateral por MRP3.

La expresión de los sistemas enzimáticos de biotransformación y los transportadores ABC en distintos tipos celulares (epitelios absortivos o secretores, elementos figurados de la sangre, macrófagos, etc.) no es estática ya que las células tienen una remarcable capacidad para regular sus niveles. La exposición a una variada gama de agentes químicos, incluyendo agentes terapéuticos, produce un incremento en la expresión de las enzimas de biotransformación y de transportadores alterando la depuración de endo- y xenobióticos (12-14).

En general, existe una regulación coordinada de los sistemas de biotransformación y los sistemas de transporte en un dado tipo celular. Diferencias tejido-específicas han sido atribuidas a variaciones en la abundancia de determinados mediadores (por ej. factores de transcripción) (15). Se ha observado que los sistemas enzimáticos y de transporte son influenciados por un gran número de factores como sexo, edad, composición de la dieta, hormonas, fármacos, etc., y que esta modulación puede ser mediada por receptores nucleares. Como consecuencia, un aumento en la cantidad de proteína y concomitantemente, en su actividad, podría acelerar la depuración de los compuestos que son sus sustratos (11, 13).

Es sabido que la regulación de estos sistemas puede producirse a varios niveles:

A nivel transcripcional:

- Por interacción de moléculas específicas con sitios selectivos en el promotor de los genes correspondientes.

A nivel postranscripcional:

- Por cambios en el procesamiento y estabilidad del ARNm.

- Por cambios en la velocidad de degradación de la proteína, en su localización, etc.

Tanto para los mecanismos de regulación transcripcional como postranscripcional se ha demostrado la participación de receptores nucleares activados por ligandos (endógenos o exógenos) (10, 11, 13). El receptor de pregnanos X (PXR, NR1I2) y el receptor constitutivo de androstanos (CAR, NR1I3) son considerados, en ese orden de relevancia, los más importantes sensores de xenobióticos que regulan genes involucrados en la biotransformación y eliminación de compuestos endógenos y exógenos (14).

Los receptores nucleares, en especial los que reconocen a xenobióticos como ligandos, luego de activarse actúan uniéndose a elementos de respuesta caracterizados por la presencia de dos o más repeticiones directas o invertidas de una dada secuencia consenso. Éstas pueden localizarse en el promotor proximal o en zonas distales (enhancers). La presencia de tales elementos se ha confirmado experimentalmente para el gen MDR1 (codificante de la proteína P-gp), donde median la inducción PXR-dependiente por rifampicina (16) y la inducción CAR-dependiente por ácido valproico (17). Resultados similares se han descrito para los genes humanos que codifican las enzimas CYP3A4 y UGT1A1, donde existen elementos de respuesta que median la inducción PXR-dependiente por rifampicina (18, 19). También se describió la presencia de elementos proximales de respuesta a PXR en el promotor de Mrp2 de rata, que median la inducción dependiente de este receptor nuclear luego del tratamiento con pregnenolona-16 $\alpha$ -carbonitrilo (20). No obstante, no se encuentra descrita en la bibliografía la presencia de tales sitios ni en el promotor ni en la región 5' distal del gen de MRP2 humano. Mediante estudios in silico nuestro grupo determinó la presencia de dos supuestos sitios de respuesta a receptores de xenobióticos en la región 5' reguladora del gen de MRP2 humano (resultados no publicados). Alternativamente, en la respuesta pueden estar implicados otros factores de

transcripción tales como AP-1. Al respecto, se ha descrito que la activación de AP-1 media la inducción de una isoforma de GST en hepatocitos de rata (21).

### **REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL. RECEPTOR NUCLEAR DE PREGNANOS X (PXR).**

El mecanismo más estudiado de regulación de sistemas de biotransformación y transporte por fármacos es el transcripcional. En la mayoría de los casos se encuentra mediado por receptores nucleares. Como se mencionó anteriormente, PXR es el receptor nuclear más importante en la mediación del efecto de fármacos y xenobióticos, modulando la expresión de los sistemas de biotransformación y excreción, que en definitiva afecta la farmacocinética de los mismos xenobióticos. PXR fue clonado por primera vez a partir de una biblioteca de hígado de ratón (22). Los mayores niveles de expresión de PXR se observaron en hígado e intestino. También se ha observado expresión de PXR, aunque con niveles inferiores, en riñón, pulmón, estómago, monocitos, capilares de la barrera hematoencefálica, útero, ovario, placenta, glándula mamaria, osteoclastos, corazón, glándulas adrenales, células progenitoras de la médula ósea, ciertas regiones del cerebro y células tumorales de origen diverso (23).

La importancia de PXR en la regulación de los sistemas en cuestión se basa en dos pilares. Por un lado, su elevada promiscuidad en lo que hace a la unión de ligandos y, por otro lado, su unión a las secuencias reguladoras de un gran número de genes entre los que se encuentran sistemas de biotransformación de fase I, de fase II y transportadores de drogas (14). La elevada promiscuidad de PXR se debe a la presencia de un bolsillo hidrofóbico de gran tamaño (1200 Å<sup>3</sup>). El mismo goza además de una flexibilidad que le permite expandirse hasta 1600 Å<sup>3</sup> y acomodar compuestos de tamaños y, fundamentalmente, de estructuras químicas variables (23).

### **INTERACCIONES DROGA-DROGA.**

La regulación de la expresión y/o actividad de los sistemas de biotransformación y transportadores de drogas puede afectar la absorción, la distribución, el metabolismo y/o la excreción de aquellos fármacos que sean sustratos de los mismos. Esto puede afectar al mismo fármaco responsable del efecto y también a otros fármacos administrados conjuntamente con el primero. En el segundo caso, se dice que existe una interacción droga-droga. Como consecuencia, pueden presentarse cambios en la respuesta terapéutica y/o toxicidad. Las interacciones pueden ser tanto deseadas o beneficiosas como también no deseadas o perjudiciales. Se pueden dividir en interacciones de carácter farmacocinético, que por lo general implican un simple desplazamiento en la curva dosis-respuesta, o interacciones de carácter farmacodinámico cuando además implican un cambio en la forma de la curva dosis-respuesta (24).

Los cambios en la expresión y/o actividad de las proteínas responsables del metabolismo y la excreción de drogas observados en estudios in vitro o in vivo en animales permiten sugerir potenciales interacciones droga-droga. Por ejemplo, la inducción de P-gp intestinal por espirolactona en ratas, disminuye la absorción de digoxina (25). Un fenómeno similar se ha descrito en estudios clínicos para distintos fármacos. Uno de esos casos incluye el cotratamiento con rifampicina, debido fundamentalmente a su rol inductor sobre varios sistemas de biotransformación y excreción de xenobióticos. Entre los fármacos cuya depuración es inducida por rifampicina pueden mencionarse: ciclofosfamida, ciclosporina, digoxina, erlotinib, etinilestradiol, ifosfamida, imatinib, lamotrigina, midazolam,

morfina, propafenona, verapamilo, warfarina y zidovudina (26-30). Las observaciones se asociaron a inducciones en la expresión de CYP3A4, UGT y P-gp, entre otras proteínas. Un efecto similar se observó en la administración de fenitoína con imatinib, irinotecan, metotrexato, paclitaxel, teniposido y topotecan (31). Lo mismo se observó luego del empleo de preparados de bálsamo de San Juan conteniendo el antidepresivo de origen natural hiperforina. En este caso se registró una mayor depuración de ciclosporina, seguida del rechazo de órganos trasplantados (32, 33). Para ciertos compuestos como ciclofosfamida, la inducción de su metabolismo como se describió en un paciente cotratado con fenitoína, no sólo disminuyó la concentración de la droga original sino que aumentó la concentración de metabolitos de mayor toxicidad (34).

Las interacciones droga-droga también pueden implicar una menor depuración de fármacos coadministrados, por lo general debido a la inhibición de una o más proteínas involucradas en tal proceso. Existen diversos ejemplos de interacciones que se registran ante la administración de un inhibidor del CYP3A4 junto a un sustrato del mismo. Vale recordar que el CYP3A4 es el responsable del metabolismo de aproximadamente el 60% de las drogas empleadas en la práctica clínica (35). Por ejemplo se ha observado que mibefradil inhibe CYP3A4, y en cierta medida también a P-gp, y de esa manera aumenta la concentración de ciclosporina, digoxina, simvastatina y tacrolimus en el organismo (36). De la misma manera se observó una menor depuración de midazolam ante la coadministración con voriconazol o ritonavir, ambos inhibidores de CYP3A4 (37). Otros inhibidores del CYP3A4 que pueden modificar el metabolismo de drogas coadministradas son amprenavir, claritromicina, diltiazem, eritromicina, fluoxetina, ketoconazol, saquinavir y tamoxifeno (35).

### BENZNIDAZOL (BZL).

El benznidazol (N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il) acetamida, BZL) (Fig. 2) es un fármaco que pertenece a la familia de los nitroimidazoles.

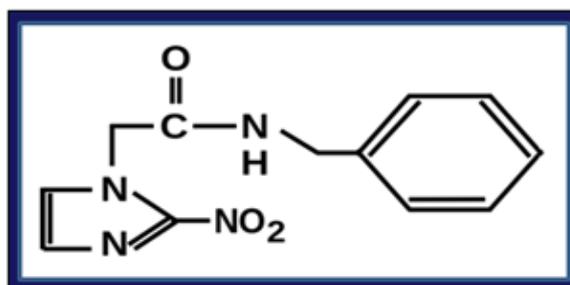


Fig. 2. Estructura química del BZL.

Junto con el nifurtimox son los fármacos de elección para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, siendo el BZL el de mayor disponibilidad en las áreas endémicas. El BZL actúa como prodroga, por lo que debe activarse para poder ejercer su función. Al igual que para otros compuestos nitroheterocíclicos, la activación implica la reducción del grupo nitro catalizada por una nitroreductasa. En ciertos organismos, como en el caso de los mamíferos, se postuló que la nitroreducción del BZL por acción de nitroreductasas de tipo II daría como resultado la formación de compuestos como los radicales nitro y superóxido, con el consecuente daño oxidativo sobre la célula.

Tanto los mamíferos como los parásitos poseen mecanismos de defensa contra los intermediarios electrófilos y en particular contra el glioxal formado por activación del BZL. En el caso de los mamíferos, el sistema de las glutatión-S-transferasas (GSTs) y de las glioxalidas se constituyen en defensas efectivas contra las mencionadas especies reactivas. En los mamíferos las glioxalidas utilizan glutatión y zinc como cofactores, mientras que en el caso del parásito utilizan tripanotiónina y níquel (6, 43). Además, algunos parásitos carecen de glioxalidas con funciones de detoxificación, lo que representaría un factor clave que determina la sensibilidad del mismo a la droga (42). Por el contrario, la deficiencia de nitroreductasas de tipo I se constituiría en un factor de resistencia (44).

La información acerca del efecto del BZL sobre la expresión y/o actividad de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas es muy escasa. Si el BZL puede modificar la farmacocinética de otras drogas o incluso su propia farmacocinética es aún más incierto. Al respecto, existen estudios que atribuirían al BZL un rol inhibitorio sobre proteínas de la familia del citocromo P450. A principios de la década del 80, se describió un efecto potenciador de BZL en la respuesta antitumoral por lomustina (45), por un mecanismo que implicaría la inhibición de la hidroxilación de la lomustina por BZL (46, 47). En concordancia con esto, BZL aumenta el tiempo de sueño de ratas anestesiadas con pentobarbital. El efecto se correlaciona con la inhibición de las actividades aminopirina- y etilmorfina N-desmetilasa, probablemente por unión covalente de metabolitos del BZL, sin cambios en los contenidos de proteína (48). La coadministración de compuestos conteniendo grupos tioles (cisteína, N-acetilcisteína, penicilamina, glutatión) produce una reversión del efecto (49). No obstante, como se anticipó más arriba, se desconocen los efectos a nivel de la expresión de las isoformas más importantes del citocromo P-450, como así también sobre la expresión y actividad de otros sistemas relevantes de biotransformación y transporte. Interesantemente, un estudio realizado en pacientes varones que recibieron BZL por 30 días (7 mg/kg/día, en dos tomas diarias) reveló que la concentración plasmática máxima tiende a disminuir con el tiempo de tratamiento (50), sugiriendo un aumento en su velocidad de metabolismo y/o excreción.

En un intento por avanzar en el conocimiento de las posibles interacciones droga-droga y en la afectación de la farmacocinética del propio BZL, nuestro grupo realizó estudios recientes tanto en ratas como en cultivo de células de origen humano. Los resultados se presentan a continuación en forma sintética.

### **EFFECTO DEL BZL SOBRE ENZIMAS DE BIOTRANSFORMACIÓN Y TRANSPORTADORES DE DROGAS EN CÉLULAS HEPG2.**

En una primera etapa, realizamos estudios utilizando la línea celular HepG2 como modelo de hepatocito humano (51). Así, en Rigalli y col. (52) demostramos un efecto inductor de BZL (200  $\mu$ M, 48 h) sobre los niveles de CYP3A4 (proteína y ARNm), aunque con una inhibición de su actividad como hecho más significativo. Esta inhibición, posiblemente debido a una acción directa sobre la enzima, podría dar lugar a potenciales interacciones droga-droga. De la misma manera en que se observó una menor depuración de midazolam ante la coadministración con inhibidores de CYP3A4 como voriconazol y ritonavir (37), lo mismo podría llegar a ocurrir en el caso de que el BZL sea administrado con sustratos del CYP3A4. La interacción sería aún de mayor gravedad en el caso de sujetos que ya expresan bajos niveles de CYP3A4 debido a factores etarios, étnicos y/o nutricionales (53, 54).

Además, se evaluó el efecto de BZL sobre enzimas de fase II. Con respecto a GST, la expresión de GST $\pi$  (proteína y ARNm) aumentó en respuesta al tratamiento que se tradujo en un aumento de la actividad GST global, determinada utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como sustrato. Dado que no se observaron diferencias en la expresión de GST $\alpha$  ni de GST $\mu$ , el incremento medido en la actividad se debería al aumento en la expresión de GST $\pi$ . Al respecto, se ha descrito su inducibilidad en hígado luego de la exposición a estímulos químicos y en modelos de preneoplasia (21, 55). En hígado humano, GSTP1 es la única isoforma de GST $\pi$  presente, siendo los ductos biliares el mayor sitio de expresión constitutiva. GST se ha visto implicada en la conjugación de especies electrofílicas potencialmente perjudiciales para la célula (56). La inducción de GST medido en la actividad se debería al aumento en la expresión de GST $\pi$ . Al respecto, se ha descrito su inducibilidad en hígado luego de la exposición a estímulos químicos y en modelos de preneoplasia (21, 55). En hígado humano, GSTP1 es la única isoforma de GST $\pi$  presente, siendo los ductos biliares el mayor sitio de expresión constitutiva. GST se ha visto implicada en la conjugación de especies electrofílicas potencialmente perjudiciales para la célula (56). La inducción de GST por BZL podría contrarrestar potenciales efectos oxidativos desencadenados por el mismo fármaco y por otros fármacos coadministrados (38). La expresión de UGT1A no fue afectada por BZL podría contrarrestar potenciales efectos oxidativos desencadenados por el mismo fármaco y por otros fármacos coadministrados (38). La expresión de UGT1A no fue afectada por BZL.

Cuando se evaluó el efecto del tratamiento con BZL sobre las proteínas transportadoras de drogas se observó un aumento concentración-dependiente en la expresión de P-gp y MRP2, sin cambios en BCRP (proteína de resistencia asociada al cáncer de mama), ni en el transportador basolateral MRP3. El aumento en los niveles proteicos y de ARNm de estos transportadores se correlacionó con un aumento en sus actividades de transporte, determinada utilizando sustratos modelos. Este es el primer estudio que demuestra un rol inductor de BZL sobre P-gp y MRP2 en un sistema humano. En estudios clínicos, se observó que sujetos con inducción de P-gp o MRP2 por rifampicina muestran menor AUC y/o mayor excreción de fármacos coadministrados (29, 30, 57). De ser BZL capaz de evocar una respuesta similar a la de rifampicina, se podrían esperar efectos sobre la depuración de otros fármacos sustratos de P-gp y/o MRP2, y por ende, cambios en la respuesta farmacológica y/o toxicológica.

#### **ACTIVACIÓN DE PXR POR BZL EN UN MODELO CELULAR.**

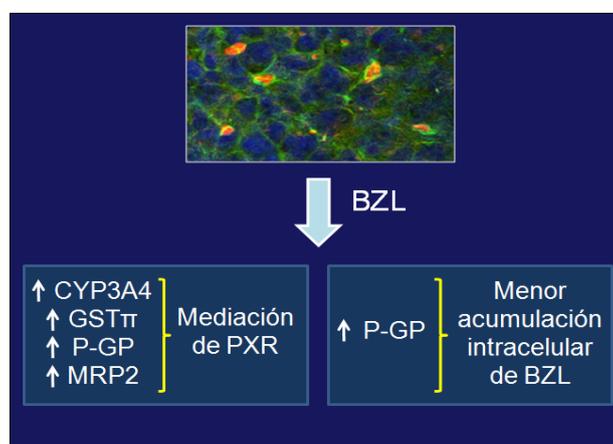
Utilizando la metodología del ARN de interferencia se logró silenciar la expresión de PXR en células HepG2. En este modelo, los efectos inductores de BZL fueron abolidos indicando que PXR es el mediador de su acción. A continuación y con la finalidad de determinar si el mecanismo por el cual PXR media el efecto de BZL consiste en una activación del mismo, se determinó la actividad del receptor nuclear en presencia de distintas concentraciones de BZL. Para ello se utilizaron células LS180-PXRRE que expresan en forma estable un gen reportero sensible a la activación de PXR. Como control positivo de activación de PXR se empleó rifampicina corroborándose la activación esperada de PXR por BZL (52).

**EFLUJO DE BZL EN CÉLULAS HEPG2. ROL DE P-GP.**

Para determinar el/los transportador/es involucrado/s en la extrusión de BZL de células HepG2 se coincubaron las células con BZL (100  $\mu$ M, 2 h) y con los inhibidores del transporte probenecid (PRO, 1 mM, inhibidor de MRPs) o verapamilo (VER, 100  $\mu$ M, inhibidor de P-gp) y se determinó la cantidad de BZL retenido luego de la incubación. Las células coincubadas con VER mostraron una mayor acumulación que las células controles o las coincubadas con PRO, sugiriendo que P-gp se encuentra efectivamente involucrada en el transporte de BZL, al menos en parte.

A fin de evaluar en forma más directa la participación de P-gp en el transporte de BZL en células HepG2 se procedió al silenciamiento del transportador mediante transfección con un siRNA específico. En estas condiciones se observó una acumulación significativamente mayor de BZL en células P-gp<sup>-</sup> que en células P-gp<sup>+</sup>, confirmándose la participación de P-gp.

Finalmente, teniendo en cuenta que P-gp participa en el transporte de BZL y que el pretratamiento con BZL induce la expresión de P-gp, era esperable que el pretratamiento con BZL modificara su propia concentración intracelular. Efectivamente, se observó una acumulación significativamente menor de BZL en las células que fueron pretratadas por 48 h con el fármaco, respecto de aquellas células controles que fueron expuestas al vehículo durante 48 h. El efecto desapareció ante el agregado del inhibidor VER. Estos estudios nos permiten concluir que el tratamiento con BZL induce la expresión y actividad de P-gp, afectando su propia acumulación en las células HepG2. Los resultados se sintetizan en la Fig. 3.



**Fig. 3. Efectos destacados del tratamiento in vitro con BZL.** Las células HepG2 expresan las enzimas de biotransformación y transportadores de drogas característicos del hígado. MRP2 (en rojo) se expresa en la zona de contacto entre células o pseudocanalículo, que se identifica en la foto superior circundado por la proteína de uniones estrechas ZO-1 (en verde). Similar distribución se observa para P-gp. Los efectos mostrados en la parte inferior resultaron de la incubación de las células con BZL 200  $\mu$ M, durante 48 hs. La mediación de PXR fue demostrada experimentalmente por supresión parcial de su expresión. La inducción de P-gp por su parte condujo a un aumento de la extrusión de BZL resultando por lo tanto en una menor acumulación celular (52).

## EFFECTO DEL BZL SOBRE ENZIMAS DE BIOTRANSFORMACIÓN Y TRANSPORTADORES DE DROGAS EN UN MODELO *IN VIVO*.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la línea celular HepG2, podría especularse que el tratamiento con BZL ha de afectar la expresión y actividad de estos sistemas en distintos tejidos del huésped donde normalmente se expresan, esto es, hígado, mucosa intestinal y riñón, entre otros. Estos órganos afectan la biodisponibilidad de drogas, por intervenir en su absorción, metabolismo y excreción, por lo que la alteración de estos sistemas por BZL podría modificar la depuración de drogas coadministradas con BZL e incluso la del propio fármaco. En una segunda etapa, evaluamos el efecto del tratamiento con distintas dosis de BZL (25; 50 y 100 mg/kg/día i.p., 3 días consecutivos) sobre los sistemas mencionados en hígado, intestino y riñón de rata. En principio, evaluamos el efecto sobre CYP3A, UGT y GST, sistemas enzimáticos cuantitativamente más importantes en los procesos de biotransformación de drogas. El tratamiento con la dosis mayor aumentó no sólo la expresión proteica de la familia de proteínas CYP3A sino también estimuló la actividad de CYP3A4 hepática, contrariamente a lo observado en células HepG2 (donde la actividad enzimática disminuyó). La contradicción entre los resultados descritos podría deberse a diferencias en los protocolos experimentales y/o a diferencias especie-específicas en la respuesta al BZL. En intestino (yeyuno e íleon) y en riñón no se observaron cambios significativos en la expresión de esta enzima. Como el hígado es el órgano cuantitativamente más importante en el proceso de biotransformación, los resultados sugieren que el metabolismo de otras drogas coadministradas y del propio BZL podría verse afectado por el tratamiento con BZL (58).

Con respecto a enzimas de fase II, el tratamiento con BZL no alteró los niveles de expresión de UGT1A en ninguno de los tejidos analizados indicando que esta etapa no es afectada para las isoformas analizadas, que representan las isoenzimas más relevantes involucradas en la glucuronización de derivados fenólicos como acetaminofeno y compuestos endógenos como la bilirrubina (56).

En cuanto a GST, las clases  $\alpha$  y  $\mu$  fueron las únicas que mostraron un aumento en la expresión luego del tratamiento con BZL, con un concomitante aumento en la actividad global. En hígado se observó un aumento en la expresión proteica de GST $\mu$ , sin cambios en la expresión de GST $\alpha$  ni GST $\pi$ , acompañado de un aumento en la actividad. Por otra parte, en yeyuno e íleon se observó un aumento proteico de GST $\alpha$ , sin cambios en la expresión de GST $\mu$  ni GST $\pi$ , el que se tradujo en un aumento de la actividad de GST global. Estos resultados sugieren que el aumento de la actividad GST en intestino se debería al menos en parte a la inducción de la expresión proteica de GST $\alpha$ . En riñón no se observaron alteraciones en la expresión de ninguna de las isoformas estudiadas (58). Es sabido que los metabolitos electrofílicos son metabolizados y excretados por procesos dependientes de glutatión que reducen su toxicidad. La reacción de conjugación es generalmente catalizada por GSTs, protegiendo a las macromoléculas celulares del ataque por compuestos electrofílicos reactivos (56). Como se dijo anteriormente, BZL es metabolizado por una nitroreductasa tipo I NADH-dependiente produciendo glioxal en el parásito (un agente citotóxico y mutagénico) (42), mientras que en mamíferos el grupo nitro es reducido a un grupo amino por una nitroreductasa tipo II, con la formación de radicales libres intermediarios y especies reactivas del oxígeno (ROS) (3, 42). En los protocolos terapéuticos, BZL es administrado vía oral. Es posible que la inducción de la expresión y actividad de GST $\mu$  en hígado y GST $\alpha$  en intestino (yeyuno e íleon) por BZL observada en

nuestro trabajo se constituya en un mecanismo compensatorio presistémico para hacer frente a la producción de metabolitos electrofílicos en el sitio de entrada de la droga al organismo.

En cuanto a la expresión de P-gp observamos que el tratamiento de ratas Wistar macho adultas con BZL indujo un aumento significativo en hígado, en yeyuno y en íleon. En riñón no se observaron cambios en la expresión de P-gp. Para evaluar si el aumento en la expresión de P-gp podría tener consecuencias funcionales sobre su actividad, la velocidad de eflujo de rodamina 123 (Ro-123, sustrato modelo de P-gp) fue medida en ratas tratadas con BZL y controles en un modelo de perfusión intestinal *in situ* de simple paso y con recolección simultánea de bilis y orina. Se observó un incremento en las velocidades de excreción biliar e intestinal (yeyuno) de Ro-123 en concordancia con el aumento de expresión de este transportador. Por otra parte, no se observaron diferencias en la excreción renal del compuesto en las ratas tratadas con BZL en relación al grupo control. La actividad de P-gp en íleon no fue evaluada (58).

Por otra parte, los niveles de expresión proteica de Mrp2 fueron significativamente inducidos por el tratamiento con BZL en hígado y en yeyuno, sin alterarse los niveles de expresión en riñón. En íleon, Mrp2 no fue detectable, como era de esperar. Utilizando el mismo modelo de perfusión intestinal *in situ* de simple paso se evaluó la velocidad de excreción de dinitrofenil-S-glutation (DNP-SG, sustrato modelo, resultante de la metabolización de CDNB) como medida de la actividad de Mrp2. Se observó que, a pesar del gran aumento observado en los niveles de expresión hepática de Mrp2, la excreción biliar de DNP-SG y su metabolito mayoritario dinitrofenil-cisteinilglicina (DNP-CG) fue apenas ligeramente mayor en las ratas tratadas con BZL. En yeyuno proximal, la velocidad de excreción de DNP-SG/CG en ratas tratadas con BZL se correlacionó con el aumento en los niveles de expresión de Mrp2 observados. Como era esperado, no se observaron diferencias en la excreción renal de estos compuestos (58).

Con respecto a Mrp2, el aumento en su expresión es usualmente acompañada por un incremento en la excreción de sus sustratos. Sin embargo, el moderado incremento en la excreción biliar de DNP-SG+DNP-CG podría deberse a síntesis de proteína no funcional (por ej. Mrp2 no localizada en la membrana canalicular), a la presencia de otros compuestos que compitan en la excreción mediada por Mrp2 (por ej. metabolitos de BZL capaces de inhibir la actividad de Mrp2) o a la utilización de concentraciones no apropiadas de CDNB (la concentración utilizada en el modelo *in vivo* es saturante a nivel intestinal, pero puede no serlo a nivel hepático). Para esclarecer esta discrepancia decidimos usar otra estrategia para evaluar la actividad intrínseca de Mrp2, utilizando el modelo de hepatocitos aislados. En el proceso de aislamiento, los hepatocitos se lavan de compuestos intracelulares (bilirrubina, sales biliares, glutation e incluso, los derivados de BZL) que podrían competir con DNP-SG por la secreción. En este modelo encontramos un incremento más significativo en la actividad de Mrp2 en respuesta al tratamiento con BZL, que esta vez se correspondió mejor con el aumento en los niveles proteicos. Estos resultados sugieren que los obtenidos *in vivo* pueden afectarse, al menos en parte, por la competición entre DNP-SG y otros potenciales sustratos de Mrp2 (58).



**Fig. 4. Efectos destacados del tratamiento in vivo con BZL.** Los efectos que se muestran en la parte inferior de la figura resultaron del tratamiento con una dosis de 100 mg/kg peso/día, i.p., durante 3 días (58).

En conjunto, estos resultados sugieren que la inducción de P-gp y Mrp2 en hígado, podría alterar la capacidad de excreción biliar de diversos compuestos y llevar a interacciones droga-droga a nivel hepático. Por otra parte, la inducción de P-gp a nivel intestinal podría tener implicancias en la absorción del BZL, que se administra terapéuticamente por vía oral o de otras drogas sustratos del transportador. Como es sabido, P-gp es uno de los principales transportadores ABC expresados en intestino y representa una importante barrera contra la absorción de xenobióticos. Por consiguiente, su eventual inducción produciría una disminución de la biodisponibilidad de ciertos fármacos y en consecuencia, de su efectividad. Por otra parte, el aumento en la expresión de Mrp2 en intestino podría modificar el tiempo de permanencia en el interior celular y la excreción intestinal de derivados resultantes de la metabolización del BZL y otras drogas. Los resultados más relevantes descriptos anteriormente se sintetizan gráficamente en la Fig. 4.

#### **DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE UNA DOSIS TESTIGO DE BZL EN RATAS.**

En la Tabla 1 se muestran los parámetros farmacocinéticos determinados en ratas controles y pretratadas con BZL para una dosis testigo de BZL (5 mg de BZL/kg peso corporal, intraduodenal). La constante de decaimiento plasmático de BZL (k) fue mayor en ratas pretratadas con BZL comparadas con el grupo control, en concordancia con un área bajo la curva (AUC) menor en el grupo pretratado con BZL en comparación al grupo control. También puede observarse que la cantidad de BZL eliminado en bilis durante 90 min fue significativamente mayor en animales pretratados con BZL en comparación con animales controles. En contraste, la cantidad de BZL excretada en orina fue similar entre ambos grupos experimentales

**TABLA 1: Parámetros farmacocinéticos resultantes de una dosis testigo de BZL.** C<sub>máx</sub>: concentración plasmática máxima; AUC: área bajo la curva; k: velocidad de eliminación. Cada valor representa la media±SD. \*significativamente diferente de Control, p<0,05, n=4-5

MUESTRA	PARÁMETRO	CONTROL	BZL
Plasma	C <sub>máx</sub> (µM)	18,8±2,3	14,7±1,6*
“	AUC(nmolmin/ml)	1298 ± 178	799 ± 20 *
“	k(min <sup>-1</sup> )	-0,0042 ± 0,0020	-0,0166 ± 0,0045*
Bilis	Excreción acumulativa (pmol/g hígado)	152±18	244±23*
	%dosis	0,64± 0.17	1,16±0,10*
Orina	Excreción acumulativa (pmol/griñón)	1178±299	1016±184
	%dosis	1,01±0,67	1,55±0,19

Los resultados claramente confirman la mayor eliminación de BZL en animales pretratados con el fármaco, en correspondencia con los hallazgos sobre sus efectos a nivel de expresión y actividad de transportadores como P-gp en hígado (58).

#### EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON BZL SOBRE SU PROPIA ABSORCIÓN INTESTINAL.

Para evaluar si la inducción de P-gp a nivel intestinal podría afectar la absorción de BZL, se utilizó el modelo de sacos intestinales. La velocidad de absorción de BZL fue particularmente estimada en sacos de yeyuno, donde previamente observamos una mayor inducción de Mrp2 y P-gp por BZL, en presencia o ausencia de PSC833, inhibidor específico de P-gp. La velocidad de transporte de BZL desde el lado mucoso al lado seroso fue menor en el grupo pretratado con BZL, que en el grupo control, a lo largo de todo el experimento; efecto que se revirtió con el tratamiento con PSC833. Se observó además una menor absorción acumulativa de BZL en ratas pretratadas en comparación con el grupo control. PSC833 fue capaz de aumentar la captación intestinal en ambos grupos experimentales (58).

En conjunto, todos estos hallazgos sugieren la posibilidad de una disminución progresiva en la absorción de BZL y/o incremento en la metabolización/eliminación después de su administración terapéutica. La afectación de la absorción y farmacocinética de otras drogas coadministradas con BZL es, por supuesto, también esperable.

#### POSIBLES IMPLICANCIAS CLÍNICAS.

Al presente, se desconoce si podría existir una inducción de sistemas de biotransformación y transportadores de drogas en pacientes tratados con BZL. La dosis usual utilizada para el tratamiento con BZL durante la enfermedad de Chagas varía entre 5 y

10 mg/kg peso corporal, administrada durante 30-60 días o por más de 5 meses en casos de reactivación de la enfermedad (2). En nuestros estudios, se utilizó una dosis de 100 mg/kg/día durante 3 días consecutivos, mostrando un efecto inductor sobre varios sistemas. La concentración plasmática de BZL medida 24 h posteriores a la última inyección en ratas fue de 15  $\mu$ M, la cual es similar a la encontrada en pacientes (13-26  $\mu$ M) 24 h posteriores a la última dosis y después de 30 días de tratamiento (50). En general, los roedores necesitan mayores dosis de un compuesto dado para reproducir los mismos efectos que en humanos. Entonces, el efector inductor de BZL en pacientes no debería ser descartado, dado que el tiempo de tratamiento es más extenso que en nuestro modelo experimental. Las interacciones droga-droga podrían ser particularmente importantes en pacientes bajo tratamiento de inmunosupresión con ciclosporina A, corticoesteroides y azatioprina para trasplantes de corazón o riñón (59, 60), o en pacientes VIH positivos infectados con *T. cruzi* que reciben antiretrovirales (61, 62).

Por otra parte, la inducción de P-gp a nivel intestinal podría tener implicancias en la absorción del BZL, que se administra terapéuticamente por vía oral o de otras drogas sustratos del transportador. Hasta el momento, no existe evidencia directa basada en estudios clínicos que sea capaz de sustentar esta presunción. Sin embargo, y a favor de esta hipótesis, Raaflaub (50) observó que la concentración plasmática máxima en pacientes hombres que recibieron BZL (7 mg/kg/día durante 30 días, dos veces al día) tiende a disminuir durante el tratamiento (-20% después de 25 días), sugiriendo un incremento en el metabolismo y/o excreción de BZL. Es por esto que decidimos estudiar si las alteraciones en las proteínas transportadoras observadas podrían tener algún efecto sobre la biodisponibilidad de una dosis testigo de BZL (5 mg/kg). Los parámetros farmacocinéticos de la dosis testigo de BZL calculados mostraron un aumento en la constante de eliminación plasmática (k) y una menor AUC plasmática en el grupo pretratado con BZL (100 mg/kg/día) en comparación con el grupo control, indicando un aumento en la depuración plasmática. Además, la  $C_{m\acute{a}x}$  de BZL en plasma fue menor en los animales pretratados con BZL, sugiriendo una menor absorción intestinal de BZL. Cuando evaluamos la cantidad de BZL excretada por la vía biliar observamos un aumento significativo en animales pretratados con BZL en comparación a los animales controles. La cantidad de BZL excretada en orina fue similar entre ambos grupos experimentales, sugiriendo que el aumento en la depuración plasmática podría deberse, al menos en parte, al aumento observado a nivel biliar (debido a la inducción de P-gp).

Al observar la disminución en la concentración plasmática máxima alcanzada luego de la administración de la dosis testigo de BZL en el grupo pretratado, decidimos evaluar si la capacidad de absorción intestinal podría estar afectada. Para este fin, estudiamos el transporte intestinal mucoso-seroso de BZL utilizando la técnica de sacos intestinales, en presencia o ausencia de PSC833 (inhibidor específico de la actividad de P-gp). Los resultados obtenidos (27% menos transporte de BZL en el sentido luminal-seroso) confirmaron nuestra hipótesis. La participación de P-gp en el eflujo de BZL fue previamente observada en células HepG2 (52). La información obtenida a partir de nuestros estudios sugiere la posibilidad de una disminución progresiva en la absorción de BZL y/o incremento en la metabolización/eliminación después de su administración terapéutica.

El hecho de que el pretratamiento con BZL no haya producido alteraciones en la expresión de CYP3A, GST, P-gp y Mrp2 en riñón es desconocido, poniéndose en evidencia un efecto órgano-específico. PXR es un receptor nuclear que regula la expresión de enzimas de biotransformación de fase I y fase II así como transportadores de xenobióticos (23). PXR se expresa ampliamente en hígado y en intestino delgado en el ser humano, rata,

ratón y conejo. Interesantemente, estos son tejidos donde los sistemas de biotransformación y transportadores se encuentran ampliamente expresados y se inducen por BZL. En células HepG2 donde se silenció el gen de PXR no se observó inducción de CYP3A4, GST $\pi$ , P-gp ni MRP2 al ser expuestas a BZL, sugiriendo que este receptor nuclear estaría involucrado en los efectos observados (52). Postulamos entonces que la inducción diferencial de los sistemas estudiados en hígado e intestino en comparación a la ausencia de efectos observados en riñón podría estar relacionada a diferencias tejido-específicas en la expresión de PXR y/o otros factores de transcripción. En riñón humano se detectaron menores niveles de PXR que en hígado e intestino (22). En consecuencia, resultados similares podrían esperarse en condiciones de tratamiento terapéutico.

## CONCLUSIONES.

Las Figs. 3 y 4 y la Tabla 1 reflejan los principales hallazgos encontrados en nuestros propios estudios utilizando el modelo de rata *in vivo* así como un modelo *in vitro* de células hepáticas de origen humano. El incremento de la expresión y actividad de sistemas específicos de fase I y II y en los transportadores de drogas más relevantes podrían dar lugar a la aparición de interacciones droga-droga con otros fármacos que pudieran ser coadministrados durante el tratamiento, así como afectar el metabolismo y excreción del propio BZL y sus metabolitos. Estas consideraciones merecen tenerse presentes, particularmente ante tratamientos prolongados con la droga.

## REFERENCIAS.

1. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. (2010) Chagas disease. *Lancet*. 375: 1388-1402.
2. Rodríguez Coura JR, de Castro SL. (2002) A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97: 3-24.
3. Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A. (2007) Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 146: 602-20.
4. Moreno SN, Docampo R, Mason RP, Leon W, Stoppani AO. (1982) Different behaviours of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Arch Biochem Biophys*. 218: 585-91.
5. Diaz de Toranzo EG, Castro JA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ. (1988) Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*. 44: 880-1.
6. Krauth Siegel L, Leroux AE. (2012) Low-molecular-mass antioxidants in parasites. *Antioxid Redox Signal*. 17: 583-607.
7. Gutteridge JM, Halliwell B. (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci*. 899: 136-47.
8. Goijman SG, Dubin M, Stoppani OA. (1998) Nifurtimox and benznidazole inhibit DNA and protein synthesis in rat hepatocytes. *Medicina*. 48: 718-9.
9. Zhou SF, Xue CC, Yu XQ, Wang G. (2007) Metabolic activation of herbal and dietary constituents and its clinical and toxicological implications: an update. *Curr Drug Metab*. 8: 526-53.
10. Köhle C, Bock KW. (2009) Coordinate regulation of human drug-metabolizing enzymes, and conjugate transporters by the Ah receptor, pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Biochem Pharmacol*. 77: 689-99.

11. Klaassen CD, Aleksunes LM. (2010) Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol Rev.* 62: 1-96.
12. Ibrahim S, Peggins J, Knapton A, Licht T, Aszalos A. (2001) Influence of beta-adrenergic antagonists, H1-receptor blockers, analgesics, diuretics, and quinolone antibiotics on the cellular accumulation of the anticancer drug, daunorubicin: P-glycoprotein modulation. *Anticancer Res.* 21: 84-7.
13. Catania VA, Sanchez Pozzi EJ, Luquita MG, Ruiz ML, Villanueva SS, Jones B, Mottino AD. (2004) Coregulation of expression of phase II metabolizing enzymes and multidrug resistance-associated protein 2. *Ann Hepatol.* 3: 11-7.
14. Mottino AD, Catania VA. (2008) Hepatic drug transporters and nuclear receptors: regulation by therapeutic agents. *World J Gastroenterol.* 14: 7068-74.
15. Kashfi K, Yang E, Roy-Chowdhury J, Roy-Chowdhury N, Dannenberg A. (1994) Regulation of uridine diphosphate glucuronosyltransferase expression by phenolic antioxidants
16. Geick A, Eichelbaum M, Burk O. (2001) Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem.* 276: 14581-7.
17. Cervený L, Svecová L, Anzenbacherová E, Vrzal R, Staud F, Dvorak Z, Ulrichová J, Anzenbacher P, Pavek P. (2007) Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways. *Drug Metab Dispos.* 35: 1032-41.
18. Liu FJ, Song X, Yang D, Deng R, Yan B. (2008) The far and distal enhancers in the CYP3A4 gene coordinate the proximal promoter in responding similarly to the pregnane X receptor but differentially to hepatocyte nuclear factor-4alpha. *Biochem J.* 409: 243-250.
19. Sugatani J, Muzishima K, Osabe M, Yamakawa K, Kakizaki S, Takagi H, Mori M, Ikari A, Miwa M. (2008) Transcriptional regulation of human UGT1A1 gene expression through distal and proximal promoter motifs: implication of defects in the UGT1A1 gene promoter. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 377: 597-605.
20. Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM, Edwards PA. (2002) Regulation of multidrug resistance-associated 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem.* 277: 2908-15.
21. Chang KT, Lii CK, Tsai CW, Yang AJ, Chen HW. (2008) Modulation of the expression of the pi class of glutathione S-transferase by *Andrographis paniculata* extracts and andrographolide. *Food Chem Toxicol.* 46: 1079-88.
22. Kliewer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, Willson TM, Zetterström RH, Perlmann T, Lehmann JM. (1998) An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell.* 92: 73-82.
23. di Masi A, De Marinis E, Ascenzi P, Marino M. (2009) Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. *Mol Aspects Med.* 30: 297-343.
24. Haefeli WE, Seibert-Grafe M, Gleiter CH. (2002) *Arzneimittel-Kombinationstherapie.* Gardez-Verlag, Sankt Augustin.
25. Ghanem CI, Gómez PC, Arana MC, Perassolo M, Delli Carpini G, Luquita MG, Veggi LM, Catania VA, Bengochea LA, Mottino AD. (2006) Induction of rat intestinal P-glycoprotein by spironolactone and its effect on absorption of orally administered digoxin. *J Pharmacol Exp Ther.* 318: 1146-52.
26. Kiang TK, Ensom MH, Chang TK. (2005) UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Ther.* 106: 97-132.
27. Fromm MF, Eckhardt K, Li S, Schänzle G, Hofmann U, Mikus G, Eichelbaum M. (1997) Loss of analgesic effect of morphine due to coadministration of rifampin. *Pain.* 72: 261-7.
28. Fromm MF, Dilger K, Busse D, Kroemer HK, Eichelbaum M, Klotz U. (1998) Gut wall metabolism of verapamil in older people: effects of rifampicin-mediated enzyme induction. *Br J Clin Pharmacol.* 45: 247-55.
29. Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J, Kroemer HK. (1999) The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest.* 104: 147-53.
30. Drescher S, Glaeser H, Mürdter T, Hitzl M, Eichelbaum M, Fromm MF. (2003) P-glycoprotein-mediated intestinal and biliary digoxin transport in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 73: 223-31.
31. Harmsen S, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH. (2007) The role of nuclear receptors in pharmacokinetic drug-drug interactions in oncology. *Cancer Treat Rev.* 33: 369-80.

32. Ruschitzka F, Meier PJ, Turina M, Lüscher MF, Noll G. (2000) Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *Lancet*. 355: 548-9.
33. Piscitelli SC, Burstein AH, Chaitt D, Alfaro RM, Falloon J. (2000) Indinavir concentrations and St John's wort. *Lancet*. 355: 547-8.
34. de Jonge ME, Huitema AD, van Dam SM, Beijnen JH, Rodenhuis S. (2005) Significant induction of cyclophosphamide and thiotepa metabolism by phenytoin. *Cancer Chemother Pharmacol*. 55: 507-10.
35. Zhou SF, Xue CC, Yu XW, Li C, Wang G. (2007) Clinically important drug interactions potentially involving mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 and the role of therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit*. 29: 687-710.
36. Foti RS, Rock DA, Pearson JT, Wahlstrom HL, Wienkers LC. (2011) Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 3A4 by mibefradil through heme destruction. *Drug Metab Dispos*. 39: 1188-95.
37. Katzenmaier S, Markert C, Riedel KD, Burhenne J, Haefeli WE, Mikus G. (2011) Determining the time course of CYP3A inhibition by potent reversible and irreversible CYP3A inhibitors using a limited sampling strategy. *Clin Pharmacol Ther*. 90: 666-73.
38. Biaglow JE, Varnes ME, Roizen-Towle L, Clark EP, Epp ER, Astor MB, Hall EJ. (1986) Biochemistry of reduction of nitro heterocycles. *Biochem Pharmacol*. 35: 77-90.
39. Gorla N, Díaz Gómez MI, Castro JA. (1986) Interaction of benznidazole reactive metabolites with rat liver deoxyribonucleic acid and nuclear proteins. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 280: 22-31.
40. Raleigh JA, Koch CJ. (1990) Importance of thiols in the reductive binding of 2-nitroimidazoles to macromolecules. *Biochem Pharmacol*. 40: 2457-66.
41. Buschini A, Ferrarini L, Franzoni S, Galati S, Lazzaretti M, Mussi F, Northfleet de Albuquerque C, María Araújo Domingues Zucchi T, Poli P. (2009) Genotoxicity reevaluation of three commercial nitroheterocyclic drugs: nifurtimox, benznidazole, and metronidazole. *J Parasitol Res*. 2009: 463575.
42. Hall BS, Wilkinson SR. (2012) Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob Agents Chemother*. 56: 115-23.
43. Chauhan SC, Padmanabhan PK, Madhubala R. (2008) Glyoxalase pathway of trypanosomatid parasites: a promising chemotherapeutic target. *Curr Drug Targets*. 9: 957-65.
44. Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I. (2008) A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 5022-7.
45. Siemann DW, Morrissey S, Wolf K. (1983) In vivo potentiation of 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea by the radiation sensitizer benznidazole. *Cancer Res*. 43: 1010-3.
46. Roberts JT, Bleehen NM. (1985) Benznidazole with CCNU: a clinical phase I toxicity study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 11: 331-4.
47. Lee FY, Workman P, Cheseman KH. (1987) Misonidazole and benznidazole inhibit hydroxylation of CCNU by mouse liver microsomal cytochrome P-450 in vitro. *Biochem Pharmacol*. 36: 1349-55.
48. Masana M, de Toranzo EG, Rubio M, Castro JA. (1985) Effect of benznidazole on the mixed function oxygenase system from rat liver microsomes. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 276: 4-11.
49. Montaltode Mecca M, Bernacchi AS, Castro JA. (2000) Prevention of benznidazole-induced prolonged effect on the pentobarbital sleeping time of rats using different thiol-containing compounds. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 108: 39-48.
50. Raaflaub J. (1980) Multiple-dose kinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Arzneimittelforschung*. 30: 2192-4.
51. Sormunen R, Eskelinen S, Lehto VP. (1993) Bile canaliculus formation in cultured HepG2 cells. *Lab Invest*. 68: 652-62.
52. Rigalli JP, Perdomo VG, Luquita MG, Villanueva SS, Arias A, Theile D, Weiss J, Mottino AD, Ruiz ML, Catania VA. (2012) Regulation of biotransformation systems and abc transporters by benznidazole in HepG2 cells. Involvement of Pregnane X-receptor. *PLoS Negl Trop Dis*. 6: e1951.
53. Cotreau MM, von Moltke LL, Greenblatt DJ. (2005) The influence of age and sex on the clearance of cytochrome P450 3A substrates. *Clin Pharmacokinet*. 44: 33-60.

54. Harris RZ, Jang GR, Tsunoda S. (2003) Dietary effects on drug metabolism and transport. *Clin Pharmacokinet.* 42: 1071-88.
55. Aliya S, Reddanna P, Thyagaraju K. (2003) Does glutathione S-transferase Pi (GST-Pi) a marker protein for cancer? *Mol Cell Biochem.* 253: 319-27.
56. Mulder GJ. (1990) Conjugation reactions in drug metabolism: An integrated approach. Taylor & Francis, Londres - Bristol.
57. Naesens M, Kuypers DR, Streit F, Armstrong VW, Oellerich M, Verbeke K, Vanrenterghem Y. (2006) Rifampin induces alterations in mycophenolic acid glucuronidation and elimination: implications for drug exposure in renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 80: 509-21.
58. Perdomo VG, Rigalli JP, Villanueva SS, Ruiz ML, Luquita MG, Echenique CG, Catania VA. (2013) Modulation of biotransformation systems and ABC transporters by benznidazole in rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 57: 4894-902.
59. Bacal F, Silva CP, Pires PV, Mangini S, Fiorelli AI, Stolf NG, Bocchi EA. (2010) Transplantation for Chagas' disease: an overview of immunosuppression and reactivation in the last two decades. *Clin Transplant.* 24: E29-E34.
60. Silva AE, Silva AC, Faleiros AC, Guimaraes CS, Correa RR, Oliveira FA, Correia D, Teixeira AC, Ramirez LE, Teixeira V de P, dos Reis MA. (2010) Acute Chagas' disease in postrenal transplant and treatment with benznidazole. Acute Chagas' disease in postrenal transplant and treatment with benznidazole. *Ann Diagn Pathol.* 14: 199-203.
61. Diazgranados CA, Saavedra-Trujillo CH, Mantilla M, Valderrama SL, Alquichire C, Franco-Paredes C. (2009) Chagasic encephalitis in HIV patients: common presentation of an evolving epidemiological and clinical association. *Lancet Infect Dis.* 9: 324-30.
62. Almeida EA, Ramos Junior AN, Correia D y Shikanai-Yasuda MA. (2011) Co-infection Trypanosoma cruzi/HIV: systematic review (1980-2010). *Rev Soc Bras Med Trop.* 44: 762-70.

## SURFACTANTE PULMONAR: DE SUS COMIENZOS HASTA NUESTROS DÍAS (PARTE I)

María Margarita Martínez Sarrasague\*<sup>1</sup>; Alejandra Noemí Cimato<sup>1</sup>; Alfredo Adolfo Hager<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Junín 956, CABA. Argentina  
marga@ffyb.uba.ar; alecimato@gmail.com; gerardohager@nialtec.com.ar

### CONTENIDOS

.....	
Resumen .....	39
Summary .....	40
1. Introducción .....	40
2. Historia .....	40
3. Composición química.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
4. Síntesis y metabolismo del surfactante .....	44
5. Función del surfactante – Mecanismo de acción.....	46
6. Mecanismos de defensa del pulmón .....	47
7. Inactivación del surfactante <sup>89</sup> .....	48
8. Terapia surfactante .....	49
9. Referencias bibliograficas .....	50

### RESUMEN

El surfactante pulmonar es un complejo lipo-proteico esencial para mantener una superficie respiratoria operativa en los pulmones de los mamíferos. Su función esencial es reducir la tensión superficial en la interfase aire-líquido alveolar a fin de estabilizar los pulmones contra las fuerzas físicas que operan a lo largo de los ciclos respiratorios de compresión-expansión, y permitir el intercambio gaseoso. Al mismo tiempo, este tensioactivo natural constituye una barrera primaria esencial contra la entrada de patógenos. La falta o deficiencia de surfactante se asocia con patologías respiratorias, cuyo tratamiento a menudo incluye la suplementación con surfactantes exógenos. En este artículo se narra brevemente cómo se descubrió y se llegó a lo que se conoce actualmente acerca del surfactante pulmonar. Se describen las características estructurales y funcionales del surfactante pulmonar endógeno, su metabolismo y los modelos actuales sobre los mecanismos de acción, con especial énfasis en sus propiedades biofísicas para estabilizar la superficie alveolar. También se proporciona una perspectiva sobre las limitaciones en el uso y en la eficiencia del surfactante pulmonar en el tratamiento de patologías respiratorias debido al infiltrado sérico o presencia de sustancias que habitualmente no se encuentran en el espacio alveolar. Por último se plantean los desafíos que hay que afrontar para dilucidar los mecanismos de inactivación que permitan en un futuro desarrollar nuevas formulaciones de surfactantes exógenos, efectivas.

**Palabras clave:** surfactante pulmonar, función, inactivación

## SUMMARY

### PULMONARY SURFACTANT: FROM ITS BEGINNING TO THE PRESENT (PART I)

Pulmonary surfactant is an essential lipid-protein complex to maintain an operative respiratory surface at the mammalian lungs. The primary function of lung surfactant is to reduce the surface tension at the alveolar air-liquid interface to stabilize the lungs against natural forces operating along the compression-expansion breathing cycles and allow gas exchange. At the same time, this natural surfactant is a primary barrier against the entry of pathogens. The lack or deficiency of surfactant is associated with respiratory diseases, whose treatment often includes supplementation with exogenous surfactants. This review briefly summary how it was discovered and what is currently known about pulmonary surfactant. Structural and functional characteristics of endogenous pulmonary surfactant, its metabolism and current models of the mechanisms of action, with special emphasis on their biophysical properties to stabilize the alveolar surface are described in this review. A view on the limitations on the use and efficiency of pulmonary surfactant, in the treatment of respiratory diseases due to the presence of serum infiltrated or substances that are not normally found in the alveolar space is also provided. Finally we discuss the challenges to be faced in order to elucidate the mechanisms of inactivation, and to develop effective new formulations of exogenous surfactants.

**Keywords:** Pulmonary surfactant, function, inactivation

## 1. INTRODUCCIÓN

En los seres vivos, la obtención de la energía necesaria para mantener las funciones celulares requiere un aporte continuo de oxígeno a los tejidos. El epitelio pulmonar constituye una estructura altamente especializada que permite este aporte como consecuencia del intercambio de gases entre el aire y el torrente circulatorio. A través de este epitelio, cincuenta veces más fino que una hoja de papel, se realiza la difusión hacia la sangre del oxígeno inhalado, y la liberación al ambiente del dióxido de carbono producido, como desecho metabólico. Para obtener el oxígeno necesario, un pulmón humano debe exponer para el intercambio gaseoso con el exterior una superficie de aproximadamente 90 m<sup>2</sup> y forzar la renovación del aire en contacto con esa superficie, a razón de unos 11.000 litros de aire por día. Para realizar este trabajo físico, la estructura del pulmón está optimizada, siendo una parte esencial de esa estructura una sustancia lubricante de naturaleza lipoproteica ubicada en la superficie respiratoria: *el surfactante pulmonar*.

## 2. HISTORIA

¿Cómo se llegó a lo que se sabe o conoce actualmente del surfactante pulmonar? En una publicación de 1997, John Clements, quien puede ser considerado como uno de los padres del surfactante, narra los principales hechos históricos que permitieron arribar a la postulación de la existencia de un surfactante pulmonar.

Hasta fines del siglo XVII poco se sabía sobre las propiedades de superficie de los líquidos. Si bien muchas observaciones cualitativas habían sido realizadas, fue recién en el siglo XVIII que florecieron los experimentos cuantitativos y las teorías vinculadas con la

actividad de superficie de fluidos (Rowlinson y Widom, 1989). Pierre Simon Laplace y Thomas Young, pioneros en la disciplina de la tensión superficial, fueron quienes formularon las leyes y establecieron las bases para un análisis matemático de la mecánica de superficie. Estas leyes han permanecido inalterables hasta la actualidad y siguen proveyendo el marco teórico para la interpretación de las propiedades funcionales de los pulmones. En las postrimerías del siglo XIX, Lord Rayleigh reportó el uso de films de superficie para estimar la masa y el tamaño de una molécula (John Strutt, 1871). Contemporáneamente, Miss Agnès Pockels (1891), interesada en los fenómenos de superficie, diseñó ingeniosos dispositivos para medir estos fenómenos, precursores de los surfactómetros que luego serían ampliamente usados, algunos conocidos con el nombre de sus diseñadores: Langmuir, Pockels, Adam, Wilhelmy, y McBain. Kart von Neergaard fue el primer investigador que vinculó la tensión superficial, en 1929, a la fisiología pulmonar (Neergaard, 1929). Su trabajo, ignorado por 25 años, pasó luego a ser citado regularmente como el evento iniciador de este campo de la ciencia. A mediados del siglo XX, Mead y colaboradores, como consecuencia de sus estudios de casos de edema pulmonar, comenzaron a pensar en las implicancias de la tensión superficial en los espacios aéreos de los pulmones (Mead et al., 1957). Por su parte, el físico inglés Pattle postuló la presencia de un material especial en los pulmones ya que le sorprendía la estabilidad de las burbujas en la espuma que salía por las vías aéreas en los casos de edema pulmonar agudo. Analizando esto, llegó a la conclusión de que estas burbujas traían consigo una capa proteica capaz de disminuir la tensión de la superficie alveolar (Pattle, 1955). Por la misma época, Clements comenzó sus experimentos procurando extraer esta sustancia especial, presumiblemente presente en la interfase alveolar, a la que dio en llamar “surfactante pulmonar”. En sus experiencias encontró que la tensión superficial de extractos salinos de lavados pulmonares disminuía de 46 a 10 mN/m cuando se reducía el área. También calculó la compresibilidad de estos films y arribó a valores consistentes con una gran capacidad para estabilizar los pulmones, evitando el colapso al final de la espiración. Si bien todos estos resultados fueron publicados, despertaron escaso interés entre fisiólogos y físicos.

Paralelamente, Ellen Avery y Jere Mead, en 1959, reportaron un hecho de vital importancia: la ausencia de surfactante en extractos de infantes muertos como consecuencia del hasta entonces conocido como síndrome de membrana hialina<sup>1</sup>, e hipotetizaron que la pérdida del surfactante y el nacimiento antes de término eran los responsables del fallecimiento (Avery y Mead, 1959). Esta publicación puso de manifiesto ante la comunidad científica la relevancia clínica de la tensión superficial y del surfactante, y atrajo la atención mundial sobre el tema, estimulando el desarrollo de estudios de laboratorio y clínicos. Sus trabajos fueron trasladados al campo de la práctica clínica por Tetsuro Fujiwara, quien desarrolló una terapia sustitutiva empleando surfactante de origen bovino.

### 3. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Los principales agentes tensioactivos del surfactante son sus componentes fosfolipídicos; gracias a su estructura anfipática se adsorben a la interfase aire-agua, y reducen su tensión surfactante en la fase acuosa. Conforme se reduce la superficie respiratoria durante la

<sup>1</sup>La Dra. Avery y sus colegas publicaron 23 papers de 1959 a 1965 acerca de lo que entonces era la causa más común de muerte entre los bebés prematuros: la incapacidad para respirar. En ese momento, la enfermedad se llama enfermedad de la membrana hialina debido a que fueron encontradas membranas vidriosas en las autopsias de niños que habían jadeado en busca de aliento y muerto rápidamente. Este síndrome es el que actualmente se denomina SDR. Avery identificó una mezcla de lípidos y proteínas en los pulmones, que llegó a ser llamada surfactante. Ella ayudó a probar que era la ausencia de surfactante - no la presencia de membranas - lo que causaba las muertes infantiles.

superficial. La razón de este fenómeno es la casi absoluta insolubilidad de los lípidos del surfactante en la fase acuosa. Conforme se reduce la superficie respiratoria durante la espiración, las moléculas fosfolipídicas quedan confinadas en una extensión de interfase progresivamente menor, aumenta por tanto su concentración, y se reduce la tensión superficial al excluirse un mayor número de moléculas de agua de la superficie.

Después de que algunas falsas hipótesis fueron descartadas, se postuló que el surfactante estaba conformado como una membrana celular, rica en fosfolípidos y con proteínas (King y Clements, 1972; Klaus *et al.*, 1961; Pattle y Thomas, 1961). La composición de los surfactantes de terapia sustitutiva, sintéticos o provenientes de diferentes especies animales varía, no obstante ello, todos tienen eficacia similar para el tratamiento del distrés respiratorio del recién nacido (SRDI), y todos fallan por igual en el tratamiento del distrés respiratorio del adulto (SRDA) (Bernhard *et al.*, 2000; Dhar, 2012; Perez Gil, 2008, Zasadzinski *et al.*, 2010; Zuo *et al.*, 2008).

El 90 por ciento en peso del surfactante de los mamíferos corresponde a material lipídico y entre el 8 y el 10 por ciento, a proteínas (Keating *et al.*, 2012). Dentro de los componentes lipídicos, los fosfolípidos suponen un 90 por ciento; el resto son lípidos neutros, entre los cuales el colesterol representa una proporción apreciable (2 – 8%). Asimismo, entre los lípidos, el 10% de ellos contienen cabezas aniónicas y el 65% residuos acilo (Creuwels *et al.*, 1997, Veldhuizen *et al.*, 1998; Walters *et al.*, 2000).

El principal componente fosfolipídico es una especie molecular inusual en cualquier otro tejido, la dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), la cual constituye entre un 30 y un 89% del surfactante (Thannhauser *et al.*, 1946). Las fosfatidil-colinas (PC) son los componentes lipídicos principales en la mayoría de las membranas de las células animales, por lo general poseen un ácido graso saturado y otro insaturado, lo que hace que tengan propiedades óptimas de fluidez a la temperatura fisiológica (Goerke, 1998). La DPPC, en cambio, posee dos cadenas saturadas de ácido graso y esta característica resulta esencial para la función del surfactante. La presencia del fosfolípido disaturado como elemento tensioactivo principal del surfactante resulta muy ventajosa. En los momentos de máxima compresión de la superficie respiratoria (al final de la espiración), las moléculas de DPPC pueden empaquetarse densamente en la interfase, haciendo descender la tensión superficial hasta valores inferiores a 2 mN/m (Naget *et al.*, 1998; Possmayer, 1997). En sus primeros trabajos, Clements estableció que la tensión superficial debía ser inferior a 2 mN/m para prevenir el colapso alveolar (atelectasia), y no mayor a 20-25mN/m a fin de mantener la estabilidad alveolar (Clements, 1997).

Los fosfolípidos carecen de un punto de fusión definido; existe en cambio una temperatura conocida como temperatura de transición, en la cual los lípidos pasan de un estado semirrígido (gel) a un estado fluido (sol). A temperatura fisiológica, la DPPC se encuentra en estado gel, por lo tanto, en esas condiciones no tiende a transferirse a la interfase aire-líquido, en el proceso de spreading<sup>2</sup>, imprescindible para reducir la tensión superficial (King, 1974). Por ese motivo, el surfactante no puede estar constituido solamente por DPPC pura, de allí la necesaria presencia del resto de las especies lipídicas del surfactante y sobre todo de las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C (Cochrane y Revak, 1991; Johansson *et al.*, 1994; Schürch *et al.*, 1992; Whitsett *et al.*, 1986; Williams *et al.*, 1991).

<sup>2</sup>El vocablo inglés *spreading* describe la propiedad de derrame o dispersión del surfactante en la interfase

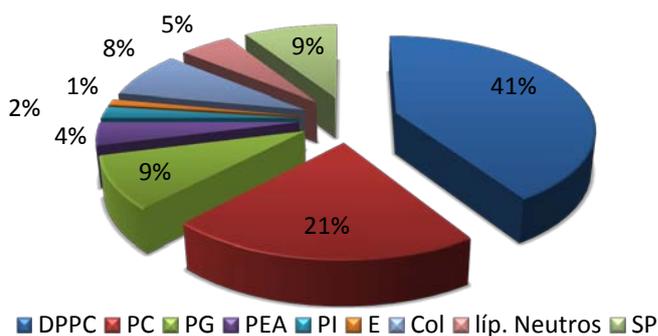


Figura 1: Porcentajes en masa de los principales componentes del surfactante pulmonar.

**DPPC:** dipalmitoil fosfatidil colina;  
**PC:** fosfatidilcolina;  
**PG:** fosfatidilglicerol;  
**PEA:** fosfatidil-etanolamina;  
**PI:** fosfatidilinositol;  
**E:** esfingomielina;  
**Col:** colesterol;  
**SP:** proteínas del surfactante

Proteínas de Surfactante

En el surfactante están también presentes una serie de proteínas (SP: surfactant protein) más o menos específicas: SP-A, SP-B, SP-C y SP-D (Johansson et al., 1994). SP-A y SP-D (Johansson et al., 1994). SP-A y SP-D son hidrofílicas, forman oligómeros de gran tamaño y cumplen funciones fundamentales en los mecanismos de defensa innata del pulmón (Holmskov, 1994; van Golde, 1995). Por otro lado, SP-B y SP-C son polipéptidos catiónicos de tamaño reducido, con elevado carácter hidrofóbico. Estas proteínas desarrollan una función fundamental en la modulación de las propiedades biofísicas de los componentes del surfactante. La carencia fatal que implica la deficiencia de la SP-B indica el rol fundamental de la misma en el procesamiento y función del surfactante. Actualmente se postula la existencia de una quinta proteína, la SP-G (Rausch et al., 2012), con propiedades fisicoquímicas similares a las proteínas liposolubles del surfactante. En la Tabla I.1 se resumen las principales características de las proteínas del surfactante.

En estudios más recientes se encontró que la SP-B se halla solamente en órganos que tienen contacto con el aire, y es la proteína más efectiva en el proceso de spreading y descenso de la tensión superficial del surfactante. Esta proteína se une reversiblemente a la DPPC a fin de ayudar en su transporte hacia la interfase alveolar (Ochs, 2010). La combinación con la SP-A daría mejores resultados en este proceso, aunque su rol sigue siendo cuestionado (Ravasio et al., 2010).

Por su parte, la SP-C promueve la incorporación de material adicional desde el reservorio hacia el film y mejora el mecanismo de estabilización de la tensión entre fases en valores cercanos a cero. Esta proteína, junto con colesterol, puede incrementar la miscibilidad de mezclas de PC y PG dado que probablemente ocurra una interacción electrostática entre estos lípidos aniónicos, y la proteína, de carácter catiónico (Creuwels et al., 1997; Rodríguez Capote et al., 2001; Walters et al., 2000).

Cuando los neumocitos sintetizan el surfactante, éste se dispone y almacena en estructuras de tipo bicapa, las cuales contienen un 50 por ciento de DPPC. La presencia de la fracción de fosfolípidos insaturados contribuye a fluidificar las membranas ricas en DPPC para que transiten con mayor facilidad hasta la interfase aire – líquido alveolar. Las proteínas SP-B y SP-C son los verdaderos catalizadores de esta transferencia alveolar (Aliget et al., 2004; Rodríguez Capote et al., 2006; Ross et al., 2002; Serrano y Perez Gil, 2006).

La estructura funcional del complejo surfactante, la velocidad de formación del film y la posible selección del fosfolípido DPPC para la interfase en el momento de la espiración son consecuencia de las interacciones entre los lípidos y las proteínas del surfactante. La regulación de la composición lipídica para mantener una apropiada fluidez resulta entonces crítica para un correcto funcionamiento del tensioactivo (Seu *et al.*, 2006).

Proteína	Principales características
SP- A	<ul style="list-style-type: none"> <li>✚ Tiene una estructura de seis trímeros. Se la puede encontrar en una forma abierta o cerrada, dependiendo de las sustancias presentes en el sistema.</li> <li>✚ tiene un rol en el sistema inmunológico y se pueden encontrar en otras áreas del cuerpo.</li> <li>✚ cambia su estructura tridimensional en presencia de Ca</li> <li>✚ protege al SP de los efectos negativos de las proteínas séricas</li> <li>✚ es necesaria para la formación de la estructura tubular de mielina</li> <li>✚ su rol se evidenciaría en situaciones de stress</li> </ul>
SP- D	<ul style="list-style-type: none"> <li>✚ Es un dodecámero</li> <li>✚ es la más grande de las proteínas del surfactante</li> <li>✚ está en las células Tipo II, más que en la interfase</li> <li>✚ interviene inmunológicamente</li> <li>✚ regula el balance del SP</li> <li>✚ su deficiencia provoca aumento de fosfolípidos, alteración de macrófagos y enfisema</li> </ul>
SP- B	<ul style="list-style-type: none"> <li>✚ 4 alfa hélices, 2 positivas y 2 neutras</li> <li>✚ es un componente de la estructura tubular de mielina</li> <li>✚ se une preferentemente a lípidos aniónicos, no a DPPC</li> <li>✚ refuerza la adsorción y el <i>spreading</i></li> <li>✚ <b>vital para la función pulmonar</b>, su ausencia impide la maduración de SP-C</li> <li>✚ fluidifica la monocapa y evita la compactación de lípidos</li> <li>✚ promueve el pandeo y la formación de estructuras reversibles no colapsables.</li> </ul>
SP- C	<ul style="list-style-type: none"> <li>✚ se une por su extremo N-terminal al grupo palmitoilo y preferentemente a lípidos aniónicos, no a DPPC</li> <li>✚ aumenta la velocidad de adsorción</li> <li>✚ promueve la formación de multicapas lipídicas, compactas</li> <li>✚ puede actuar como una palanca para mover los lípidos</li> </ul>
SP-G	<ul style="list-style-type: none"> <li>✚ se pueden encontrar en otras áreas del cuerpo (lágrimas, saliva)</li> <li>✚ posee propiedades fisicoquímicas similares a SP-B y SP-C</li> <li>✚ posiblemente interactúe con fosfolípidos y participe en la regulación de las características de la superficie tensioactiva</li> </ul>

Tabla 1: Proteínas del surfactante

#### 4. SÍNTESIS Y METABOLISMO DEL SURFACTANTE

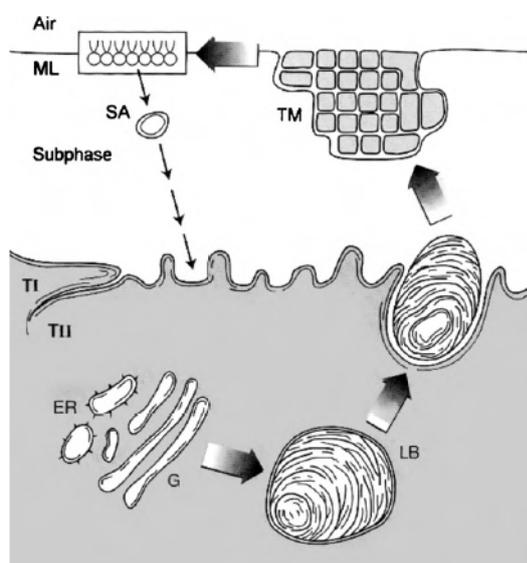
La disposición citológica y las características morfométricas de los alvéolos de mamíferos han sido ampliamente estudiadas (Herzog *et al.*, 2008). Forman parte de la estructura alveolar:

- Las células o neumocitos Tipo I: median el intercambio de gases.
- Las células o neumocitos Tipo II (CT2): tienen funciones secretantes, proliferativas e inmunológicas.

- Las células endoteliales: tienen funciones metabólicas y son críticas para el intercambio gaseoso.
- Los macrófagos alveolares: coordinan las defensas del huésped.
- Los fibroblastos intersticiales: soportan la estructura alveolar mediante la secreción de una matriz extracelular proteica.

Las CT2 participan en el proceso secretorio, en el transporte, en funciones inmunes y en *stemcells*. Producen, secretan y reciclan los componentes lipídicos y proteicos del surfactante pulmonar; poseen rutas metabólicas especiales destinadas a producir especies disaturadas que no aparecen en proporción tan elevada en el resto de los tejidos. Estas células ayudan a mantener el espacio alveolar relativamente libre de fluido y transportan sodio a través de los canales apicales y de la ATPasaNa/K. Pero esta función no se aplica a la capacidad de depuración en caso de injuria severa de pulmón, situación en la que el fluido contiene elevada concentración de proteínas, y la barrera epitelial está dañada. A la fecha se desconocen los factores que regulan el volumen del fluido alveolar y su pH.

El ciclo del metabolismo de los fosfolípidos comienza con su secreción en forma de cuerpos lamelares desde los neumocitos (Haller *et al.*, 2004). Los cuerpos lamelares (LB) se desenvuelven en un entramado de fosfolípidos de membrana conocido como mielina tubular (TM), la cual también se desagrega para formar o bien un film en la superficie alveolar, o sino vesículas lipídicas de diversos tamaños. Las proteínas del surfactante se sintetizan como proproteínas y luego son procesadas a su forma madura (Baritussio y col, 1981; Guttentag *et al.*, 2003; Kashchiev y Exerowa, 2001; Sato y Kishikawa, 2001; Veldhuizen y Possmayer, 2004). El proceso de re-captación y secreción de *novos* difícil de demostrar debido a los múltiples componentes, la naturaleza polimórfica del surfactante y la heterogeneidad celular del parénquima pulmonar. A pesar de ello, hay evidencias que demuestran que el ciclo del surfactante tiene a los macrófagos, las células tipo II y la capa alveolar como los principales protagonistas en el *turnover* del surfactante (Ikegami *et al.*, 2005), el cual depende además del nivel de ventilación pulmonar (Gobran y Rooney, 2004; Wuet *et al.*, 2011). La hiperventilación en el ejercicio se asocia con un transporte más rápido y los cambios cíclicos en la superficie alveolar promueven la conversión de agregados activos de surfactante en formas inactivas, más livianas, listas para el *clearance* (Oyarzun y Clements, 1978; Putman *et al.*, 1996).



**Figura 2:** Ciclo del surfactante pulmonar. El surfactante se sintetiza en el retículo endoplásmico (ER), se procesa vía Golgi, y es ensamblado en los cuerpos lamelares (LB). Los LB se secretan a la subfase alveolar, donde se convierten en mielina tubular, que llega a la monocapa (ML). Con las contracciones repetidas el film se

## 5. FUNCIÓN DEL SURFACTANTE – MECANISMO DE ACCIÓN

Las sustancias capaces de cambiar significativamente la energía de una superficie de separación de fases se conocen como **surfactantes**. Una disminución en la tensión superficial con un incremento en la concentración de un soluto en particular implica que dicho soluto es positivamente adsorbido en la superficie. En el caso de los PL de la superficie alveolar, las colas no polares de las moléculas se orientan hacia el aire y las cabezas polares quedan sumergidas en la fase acuosa del alvéolo (Hills, 1999). El surfactante pulmonar tiene una propiedad que lo convierte en un tensioactivo extremadamente eficaz: el descenso que produce en la tensión superficial es tanto mayor cuanto más se reduce el volumen de los alvéolos durante la espiración. Merced a ese fenómeno, la relación coeficiente de tensión superficial / radio ( $\gamma/r$  de la expresión de la Ley de Laplace) permanece constante. Por otra parte, en la compresión, durante la exhalación, el área disminuye y el surfactante adquiere mayor densidad minimizando la tensión de la interfase y disminuyendo la tendencia de colapso alveolar (Bachofenet *al.*, 1987 y 2001; Schurchet *al.*, 1978).

El proceso de *spreading* o derrame del surfactante en la interfase alveolar sólo es posible por debajo de la temperatura de transición. En caso contrario, si se produce una expansión rápida desde el estado condensado, el fosfolípido se fractura y aparecen "icebergs" en la estructura de la monocapa del film que reviste la superficie del alvéolo (de la Serna *et al.*, 2004 y 2009). La temperatura de transición o crítica de la DPPC es 41°C, pero en asociación con PG, esta temperatura desciende a 37°C.

Durante la adsorción, los films de surfactante disminuyen la tensión superficial de 70 mN/m a 20-25 mN/m a 37°C. En este rango de tensiones superficiales, las moléculas de PL se encuentran en equilibrio termodinámico con las moléculas de la sub-fase y este equilibrio se corresponde con la tensión de equilibrio del *spreading*. Para lograr tensiones menores, cercanas a cero, será necesaria la compresión lateral del film, fenómeno que ocurre en la espiración. Esta compresión no debe implicar una reducción del área alveolar superior al 20-30% de la superficie alveolar. Por lo tanto el film surfactante debe tener una compresibilidad ( $d \ln A / d \gamma$ ) inferior a  $0,01 \text{ (mN/m)}^{-1}$ . En la expansión, el surfactante incrementará levemente la tensión hasta llegar a valores cercanos a la tensión de equilibrio mencionada más arriba (Bachofenet *al.*, 2001; Schurchet *al.*, 1978).

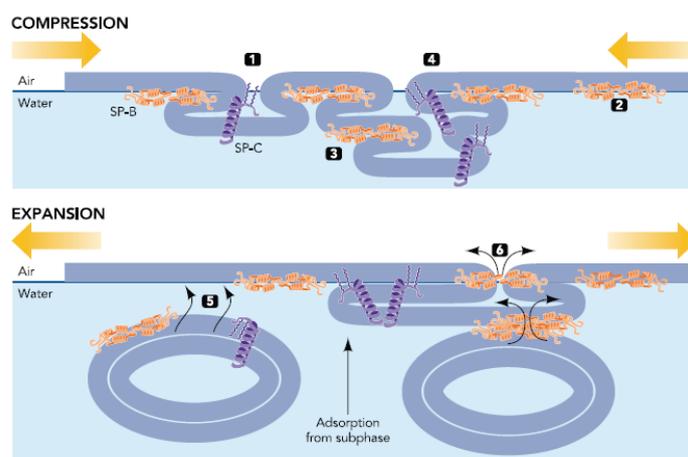


Figura 3: Organización del surfactante en el ciclo respiratorio. Las proteínas hidrofóbicas del

surfactante cumplen una función esencial facilitando un óptimo comportamiento dinámico durante la respiración. Durante la exhalación, el film surfactante se pliega en una formación tridimensional transitoria, formando una estructura compleja que consigue el mínimo de tensión interfacial. La SP-C facilita el plegamiento y la compresión, mediante la expulsión de lípidos y complejos lipo-proteicos desde la interfase (1). SP-B estabiliza el film interfacial (2) y promueve el establecimiento de contactos entre bicapas de PL, logrando un acomodamiento de multicapas (3). SP-B proveería una estabilidad mecánica que permitiría la compresión, posiblemente mediante el incremento de la cohesividad entre las capas de surfactante en el momento de máxima compresión. SP-C podría promover la asociación de las estructuras de surfactante excluido un film densamente empaquetado (4). Ambas proteínas hidrofóbicas promoverían la inserción (5) y el re-spreading (6) de los PL desde la subfase hacia la interfase durante la inspiración (Copiado de Perez Gil y Weaver, 2010).

La estructura del film, su actividad de superficie, su resistencia a disturbios mecánicos, y la susceptibilidad a la acción de los agentes inhibitorios dependen no solo de su composición bioquímica sino también de su arquitectura luego de la adsorción de novo (Schürch et al., 1998). Para una interfase fisiológicamente adecuada no solo importa el mínimo de valor de tensión superficial alcanzado, también se debe tener en cuenta el tiempo demorado en alcanzar ese estado, entendiéndose por ello la velocidad de adsorción o proceso de spreading. Por otra parte, también se debe considerar el grado de compresibilidad de área necesario para lograr esa instancia (Notter et al., 2002). Se puede concluir entonces que desde el punto de vista de capacidad tensioactiva, un surfactante funcional debe ser capaz de adsorberse rápidamente en la interfase; lograr valores extremadamente bajos de tensión durante la compresión y re-expandirse durante la inspiración.

## 6. MECANISMOS DE DEFENSA DEL PULMÓN

La principal función del surfactante consiste en facilitar el proceso de intercambio gaseoso, minimizando la energía que el tejido pulmonar debe aportar para mantener abierta y expuesta la superficie de intercambio durante los sucesivos ciclos de inspiración-espriación. Pero, además, el sistema surfactante constituye una primera barrera a la entrada de microorganismos patógenos ya que muchos de sus componentes moleculares forman parte de mecanismos de defensa innatos.

La extensa superficie de contacto que el epitelio respiratorio expone al medio externo exige la concurrencia de diversos mecanismos de defensa que eviten la entrada masiva de organismos patógenos. En los espacios alveolares coexisten mecanismos de defensa innatos (no mediados por anticuerpos) y mecanismos adaptativos (mediados por anticuerpos). Algunos de esos mecanismos han evolucionado de forma simultánea con el sistema surfactante (Perez Gil, 2010). El sistema pulmonar de defensa está constituido por la suma de los siguientes elementos: clearance muco-ciliar de las vías respiratorias, células fagocíticas (macrófagos alveolares), y las proteínas de defensa SP-A y SP-D. Estas proteínas hidrofílicas son capaces de reconocer, unir y facilitar la depuración de las sustancias infecciosas en el pulmón. Por otro lado, SP-A y SP-D juegan un papel fundamental en la homeostasis del surfactante y en la regulación de las células pulmonares inmunes (Crouch y Wright, 2001).

En ausencia de las proteínas, la acción de captación de las bacterias por parte de los macrófagos es deficiente. También se reduce la producción de radicales y la eliminación de microorganismos, y están incrementados los marcadores de inflamación pulmonar, lo mismo

que las citoquinas, el factor de necrosis y las interleuquinas entre otros (Hartshorn et al., 1998; Kingma y Whitsett, 2006; LeVine et al., 2000). Por otro lado, se ha demostrado que las proteínas hidrofóbicas del surfactante (SP-B y SP-C) poseen actividad antibiótica (Bruhn et al., 2003; Olmeda et al., 2013; Ryan et al., 2006).

## 7. INACTIVACIÓN DEL SURFACTANTE

“Inactivación del surfactante” es una expresión muy amplia que alude a la inhabilidad del surfactante, en diversas condiciones, de proveer una reducida y adecuada tensión superficial. Esta expresión incluye degradación, alteración de la subfase alveolar, de la estructura del film en la superficie, interferencia en la adsorción del tensioactivo o sobrecompresión del mismo.

La falta de un sistema surfactante operativo conduce a problemas respiratorios severos como consecuencia de la dificultad para mantener abiertos los espacios pulmonares. Esto es lo que le puede ocurrir a los niños que nacen prematuramente antes de la semana 35 de gestación. El surfactante es uno de los últimos sistemas en madurar a lo largo del desarrollo fetal; lo hace cuando el feto se está preparando para el parto, momento en que debe cambiar su forma de obtener el oxígeno. La síntesis y acumulación de DPPC se dispara alrededor de la semana 35 de gestación. También en las últimas semanas se incrementa la síntesis de PG y de las proteínas específicas del surfactante. Cuando un bebé nace antes de que sus pulmones dispongan de un surfactante funcional, tiene enormes dificultades para desalojar el líquido amniótico que rellena sus pulmones y poder respirar a través de ellos. Si se fuerza la ventilación de las vías aéreas del bebé prematuro, dada la fragilidad de los tejidos en esas primeras horas de vida, se desencadenan múltiples problemas derivados del daño pulmonar asociado (Pérez Gil, 2010). El umbral de supervivencia de los recién nacidos prematuros experimentó un aumento espectacular a fines de los años ochenta del siglo pasado, cuando se comprobó que bastaba administrar a esos niños con pulmones inmaduros, en el momento de su nacimiento, una dosis de material surfactante exógeno; ello les permitía abrir sus pulmones sin dificultad y el inicio de la ventilación pulmonar estimulaba la producción de su propio surfactante (Sweet y Halliday, 2009)

Por otro lado, la función del surfactante se encuentra comprometida en enfermedades de pulmón entre las que podemos mencionar: síndrome de distress respiratorio agudo (ARDS), injuria pulmonar aguda (ALI), bronquitis crónica, fibrosis quística, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), neumonía. En los trasplantes pulmonares también se ve afectada la fisiología pulmonar (Hohlfeld et al., 1998).

El ARDS es una enfermedad severa que se desarrolla como consecuencia del daño pulmonar, pero también está asociada con una deficiencia o con la inactivación del surfactante (Lewis y Veldhuizen, 2003). Según la American-European Consensus Conference on ARDS, este síndrome se caracteriza por una manifestación inicial severa, una disminución en el índice de oxigenación, infiltrados bilaterales observables en radiografías pulmonares y presión capilar inferior a 18 mmHg. La incidencia de ARDS se ubica entre un 13,5 y un 75 por 100000, y afecta a 16-18% de los pacientes con ventilación asistida en terapia intensiva. A pesar de los esfuerzos realizados para diagnosticar y tratar esta patología, el índice de mortalidad sigue siendo elevado, con tasas de 30-40% (Bernard et al., 1994). Sus manifestaciones clínicas pueden ser resultado de numerosas factores y

constituye la principal causa de mortalidad y morbilidad de enfermedades respiratorias. La administración de un material surfactante exógeno a pacientes afectados produce sólo un efecto transitorio, entre otras razones porque este material resulta también inactivado (Lauer et al., 2006). La filtración de proteínas plasmáticas dentro del espacio alveolar debido a una inadecuada función de la barrera constituida por el endotelio capilar y el epitelio alveolar es un evento muy temprano en la patogénesis del ARDS y podría contribuir sustancialmente a las alteraciones bioquímicas y biofísicas que se producen en el sistema surfactante en esta patología (Günther et al., 2001; Markart et al., 2007). La deficiencia de surfactante afecta la progresión y el pronóstico en el ARDS, así como también se incrementa la posibilidad de desarrollar este síndrome en la población de riesgo (Lauer et al., 2006; Taut et al., 2008).

## 8. TERAPIA SURFACTANTE

La mayoría de las preparaciones de surfactante que se utilizan terapéuticamente son de origen animal; contienen distintas mezclas fosfolipídicas, y en algunos casos las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C. Un desafío de la investigación actual en esta área es la producción de proteínas hidrofóbicas humanas de origen recombinante para desarrollar surfactantes artificiales “humanizados” (Notter et al., 2002; Serrano y Pérez Gil, 2006).

La terapia con surfactante exógeno es el tratamiento indicado en el síndrome de distress respiratorio infantil (IRDS) en los servicios de neonatología. Sin embargo, en algunas situaciones particulares, tales como la del síndrome de aspiración de meconio, sustancias que normalmente no se encuentran presentes en el fluido alveolar inactivan tanto al surfactante endógeno como al exógeno y provocan que el tratamiento de reemplazo con el tensioactivo resulte menos eficaz (Dargaville y Mills, 2005; Finer, 2004; Poulain y Clements, 1995). Por otro lado, la sensibilidad a la inhibición varía notoriamente entre los distintos preparados comerciales de surfactantes, presumiblemente debido a la diferencia en el contenido de las proteínas que presentan estos productos (Bernhard et al., 2000; Blanco y Pérez Gil, 2007; Cheng-Hwa Ma y Sze Ma, 2012).

En los pacientes con ARDS, la administración transbronquial de surfactante pulmonar exógeno mejora el cuadro en muy pocos casos, y sólo el 4,5% del surfactante administrado llega a los pulmones, lo que hace que se necesiten dosis diarias superiores a 5mg/kg con la consecuente sobrecarga pulmonar que ello implica (Günther et al., 2001). En estos pacientes el infiltrado sérico podría ser la causa de la falta de eficacia de la terapia surfactante.

La comprensión de los mecanismos moleculares de la inactivación del surfactante para las diferentes patologías respiratorias ayudaría en el desarrollo de mejores preparaciones. Se han propuesto diferentes teorías para explicar esta inactivación, pero todavía se desconoce mucho acerca del mecanismo a través del cual los distintos componentes del suero podrían estar interactuando con los fosfolípidos y las proteínas del surfactante (Holmet al., 1988 y 1999; Nag et al., 2006; Sáenz y Casal, 2007; Warriner et al., 2002; Zasadzinski et al., 2005).

Como hemos mencionado, el desarrollo de nuevas formulaciones de surfactante debe focalizarse en la preparación de productos sintéticos de composición adecuada, bajo costo y resistentes a la inactivación, de manera que puedan mejorar la eficiencia en el tratamiento de las patologías antes mencionadas. Además deben investigarse nuevas formas farmacéuticas que eviten la instilación transbronquial, tan traumática para los pacientes y procurando así extender el uso del surfactante no solo como principio activo per

se sino también como carrier de otras drogas (antibióticos, antiinflamatorios, anticuerpos específicos, broncodilatadores, drogas lipofílicas para el cáncer, mucolíticos, entre otros) dirigidas al pulmón. El desarrollo de mejores preparaciones abrirá nuevas oportunidades para una exitosa terapia surfactante en numerosas enfermedades pulmonares.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alig T, Warriner H, Lee L, Zasadzinski J. 2004. Electrostatic barrier to recovery of Dipalmitoylphosphatidylglycerol monolayers after collapse, *Biophys. J.* 86:897–904.
2. Avery M, Mead J. 1959. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *AMA J Dis Child.* 97 (5, Part 1):517-23
3. Bachofen H, Schürch S, Urbinelli M, Weibel E. 1978. Relations among alveolar surface tension, surface area, volume, and recoil pressure, *J. Appl. Physiol.* 62:1878–1887.
4. Bachofen H, Schürch S. 2001. Alveolar surface forces and lung architecture. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 129: 183–193.
5. Baritussio A, Magoon M, Goerke J, Clements J. 1981. Precursor-product relationship between rabbit type II cell lamellar bodies and alveolar surface-active material. Surfactant turnover time. *BiochimBiophysActa.* 23;666(3):382-93.
6. Bernard G, Artigas A, Brigham K, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, LeGall J, Morris A, Spragg R. 1994. Report of the American-European Consensus conference on acute respiratory distress syndrome: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. Consensus Committee. *J Crit Care.* 9(1):72-81.
7. Bernhard W, Mottaghian J, Gebert A, Rau G, von Der H, Poets C. 2000. Commercial versus native surfactants. Surface activity, molecular components, and the effect of calcium, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162: 1524–1533.
8. Clements JA. 1997. Lung surfactant: A Personal Perspective. *Annu. Rev. Physiol.* 59:1–21.
9. Cochrane C, Revak S. 1991. Pulmonary surfactant protein B (SP-B): structure-function relationships. *Science* 254:566–568.
10. Creuwels L, van Golde L, Haagsman H. 1997. The Pulmonary Surfactant System: Biochemical and Clinical Aspects. *Lung* 175:1–39
11. Crouch E, Wright J. 2001. Surfactants protein A and D and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol*, 63: 521-554
12. Dargaville P, Mills J. 2005. Surfactant therapy for meconium aspiration syndrome: current status. *Drugs* 65(18):2569-91.
13. de la Serna J, Perez-Gil J, Simonsen A, Bagatolli L. 2004. Cholesterol rules: direct observation of the coexistence of two fluid phases in native pulmonary surfactant membranes at physiological temperatures. *J Biol Chem.*, 279(39):40715-22.
14. de la Serna J, Orädd G, Bagatolli L, Simonsen A, Marsh D, Lindblom G, Perez-Gil J. 2009. Segregated phases in pulmonary surfactant membranes do not show coexistence of lipid populations with differentiated dynamic properties. *Biophys J.* 97(5):1381-9.
15. Finer NN. 2004. Surfactant use for neonatal lung injury: beyond respiratory distress syndrome. *PaediatrRespir Rev Suppl A*:S289-97. Review.
16. Gobran L, Rooney S. 2004. Pulmonary surfactant secretion in briefly cultured mouse type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 286(2):L331-6. Epub 2003 Oct 17.
17. Goerke J, 1998. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim Biophys Acta.* 1408 (2-3):79-89. Review
18. Günther A, Ruppert C, Schmidt R, Markart P, Grimminger F, Walrath D, Seeger W. 2001. Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome. *Respir Res.* 2(6):353-64. Epub 2001 Oct 12.
19. Guttentag S, Robinson L, Zhang P, Brasch F, Bühling F, Beers M. 2003. Cysteine protease activity is required for surfactant protein B processing and lamellar body genesis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 28(1):69-79.

20. Haller T, Dietl P, Stockner H, Frick M, Mair N, Tinhofer I, Ritsch A, Enhorning G, Putz G. 2004. Tracing surfactant transformation from cellular release to insertion into an air-liquid interface. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 286(5):L1009-15.Epub2004 Jan 2.
21. Hartshorn K, Crouch E, White M, Colamussi M, Kakkanatt A, Tauber B, Shepherd V, Sastry K. 1998. Pulmonary surfactant proteins A and D enhance neutrophil uptake of bacteria. *Am J Physiol,* 274:L958-L969.
22. Herzog E, Brody A, Colby T, Mason R, Williams M. 2008. Knowns and unknowns of the alveolus. *Proc Am Thorac Soc.* 5(7):778-82.
23. Hills B, 1999. An alternative view of the role(s) of surfactant and the alveolar model. *Journal of Applied Physiology.* 87 (5) 1567-1583
24. Hohlfeld J, Tiryaki E, Hamm H, Hoymann H, Krug N, Haverich A, Fabel H. 1998. Pulmonary surfactant activity is impaired in lung transplant recipients. *Am J Respir Crit Care Med.* 158(3):706-12.
25. Holm B, Enhorning G, Notter R. 1988. A biophysical mechanism by which plasma proteins inhibit lung surfactant activity, *Chem. Phys. Lipids* 49: 49–55.
26. Holm B, Wang Z, Notter R. 1999. Multiple mechanisms of lung surfactant inhibition, *Pediatr. Res.* 46: 85–93.
27. Holmskov U, Malhotra R, Sim RB, Jensenius JC. 1994. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol Today* 15:67–74
28. Johansson J, Curstedt T, Robertson B. 1994. The proteins of the surfactant system. *Eur Respir J.* 7:372–391
29. Kashchiev D, Exerowa D. 2001. Structure and surface energy of the surfactant layer on the alveolar surface. *Eur Biophys J.* 30(1):34-41.
30. Keating E, Zuo Y, Tadayyon S, Petersen N, Possmayer F, Veldhuizen R. 2012. A modified squeeze-out mechanism for generating high surface pressures with pulmonary surfactant. *Biochim Biophys Acta.* 1818(5):1225-34.
31. King R, Clements J. 1972. Surface active materials from dog lung: II. Composition and physiological correlations. *Am. J. Physiol.* 223:715–725.
32. King R. 1974. The surfactant system of the lung. *Fed Proc.;* 33(11):2238-47.
33. Kingma P and Whitsett J. 2006. In defense of the lung: surfactant protein A and surfactant protein D. *Curr Opin Pharmacol.;*6(3):277-83. Epub2006 Mar 30. Review.
34. Klaus M, Clements J, Havel R. 1961. Composition of surface-active material isolated from beef lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 47:1858–1859.
35. Lauer S, Fischer L, Stubbe H, Van Aken H, Westphal M. 2006. Value of surfactant replacement therapy in the treatment of acute respiratory distress syndrome. *Anaesthesist.* 55(4):433-42.
36. Lauer S, Fischer L, Stubbe H, Van Aken H, Westphal M. 2006. Value of surfactant replacement therapy in the treatment of acute respiratory distress syndrome. *Anaesthesist.* 55(4):433-42.
37. Lewis J, Veldhuizen R. 2003. The role of exogenous surfactant in the treatment of acute lung injury. *Annu Rev Physiol;* 65:613-42. Review.
38. Markart P, Ruppert C, Wygrecka M, Colaris T, Dahal B, Walmrath D, Harbach H, Wilhelm J, Seeger W, Schmidt R, Guenther A. 2007. Patients with ARDS show improvement but not normalization of alveolar surface activity with surfactant treatment: putative role of neutral lipids. *Thorax.* 62(7):588-94.
39. Mead J, Whittenberger J, Radford E. 1957. Surface tension as a factor in pulmonary volume-pressure hysteresis. *J. Appl. Physiol.* 10:191–196.
40. Nag K, Pérez-Gil J, Ruano M, Worthman L, Stewart J, Casals C, Keough K. 1998. Phase transitions in films of lung surfactant at the air-water interface. *Biophys J.* 74(6):2983-95.
41. Nag K, Keough K, Morrow M. 2006. Probing perturbation of bovine lung surfactant extracts by albumin using DSC and 2H-NMR, *Biophys. J.* 90: 3632–3642.
42. Neergaard K.v. 1929. New views on a conceptual basis of the respiratory mechanics. *Z. Total Exp Med* 66:1-22.
43. Notter R, Wang Z, Egan E, Holm B. 2002. Component-specific surface and physiological activity in bovine-derived lung surfactants. *Chem Phys Lipids.* 114(1):21-34.
44. Ochs M. 2010. The closer we look the more we see? Quantitative microscopic analysis of the pulmonary surfactant system. *Cell Physiol Biochem.* 25(1):27-40.
45. Oyarzun M, Clements J. 1978. Control of lung surfactant by ventilation, adrenergic mediators, and prostaglandins in the rabbit. *Am Rev Respir Dis.* 117(5):879-91.
46. Pattle R E. 1955. Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature* 175:1125–1126.
47. Pattle R, Thomas L. 1961. Lipoprotein composition of the film lining of the lung. *Nature* 189:844.

48. Pérez-Gil J. 2008. Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions. *Biochim Biophys Acta.*;1778(7-8):1676-95.
49. Pérez-Gil J. 2010. El sistema surfactante pulmonar. *Investigación y ciencia.* Febrero 38-45.
50. Perez-Gil J, Weaver T. 2010. Pulmonary surfactant pathophysiology: current models and open questions. *Physiology (Bethesda).* 25(3):132-41. Review
51. Pockels A. 1891. Surface tension. *Nature* 43:437–439.
52. **Possmayer F. 1997. Physicochemical aspects** of pulmonary surfactant. In: Polin RA, Fox WW (editors) Philadelphia: W.B. Saunders Company, pp. 1259-75.
53. Poulain F, Clements J. 1995. Pulmonary surfactant therapy. *West J Med.* 162(1):43-50. Review.
54. Putman E, Creuwels LA, van Golde LM, Haagsman HP. 1996. Surface properties, morphology and protein composition of pulmonary surfactant subtypes. *Biochem J.* 1;320 ( Pt 2):599-605.
55. Rausch F, Schicht M, Paulsen F, Ngueya I, Bräuer L, Brandt W. 2012. "SP-G", a putative new surfactant protein--tissue localization and 3D structure. *PLoS One.*7(10):e47789.
56. Ravasio A, Olmeda B, Bertocchi C, Haller T, Pérez-Gil J. 2010. Lamellar bodies form solid three-dimensional films at the respiratory air-liquid interface. *J Biol Chem.* 285(36): 28174-82.
57. Rodríguez-Capote K, Nag K, Schurch S, Possmayer F. 2001. Surfactant protein interactions with neutral and acidic phospholipid films. *Am. J. Physiol.* 281 L231–L242.
58. Rodríguez-Capote K, Manzanares D, Haines T, Possmayer F. 2006. Reactive oxygen species inactivation of surfactant involves structural and functional alterations to surfactant proteins SP-B and SP-C. *Biophys J.* 90(8):2808-21.
59. Ross M, Krol S, Janshoff A, Galla H. 2002. Kinetics of phospholipid insertion into monolayers containing the lung surfactant proteins SP-B or SP-C, *Eur. Biophys. J.*31: 52–61.
60. Rowlinson J and Widom B. 1989. *Molecular Theory of Capillarity.* Clarendon Publishers, Oxford.
61. Saenz A, Casals C. 2007. Mechanisms involved in surfactant inhibition by CRP: the protective role of SP-A, *Eur. Biophys. J.* 36 (Suppl 1): S85.
62. Sato S, Kishikawa T. 2001. Ultrastructural study of the alveolar lining and the bronchial mucus layer by block staining with oolong tea extract: the role of various surfactant materials. *Med Electron Microsc.* 34(2):142-51.
63. Schürch S, Goerke J, Clements J. 1978. Direct determination of volume- and time dependence of alveolar surface tension in excised lungs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75: 3417–3421.
64. Schürch S, Possmayer F, Cheng S, Cockshutt A. 1992. Pulmonary SP-A enhances adsorption and appears to induce surface sorting of lipid extract surfactant. *Am. J. Physiol.* 263:L210– L218.
65. Schürch S, Green FH, Bachofen H. 1998. Formation and structure of surface films: captive bubble surfactometry. *BBA* 1408(2-3):180-202.
66. Serrano A, Pérez-Gil J. 2006. Protein-lipid interactions and surface activity in the pulmonary surfactant system. *Seu et al., 2006*
67. Strutt J. 1871. On the light from the sky, its polarization and color. *Philosophical Magazine, series 4, vol.41, 107-120, 274-279.*
68. Sweet D, Halliday H. 2009. The use of surfactants in 2009. *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 94(3):78-83.
69. Taut F, Rippin G, Schenk P, Findlay G, Wurst W, Häfner D, Lewis J, Seeger W, Günther A, Spragg R. 2008. A Search for subgroups of patients with ARDS who may benefit from surfactant replacement therapy: a pooled analysis of five studies with recombinant surfactant protein-C surfactant (Venticute). *Chest.* 134(4):724-32.
70. Thannhauser S, Benotti J, Boncoddio N. 1946. Isolation and properties of hydrolecithin (dipalmityl lecithin) from lung: its occurrence in the sphingomyelin fraction of animal tissues. *J Biol Chem* 166:669–675.
71. Van Golde LMG. 1995. Potential role of surfactant protein A and D in innate lung defense against pathogens. *Biol Neonate* 67:2–17.
72. Veldhuizen R, Nag K, Orgeig S, Possmayer F. 1998. The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochim Biophys Acta.* 1408(2-3):90-108.
73. Veldhuizen R, Possmayer F. 2004. Phospholipid metabolism in lung surfactant. *Subcell Biochem.* 37:359-88.
74. Walters R, Jenq R, Hall S. 2000. Distinct steps in the adsorption of pulmonary surfactant to an air-liquid interface. *Biophys J.* 78(1):257-66.
75. Warriner H, Ding J, Waring A, Zasadzinski J. 2002. A concentration-dependent mechanism by which serum albumin inactivates replacement lung surfactants. *Biophys. J.* 82: 835–842.

76. Whitsett J, Ohning B, Ross G, Meuth J, Weaver T, Holm B, Shapiro D, Notter R.1986. Hydrophobic surfactant-associated protein in whole lung surfactant and its importance for biophysical activity in lung surfactant extracts used for replacement therapy. *Pediatr. Res.* 20:460–467.
77. Williams M, Hawgood S, Hamilton R. 1991. Changes in lipid structure produced by surfactant proteins SP-A, SP-B, and SP-C. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5:41–50.
78. Wu X, Li S, Wang X, Song Y, Chen Z, Jiang J, Bai C. 2011. Therapeutic role of terbutaline in a rat whole-lung lavage model. *Exp Lung Res*; 37(9):542-8.
79. Zasadzinski J, Alig T, Alonso C, Bernardino de la Serna J, Perez-Gil J, Taeusch H. 2005. Inhibition of pulmonary surfactant adsorption by serum and the mechanisms of reversal by hydrophilic polymers: theory. *Biophys J.* 89(3):1621-9.
80. Zasadzinski J, Stenger P, Shieh I, Dhar P. 2010. Overcoming rapid inactivation of lung surfactant: analogies between competitive adsorption and colloid stability. *BBA.* 1798(4):801-28. Review.
81. Zuo Y, Veldhuizen R, Neumann A, Petersen N, Possmayer F. 2008. Current perspectives in pulmonary surfactant--inhibition, enhancement and evaluation. *Biochim Biophys Acta*;1778 (10):1947-77. Review

## GENETICA Y EPIGENETICA DE LAS ADICCIONES

**Carlos M. Baratti<sup>1\*</sup>, Mariano M Boccia<sup>2,3</sup>, Mariano G. Blake<sup>2,3</sup>, María C. Krawczyk<sup>2,4</sup>**

1 Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica , 2 Laboratorio de Neurofarmacología de los Procesos de Aprendizaje y Memoria, Cátedra de Farmacología, Facultad de farmacia y Bioquímica, UBA, 3 Miembros de la Carrera del Investigador Científico y Tecnológico (CONICET), 4 Becaria del CONICET

\*Correspondencia Doctor CM Baratti

### CONTENIDOS

Resumen .....	54
Summary .....	54
Introducción.....	55
Genética de las adicciones.....	56
Epigenética de las adicciones.....	60
Comentarios finales y conclusiones .....	63
Referencias Bibliográficas .....	64

### RESUMEN

Las adicciones generadas por el empleo reiterado de las drogas de abuso, constituyen un trastorno psiquiátrico crónico y recidivante, definido por la búsqueda y el consumo compulsivo de dichas drogas, pese a las consecuencias negativas personales y sociales, que ello provoca. La vulnerabilidad individual en respuesta a la exposición repetida al alcohol, anfetaminas, cocaína, marihuana, opiáceos, medicamentos psicotrópicos, etc., está condicionada aproximadamente en un cincuenta por ciento por factores genéticos y, en otro cincuenta por ciento, por factores ambientales. La persistencia de las adicciones sugiere un papel relevante de mecanismos epigenéticos, los cuales transducen a los estímulos ambientales para promover cambios en la estructura de la cromatina nuclear los que, a su vez, activan o reprimen a la transcripción génica. Si los cambios epigenéticos provocados por las drogas de abuso pueden ser transferidos a la progenie de un individuo y así influenciar su susceptibilidad hacia ellas, es materia activa de discusión.

**Palabras claves:** Adicciones – Genética – Epigenética

### SUMMARY

## GENETIC AND EPIGENETIC OF ADDICTIONS

Drug addiction is a chronic and relapsing disorder defined as a compulsive drug seeking and taking that continues despite significant personal and social negative consequences. The individual vulnerability in response to repeated exposure to a drug of abuse, is determined roughly half by genetic factors, and half by non-genetic factors which are mainly represented by environmental exposures. The persistence of addictions suggests a significant role for epigenetic mechanisms in these conditions, which transduce environmental stimuli to promote changes in nuclear chromatin structure to activate or repress gene transcription. Whether any drug-induced epigenetic change is transferred to offspring to influence their susceptibility to drug abuse is until now a matter of discussion.

**Key words:** Addictions – Genetic - Epigenetic

## INTRODUCCIÓN

Las adicciones, en particular las generadas ante el consumo reiterado de las llamadas drogas de abuso (alcohol, anfetaminas, analgésicos opiáceos, cocaína, medicamentos sedantes, inhalantes, etc.), son enfermedades psiquiátricas complejas caracterizadas por un primer contacto “casual” o “recreativo” con la droga en cuestión, que **podría** progresar hacia un estado de consumo compulsivo e incontrolado de ella (1,2). Esta situación tiene lugar pese a las consecuencias negativas (personales, que incluyen problemas de salud, sociales, laborales y judiciales) que acarrea dicho comportamiento y aun cuando quien padece el trastorno pueda tener plena conciencia de ello e intente autocontrolarlo (3).

Lo antedicho expresa en términos muy generales la interpretación más clásica de los comportamientos adictivos provocados por las drogas de abuso, que podría también extenderse para otras adicciones (4), y pone su énfasis en el concepto de adicción como una **enfermedad crónica y recurrente** (5), con sustratos biológicos que yacen en el sistema nervioso central (6). Si bien este punto de vista acerca de las adicciones es el más difundido a través de la literatura científica y popular, también existen otros que no acuerdan en un todo con él (7) y mantienen vigentes las discusiones acerca de la naturaleza de las adicciones (8,9), sus tratamientos y posible recuperación del adicto.

En los últimos veinte años se han realizado importantes progresos en el conocimiento de las estructuras neuroanatómicas (amígdala, corteza prefrontal, hipocampo, etc.), de los circuitos (mesocorticolímbico), de los neurotransmisores y neuromoduladores (acetilcolina, ácido gamma aminobutírico, dopamina, péptidos opioides, serotonina, etc.), y de las vías de transducción de las señales involucradas en el síndrome adictivo (6,10,11,12). Sobre la base de esos conocimientos, hemos comenzado a comprender que los reiterados “insultos farmacológicos” causados por las drogas de abuso en los individuos que son vulnerables a ellas, originan cambios patológicos persistentes en los circuitos cerebrales que regulan cómo una persona interpreta a los estímulos que le generan fuertes motivaciones (alimentos, cópula, evitar situaciones peligrosas), ya que están ligados con su propia supervivencia y la de su especie, y cómo reacciona conductualmente frente a ellos (13). Así, las drogas de abuso y eventualmente adictivas interaccionan con, y modifican a, los circuitos cerebrales que nos permiten aprender acerca de los estímulos ambientales significativos, tales como los mencionados más arriba, y adaptarnos a ellos (13). No en vano existe un alto grado de solapamiento neuroanatómico y funcional entre dichos circuitos y aquellos normalmente utilizados en el aprendizaje (14) e involucrados en las diversas fases de los procesos mnésicos (15,16,17,18,19). Ello otorga un respaldo significativo para considerar que en las adicciones se desarrollan procesos de aprendizaje conducentes a memorias persistentes pero no adaptativas, ya que las drogas adictivas, al modificar diversos aspectos neurobiológicos de los circuitos motivacionales, dañan el desarrollo de estrategias conductuales dirigidas hacia los estímulos biológicos naturales, favoreciendo la orientación del comportamiento del individuo hacia la búsqueda y consumo compulsivo de aquellas (13,20).

Sólo algunos individuos parecerían sucumbir a los efectos devastadores causados por el uso reiterado de las drogas de abuso; otros son capaces de emplearlas casualmente y no expresar las características conductuales del síndrome adictivo (11). Así, algunos son más **vulnerables** que otros en cuanto a la predisposición para el inicio del consumo, o bien, cuando éste ya se ha establecido, reiniciarlo luego de permanecer abstinerente (no consumir)

durante períodos más o menos prolongados. Esa vulnerabilidad depende de diversos factores biológicos y psicosociales. Entre los primeros se destacan los de naturaleza esta revisión. Además, la edad, el sexo y el estado de salud general, incluida la presencia de enfermedades mentales, influyen en la vulnerabilidad a las adicciones. Entre los segundos, el medio socioeconómico en que se ha desarrollado el individuo, incluyendo su adecuada inserción en un sistema educativo y laboral capaz de otorgarle igualdad de oportunidades y progreso frente al resto de la sociedad, son también determinantes esenciales para reducir la posibilidad de iniciar el camino que eventualmente podría conducir al síndrome adictivo. Una vez establecido, es deber prioritario por parte de los gobiernos, con el apoyo inequívoco de las sociedades que los legitiman, adoptar las medidas adecuadas y necesarias, no sólo para acudir en rescate del adicto (NIDA, Infofacts, Marzo 2009; [www.drugabuse.gov](http://www.drugabuse.gov)), además de prevenir que se arribe a esa situación. En tal sentido, tengamos presente que el llamado popularmente “mundo de la droga”, se expande y diversifica (WorldDrugReport 2013, UN, New York, 2013).

En las siguientes secciones, revisaremos algunos aspectos esenciales acerca de los factores genéticos y epigenéticos que influyen en la vulnerabilidad hacia las drogas de abuso.

## GENÉTICA DE LAS ADICCIONES

Generalidades. Las adicciones son enfermedades complejas, multifactoriales y poligénicas que no siguen un claro modelo mendeliano de expresión; en ese sentido, se asemejan a otras enfermedades complejas (diabetes, hipertensión, trastornos depresivos, esquizofrenia, obesidad, etc.), para las cuales no se ha podido identificar un único gen que se relacione unívocamente con la vulnerabilidad individual hacia ellas (21,22). Sin embargo, existen pocas dudas acerca de que una carga genética, representada por mutaciones puntuales en determinados genes, representa uno de los factores de riesgo que incrementan la susceptibilidad individual hacia las adicciones (22). Los otros factores de riesgo que se hallan implicados en el inicio y el desarrollo del síndrome adictivo, son de naturaleza no genética, ya que en principio no serían estrictamente heredables, y se los define como “ambientales” (disponibilidad y accesibilidad de la droga de abuso, factores biológicos pre- o postnatales, factores psicosociales, etc.) (22). En este contexto cobra importancia el denominado Índice o Coeficiente de Heredabilidad ( $h^2$ ), el cual representa la proporción de la variabilidad de una característica (atributo, conducta, trastorno) que es causada por diferencias genéticas en una población y en un momento determinado (23). Más específicamente, las diferencias entre los miembros de una población con respecto a una determinada característica, son asignadas a la suma de factores genéticos (varianza genética, VG), no genéticos (varianza ambiental, VA) y de la interacción de ambos factores (varianza genética-ambiental, VGA), suma que representan a la varianza fenotípica total (VF). El cociente  $VG/VF$ , es el antedicho Índice de Heredabilidad ( $h^2$ ), cuyos valores oscilan entre 0 (la varianza fenotípica total es atribuible a influencias no genéticas) y 1 (la varianza fenotípica total es exclusivamente atribuible a factores genéticos). Hasta donde es conocido, parecería que ningún comportamiento adictivo está determinado exclusivamente por la carga genética ( $h^2=1$ ) o por factores no genéticos ( $h^2=0$ ). Los estudios comparativos realizados entre gemelos fraternos (mellizos) y gemelos monocigotas (gemelos verdaderos) y de adopción, arrojan valores de  $h^2$  que van de 0.4 a 0.7, con respecto a la heredabilidad de

de genes que predispondrían a las adicciones a las drogas de abuso (alcohol: 0,5; cocaína: 0,6; opiáceos: 0,7) (23). A partir de lo antedicho, hasta un 50 % del riesgo de incurrir en una adicción generada por las drogas de abuso más frecuentes podría ser atribuible a factores heredables, riesgo que se incrementa de 4 a 8 veces si existen parientes en primer grado que manifiestan tal condición (23). Aun así, los genes representan factores de riesgo que incrementan la probabilidad de ocurrencia de una adicción, pero no garantizan que tal condición efectivamente tenga lugar (23).

Genes. Los estudios neurobiológicos del síndrome adictivo, han puesto de manifiesto un conjunto significativo de modificaciones anatómicas y funcionales en distintas regiones cerebrales, a las cuales se considera ligadas con el consumo desmedido de las drogas de abuso y sus consecuencias inmediatas y mediatas sobre el comportamiento y el estado de salud general del individuo afectado (1). En tal sentido, toda la maquinaria sináptica básica que sostiene el funcionamiento de las neuronas (neurotransmisores, receptores, vías de señalización, enzimas, canales iónicos, genes de expresión inmediata, etc.) sufre el impacto de aquellas. Si los genes generan las proteínas estructurales y funcionales que constituyen “los ladrillos” de los mecanismos celulares antes citados, la posible identificación de genes vinculados con las adicciones requeriría una vinculación muy sólida entre éstos y los “ladrillos”. Por otra parte, cada uno de los comportamientos que podrían contribuir al desarrollo de una adicción, tendrían algún tipo de correlato neurobiológico y su correspondiente “genética”, lo cual torna mucho más difícil otorgarle a un gen aislado un papel determinante y específico en la generación y persistencia de una adicción. Un estudio reciente llevado a cabo en la Universidad de Pekín, China, que toma como base más de 1000 trabajos publicados entre 1976 y 2006 y en los cuales se señala la existencia de vínculos entre genes y regiones cromosómicas con las adicciones a las drogas, pone en evidencia que ello sería posible para aproximadamente 1500 genes; de ese total, 396 fueron utilizados para construir un “mapa de genes y sus productos”, del que surgen cinco vías moleculares que parecen ser compartidas por las drogas más comunes (alcohol, cocaína, nicotina y opiáceos) (25). El mapa revela una llamativa semejanza con varias vías que son consideradas parte de los circuitos neuronales implicados en las adicciones (6), pero también, por primera vez, le otorga un posible papel a las sinapsis eléctricas (“gap-junctions”) en las adicciones provocadas por las drogas de abuso.

La genética epidemiológica trata de explicar las diferencias entre los individuos. Ello es relativamente simple cuando la variabilidad se analiza en poblaciones animales (ratas, ratones, moscas), cuyos genes pueden ser controlados en experimentos de cruzamiento y/o son criados en ambientes controlados. En los seres humanos, el control genético viola principios éticos y ello también puede ser aplicable al control ambiental para estos fines y aun cuando este control tuviese lugar, es probable que fuese más “artificial” que “natural”. A pesar de estas limitaciones, es factible realizar estudios genéticos epidemiológicos en las poblaciones humanas mediante diseños que analizan muestras de individuos genéticamente relacionados (familias, estudios de adopción, gemelos) y estudios de genética molecular (ligamiento y asociación). Los Estudios de Asociación del Genoma Completo (o Ampliado) (EAGC) (26) analizan la variación genética a lo largo de todo el genoma, humano o de otra especie, con el objeto de identificar su asociación con un rasgo observable; en general, la variante genética en estudio corresponde a los llamados **polimorfismos de un solo (o único) nucleótido** (SNPs), a los cuales nos referiremos brevemente a continuación.

Polimorfismos genéticos. Son caracteres monogénicos multialélicos que se encuentran presentes en una población con una frecuencia superior al 1 %. Desde el punto de vista de sus estructuras moleculares existen diversos tipos de polimorfismos, aunque el

más conocido y frecuente es el antes mencionado polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), en el cual una única base es reemplazada por otra en un sitio específico del genoma (27). Constituyen hasta el 90 % de las variaciones genéticas totales del genoma humano y se presentan, en promedio, cada 1300 pares de bases; se localizan en regiones intrónicas, exónicas, reguladoras e intergenómicas.

Si bien los SNPs en forma aislada no parecerían influenciar de manera significativa a las funciones de los genes, muchos de ellos afectan a la farmacocinética y a la farmacodinamia de diversos tipos de drogas, incluidas las de abuso, en la medida en que los componentes fundamentales de esos procesos (receptores, transportadores, enzimas, canales, etc.) sufren polimorfismos (28,29,30). Como ejemplos puntuales de lo antedicho, nos referiremos a los polimorfismos que afectan al metabolismo del etanol (EtOH), incorporado al organismo a través de diversos tipos de bebidas alcohólicas, y de la nicotina, principal componente adictivo presente en el tabaco. En ambos casos, también resumiremos los efectos de algunos polimorfismos que influyen a la farmacodinamia de dichas sustancias, siempre con relación a los comportamientos adictivos que son capaces de generar.

Polimorfismos en el metabolismo del etanol: las enzimas fundamentales involucradas en el metabolismo del EtOH son la alcohol deshidrogenasa (ADH), que cataliza la conversión del alcohol en acetaldehído, y la aldehído deshidrogenasa (ALDH), que oxida al acetaldehído hacia acetato (31). Ambas enzimas presentan distintas formas moleculares que difieren en sus propiedades cinéticas, localización subcelular, distribución tisular y étnica, y su codificación está determinada por varios genes (31). Así, las ADH humanas son codificadas por siete genes (ADH1A, 1B, 1C, 4, 5,6 y 7) alineados en el cromosoma 4q y cuyos productos dan origen a cinco clases de ADH (I a V) diferenciables en base a sus similitudes estructurales y cinéticas (31). El gen ADH1B, codifica a la deshidrogenasa de igual nombre y presenta el polimorfismo ADH1B\*1 Arg48His, en el cual el aminoácido Arginina 48 ha sido sustituido por Histidina. La enzima resultante muestra un incremento significativo en su capacidad para metabolizar EtOH hacia acetaldehído, favoreciendo su acumulación transitoria; la presencia de este polimorfismo podría considerarse un factor de protección para el consumo del alcohol si se toman en cuenta las propiedades aversivas del metabolito (31). Por otra parte, el acetaldehído generado durante la oxidación del EtOH es metabolizado por dos enzimas principales: la ALDH1 (citósolica), codificada por el gen ALDH1A1 (cromosoma 9) y por la ALDH2 (mitocondrial), codificada por el gen ALDH2 (cromosoma 12). Una variante alélica codificante de la enzima mitocondrial, denominada ALDH2\*2, que resulta de la sustitución del aminoácido Lisina (posición 487) por glutámico, da lugar a una enzima prácticamente inactiva frente a su sustrato natural (acetaldehído) (31). Los portadores homocigotas de este polimorfismo (en su mayoría asiáticos), aun ante la ingestión de pequeñas cantidades de bebidas alcohólicas registran niveles sanguíneos elevados de acetaldehído (32), que serían responsables, en parte a través de la liberación de histamina, del característico rubor cutáneo ("flushing") que provoca el alcohol en estos individuos. El rubor, si bien es una expresión fenotípica molesta y reveladora de la ingesta alcohólica, también va acompañado de cefaleas, náuseas, palpitaciones y, en algunos casos, severos colapsos cardiovasculares que ponen en riesgo la vida. Estas reacciones adversas que acompañan al consumo de alcohol, "disuadirían" a los portadores del polimorfismo de continuar con esa práctica, de modo tal que el alelo alélico del gen ALDH2, también actuaría como un factor de protección frente a un posible abuso de bebidas

alcohólicas (32). Sin embargo, el efecto protector del alelo ALDH2\*2, al igual que el de otros alelos, puede ser modulado por factores ambientales (sociales), de modo tal que los portadores heterocigotos de este alelo (ALDH2\*2/ALDH2\*1), normalmente protegidos en un 75 %, pueden tornarse adictos al alcohol (24). Es interesante recordar que la inhibición de la ALDH por medios farmacológicos (disulfiram) (1), combinado con tratamientos psicosociales, disminuye la cantidad y frecuencia de la ingesta alcohólica (Consenso APA y ATA, 2010) y que el acetaldehído podría ser un mediador de alguna de las acciones reforzadoras del EtOH capaces de promover su consumo, al menos en ciertos modelos experimentales de autoconsumo de etanol, en los cuales se facilita el metabolismo cerebral del alcohol hacia acetaldehído a través de catalasas, sin cambios en los niveles periféricos de éste (33); no se conocen aún los blancos moleculares sobre los cuales actuaría el acetaldehído a nivel cerebral y que podrían estar vinculados con sus propiedades reforzadoras (33).

Los efectos reforzadores positivos del EtOH se ejercen a través de la vía mesocorticolímbica, no sólo con la participación del neurotransmisor DA, sino también de la acetilcolina, el ácido gamma aminobutírico (GABA), el glutamato, la serotonina y de varios péptidos (dinorfina, péptido Y, etc.) (34). En tal sentido, se han descrito mutaciones en los genes que codifican a la subunidad GluNA2 del receptor NMDA para el glutamato y de la subunidad  $\beta_1$  del receptor GABA<sub>A</sub> para el GABA, que favorecen el consumo de alcohol. Un inicio temprano de la ingesta alcohólica, tendría relación con cambios en los receptores D<sub>2</sub> para la dopamina, mientras que los receptores Y<sub>2</sub> para el neuropéptido Y, estarían asociados con la ingesta abusiva del EtOH, el síndrome de retirada que se desencadena ante su ausencia aguda y su empleo simultáneo con la cocaína (22,34).

Polimorfismos en el metabolismo de la nicotina: la nicotina actúa a nivel del sistema nervioso central (SNC) a través de su interacción con los receptores colinérgicos nicotínicos neuronales (nAChRs) (35), los cuales son canales iónicos activados por ligandos, y cuya estructura está determinada por el ensamble de cinco subunidades, iguales o diferentes, que dan origen al canal en la membrana de los terminales nerviosos colinérgicos. Se conocen 9 subunidades  $\alpha$  ( $\alpha_2$  - $\alpha_{10}$ ) y tres subunidades  $\beta$  ( $\beta_2$  - $\beta_4$ ); el subtipo más abundante de nAChRs en el SNC, es el que contiene a las subunidades  $\alpha_4$  y  $\beta_2$  ( $\alpha_4\beta_2$ nAChR) y se lo considera de importancia primordial para las acciones adictivas de la nicotina y como un blanco molecular esencial para la acción de algunas drogas aprobadas para el tratamiento del hábito de fumar (1,21,35). Sin embargo, también se conocen variantes genéticas en el agrupamiento de genes CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4, localizados en el cromosoma 15q25, los cuales codifican para las subunidades  $\alpha_5$ ,  $\alpha_3$  y  $\beta_4$  respectivamente, todas las cuales incrementan la vulnerabilidad al tabaco y a las enfermedades vinculadas con su abuso (35). Por último, los nAChRs también podrían estar involucrados en distintos aspectos de las adicciones producidas por el alcohol, la cocaína, los cannabinoides y los opiáceos (36).

Las variantes genéticas que alteran al metabolismo de la nicotina, contribuyen de manera significativa para definir distintos fenotipos ligados al hábito de fumar. La mayor parte de la nicotina es primariamente metabolizada por el citocromo P450 2A6 (CYP2A6) a conitina y ésta, mediante el mismo citocromo, hacia 3'hidroxiconitina (37). Para este citocromo se han identificado más de 37 alelos que influyen al metabolismo de la nicotina (36), dando lugar a marcadas diferencias de acuerdo al sexo (el metabolismo de la nicotina es más rápido en las mujeres y se acelera en presencia de estrógenos) y al grupo étnico (los asiáticos metabolizan más lentamente a la nicotina, comparados con los caucásicos). Los portadores de variantes alélicas que los califica como "metabolizadores rápidos" de nicotina, consumen un mayor número de cigarrillos/día, comparados con los "metabolizadores

rápidos” de nicotina, consumen un mayor número de cigarrillos/día, comparados con los “metabolizadores lentos”; en estos últimos, la dependencia al tabaco se reduciría con la edad y parecen estar menos expuestos al desarrollo de cánceres pulmonares, al menos cuando en su gestación participa la nitrosamina (4-metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), específica del tabaco, la que se convierte en cancerígena a través del CYP2A6 (29). Algunas variantes alélicas del CYP2B6, si bien no modifican significativamente a la eliminación sistémica de la nicotina, podrían alterar al metabolismo de esta a nivel del SNC (38).

Acceso a datos genéticos relativos al consumo de drogas de abuso: El desarrollo alcanzado por diversas tecnologías durante la última década, que permiten analizar cientos de miles de variantes genéticas (SNPs) en un gran número de individuos, ha facilitado la realización de los Estudios de Asociación del Genoma Completo (o Ampliado) (conocidos como GWAS), en los que se busca establecer una asociación de variantes genéticas con una enfermedad compleja ([www.genome.gov/gwastudies](http://www.genome.gov/gwastudies)). En lo atinente a las drogas de abuso, lícitas e ilícitas, remitimos al lector a los bancos de datos que disponen algunos consorcios de investigación genética y que están disponibles para la comunidad científica (NIDA Genetics Consortium [www.nida.nih.gov/about/organization/genetics/consortium/index.html](http://www.nida.nih.gov/about/organization/genetics/consortium/index.html)); Database of Genotypes and Phenotypes (dbGaP; [www.ncbi.nlm.nih.gov/gap](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap)) y NIAAA'S Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism (COGA; [www.niaaa.nih.gov/ResearchInformation/Extramuralresearch/SharedResources/projcoga.htm](http://www.niaaa.nih.gov/ResearchInformation/Extramuralresearch/SharedResources/projcoga.htm)).

## EPIGENÉTICA DE LAS ADICCIONES

Generalidades. Las adicciones a las drogas de abuso pueden ser consideradas como una forma de plasticidad neuronal no adaptativa que ocurre en individuos vulnerables ante el consumo reiterado de este tipo de sustancias. La vulnerabilidad está condicionada en un cincuenta por ciento por factores genéticos (aun cuando no se han identificado genes específicos) y por factores no genéticos (ambientales), como así también por eventos aleatorios que tienen lugar durante el desarrollo. Una vez que los comportamientos adictivos se han establecido, sus consecuencias personales y sociales pueden permanecer durante largo tiempo. Estas características de las adicciones a las drogas de abuso, sugieren un papel importante para los **mecanismos epigenéticos** en su génesis y desarrollo. Estos mecanismos pueden ser vistos como el **vehículo a través del cual el ambiente interactúa con el genoma de un individuo, para determinar todos los aspectos de sus funciones, tanto en condiciones de salud, como de enfermedad** (39,40).

**Mecanismos Epigenéticos.** Si los tres billones de nucleótidos del ADN del genoma humano se desplegaran en línea recta, su longitud alcanzaría aproximadamente 2 metros. En el núcleo de las células eucariotas, el ADN se compacta asociándose a proteínas histónicas (básicas) y no histónicas, para dar origen a la cromatina. La unidad fundamental de la cromatina o **nucleosoma**, está formada por el ADN que se enrolla dos vueltas alrededor de un octámero de histonas (dos copias de H2A, H2B, H3 y H4), en forma similar a un hilo que forma un ovillo en un carretel. La cromatina condensada (heterocromatina) no permite la transcripción de los genes, mientras que la más laxa (eucromatina) sí lo hace (41). Son precisamente los diversos mecanismos epigenéticos que resumiremos a continuación, los responsables del espaciamiento de los nucleosomas y del grado de condensación de la cromatina (40).

El término epigenética (“por encima de la genética”) puede ser definido como un conjunto de procesos bioquímicos a través de los cuales se alcanzan modificaciones en la expresión de los genes, las cuales pueden ser de larga duración, pero no necesariamente heredables, sin que ello implique alteraciones en la secuencia del ADN. Los mecanismos epigenéticos más relevantes identificados hasta el presente son: metilación del ADN, modificaciones postraslacionales de las histonas que integran los nucleosomas, interacciones con ARNs no codificantes y remodelación de la cromatina mediante complejos enzimáticos (ATP-dependientes) que reestructuran a los nucleosomas (40).

La metilación del ADN es indispensable para el desarrollo y la supervivencia celular a lo largo de toda la vida del organismo y desempeña un papel determinante en la inactivación del cromosoma X y en el “sellado” (“imprinting) de genes en los mamíferos (40). Implica la adición covalente de un grupo  $-CH_3$  (aportado por la S-adenosilmetionina, SAM) al C5 de la base citosina, catalizada por una familia de ADN metiltransferasas (DNMTs) y tiene lugar principalmente en pequeños agrupamientos de dinucleótidos CpG (citosina-fosfato-guanina) conocidos como “islas CpG”, presentes en las cercanías de las regiones de inicio del proceso de transcripción de genes específicos y de genes “guardianes”. La DNMT1, llamada “de mantenimiento”, incorpora grupos  $-CH_3$  al ADN hemimetilado (hay islas CpG metiladas en una sola de sus cadenas) y posibilita que las moléculas del ADN conserven un patrón de metilación luego de la mitosis; las DNMT3a y b, llamadas “de novo”, metilan sitios CpG en cualquiera de las cadenas del ADN previamente no metilados, y se expresan significativamente en las células embrionarias. En los animales de experimentación, la remoción de los genes que codifican a las DNMTs es letal, mientras que en los seres humanos, su sobreexpresión puede estar ligada a una variedad de cánceres (42).

La consecuencia funcional de la metilación del ADN es la supresión de la transcripción génica, que puede, en casos de hipermetilación, ser “silenciada por completo” (40.42).

El mecanismo epigenético mejor conocido de remodelación de la cromatina nivel del SNC, corresponde a las modificaciones postraslacionales covalentes de las histonas, que tienen lugar a nivel de sus extremos N-terminales (“colas”) sobre distintos residuos de aminoácidos (40). Se considera que la suma de las modificaciones operadas en las histonas en un gen determinado, define un estado epigenético de activación o silencio de dicho gen (código de histonas) (40).

Algunos estudios realizados en animales de laboratorio sometidos a la administración aguda o repetida de drogas estimulantes, tales como la cocaína y las anfetaminas, asociados al empleo de las técnicas de micromatrices (“microarrays”) para la detección de cambios en la expresión de ARNs mensajeros en las regiones citadas, sugieren que varios genes pueden ser rápidamente inducidos ante la administración aguda de cocaína, entre ellos los que codifican a los factores de transcripción cFos, FosB y deltaFos (40, 43). Otros genes, por ejemplo los que codifican a los factores de transcripción NF $\kappa$ B y BDNF, son inducidos ante una única administración de cocaína, sólo si ésta fue previamente inyectada (o autoadministrada) de manera crónica (43).

Ya se ha dicho que existe una clara superposición entre las regiones neuroanatómicas y los mecanismos neuroquímicos y moleculares que participan en los procesos normales de aprendizaje y memoria, y aquellos que son afectados por las drogas de abuso, y que a partir de ello podrían conducir a la instalación y expresión de conductas aberrantes características del síndrome adictivo (20). Dado que los procesos normales de

de aprendizaje y memoria, y aquellos que son afectados por las drogas de abuso, y que a partir de ello podrían conducir a la instalación y expresión de conductas aberrantes características del síndrome adictivo (20). Dado que los procesos normales de aprendizaje y memoria también parecerían ser influenciados por distintos marcadores epigenéticos (44, 45), deberá establecerse si las remodelaciones de la cromatina a nivel de los genes que se hallan implicados en el aprendizaje y la memoria, tienen algún tipo de vínculo con las “memorias de las adicciones”.

**Herencia epigenética.** Tanto los eventos ambientales transitorios, como los reiterados, modifican al código epigenético (46). Es posible que la acumulación de marcadores epigenéticos a lo largo de la vida, otorgue ventajas adaptativas a los descendientes de los portadores de dichos marcadores, aunque también es factible que dicha situación se asocie con la predisposición para la adquisición de enfermedades complejas, entre ellas las adicciones a las drogas de abuso (46). Los efectos epigenéticostransgeneracionales (EET), tienen lugar cuando un factor ambiental induce cambios epigenéticos que pueden ser observados al menos en una subsecuente generación (46). Una vía para la concreción de un EET tendría lugar durante la vida prenatal e implica una programación fetal. En este caso, los factores ambientales instalarían cambios epigenéticos en las células somáticas del feto en desarrollo, los cuales podrían expresarse como fenotipos en su vida post-natal. Por otra parte, los marcadores epigenéticos presentes en una generación, se propagarían a otra mediante interacciones conductuales y sociales entre padres e hijo y requiere que los factores ambientales permanezcan presentes en cada generación; en términos genómicos, no se la considera una verdadera herencia. Un ejemplo de ello se tendría en la transferencia de los cuidados maternos que desarrollan las hembras durante la crianza de sus crías, los cuales son expresados de igual modo por las hembras hijas cuando se encuentran en la misma situación (46,47). Por último, existiría una transmisión de información epigenética a través de las células germinales (óvulos y espermatozoides) de la generación parental en las cuales se establecen los marcadores epigenéticos mantenidos mediante las divisiones meióticas, a la progenie (47).

Si bien la discusión acerca de la herencia transgeneracional de los marcadores epigenéticos permanece abierta, varios estudios la demuestran al menos parcialmente (48). Uno de los primeros que puso de manifiesto la relevancia de la herencia epigenética fue realizado en individuos que habían sido expuestos prenatalmente a la gran hambruna de 1944 en Holanda (49). En la sangre de estas personas, sesenta años más tarde de finalizada la II Guerra, se encontró un menor grado de metilación del gen que codifica al Factor II de Crecimiento Insulina Símil (IGF2), que es esencial para el crecimiento y el desarrollo (49). La exposición a diversas toxinas ambientales, algunas de ellas calificadas como alteradoras del metabolismo, durante la gestación, induce cambios epigenéticos permanentes en las células germinales, los cuales transmiten alteraciones a las subsecuentes generaciones durante su vida adulta, sin que éstas se encuentren sometidas a las acciones directas de dichas toxinas (49). Las crías hembras que han recibido un adecuado cuidado materno durante su vida temprana también prodigarán dichos cuidados a sus descendientes. Los modelos animales que permiten analizar los efectos del estrés y de la separación materna sobre las siguientes generaciones, indican que se producen de metilación en las regiones promotoras de varios genes en las células germinales y en el cerebro de los machos separados (48). En cuanto a una posible herencia epigenética transgeneracional de la vulnerabilidad hacia las drogas de abuso, se ha

demostrado, por ejemplo, que la autoadministración de cocaína durante el período de espermatogénesis en ratas macho, provoca alteraciones de la metilación de histonas asociadas a determinados genes de los espermatozoides, las cuales son retenidas y transmitidas sólo a sus progenies (F1) macho. Esta modificación epigenética se asocia con un incremento de los niveles del BDNF en la corteza prefrontal medial y, curiosamente, con un menor consumo de cocaína en la vida adulta de esta progenie, lo cual significaría que los cambios moleculares observados contribuirían a reducir la vulnerabilidad de la progenie para un consumo excesivo de cocaína. Estos datos, derivados de un modelo experimental, se oponen a los proporcionados por los estudios epidemiológicos humanos, que en general sugieren que los hijos de padres que abusan o son adictos a diversas clases de drogas son más vulnerables a ellas (45, 48, 50). Los cambios en la expresión de genes y sus consecuencias moleculares y conductuales esbozados en los párrafos anteriores, y que obedecerían a variaciones epigenéticas heredables, deben, en un futuro próximo, ser perfectamente diferenciados de los heredados por vía estrictamente genética a partir de la información contenida en el propio ADN (4).

## COMENTARIOS FINALES Y CONCLUSIONES

Las adicciones a las drogas de abuso, lícitas o ilícitas, y quizás a otras de naturaleza no farmacológica (alimentos, sexo, juego, tecnologías, redes sociales, etc.), constituyen trastornos psiquiátricos crónicos y recidivantes, caracterizados por la búsqueda y consumo compulsivo de una de aquellas sustancias, pese a tener plena conciencia de las consecuencias negativas que tal comportamiento conlleva para el individuo vulnerable a ellas (1). Desde un punto de vista médico, son enfermedades multifactoriales complejas, cuya vulnerabilidad está condicionada tanto por factores genéticos, que contribuirían groseramente en un 50%, aun cuando hasta el momento no se han identificado genes específicos (23), y por factores no genéticos que aportarían el otro 50%, los cuales incluyen a eventos aleatorios que tienen lugar durante el desarrollo, y a la exposición a diversas señales ambientales, en las que se integran distintos factores sociales y psicológicos, junto al tipo de droga que eventualmente podría ser abusada, su disponibilidad y accesibilidad, modelos de consumo que se modifican en el tiempo y de acuerdo a los grupos sociales que están sometidos a él (WorldDrugReport 2012, UnitedNationsPublication Sales ), etc. Así, la vulnerabilidad para la adquisición y el desarrollo de una adicción depende, en primera instancia, no de la suma, sino de una interacción entre genes y ambiente (51). La epigenética y la genética trabajan de consuno para proporcionar un mecanismo integrado de expresión génica (48) y es clave para comprender cómo el ambiente interacciona con el genoma sin afectar a la secuencia del ADN, permitiendo que los genes modifiquen su expresión (40). En el contexto de las adicciones a las drogas de abuso, su administración repetida induce cambios en los tres mayores mecanismos de regulación epigenética (metilación del ADN, modificaciones covalentes post-traduccionales de las histonas nucleosómicas y ARNs no codificantes (40), localizables en las áreas de recompensa (núcleo accumbens, área ventral tegmental y corteza prefrontal) del cerebro (1), cambios que, a través de modificaciones persistentes en la expresión de genes, contribuirían a los fenotipos conductuales aberrantes que caracterizan a las adicciones, en particular las generadas por la cocaína y congéneres, y las anfetaminas (40). Se requiere mucha más información para asegurar que las modificaciones epigenéticas inducidas por las

las drogas de abuso y otros factores ambientales, incluidos los medicamentos, son transferidas a las progenies de los consumidores primarios y, de serlo, influyen su susceptibilidad a las condiciones ambientales citadas. La transmisión transgeneracional requeriría que los cambios epigenéticos inducidos por el ambiente tuviesen también lugar en las células germinales (óvulos y espermatozoides) para persistir en el embrión y así afectar a las funciones cerebrales. Como se ha mencionado, existen algunas, pero insuficientes, evidencias acerca de ello (40). En conclusión, durante los últimos años se ha incrementado notablemente el conocimiento del papel que desempeñan los genes en el SNC de los seres humanos y de cómo sus productos son influenciados por otros genes y por el ambiente, tanto durante el período prenatal, el desarrollo y la vida adulta, mientras que los avances de la epigenética comienzan a clarificar la naturaleza molecular de los cambios neuroplásticos que tienen lugar en regiones específicas y que facilitan la transición desde un empleo casual (recreativo) hacia uno crónico y por fin compulsivo, de las drogas de abuso (8).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Baratti, C.M., Boccia M.M., Blake, M. G., Krawczyk, M. (2009) Neurofarmacología de las drogadicciones. *Revista Farmacéutica* 151(2):5-20.
- (2) Meyer, R.E. (1996) The disease called addiction: Emerging evidence in a 200-year debate. *The Lancet* 347:162-166.
- (3) Hyman, S.E., Malenka, R. C., Nestler, E.J. (2006) Neural mechanisms of the addiction: The role of reward-related learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 29:565-598.
- (4) Pelchat, M.L. (2009) Food addiction in humans. *J Nutr.* 139:620-622.
- (5) Leshner, A.I. (1997) Addiction is a brain disease, and it matters. *Science* 278:45-49.
- (6) Volkow, N. D., Wang G.J., Fowler, J.S., Tomasi D. (2012) Addiction circuitry in the human brain. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52:321-336.
- (7) Heyman, G.M. (2013) Quitting Drugs: Quantitative and qualitative features. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 9:29-59.
- (8) Volkow, N.D., Baler, R.D. (2014) Addiction science: Uncovering neurobiological complexity. *Neuropharmacol.* 76:235-249.
- (9) Wise, R.A., Koob, G.F. (2014) The development and maintenance of drug addiction. *Neuropsychopharmacol.* 39:254-262.
- (10) Feltenstein, M.W., See, R.E. (2008) The neurocircuitry of addiction: An overview. *Br. J Pharmacol.* 154:261-274.
- (11) Nestler, E.J. (2013) Cellular basis of memory for addiction. *Dialogues Clin. Neurosci.* 15:431-443.
- (12) Stuber, G.D., Britt J.P., Bonci, A. (2012) Optogenetic modulation of neural circuits that underlie reward seeking. *Biol. Psychiatry* 71(12):1061-1067.
- (13) Kalivas, P.W., O'Brien, C. (2008) Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacol.* 33:166-180.
- (14) Kelley, A.E. (2004) Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron* 44:161-179.
- (15) Baratti, C. M., Boccia M. M., Blake, M. G. (2009) Pharmacological effects and behavioral interventions on memory consolidation and reconsolidation. *Braz. J Med. Biol. Res.* 42:148-154.
- (16) Berke, J.D. (2003) Learning and memory mechanisms involved in compulsive drug use and relapse. *Meth. Mol. Med.* 79:75:100.

- (17) Cleva, R. M., Gass, J. T. (2010) Neuroanatomical structures underlying the extinction of drug-seeking behavior. *The Open Addiction J.* 3:63-75.
- (18) Tronson, N.C., Taylor, J.D. (2013) Addiction: A drug-induced disorder of memory reconsolidation. *Current Opinion in Neurobiol.* 23(4):573-580.
- (19) Torregrossa, M. M., Taylor, J. R. (2013) Learning to forget: Manipulating extinction and reconsolidation processes to treat addiction. *Psychopharmacol.* 226(4):659-672.
- (20) Torregrossa, M.N., Corlett, P.R., Taylor, J.R. (2011) Aberrant learning and memory addiction. *Neurobiol. Learn. Mem.* 96:609-623.
- (21) Duncan, J.R. (2012) Current perspectives on the neurobiology of drug addiction: A focus on genetics and factors regulating gene expression. *ISRN Neurol.* 2012:1-24.
- (22) Volkow, N.D., Muenke, M. (2012) The genetics of addiction. *Hum. Genet.* 131:773-777.
- (23) Urbanoski, K.A., Kelly, J.F. (2012) Understanding genetic risk for substance use and addiction: A guide for non-genetists. *Clin. Psychol. Rev.* 32:60-70.
- (24) Kalant, H. (2010) What neurobiology cannot tell us about addiction. *Addiction* 5:780-789.
- (25) Li, C. Y., Mao, X., Wei, L. (2008) Genes and (common) pathways underlying drug addiction. *PLOS Comp. Biol.* 4(1):28-34.
- (26) Manolio, T.A. (2010) Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl. J Med.* 363:166-176.
- (27) Brookes, A.J. (1999) The essence of SNPs. *Gene* 234:177-186.
- (28) Nieratschker, V., Batra, A., Fallgater, A.J. (2010) Genetics and epigenetics of alcohol dependence. *J Mol. Psychiatry* 1:11-18.
- (29) Benowitz, N.L. (2010). Nicotine addiction. *N Engl. J Med.* 362(24):2295-2303.
- (30) Herman, A. I., Balog, C. N. (2012) Polymorphisms of serotonin transporter and receptor genes: Susceptibility to substance abuse. *Substance Abuse and Rehabilitation* 3:49-57.
- (31) Edenberg, H.J. (2007) The genetics of alcohol metabolism. Role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. *Alcohol Res. & Health* 30(1):5-13.
- (32) Quertemont E. (2004) Genetic polymorphism in ethanol metabolism: Acetaldehyde contribution to alcohol abuse and alcoholism. *Mol. Psychiatry* 9:570-581.
- (33) Karahanian, E., Quintanilla, M.E., Tampier, L., Rivera-Maza, M y col. (2011) Ethanol as a prodrug: Brain metabolism of ethanol mediates its reinforcing effects. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 35(4):606-612.
- (34) Morozova, T., Goldman, D., Mackay, T., Anholt, R. (2012) The genetic basis of alcoholism: Multiple phenotypes, many genes, complex networks. *Genome Biol.* 13:239-250.
- (35) Picciotto, M. R., Kenny, P. J. (2012) Molecular mechanisms underlying behaviors related to nicotine addiction. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* A012112.
- (36) Tuesta, L., Fowler, C.D., Kenny, P.J. (2011) Recent advances in understanding nicotinic receptor signaling mechanisms that regulate drug self-administration behavior. *Biochem. Pharmacol.* 82(8):984-995.
- (37) Benowitz, N.L. (2009) Pharmacology of nicotine: Addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49:57-71.
- (38) Khokhar, J.L., Ferguson, C.S., Zhu, A., Tyndale, R.F. (2010) Pharmacogenetics of drug dependence: Role of gene variations in susceptibility and treatment. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50:39-61.
- (39) Jaenisch, R., Bird, A. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genetics* 33:245-254.
- (40) Nestler, E.J. (2014) Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacol.* 76:259-268.
- (41) Pierce, B. (2006) Genética. Un Enfoque Funcional. Editorial Médica Panamericana. Buenos.
- (42) Sweatt, J. D., Nestler, E.J., Meaney, M.J., Akbarian, S. (2013) An overview of the molecular basis of epigenetics. En: *Epigenetic Regulation In The Nervous System*, JD Sweatt et al. (Eds.), Elsevier NY.
- (43) Rogge, G.A., Wood, M.A. (2013) The role of histone acetylation in cocaine-induced neural plasticity and behavior. *Neuropsychopharmacol. Rev.* 36:94-110.

- (44) Zovkic, I.B., Guzman-Karlsson M.C., Sweatt, J. D. (2013) Epigenetic regulation of memory formation and maintenance. *Learn Mem.* 20:61-74.
- (45) Fischer, A. (2014) Epigenetic memory: The Lamarckian brain. *EMBO J* 33(9):965-970.
- (46) Bohacek, J., Mansuy, I.N. (2013) Epigenetic inheritance of disease and disease risk. *Neuropsychopharmacol. Rev.* 38:220-236.
- (47) Champagne, F.A. (2010) Epigenetic influence of social experiences across the life span. *Develop. Psychobiol.* 52(4):299-311.
- (48). Vassoler, F.M., Sadri-Vakili, G. (2014) Mechanisms of transgenerational inheritance of addictive-like behaviors. *Neuroscience* 264:198-206.
- (49) Heijmans, B. T., Tobi, E. W., Stein, A. D., Putter, H y col. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 105(44):17046-17049.
- (50) Tuesta, L.M., Zhang Y. (2014) Mechanisms of epigenetic memory and addiction. *EMBO J* 33(10):1091-1103.
- (51) Vassoler, F.M., Byrnaes, E.M., Pierce, R.C. (2014) The impact of exposure to addictive drugs on future generations. Physiological and behavior effects. *Neuropharmacol.* 76:269-275.

## ENVEJECIMIENTO: UN DESAFÍO

Susana E. Sommer\*

Maestría de Biología Molecular Médica-UBA, FCEN – Ciudad Universitaria-Pabellón 2-  
Buenos Aires -Argentina  
COMEST (Comisión mundial de ética en la ciencia y la tecnología) UNESCO.susommer@fibertel.com.ar

### CONTENIDOS

Resumen .....	67
Abstract.....	67
Introducción.....	68
Algunos Dilemas Éticos .....	68
Acerca De La Futilidad.....	69
Cuidados Paliativos .....	69
Disposiciones Anticipadas.....	71
Conclusiones .....	72
Referencias Bibliográficas .....	74

### RESUMEN

#### Envejecimiento: un desafío

Se calcula que en el año 2050, un quinto de la población tendrá más de 65 años. Este aumento del número de personas mayores conlleva un enorme desafío para la sociedad en su conjunto y es un tema que requiere respuestas políticas, médicas y éticas. Entre los dilemas éticos a considerar están los relacionados con la autonomía personal y los relacionados con el fin de la vida. Se entiende por autonomía la obligación de respetar los valores y opciones personales de cada individuo en aquellas decisiones básicas que le atañen. Presupone incluso el derecho a equivocarse al hacer una elección. Por lo tanto constituye un importante dilema ético relacionado con el envejecimiento la posibilidad de que a causa de la edad la autonomía resulte disminuida de manera significativa.

En cuanto a los dilemas con relación al fin de la vida implica el derecho a tomar decisiones respecto de planes de vida, la integridad, la dignidad, el cuerpo, la salud, y acceder a una muerte digna. La discusión ética muestra que gastar en intervenciones que no benefician a los pacientes, implica grandes sumas de dinero y este despilfarro aumenta notoriamente los costos. Es decir la discusión ética se transforma en evitar el derroche.

**Palabras clave: dilemas éticos – autonomía – fin de la vida**

### ABSTRACT

#### Aging: a challenge

By the year 2050, a fifth of the population will be more than 65 years old. This increase in the age of the population will turn in a huge challenge for the whole of society and will demand political, social and ethical answers. The ethical dilemmas to be considered are those related to personal autonomy and end of life. Autonomy is the capacity of a rational individual to make an informed, un-coerced decision, including the right of making a wrong decision. And respect for elderly's autonomy may be significantly challenged.

Regarding end of life, the dilemmas are related to decisions regarding health, integrity and the right to die with dignity. The ethical discussion shows that spending funds that show no benefits for patients imply a waste which increases expenditure and turns the ethical discussion in avoiding squandering.

**Key words: ethical dilemmas – autonomy – end of life**

## **INTRODUCCIÓN**

Se calcula que en el año 2050, un quinto de la población tendrá más de 65 años(1). El valor promedio del número de años que vive una población ha variado a lo largo del tiempo. En la Grecia clásica como en la Antigua Roma, la longevidad era de 28 años. A principios del siglo XIX era de 30 a 40 años y llega a los 50 a 65 en el comienzo del siglo XX. Estos cambios se deben más a mejoras en los sistemas de agua potable, cloacas, cuidado de la salud y educación, que al progreso de la medicina, lo que también explica la diferencia en longevidad entre países pobres y ricos. Es interesante señalar que el aumento del número de personas mayores (recordemos que en general, las mujeres viven de 6 a 8 años más años que los varones) trae consigo un enorme desafío para la sociedad en su conjunto (2), porque cada día hay más personas con dificultades físicas o con algún tipo de disminución cognitiva, cosa que conlleva cargas sociales y económicas y que necesita de respuestas políticas, médicas y éticas. Otra cuestión a dirimir es si el cuidado de las personas mayores es una responsabilidad de la familia o del estado.

En el pasado, los 65 años anunciaban el momento de jubilarse y delimitaban claramente las etapas del trabajo y la del así llamado ocio. Hoy en día, muchos se encuentran obligados a asumir nuevas responsabilidades y actividades, lo que requiere modificar el significado de ser mayores y/o jubilados.

Por otra parte, el aumento de la expectativa de vida de la población y la existencia de gran número de adultos mayores plantea serias dificultades en la asignación de recursos y requiere la búsqueda de soluciones. Es importante recordar que estas personas contribuyeron a solventar un sistema de previsión y salud y actualmente se enfrentan a unas jubilaciones ridículamente bajas que también erosionan su autonomía material.

## **ALGUNOS DILEMAS ÉTICOS**

Entre los dilemas a considerar están los relacionados con el fin de la vida, algo de lo que generalmente no hablamos, que no estamos preparados a afrontar y para la que muchas veces carecemos de un lenguaje adecuado.

A diferencia de lo que ocurría en el pasado cuando la gente moría en sus casas, rodeada de familia, amigos y el médico de la familia; hoy en día se extingue en una institución, rodeada de alta tecnología y especialistas que no la conoce, ni saben de su persona o sus valores (3).

Aunque no podemos saber ni controlar si nuestra decadencia será mental o física, podemos pensar si queremos que nos mantengan vivos a cualquier precio. No podemos modificar cuando vamos a morir, pero sí podemos pensar en decidir cómo preferimos hacerlo. Sin desmerecer los logros de la medicina, podemos opinar cuántas pruebas y estudios aceptaremos, qué técnicas consentiremos, disponer previamente cuáles son los tratamientos que consideramos agresivos, inútiles o dolorosos. La prolongación de la vida de una persona que sufre puede parecer más una agresión que una bendición, como ilustra el Talmud “no está bien evitar la muerte cuando es inevitable”.

## ACERCA DE LA FUTILIDAD

Existe el riesgo de que la medicina geriátrica prolongue la vida sin mejorar su calidad. El derecho a una muerte natural se contrapone a la aplicación de tecnologías avanzadas que prolongan la vida biológica (4). Cuando la medicina geriátrica alarga la vida sin mejorar la calidad de la misma y realiza intervenciones que no producen beneficios significativos a los pacientes, se comienza a hablar de futilidad médica, una expresión que designa aquello que, aplicado a un paciente, no le produce ya un beneficio sino un perjuicio. Al proponer una práctica terapéutica se debe considerar el bienestar del afectado, la eficacia del tratamiento y el aspecto del costo para todas las partes involucradas. El debate acerca de la futilidad muestra, una vez más, que no siempre lo que es técnicamente posible es éticamente correcto.

La futilidad involucra ofrecer intervenciones médicas que no serán útiles ni efectivas. Uno de los problemas es que no siempre es sencillo alcanzar un consenso acerca de qué es fútil. Es sabido que los antibióticos son ineficaces ante las infecciones virales, pero en situaciones mucho más complejas resulta difícil discernir si un tratamiento resultará provechoso. Finalmente, lo que revela cuán útil o no es una terapia médica es la experiencia: si es inútil en el 100% de los casos, claramente es fútil. Aún convencidos que nuestros médicos harán lo apropiado para la situación, posiblemente debiéramos resolver tanto a nivel individual como colectivo las preferencias para esas circunstancias.

## CUIDADOS PALIATIVOS

En principio, todos deseamos un final rápido y sin dolor. Esto no es fácil de conseguir. La mayoría desea acabar sus últimos días bien cuidados, de preferencia en la propia casa, con la atención médica necesaria, sin tratamientos agresivos y sin sufrimiento. Podemos aspirar e incluso solicitar que nos alivien los dolores, que nos den oxígeno si hace falta, que nos bajen la fiebre o nos calmen la sed. Pero al mismo tiempo, podemos anhelar que no nos pinchen otra vez para hacer estudios que no llevan a una mejoría, sino que vuelven a confirmar lo obvio: nos estamos muriendo. Y aquí surge la necesidad no de un programa de curación sino de alguna forma para aliviar la ansiedad, calmar el dolor y manejar estos síntomas con eficiencia de manera de no provocar excesiva sedación, alucinaciones u otros efectos indeseados.

Una idea que surge es la de facilitar los últimos días de los pacientes terminales en el propio domicilio o en sitios lo más parecidos a un hogar. Una mujer inglesa, Dame Cicely Saunders, quien trabajaba como voluntaria en un hospital observó que estos centros de salud no estaban capacitados para controlar el dolor y manejar la muerte. Por este motivo, ella crea un espacio donde consigue transformar el cuidado de los moribundos en una disciplina con entidad propia, cuyo objetivo es una buena muerte. De hecho, está demostrado que aún en lugares donde existe el suicidio asistido en forma legal y también la opción de cuidados paliativos, gran cantidad de pacientes eligen esta alternativa.

La medicina paliativa brinda una atención activa cuando tanto la cura como la prolongación de la vida no son posibles. Sobre esta cuestión, la Organización Mundial de la Salud dio una primera definición en 1986 y en el año 2002 produjo una nueva versión: "La atención paliativa es un enfoque que mejora la calidad de vida de unos pacientes y familiares que se están enfrentando a los problemas asociados a una enfermedad potencialmente mortal, a través de la prevención y el alivio del sufrimiento realizando una identificación temprana, una evaluación adecuada y aplicando tratamientos para el dolor y otros problemas físicos, psicosociales y espirituales".

Este cuidado implica además del diagnóstico de los síntomas físicos y psicológicos, la creación de una comunidad de intereses y necesidades que deben realizarse en un ambiente hospitalario. Requiere un buen equilibrio en el manejo del dolor y otros síntomas, ya que si la recuperación es imposible, el foco debe estar en tratar la persona y no la enfermedad. Una de las sustancias utilizadas habitualmente es la morfina, que favorece un tratamiento apropiado del sufrimiento y a la vez que calma el dolor acelera el desenlace, un efecto secundario no buscado, que se conoce como la doctrina del “doble efecto”.

Desde las obligaciones éticas de los especialistas en relación con los pacientes es incuestionable que el rol de los médicos es ayudar a los enfermos, pero también es irrefutable que no existe obligación alguna de ofrecer tratamientos que no benefician a los afectados. Las intervenciones fútiles no son aconsejables ya que en muchos casos sólo favorecen el aumento del dolor y el malestar de los pacientes en sus últimas semanas de vida, y además involucra gastos médicos. Algunos autores (5) consideran que siempre habrá pacientes o familiares de éstos que eligen médicos que ofrecen tratamientos poco efectivos, invasivos y costosos, en especial si no deben pagarlos..

A pesar de que existen normas claras y recomendaciones sobre futilidad, no siempre es sencillo su cumplimiento, y muchas veces los criterios de los enfermos no coinciden con los de los facultativos tratantes.

Si bien es cierto que el respeto a la autonomía de los pacientes implica que ellos pueden preferir o desechar diversas alternativas de tratamiento aceptables desde un punto de vista médico, no los habilita a adoptar cualquier procedimiento. Al contrario, las obligaciones de los médicos están limitadas a ofrecer tratos consistentes con las normas profesionales aceptadas (6).

Se debe distinguir entre efectos, beneficios, racionalización de recursos y futilidad. Es importante analizar los motivos que llevan tanto a médicos como pacientes y al público a solicitar cada vez más intervención médica. Hasta el momento no se ha realizado una deliberación pública en la sociedad para discutir cuáles son los valores de los médicos y los pacientes con respecto a estos temas.

La discusión ética muestra que gastar en intervenciones que no benefician a los pacientes, implica grandes sumas de dinero y este despilfarro aumenta notoriamente los costos (7). Es decir la discusión ética se transforma en evitar el derroche. Aunque el concepto de futilidad médica tiene una historia polémica, esta nueva cuestión ética forma parte del debate sobre futilidad (8). No se trata de médicos que niegan tratamientos inútiles a los pacientes y/o las familias que los solicitan. En la actualidad se observan intervenciones fútiles motivadas por médicos que actúan por rutina, por razones de su propio interés financiero o basados en evidencias incorrectas. La ética de impedir el despilfarro se torna en un elemento importante de la ética profesional (9).

Los argumentos éticos que fundamentan evitar el derroche se basan en que no se debe negar tratamientos beneficiosos, así sean caros, y por otra parte se entiende que es perjudicial ofrecer tests y tratamientos inservibles. Los tratamientos incorrectos pueden ocasionar complicaciones, las pruebas diagnósticas equivocadas pueden promover falsos positivos que a su vez generan nuevas pruebas y complicaciones. *Primum non nocere* se torna en el argumento más potente para eliminar medicina no beneficiosa (10).

## DISPOSICIONES ANTICIPADAS

Cuando se mantiene a las personas conectadas a dispositivos como los respiradores, ¿cuál es el propósito?, ¿mantener la circulación o restaurar al paciente a niveles básicos de vida activa y pensante?

A pesar de lo difícil que es definir futilidad, es claro que muchas veces los médicos piensan que además de la inutilidad y altos costos de ciertos tratamientos, lo que está en discusión es que no se prolongue la agonía ni se les cause dolor y sufrimiento a personas, que ya están al fin de su vida. Además, como señalaban Bernard Gert (11) y colaboradores, aunque moralmente es equivalente rechazar que retirar un tratamiento extraordinario, por ejemplo un respirador, desde el punto de vista práctico no son situaciones equivalentes.

Es por eso que se habla de direcciones anticipadas que se encuentran contempladas en las más modernas legislaciones a nivel internacional. Los denominados "*living will*", o testamento vital, son instrucciones escritas que especifican las decisiones a tomar en caso de no poder decidir ya sea por enfermedad o incapacidad. Éstos tuvieron su origen y desarrollo a partir de los años 60' en los Estados Unidos de América.

Las directivas anticipadas constituyen una herramienta a disposición de las personas, que podría facilitar la interpretación de sus preferencias de cuidado de su salud en situaciones límite donde no pueden manifestar sus deseos. El objetivo esencial es conocer el pensamiento y las preferencias de los pacientes. Son instrucciones precisas que los individuos dejan por escrito sobre qué tipos de cuidados desean recibir y cuáles no, en situaciones en las que no estén capacitados para tomar decisiones o no puedan expresar su voluntad. Permite a los médicos intervinientes evitar tratamientos no deseados cuando un enfermo se encuentra en estado grave así esto implique la muerte.

Este documento debe incorporarse a la historia clínica de cada paciente (12), pero no se estipula un procedimiento claro para garantizar fehacientemente que llegue al legajo médico. Esto implicaría en la práctica junto con la inexistencia de una historia clínica unificada, que cada persona deba llevar una copia de su testamento vital a cada uno de los establecimientos donde sea tratado.

En esta ley queda expresamente establecida la obligación de los establecimientos médicos, tanto públicos como privados, de procurar el cumplimiento de las voluntades anticipadas, y asimismo regula un procedimiento específico para suspender tratamientos en casos en donde el paciente se encuentre impedido de comunicar su voluntad producto de una enfermedad terminal e irreversible, haciendo valer su derecho a no sufrir un "*ensañamiento terapéutico*".

Las directivas avanzadas contribuyen a una reducción del estrés en los pacientes, su familia y los proveedores de salud. Una consecuencia no buscada es una disminución de los juicios de mala praxis, además de reducir la incidencia de la depresión, problemas de alcoholismo y otros signos de duelo entre los sobrevivientes.

Estos documentos son susceptibles de ser cambiados en cualquier momento si las circunstancias o los deseos de la persona varían, por lo que es recomendable revisarlos cada tanto, quizás cada 10 años (13).

En nuestro país (14) existe la posibilidad de ejercer este derecho, tanto dentro de las instituciones de salud como en forma notarial. Así, según una nota aparecida en el diario La Nación durante 2012, en el Hospital Italiano más de 60 personas ya renunciaron anticipadamente ante sus médicos de cabecera a recibir reanimación cardiopulmonar, ventilación mecánica, diálisis, y alimentación o hidratación artificiales, u otros tratamientos

si padece de una enfermedad irreversible o sin expectativas posibles de curación. En este artículo periodístico se indica que “el año 2011 crecieron un 150% los colegios de escribanos del país que ofrecen la posibilidad de expresar esta voluntad, tanto ante una imposibilidad de salud transitoria como permanente. En este caso, claro, hay que tener en cuenta un costo por la actuación notarial”.

La autonomía personal con relación al fin de la vida implica el derecho a tomar decisiones respecto de planes de vida, la integridad, la dignidad, el cuerpo, la salud, y acceder a una muerte digna. Es decir, sin sufrimiento insoportable, con capacidad para transmitir afectos, con posibilidad de adoptar definiciones sobre el cuerpo así como la propia vida, respetando las propias convicciones y valores.

La muerte, como la vida, es un tema ético. Se habla de una buena muerte, de morir con dignidad. La premisa ética fundamental en el cuidado de los moribundos: asegurar una vida lo mejor posible hasta morir. Tratar a los desahuciados como seres humanos requiere una comunicación veraz y que la relación médico-paciente permita al enfermo, su familia y el entorno profesional aceptar intelectual y emocionalmente que la persona está muriendo.

## CONCLUSIONES

Se entiende por autonomía la obligación de respetar los valores y opciones personales de cada individuo en aquellas decisiones básicas que le atañen. Presupone incluso el derecho a equivocarse al hacer una elección. Por lo tanto constituye un importante dilema ético relacionado con el envejecimiento la posibilidad de que a causa de la edad la autonomía resulte disminuida de manera significativa (15).

El texto de Martha Holstein, Jennifer A. Parks, & Mark Waymack (16), describe de manera acabada muchos de los puntos centrales en torno a la problemática del envejecimiento. Estos autores plantean que dada la situación de dependencia y falta de suficiencia que la edad avanzada puede generar, la aplicación del principio de autonomía es muy problemática, en especial para las personas que habitan hogares de ancianos u otras instituciones que asumen su cuidado, donde es difícil tomar decisiones significativas.

Por ello proponen utilizar el concepto de autonomía “relacional” (17), una reconceptualización feminista<sup>a</sup> de la noción de autonomía (18), que implica tener en cuenta el efecto de los factores externos sobre el individuo.

El objetivo es plantear la necesidad de políticas públicas que apoyen el bienestar de todas las personas mayores, sin diferencias de clase o de género, incluyendo a los que no poseen condiciones económicas y/o físicas privilegiadas.

Es interesante como en este texto se analiza el significado de conceptos como envejecimiento productivo, compromiso cívico, envejecimiento exitoso; en que los autores señalan que tales nociones corresponden a una fracción de las personas mayores, la que está en buena situación económica y goza de buena salud. Esto último no significa que estén en contra de la creación de oportunidades para que la población adulta contribuya con la comunidad, siempre que tengamos presente que es una opción sólo asequible para algunos pocos.

Asimismo abordan la necesidad del apoyo de terceros, habitualmente la familia, y en particular las mujeres, donde el cuidar de otros no es un empleo remunerado y en que serán cuestionadas si no lo hacen. Como señala Lisa Eckenweiler “el trabajo de estos cuidadores ,

la mayoría de los cuales son mujeres, representa una masa crítica de la masa global de trabajadores de la salud” (19).

Por su parte, Agich, un filósofo que se ha dedicado a estas cuestiones, considera (20) que la autonomía en la vejez debe tener un sentido mucho más amplio e incluir el sostén de la autoestima al sentir la ansiedad de envejecer y acercarse a la muerte, la disminución de ciertas capacidades y el aumento de la dependencia con los demás, y lo que significa, en especial en las sociedades occidentales, donde se hace un culto de la independencia y la autonomía.

También señala que tradicionalmente, se pensaba que la edad implicaba mayor sabiduría y experiencia y por lo tanto implicaba que los mayores eran dignos de respeto. Y prosigue, para poder valorizar a los mayores es necesario comprender que no son necesariamente fuertes e independientes y que la historia acerca de quiénes somos es contada por los mayores, no importa cuán frágiles o discapacitados están.

Todo esto lleva a preguntarse y preguntarnos cuán iguales son estas personas a sí mismos, cuanto se parecen a cómo eran antes, a que se deben ciertos comportamientos extemporáneos, que tratamos de ignorar o negar, y también a indagarnos como sociedad acerca de la atención y el cuidado que merecen.

La identidad personal plantea un problema complejo, el peso moral que tienen decisiones, creencias y valores previos, desde haber jurado que nunca vivirían en un geriátrico hasta que mejor muertos que dependientes. ¿Qué peso tiene los deseos expresados previamente, como pueden ser las decisiones anticipadas, deben respetarse preferencias expresadas por alguien distinto a la persona actual? Estas preguntas éticas, aparentemente teóricas deben ser resueltas por las familias cada día, y finalmente lo que se busca es cuidar a los mayores de manera tal que se sientan confortables, cuidados y seguros en sus condiciones actuales.

Esto a su vez está relacionado con los recursos necesarios para el cuidado de la salud y el bienestar de los mayores que no es sólo un tema individual sino que es un problema de la sociedad. Los gastos aumentan con el aumento del número de personas mayores y se plantean temas de justicia y de adjudicación de recursos, porque la forma en que se utilizan los fondos afecta y atraviesa a todas las generaciones. Lo que se use para la tercera edad es dinero que no será dedicado a otros rubros como educación, cuidados médicos u otros servicios sociales para los jóvenes, pero no podemos olvidar que fueron ellos los que generaron parte de esos recursos a través de sus contribuciones a lo largo de una vida de trabajo.

Estamos inmersos en una cultura que tiende a discriminar a los mayores o a tratarlos como infantes, la sociedad no aprecia la vejez y la fragilidad, inclusive, como señala Agich, ni siquiera si uno es viejo, frágil y sabio. Expone que es necesario que cualquier análisis, descripción, estimación, o relación de ética y envejecimiento incluya los prejuicios sobre el tema y expresa que la injusticia es no reconocer que los viejos deben ser apreciados por lo que son, personas mayores.

Muchas veces debemos optar entre dos alternativas (21), donde ambas son equivalentes, e igualmente correctas, en el caso de un padre con enfermedad crónica, ¿cómo compatibilizar su cuidado sin descuidar nuestra propia familia directa: pareja e hijos?. En el caso de las directivas anticipadas, ¿cuándo es el momento de practicarlas y si se contraponen con las creencias y prejuicios del que tiene que efectuarlas?. Seguramente

cada uno de nosotros tiene presente más de una ocasión en que debió enfrentar decisiones de este tipo.

Y es así que nos encontramos ante la duda de respetar a ultranza la autonomía de alguna persona mayor en algunos casos complejos donde el envejecimiento, la enfermedad, el sufrimiento implican una dependencia y vulnerabilidad por la que requieren ayuda. Se torna difícil resolver entre la asistencia para realizar tareas cotidianas y el rechazo a la ayuda necesaria. No es fácil pedir ayuda y aceptar que no podemos solos.

Por todo esto es que sugiero que hay que considerar a las personas mayores como seres concretos y no como abstracciones y entender que debemos respetar su individualidad, sus experiencias afectivas y personales y aceptar sus hábitos y deseos.

-----  
<sup>a</sup>Laversión tradicional del principio de autonomía no tiene en cuenta el carácter de dependencia y vulnerabilidad del ser humano. En sentido abstracto, la autonomía da cuenta de las decisiones y actos individuales, pero no podemos dejar de lado que muchas veces, las decisiones individuales dependen de múltiples factores relacionales.

La **autonomía relacional** se articula como un concepto que intenta dotar de condiciones de posibilidad a la autonomía. Como señalan Catriona Mackenzie y Natalie Stoljar (2000), las preocupaciones centrales de la perspectiva relacional solo pueden comprenderse adecuadamente atendiendo al contexto de interacción que le es propio. Por otra parte, la autonomía relacional está especialmente interesada en desentrañar los procesos de socialización en los que se inscribe y actúa la persona autónoma.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Global Population Ageing: Promise or Peril, Geneva: World Economic Forum, 2011.
2. Ageing in the Twenty-First Century :A Celebration and A Challenge . United Nations Population Fund (UNFPA)andHelpAge International, 2012. ISBN 978-0-89714-981-5
3. Cranford, Ronald E.1996.Modern technology and the care of the dying, *Birth to Death*. Edited by D.C.Thomasma& Thomasine Kushner
4. Hill, T. Patrick. 1996. Care of the dying. *Birth to Death*. 1996. Edited by D.C.Thomasma& Thomasine Kushner
5. Gillick, Muriel. 2007. *The Denial of Aging*. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press.
6. Ver: [depts.washington.edu/bioethx/topics/futil.html](http://depts.washington.edu/bioethx/topics/futil.html)
7. Berwick DM, Hackbarth, AD. 2012.Eliminating waste in US healthare. *JAMA* ;307:1513-1516.
8. Brody, H.2012. From an Ethics of Rationing to an Ethics of Waste Avoidance. *N. Engl. J Med* ; 366:1949-1951
9. Truog RD, Brett AS, Frader J.1992. The problem with futility. *N. Engl. J Med* ;326:1560-1564
10. Welch WG, Schwartz L, Woloshin S. 2011. *Overdiagnosed: making people sick in the pursuit of health*. Boston: Beacon Press,.

11. Gert, B. et al. 1994. Distinguishing between Patients' Refusals and Requests. *Hastings Center Report*. July-August.
12. Aizenberg, Marisa y Romina D. Reyes. La regulación de las Directivas Médicas Anticipadas en la Ley 26.529 [www.derecho.uba.ar/extension/dma\\_msa\\_rdr.pdf](http://www.derecho.uba.ar/extension/dma_msa_rdr.pdf)
13. Brody, Jane E. 2012. Mapping Your End-of-Life Choices. *Personal Health* June 18, 2012.
  
14. Fabiola Czubaj Más personas deciden cómo será su final – 13/2/2012 *La Nación* <http://www.lanacion.com.ar/1448309-mas-personas-deciden-como-sera-su-final>
15. Agich, George J. 2001. Implications of Aging Paradigms For Bioethics. Vol. 10. *Aging: Culture, Health, and Social Change*. International Library of Ethics, Law, and the New Medicine. Dordrecht ; Boston : Kluwer.
16. Holstein, Martha, Jennifer A. Parks, Jennifer & Waymack, Mark. 2011. *Ethics, Aging, and Society. The Critical Turn*. Springer Publishing Company, LLC
17. Mackenzie, Catriona & Natalie Stoljar (eds.). 2000. *Relational Autonomy: Feminist Perspectives on Autonomy, Agency, and the Social Self*. Oxford University Press.
18. Jocelyn Downie & Llewellyn, J (eds.) . 2011. *Being relational*. UCB Press, Vancouver.
19. Eckenweiler, L. 2013. Introduction. *IJFAB*, vol.6, #12..Special Issue on Aging and Long-Term Care
20. Agich, George J. 1996 *ethics and aging* en Thomasma D.C. & Kushner, Th. (editors) *Birth to death, science and bioethics*. Cambridge, Cambridge University Press.
21. Kidder, R. M. (2003). *How good people make tough choices: Resolving the dilemmas of ethical living*. New York: Harper.

## LOS FARMACOS COMO CONTAMINANTES EMERGENTES DE LOS AMBIENTES ACUÁTICOS [\*].

Alfredo Salibián

Departamento de Ciencias Básicas - Programa de Ecofisiología Aplicada (PRODEA)  
Instituto de Ecología y Desarrollo Sustentable (INEDES) - Universidad Nacional de Luján  
Casilla de Correo 221 - B6700ZBA-Luján, Argentina[salibian@mail.unlu.edu.ar]

### TABLA DE CONTENIDOS

Resumen .....	76
Summary .....	77
Introducción - ¿Qué son los Contaminantes Emergentes?.....	78
La compleja problemática de los fármacos como contaminantes del medio acuático.....	80
Drogas de abuso en los medios acuáticos. ....	82
Vías de ingreso de los fármacos y destinos en los ambientes acuáticos. ....	83
Fármacos en los cuerpos de agua superficial de Argentina. ....	85
Conclusiones. ....	87
Referencias bibliográficas. ....	88

### RESUMEN

El medio acuático es el destino ambiental final de los vertidos sólidos y líquidos que vehiculizan mezclas de los productos generados por diversas actividades antrópicas.

La atención de los investigadores se ha orientado recientemente al estudio de la dinámica de un grupo de sustancias que genéricamente se conocen como Contaminantes Emergentes (CEs); es un conjunto muy diverso que incluye fármacos utilizados en terapéutica (humana y animal) y productos de aseo personal y cosméticos (siglas de sus denominaciones en inglés: PPCPs: *Pharmaceuticals and Personal Care Products*).

Tanto en las fases líquidas de los medios acuáticos (superficiales y subterráneas) como en las sólidas asociadas (sedimentos), se ha detectado una importante diversidad de CEs. Las evidencias disponibles muestran que las variedades químicas y las cantidades de dichos productos que son vertidas a los ambientes acuáticos están aumentando en forma sostenida.

Los complejos y variados problemas que esos contaminantes pueden desencadenar en los medios acuáticos están asociados, entre otros factores, a su diversidad química, a los procesos de su degradación o combinación.

La bibliografía informa que los tratamientos convencionales de mitigación de los efluentes líquidos (industriales y domésticos) antes de su vuelco a los cuerpos de agua

---

[\*] Manuscrito recibido el 15/9/ 2014.

superficiales, que pueden ser vehículos de estos productos, no son suficientes para retenerlos, degradarlos o inactivarlos antes de su ingreso a los ambientes acuáticos naturales como sus receptores finales.

Finalmente, hay acuerdo de que las concentraciones que pueden alcanzar los CEs, en particular en los cuerpos de agua peri-urbanos, deben ser monitoreados tanto por sus efectos adversos localizados, como en el de sus riesgos para la salud humana.

**Palabras Clave:**contaminantes emergentes - fármacos- medios acuáticos.

## SUMMARY

### PHARMACEUTICALS AS EMERGING CONTAMINANTS OF THE AQUATIC ENVIRONMENT.

The aquatic environment is the final site of disposal for solid and liquid mixtures of most products generated by the diverse anthropic activities. The attention of researchers has recently been oriented to the study of the environmental dynamics of a group of substances generically known as Emerging Contaminants (ECs); it is a very diverse group of chemicals that includes drugs (used in human and animal therapy) and personal care products (PPCPs: *Pharmaceuticals and Personal Care Products*).

Both liquid phases (surface and underground) as well as the associated solid phases (sediment) of aquatic environments showed to contain a significant diversity of pharmaceuticals. The available evidence shows that both the diversity and the amount of those contaminants in the aquatic environments are increasing steadily.

The complex and varied problems that these pollutants can trigger in the aquatic environments are associated, among other factors, to their chemical diversity, the physicochemical changes that may happen in their structure, persistence and stability in different matrices as well as the interactions between their degradation and/or transformation products and biotic components of each particular environmental compartment; the picture becomes even more complicated when new products are generated as a consequence of those interactions, modifying the physicochemical and ecotoxicological quality of the water.

The literature reports that conventional previous mitigation treatments of industrial and domestic liquid effluents (which can be vehicles for pharmaceuticals), may not be sufficient to retain, degrade or inactivate them before they reach aquatic environments. And also that the generated chemical concentrations and the toxicological quality of water, particularly surface and groundwater of peri-urban waterbodies, should be monitored considering their potential adverse effects and their risks to human health.

There is agreement that CEs should be monitored both for its localized adverse effects, as well as for their risks to human health.

**Key words:** emerging contaminants - pharmaceuticals - aquatic environments.

## INTRODUCCIÓN - ¿QUÉ SON LOS CONTAMINANTES EMERGENTES?

Un número creciente de sustancias, de variadas estructuras químicas y propiedades fisicoquímicas y biológicas, son halladas en los ambientes acuáticos y reconocidas genéricamente como *contaminantes*. Algunas de ellas, a pesar de ser *naturales* se incorporan a esa categoría cuando, como consecuencia de eventos ambientales extremos de condiciones geológicas particulares, son removidas de sus depósitos y transferidas a otros compartimentos ambientales y/o, aumentan sus concentraciones superando niveles preestablecidos para las mismas considerando sus usos y propiedades. Otros contaminantes son los *antrópicos* o “*artificiales*” cuyo origen está asociado a las actividades humanas (industriales, productivas) (por ejemplo: perfluoratos, pesticidas, fenoles, ftalatos, plastificantes, antioxidantes, triazoles, pesticidas, herbicidas, detergentes, aditivos, colorantes, plastificantes, edulcorantes de síntesis, nanopartículas, ignífugos halogenados, etc.). Se los puede encontrar en los residuos sólidos (por ej. los basurales urbanos a cielo abierto), efluentes urbanos (domésticos, municipales, industriales) o agrícolas; las actividades asociadas a la producción ganadera intensiva (tambos, corrales de engorde) o acuícola, también contribuyen a la dispersión ambiental de estos contaminantes que finalmente se incorporan a los medios acuáticos, superficiales o subterráneos. Los avances tecnológicos, en particular los referentes a las técnicas analíticas, han contribuido a la constatación inequívoca de su presencia aún en concentraciones traza y que la cantidad de los mismos en los medios acuáticos esté expandiéndose aceleradamente.

Recientemente la lista de contaminantes acuáticos se ha estructurado agrupándolos bajo la denominación de *Contaminantes Emergentes-CE* (en inglés, *Emerging Contaminants- EC*, o *Chemicals/Contaminants of Emerging Concern - CEC*). Se los caracteriza como productos de variados orígenes (exógenos), diversidad química y usos; exhiben en común su prolongada persistencia ambiental, pudiendo interferir en aspectos básicos del funcionalismo integrado de los seres vivos, incluidos los humanos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8).

La calificación de *emergentes* no debe inducir la creencia equívoca de que su detección en los ecosistemas es un hallazgo reciente. Por el contrario, se sabe que han sido vertidos al ambiente en el pasado como productos metabólicos (endógenos) de los animales, eliminados con sus excretas, o desde las fases iniciales de diversos sistemas de producción industrial.

Lo antedicho ha de ser visualizado en un marco mayor determinado por la confluencia de diversos factores adicionales, cuya incidencia se ha acentuado recientemente: nuevas tecnologías que generan CEs, insuficientes sistemas de tratamiento de residuos, prácticas agrícolas intensivas ambientalmente inadecuadas y aceleración de los procesos de urbanización (las proyecciones disponibles anticipan que en el año 2025 el 92.7 % de la población argentina será urbana). A esta lista deben añadirse los impactos directos o indirectos de eventos globales recientes (como los Cambios Climáticos) que ya están generando - entre otros- problemas de contaminación acuática y cuyos efectos ya se están documentando (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23).

Los CEs incluyen dos grupos de sustancias: fármacos y productos de aseo y cuidado personal, rotulados en conjunto como PPCPs [por la expresión en inglés *Pharmaceuticals and Personal Care Products*]. La información que concierne a unos y a otros se puede consultar, entre otras fuentes, en la base de datos de la US EPA (<http://www.epa.gov/ppcp/lit.html>).

El primer subgrupo (*Pharmaceuticals* - P) corresponde a los fármacos propiamente dichos, naturales o de síntesis, utilizados en terapéutica humana y animal (24). El segundo reúne a los productos de uso personal (*Personal Care Products* - PCPs), cuyas formulaciones están basadas en productos de síntesis multifuncionales (tinturas para el cabello, lápices labiales, geles capilares, cosméticos, shampoos, dentífricos, fragancias, antitranspirantes, desodorantes, lociones y cremas corporales, sales de baño, inciensos, protectores solares, etc.).

Los PPCPs exhiben diversas y complejas propiedades en lo referente a su comportamiento e impactos cuando ingresan a los medios acuáticos, las que son determinantes de su dinámica en las matrices de esos ambientes y/o de la susceptibilidad de las biotas afectadas (2, 10, 11, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35). Si bien por ahora es potencial, se reconoce el riesgo de su acumulación en el agua potable (36).

Las consecuencias perjudiciales o indeseadas asociadas a los fármacos en los compartimientos ambientales pueden manifestarse en muy bajas concentraciones por tratarse de moléculas biológicamente activas (por lo que también se las reconoce como *microcontaminantes orgánicos*). Sus efectos pueden ser de amplio espectro, a veces inespecíficos indirectos, y también directos, afectando individuos, poblaciones y comunidades; además, ciertos procesos naturales como la bioacumulación y biomagnificación, contribuyen a la "amplificación ambiental" de su distribución y, por ende, de sus impactos (4, 7, 12, 32, 37, 38, 39, 40, 41).

Cabe señalar que una elevada tasa de degradación ambiental no asegura la inocuidad toxicológica posterior de un fármaco en el medio acuático ya que los productos de transformación generados pueden también exhibir toxicidad o ser bioacumulados por otras especies cohabitantes del mismo sitio. De allí que para abordar el estudio de la cinética de los fármacos en el medio acuático no es suficiente la información provista por los muestreos puntuales, espacial y temporalmente limitados, los análisis químicos o los bioensayos simples (uniespecíficos) de toxicidad complementarios (en condiciones de laboratorio o de campo). Se debe recurrir a protocolos que contemplen en sus cronogramas muestreos múltiples, secuenciales en el tiempo y el espacio, bioensayos de toxicidad pluriespecíficos en lo referente a las especies diana utilizadas, de tipo crónico y ensayos con mezclas de fármacos, esto último para intentar simular condiciones ambientales y entornos razonablemente próximos a las reales.

Un factor adicional a los mencionados que debe ser considerado en relación a la dinámica ambiental de los fármacos y a sus impactos adversos y riesgos cuando alcanzan los medios acuáticos es la oscilación de sus concentraciones en el transcurso del día (variación circadiana). También se ha mostrado la importancia de tener en cuenta otros factores como la actividad productiva que se desarrolla en las márgenes de un medio particular, o la estacionalidad; así, si los efluentes conteniendo fármacos son vertidos a un río o arroyo cuyo flujo es cambiante según la estación climática, sus efectos en general y sobre la biota local en particular, serán diferentes en función de las oscilaciones que pueden registrarse en las concentraciones (que serán menores en temporadas lluviosas y aumentadas en verano) y en su entorno fisicoquímico (24, 36, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48).

No obstante, corresponde recordar que las listas de fármacos incluyen varias categorías de ellos (como vitaminas, electrolitos, aminoácidos, péptidos, carbohidratos, vacunas) que son considerados desprovistos de riesgos.

Se dispone de evidencias que muestran la presencia de PPCPs en diferentes compartimientos de ambientes marinos aunque los riesgos e impactos asociados a su

presencia aparecen atenuados significativamente por los fenómenos de dilución (12, 26, 49, 50).

El marco de este texto se limita a ciertos aspectos ambientales (origen, destino, efectos y riesgos) referidos a uno de los grupos de CE detectados en los ecosistemas acuáticos continentales (arroyos, ríos, lagos, represas): fármacos utilizados en terapéutica humana y sus productos de degradación metabólica (biológica) o fisicoquímica (ambiental); esos aspectos son particularmente significativos en dichos ambientes, con mayor prevalencia e intensidad en aquellos próximos a las áreas urbanas y periurbanas. En esos mismos sitios debe considerarse la misma problemática, como factor agravante por los hábitos muy difundidos de automedicación. Se excluyeron referencias al origen, destino y transformaciones ambientales de los fármacos utilizados en las prácticas veterinarias (incluida la acuicultura) a pesar de que con frecuencia se utilizan los mismos productos en los dos ámbitos, veterinario y humano.

### **LA COMPLEJA PROBLEMÁTICA DE LOS FÁRMACOS COMO CONTAMINANTES DEL MEDIO ACUÁTICO.**

La presencia de fármacos en los cuerpos de agua, la descripción científica de la problemática asociada a ella y el creciente conocimiento de sus impactos ambientales y riesgos sanitarios son aspectos que empezaron a ser considerados y abordados en los países industrializados a mediados de la década del 70 (6, 12, 26, 51, 52). Actualmente hay acuerdo en que la presencia de fármacos en los medios acuáticos es muy difundida y advierte la necesidad futura de investigaciones que contribuyan para lograr una comprensión más documentada acerca de las consecuencias acopladas a la presencia de PCPPs en los ambientes acuáticos (29, 32, 33, 43, 53).

En fecha cercana se han dado a conocer los resultados de monitoreos llevados a cabo en algunos países de América Latina (3, 40, 54, 55, 56, 57) y Africa (59).

Los fármacos pueden afectar de diversas maneras la calidad toxicológica y ecotoxicológica originales del agua, y por tanto sus aptitudes de uso, además de una variedad de impactos adversos en los organismos que albergan o se hallan próximos a ellos. Conviene tener en cuenta que los impactos ambientales de los fármacos y de los productos de su degradación, debido a su baja concentración, son generalmente subletales; no obstante hay fármacos que aún a esas concentraciones afectan severamente la "estabilidad" de muchas entidades de la biota afectada, con diferentes respuestas según su identidad y el estadio de desarrollo de los individuos de las comunidades típicas del sitio considerado.

El listado de esos efectos ecotóxicos sobre las especies acuícolas es extenso y diverso; mencionamos algunos: cito y genotoxicidad, inducción/depleción de los componentes enzimáticos de los sistemas antioxidantes, alteraciones del sistema reproductivo, reducción de la producción embrionaria, alteraciones en la motilidad espermática, disrupción endocrina, feminización de machos y masculinización de hembras (15, 18, 37, 42), alteración en la expresión génica, alteración de los mecanismos de defensa inmunológica, cambios en el metabolismo nitrogenado, acumulación en tejidos críticos, modificación en la performance natatoria y en la conducta de escape de predadores, inhibición de la función ovárica, inducción de conductas anxiogénicas (20, 44, 46, 60, 61, 62), entre otros.

Recientemente se describió el "efecto infoquímico" (*infochemical effect*) que refiere a las interferencias que pueden provocar los fármacos en el medio acuático en los sistemas

quimiosensibles de comunicación ambiental de los peces que, entre otras funciones, les permite detectar presas y predadores o atraer individuos de otro sexo.

El abordaje de los riesgos asociados a los fármacos que se degradan en los medios acuáticos demanda tener en cuenta que los productos generados: a) pueden ser bioactivos, b) su difusión y uso aumentan en forma sostenida, y c) decenas de ellos, son utilizados en forma regular y simultánea, activando a su arribo al medio interacciones de variado carácter (que en muchos casos son insuficientemente conocidas).

La dinámica de los fármacos intactos o de los productos resultantes de sus transformaciones ambientales depende del perfil fisicoquímico, de las propiedades intrínsecas del sitio donde se acumulan (pH, fuerza iónica) y de las moléculas (sensibilidad/resistencia a la degradación, solubilidad, lipofilicidad, volatilidad, hidrofobicidad, intercambios iónicos, vida media, fenómenos de complejización de superficie, uniones hidrógeno), así como de la de los suelos (adsorción, contenido de Carbono orgánico). La hidrofobicidad en particular explica el hecho de que se los halle con frecuencia asociados a material particulado en suspensión o en los sedimentos acumulándose por interacciones electrostáticas (37, 41, 57, 63, 64, 65, 66, 67, 68). El conocimiento que se dispone acerca de otros factores ambientales y biológicos complementarios (tasas de degradación en medios de diferente perfil fisicoquímico, diversidad química, actividad biológica, mecanismos de acción, persistencia, resistencia a la inactivación y degradación ambiental o biológica) es apenas incipiente. Ciertos factores exógenos pueden determinar significativamente su distribución ambiental (por ejemplo, las lluvias y tormentas, aguas de deshielo, variaciones estacionales, etc.) y determinantes de la vulnerabilidad de las especies que componen la comunidad biótica típica de cada sitio.

En rigor se debería hablar de mezclas de fármacos ya que en los vertidos en los cuerpos de agua receptores coexisten un elevado número de productos cuya magnitud no es constante en el tiempo, y que tienen diversos objetivos terapéuticos (antibióticos, antiinflamatorios, analgésicos, hormonas, tranquilizantes, psicotrópicos, reguladores del metabolismo lipídico, bloqueadores cardíacos, antihipertensivos, antiepilépticos, esteroides, drogas anticancerosas, medios de contraste, etc.).

El escenario no es simple: en Argentina la cantidad de marcas registradas en la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) oscilaba (en el año 2011) alrededor de 5000 y unos 2000 principios activos, cubriendo un amplísimo espectro de mecanismos de acción, estructura química, propiedades físicas, metabolismo y toxicidad (biológica y ambiental). Por otra parte, la información disponible acerca de sus efectos y riesgos en los diferentes ambientes acuáticos cubre apenas el 10 % de aquella cifra con el agravante de que sólo una mínima parte de ese porcentaje ha sido detectada en los vertidos cloacales en concentraciones compatibles con la sensibilidad de las técnicas analíticas disponibles (3, 4, 26, 27, 28, 42, 60, 69).

Los riesgos para la salud humana, se superponen con frecuencia a los ecológicos; tal el caso del contacto continuado, o del uso o ingesta de alimentos y de aguas contaminadas con CE. Y también serán mayores en los ambientes próximos a los grandes conglomerados humanos que, a su vez, se caracterizan por ser generadoras de una diversidad de emisiones, y elevadas cantidades de residuos. Esta realidad puede ilustrarse con las cifras que describen un aspecto cuantitativo de la situación en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires: ella genera casi 3.800 Tn/día de residuos sólidos (1.23 Kg/día/habitante). Por su parte, el conjunto de los municipios que constituyen el Conurbano generan cerca de 11 millones de Kg (70).

Es importante señalar que los impactos adversos de los fármacos en los medios acuáticos pueden exceder los efectos que se registran en algunos individuos particulares de la biota animal; no deben descartarse procesos que pueden traslocarlos a vegetales y, desde allí, reingresar al humano por vía alimentaria. Y también que los mismos son excretados-intactos, biodegradados, transformados por factores abióticos o activados metabólicamente a formas más reactivas-aumentando la diversidad original de las mezclas y generando entornos de mayor complejidad química y simultáneos efectos biológicos.

Lo antedicho advierte sobre la importancia de considerar el cuadro desde una perspectiva correcta, interdisciplinaria e integradora (52, 60): no solamente sus concentraciones ambientales son importantes, sino también las interacciones de disímil naturaleza (sinérgicas, aditivas o antagónicas) que pueden ocurrir en las mezclas de fármacos intactos o de los productos y metabolitos generados previamente durante las diferentes fases de su metabolismo y/o degradación, los que pueden coexistir en un vertido o ambiente particular (27).

Se ha sugerido que ciertas interacciones entre plantas acuáticas y sus entornos químicos (los originales y los generados por el ingreso de CEs) podrían ser aptos para removerlos. Se sabe también de sus efectos sobre otros componentes de los ambientes como las algas. Marco-Urrea *et al.* documentaron (71, 72) la degradación en medio acuático de algunos fármacos (antibióticos, analgésicos, estrógenos) por varias especies de hongos (basidiomicetes) mediante mecanismos enzimáticos intra y extracelulares; esta propiedad fue propuesta como alternativa apta para la depuración/bioremediación de medios contaminados.

Park *et al.* (73) comunicaron la detección de disruptores endocrinos en insectos cuyos estadios larvales se desarrollaban en contacto con los fluidos de una planta de tratamiento de líquidos cloacales, que les permitió advertir sobre la posibilidad de un mecanismo de amplificación de la distribución ambiental de fármacos asociado a insectos que, por su parte son alimento de otros invertebrados y de aves.

Es interesante que varios receptores celulares, específicos para fármacos particulares, se hayan conservado evolutivamente en grupos tan alejados como los peces y los humanos (15, 74).

### **DROGAS DE ABUSO EN LOS MEDIOS ACUÁTICOS.**

Estos CEs se caracterizan por su estabilidad y comparten con los fármacos varios aspectos de su comportamiento ambiental (75). Hay evidencias que documentan la prevalencia de su uso y presencia en medios acuáticos urbanos de Europa en cantidades mensurables, intactas y acompañadas por sus metabolitos (cocaína, opioides –codeína, metadona-, cannabinoides, anfetaminas, derivados de la marihuana) (76, 77, 78). El World Drug Report estimó (79) que 3.3-6.1 % de la población mundial, en el rango etario de 15-64 años (149-272 millones) consumieron una sustancia ilícita (mayormente cannabinoides) por lo menos una vez en el año 2009.

Algunos autores han señalado el valor del conocimiento de las concentraciones de estos productos en los cuerpos de agua como parámetros indirectos para estimar la magnitud de su consumo (15, 16, 29, 43, 80, 81) y disponer de un “sistema de vigilancia epidemiológica cloacal” (*sewage epidemiology*) (93), complementario de los pre-existentes (82, 83). Recientemente se detectaron nuevos “fármacos psiquiátricos” y sustancias psicoactivas en efluentes, cuerpos de agua superficiales y subterráneos, suelos y sedimentos (30, 51, 84).

Se han reportado aumentos significativos de las concentraciones de estas drogas en el medio acuático los fines de semana habiéndose sugerido que esa información puede ser útil para evaluar la eficacia de estrategias orientadas al control y a la reducción de su consumo (85).

### VÍAS DE INGRESO DE LOS FÁRMACOS Y DESTINOS EN LOS AMBIENTES ACUÁTICOS.

Los PPCPs pueden llegar a los medios acuáticos por diferentes rutas. Las más importantes son los efluentes y residuos de origen doméstico-municipal-industrial (principalmente sólidos), residuos generados en plantas de tratamiento de efluentes cloacales (formas líquidas) y depuradoras o pozos sépticos (53, 86, 87). Una parte importante de los efluentes urbanos residuales que llegan al medio acuático es por vertidos (puntuales) directos (sin tratamiento), de los sistemas cloacales y plantas de tratamiento. Las dos últimas alternativas producen efluentes reutilizables y un residuo sólido también llamado *biosólido*.

Otra de las vías está la asociada a la práctica de la aplicación de esos residuos agrícolas crudos (que pueden ser generados en tambos, corrales de engorde, *feedlots*) (88) irrigando con ellos suelos destinados a la producción agropecuaria intensiva, como suplemento aditivo o sustituto de fertilizantes inorgánicos, y con la "ventaja" de reuso del agua originalmente retenida. Considerando su riqueza en restos orgánicos algunos son aplicados como proveedores de materia orgánica a los cultivos con una eficacia dependiente del tipo de suelo (18, 82, 89). Como contrapartida de dichos beneficios, no se puede ignorar que esos vertidos pueden aportar, al mismo tiempo, fármacos, patógenos, metales pesados y diversos tóxicos (en concentraciones hasta del orden de los mg/Kg) (88) por lo que pueden tener efectos ambientales y sanitarios perjudiciales. Por ello, los beneficios ecológicos atribuidos a los biosólidos coexisten con algunas incertidumbres y riesgos.

La concentración original de los fármacos, por su parte, así como sus productos de degradación en esos efluentes primarios es muy variable, y dependiente de las actividades, tasas y patrones de consumo de las poblaciones de origen en particular, en concentraciones que se hallan en el rango de los ng/L - µg/L. Hay acuerdo de que las concentraciones ambientales son típicamente menores que las dosis terapéuticas mínimas.

Aún antes de ser utilizados como tales, los fármacos pueden pasar a la categoría de contaminantes traza; es el caso de los no consumidos o vencidos (o "*medicine wastage*"); es habitual desprenderse de ellos vertiéndolos al sistema cloacal o mezclándolos con los residuos domiciliarios. Desde esos sitios pueden incorporarse a alguno de los destinos antes mencionados (36, 53, 87) Los hospitales y laboratorios de productos farmacéuticos que no disponen de plantas para el tratamiento y depuración de sus efluentes, también pueden transferir al ambiente acuático superficial y subterráneo cantidades importantes de fármacos y productos químicos (16, 21, 22). Los de los hospitales pueden contener, además de fármacos, desechos generados en otras de sus actividades (cocina, lavaderos, higiene ambiental y de pacientes, reactivos químicos, desinfectantes, detergentes, fijadores fotográficos, medios de contraste, bacterias patógenas, etc.).

La eficacia de las plantas de tratamiento para reducir significativamente las concentraciones originales de los fármacos presentes en los efluentes que reciben puede ser en algunos casos, muy limitada, especialmente para sus componentes no biodegradables.

Todos los vertidos, cualquiera sea su origen, "historial ambiental" y perfil fisicoquímico, llegan en primera instancia a algún receptor acuático de superficie (río, arroyo, lago, laguna, etc.); cabe mencionar que los fármacos contaminantes presentes en esos sitios pueden percolar o migrar por escorrentía hasta alcanzar otros compartimentos próximos como los sedimentos y acuíferos (19, 41, 57). Se ha reportado que los vertidos pueden contener fármacos "desconocidos" (90). Es evidente que las transformaciones que ocurren en los fármacos desde los inicios de los procesos de su producción industrial y, luego, a lo largo de sus trayectorias ambientales, advierte sobre la posibilidad cierta de que próximamente los mismos, intactos y los productos de su transformación/degradación, serán los futuros contaminantes del agua subterránea y, de allí, del agua potable (12).

En los vertidos sin tratamiento las concentraciones de los fármacos siempre superan los niveles que alcanzan posteriormente en los compartimentos del receptor final; esto es un "impedimento" importante ya que su detección y análisis en esos sitios, son costosos y requieren equipos y técnicas químicas y bioanalíticas de alta sensibilidad, acoplados a pretratamientos para la extracción y concentración de los analitos a determinar.

Los ecotoxicólogos han llamado la atención acerca del valor de la información toxicológica que brindan sus métodos y estimaciones; ellas se basan en bioensayos de laboratorio, generalmente uniespecíficos, de limitada duración en el tiempo (agudos), variados *endpoints* y susceptibilidades de las especies *test* utilizadas, y cuyos resultados se expresan mediante parámetros que difícilmente pueden describir o identificar acabadamente el complejo escenario de los riesgos que interesa determinar o evaluar (30).

En casi todos los casos la exposición a los fármacos de las comunidades acuáticas y/o sus productos de degradación es multiespecífica y de tipo crónico, en concentraciones variables en el tiempo. Por esa razón los efectos tóxicos agudos de los fármacos sobre los organismos acuáticos y, en consecuencia, los índices que expresan esa toxicidad de las muestras ambientales evaluadas en condiciones de laboratorio (CL-50, LOEC, NOEC, PEC/PNEC) son vigentes sólo para los breves lapsos temporales de los muestreos (25, 60, 86).

Actualmente se considera conveniente incorporar en los programas de evaluación y monitoreo del riesgo de los fármacos en muestras acuáticas, ensayos de toxicidad uni o pluriespecíficos pero de tipo crónico, expresando los resultados como una relación de toxicidad (agudo/crónico) (12, 42); de esa forma las conclusiones podrían aproximarse y reflejar la realidad. Cuando se dispone de la información respectiva podría recurrirse a herramientas predictivas como el QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) o el QSTR (*Quantitative Structure-Toxicity Relationship*) (13, 45, 91). Un aspecto crítico a considerar en el diseño de los protocolos y en el uso de la información brindada por los bioensayos, es la susceptibilidad de las especies *test* utilizadas en ellos para los fármacos estudiados.

El diseño moderno de fármacos contempla como un objetivo importante asegurar la mayor resistencia a los procesos orgánicos o ambientales de inactivación o biodegradación; esto trae aparejada como consecuencia una prolongada persistencia en el medio que ha de tenerse en cuenta al considerar sus eventuales efectos ambientales adversos. Bajas concentraciones de algún fármaco particular pueden ser inofensivas para los animales que viven en el ambiente donde se los encuentra o para las personas que los consumen o utilizan agua de esos sitios; pero las mismas cantidades de otros fármacos que pueden coexistir con aquéllas, pero farmacológicamente muy activas (por ejemplo: hormonas, antibióticos, anticonceptivos, cafeína, cardioactivos, psicotrópicos) pueden actuar

como estresores por si o por sus metabolitos (activos o tóxicos) y significar, en el largo plazo, perturbaciones por sus exposiciones "crónicas"; el riesgo es particularmente significativo en el caso de los grupos vulnerables de la población expuesta ( niños, mujeres en edad reproductiva, ancianos, pacientes con deficiencia en su sistema inmune o inmunosuprimidos) (9, 93).

El siguiente ejemplo puede ilustrar la complejidad de los problemas que se pueden presentar. Consideremos un efluente líquido con elevadas concentraciones de antibióticos (por ejemplo, el de un hospital o laboratorio de productos químico-farmacéuticos) que es vertido al reactor de una planta depuradora o de tratamiento (65); las consecuencias de ese vuelco pueden ser, a) reducción (y aún la muerte) de las poblaciones bacterianas (que son componentes normales y críticos de los reactores que degradan y reciclan la materia), o b) selección de formas bacterianas resistentes, interferencias en procesos fisiológicos, cambios en las proporciones de los isómeros (66), alteraciones en la regulación de los mecanismos de estrés oxidativo, interferencia en la síntesis de hormonas o reproducción (38, 44, 94).

Se sabe que, con excepciones, la composición química y concentración de la mayoría de los fármacos que pueden encontrarse en las aguas residuales originales son modificadas antes o después de su vertido, a entidades diferentes de las que finalmente llegan y se detectan en los ecosistemas acuáticos. En otras palabras, los efectos de un efluente volcado directamente, sin tratamiento previo, no serán comparables con los de otro sometido previamente a un sistema de depuración, degradación o remoción de los fármacos que contiene. Para esto último se recurre a diversas técnicas convencionales: cloración, adsorción (C activado), ozonización, oxidación, fotodegradación (fotooxidación), foto y radiólisis, electroquímica, osmosis reversa, etc. (7, 29, 46). La situación será otra y toxicológicamente más compleja si el vertido reúne, como el de un parque industrial, efluentes de varias fuentes. Conviene recordar que algunos sistemas biológicos convierten a los fármacos en formas polares (glucurónidos) las que posteriormente, en las plantas de tratamiento de efluentes, pueden ser hidrolizadas a las formas activas originales.

Los aspectos de la dinámica ambiental someramente considerados hasta aquí no excluyen la posibilidad, comprobada, de que cantidades no despreciables de ciertos fármacos (por ejemplo, antihistamínicos, antibióticos) sean resistentes a los tratamientos y procesos de potabilización y así llegar y persistir en el agua potable; en esos casos el riesgo es exponer a las personas al consumo de "fármacos ambientales", obviamente no prescritos para ellas.

Diremos por último, que actualmente crece la opinión de que los impactos sanitarios y ecológicos de los fármacos pueden ser controlados si se integran adecuadas medidas de control de las diferentes etapas de su *ciclo de vida*: diseño, producción, prescripción, uso, eficacia terapéutica, eliminación-descarte, destinos ambientales, biodisponibilidad, interacciones con otros fármacos o con productos de degradación y medidas biotecnológicas de remediación, bioacumulación, toxicidad y ecotoxicidad. La información generada en un protocolo como el mencionado será de utilidad para los Organismos Regulatorios así como para las industrias.

## **FÁRMACOS EN LOS CUERPOS DE AGUA SUPERFICIAL DE ARGENTINA.**

Diferentes Organismos que se ocupan de generar normas regulatorias orientadas a la protección del ambiente y la salud pública (WHO, US EPA, Comunidad Europea-CE) (92,

96) han incluido en sus programas líneas prioritarias y protocolos encaminados al abordaje de las complejas problemáticas asociadas a los CE. La Comunidad Europea ha aprobado una norma (76) que demanda una evaluación de riesgo ambiental como condición previa a la autorización para la comercialización de nuevos fármacos; esta exigencia se aplica en Europa cuando la concentración ambiental es 1 µg/L (en USA) o 10 ng/L (64).

En nuestra región las normas regulatorias de la calidad del recurso agua apta para diferentes destinos se limitan mayormente a contaminantes de origen industrial; en cambio no se dispone aún de normas para la evaluación de los riesgos ambientales o sanitarios asociados a los fármacos (primarios y/o productos de su degradación) de uso en terapéutica humana. Los niveles guía máximos permitidos en aguas continentales considerando sus diferentes usos o destinos en Argentina (a nivel Nacional, Provincial o Municipal) no han establecido aún esos valores para los fármacos mayoritariamente consumidos.

La información acerca de las concentraciones de PPCPs en los ambientes acuáticos del país, su destino y comportamiento ambiental es incipiente y fragmentaria o inexistente.

Los fármacos en particular no fueron monitoreados regularmente en los ambientes acuáticos de Argentina. Este déficit puede ser atribuido a varias razones: a) en relación a los países desarrollados los riesgos son menores o incipientes debido a que la magnitud de su consumo global es limitado, b) carencia de programas de monitoreo regular específicamente orientados al conocimiento de la calidad de los medios acuáticos superficiales, c) limitaciones tecnológicas (42) referidas a métodos e instrumental analítico selectivo y preciso, y d) estadísticas de producción y consumo imprecisas, incompletas o poco confiables.

Elorriaga *et al.*, (54) efectuaron monitoreos puntuales y determinaron la prevalencia y rango de concentraciones de 4 fármacos en efluentes de plantas de tratamiento primario en seis localidades de las Provincias de Buenos Aires y Córdoba, con poblaciones de diferentes dimensiones y grados de urbanización. Los mismos autores (55) evaluaron la presencia de esos fármacos en un número mayor de sitios, incluyendo conglomerados urbanos de dimensiones relativas superiores a las de aquél estudio previo; además determinaron la magnitud de la dilución en la concentración del fármaco aguas abajo de los sitios de vertido.

Poco tiempo después, Valdés *et al.* (40) informaron los resultados de otro monitoreo efectuado en 6 sitios del río Suquía (Provincia de Córdoba), un cuerpo multiestresado, localizados a lo largo de 70 Kms. Evaluaron la presencia y variaciones temporales de sus concentraciones para 15 fármacos, aguas arriba y abajo de la planta de tratamiento de efluentes de la ciudad de Córdoba.

Eissa *et al.*, por su parte, informaron recientemente (61) que el Ibuprofeno, en bioensayos de laboratorio y en concentraciones subletales, tuvo efectos de interferencia en los parámetros conductuales y aquéllos descriptivos de la actividad natatoria de formas juveniles de la carpa común (*Cyprinus carpio*) luego de su exposición al analgésico por 2 semanas.

Varios miles de Tn de fármacos se vuelcan cada año a diferentes compartimientos ambientales. Esta afirmación está debidamente documentada para ambientes de algunos países; la importancia del problema para los ecosistemas locales puede ser apreciada con algunas cifras por ahora sólo estimativas; efectuamos un cálculo basado en datos del último Censo Nacional de Argentina (2010), referidos en particular al Partido de Luján (Provincia de

Buenos Aires); dicho Censo informó acerca de la infraestructura de los Municipios en lo relativo a la disposición de aguas residuales. Del total de hogares de dicho distrito (32.524), menos de la mitad (39,6 %) disponía de desagüe a red pública (cloaca), 32,4 % a cámara séptica y pozo ciego, y el 26,6 % sólo a pozo ciego; el 0.3 % de los hogares desagotaba sus desechos a un hoyo excavado en la tierra mientras que el 1.1 % de ellos no disponían de baño o letrina.

Considerando su población de entonces (106.899 habitantes) y suponiendo que la mitad de ella (en promedio, y sin discriminar por grupos etarios), consume un comprimido de 500 mg de Aspirina por día, se puede determinar que el total del consumo anual de dicho fármaco en Luján habría sido de 9755 Kg; el mismo cálculo, pero referido a una ingesta diaria de 400 mg de Ibuprofeno, mostraría que el consumo global de dicho analgésico para esa población alcanzaría a poco más de 7800 Kg/año. En ambos casos, el verdadero impacto ambiental debiera considerar la información complementaria (farmacocinética) de esos fármacos y estimar la magnitud de los productos generados desde sus respectivas reacciones metabólicas, así como los riesgos sanitarios y ambientales asociados a sus dinámicas biológicas y ambientales. .

Obviamente, el cuadro será diferente para distritos más poblados o si el análisis se realiza con mayor detalle o precisión (por ejemplo, considerando el total de los fármacos que la misma población consumió más los que descartó, o el perfil etario) en un año. Es también importante considerar la distribución cuantitativa relativa de las poblaciones entre ámbitos urbanos y rurales, así como su infraestructura sanitaria. En el segundo caso, los riesgos serán mayores debido a la carencia de sistemas cloacales.

## CONCLUSIONES.

- Los Contaminantes Emergentes constituyen un grupo muy diverso de sustancias que incluye a los fármacos (utilizados en terapéutica humana y animal) y a productos destinados al aseo personal y uso como cosméticos.
- Los ecosistemas acuáticos superficiales (arroyos, ríos, lagos, represas) se reconocen como el principal destino ambiental de los fármacos, al que llegan por diferentes y variables itinerarios, con una serie de acontecimientos igualmente múltiples y variados que ocurren en su tránsito hacia los ambientes destinatarios finales.
- Las evidencias científicas disponibles muestran inequívocamente que la variedad y las cantidades de los fármacos que se detectan en las matrices de los ecosistemas acuáticos continentales están aumentando en forma sostenida.
- Los fármacos han sido detectados en los compartimentos líquidos de numerosos ambientes acuáticos continentales (superficiales y subterráneos) así como en los sólidos asociados (sedimentos); con mucho menor frecuencia han sido hallados en ambientes acuáticos marinos.
- Las vías de ingreso de los fármacos a los medios acuáticos son variados; entre los más comunes se consideran los efluentes y residuos de variado origen (doméstico, municipal, industrial); otra de las vías está vinculada a la práctica de aplicación de residuos crudos (biosólidos) como suplemento en las actividades agrícolas
- En fecha reciente se han llevado a cabo estudios en ambientes acuáticos receptores de drogas de abuso o ilícitas tendientes al desarrollo de metodologías que permitan determinar la magnitud y variedad de las sustancias consumidas en sitios particulares.

Al incorporarse a los diferentes sistemas acuáticos, los fármacos se integran en un escenario en el que ocurren acontecimientos químicos y biológicos que conllevan numerosos impactos de variada clase diversidad tales como hidrólisis, interacciones con otros productos preexistentes, cambios en su estructura y comportamientos ambientales, modificaciones en sus configuraciones, etc. que devienen en factores cuyos efectos pueden apreciarse tanto a nivel de los componentes abióticos como de los bióticos de cada sitio.

También se registran interacciones con otros componentes químicos preexistentes así como con las entidades bióticas propias de cada sitio particular, estableciendo con ellos vínculos de variado tipo e intensidad, desde los inocuos hasta los de elevada ecotoxicidad para las comunidades locales originales, y con riesgos futuros para los humanos después de los diversos procedimientos potabilizadores que se apliquen al agua de dichos sitios.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Aga DS. (Editor) (2008). Fate of pharmaceuticals in the environment and in water treatment systems. CRC Press, Boca Raton FL.
2. Boxall ABA, Rudd MA, Brooks BW et al. (2012). Pharmaceutical and personal care products in the environment: what are the big questions? *Environ Health Perspect* 120: 1221-1229.
3. Caliman FA, Gavrilescu M. (2009). Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment - A review. *Clean* 37: 277-303.
4. Daughton CG.(2008).Pharmaceuticals as environmental pollutants:the ramifications for human exposure. *Internat Encyclopedia Public Health* 5: 66-102.
5. Lambropoulou DA, Nollet LML (Eds.) (2014). Transformation products of emerging contaminants in the environment: analysis, processes, occurrence, effects and risks. Volumes 1 and 2. John Wiley & Sons.
6. Richardson ML, Bouron JM. (1985). The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J Pharm Pharmacol* 37: 1-12.
7. Rivera-Utrilla J, Sánchez-Polo M, Ferro-García MA, Prados-Joya G et al. (2013). Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere* 93: 1268-1287.
8. Roig B. (Editor) (2010). Pharmaceuticals in the environment: current knowledge and need assessment to reduce presence and impact. IWA Publishing, London.
9. Akingbemi BT, Hardy MP. (2001). Oestrogenic and antiandrogenic chemicals in the environment: effects on male reproductive health. *Finnish Med Soc Duodecim, Ann Med* 33: 391-403.
10. Berkner S, Thierbach C. (2014). Biodegradability and transformation of human pharmaceutical active ingredients in environmentally relevant test systems. *Environ Sci Pollut Res* 21: 9461-9467.
11. Boxall ABA, Hardy A, Beulke S, Boucard T, et al. (2009). Impacts of climate change on indirect human exposure to pathogens and chemicals from agriculture. *Environ Health Perspect* 117, 508-514.
12. Brooks BW, Huggett DB, Boxall ABA. (2009). Pharmaceuticals and personal care products : research needs for the next decade. *Environ Toxicol Chem* 28: 2469-2472.
13. Christen V, Hickmann S, Rechenberg B, Fent K (2010). Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems : a concept for their identification based on their mode of action. *Aquat Toxicol* 96 : 167-181.
14. Daughton CG. (2009). Chemicals from the practice of healthcare: challenges and unknowns posed by residues in the environment. *Environ Toxicol Chem* 28: 2490-2494.
15. Fent K, Weston AA, Caminada D. (2006).Ecotoxicology of human pharmaceuticals.*Aquat Toxicol* 76: 122-159.
16. Fick J, Soderstrom H, Lindberg RH, Phan C. et al. (2009). Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environ Toxicol Chem* 28: 2522-2527.
17. Gómez SE, Menni RC (2005). Cambio ambiental y desplazamiento de la ictiofauna en el Oeste de la Pampasia. *Biol Acuát* N° 22: 151-156.

18. Gunnarsson L *et al.* (2009). Pharmaceutical industry effluent diluted 1:500 affects global gene expression, cytochrome P450 1A activity, and plasma phosphate in fish. *Environ Toxicol Chem* 28: 2639-2647.
19. Khetan SK, Collins T. (2007). Human pharmaceuticals in the environment : a challenge to green chemistry. *Chem Rev* 107: 2319-2364.
20. Kostich MS, Lazorchak JM. (2008). Risks to aquatic organisms posed by human pharmaceutical use. *Sci Total Environ* 389: 329-339.
21. Larsson DGJ, Fick J. (2009). Transparency throughout the production chain. A way to reduce pollution from the manufacturing of pharmaceuticals ?. *Regulat Toxicol Pharmacol* 53: 161-163.
22. Larsson DGJ, de Pedro C, Paxeus N. (2007). Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J Hazard Materials* 148:751-755.
23. Manciocco A, Calamandrei G, Alleva E. (2014). Global warming and environmental contaminants in aquatic organisms : the need of the etho-toxicology approach. *Chemosphere* 100: 1-7.
24. Boillot C, Bazin C, Tissot-Guerraz F, Droguet J, *et al.* (2008). Daily physicochemical, microbiological and ecotoxicological fluctuations of a hospital effluent according to technical and care activities. *Sci Total Environ* 403 : 113-129.
25. Agerstrand M, Breitholtz M, Rudén C. (2011). Comparison of four different methods for reliability evaluation of ecotoxicity data: a case study of non-standard test data used in environmental risk assessments of pharmaceutical substances. *Environ Sci Europe* 23: 1-17.
26. Bundschuh M, Hahn T, Gessner MO, Schulz R. (2009). Antibiotics as a chemical stressor affecting an aquatic decomposer-detrivore system. *Environ Toxicol Chem* 28: 197-203.
27. Celiz MD, Tso J, Aga DS. (2009). Pharmaceutical metabolites in the environment: analytical challenges and ecological risks. *Environ Toxicol Chem* 28: 2473-2484.
28. Corcoran J, Winter MJ, Tyler CR. (2010). Pharmaceuticals in the aquatic environment : a critical review of the evidence for health effects in fish. *Crit Revs Toxicology* 40: 287-304.
29. Fatta-Kassinos D, Meric S, Nicolaou A. (2011). Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Anal Bioanal Chem* 399: 251-275.
30. Ginebreda A, Muñoz I, López de Alda M, Brix R, *et al.* (2010). Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers : relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). *Environ Internat* 36: 153-162.
31. Jjemba PK. (2006). Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* 63: 113-130.
32. Nohynek GJ, Antignac E, Re T, Toutain H. (2010). Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. *Toxicol Appl Pharmacol* 243: 239-259.
33. Rosi-Marshall EJ, Royer TV. (2012). Pharmaceutical compounds and ecosystem function : an emerging research challenge for aquatic ecologists. *Ecosystems* 15: 867-880.
34. Tijani JO, Fatoba OO, Petrik LF. (2013). A review of pharmaceuticals and endocrine-disrupting compounds : sources, effects, removal, and detections. *Water Air Soil Pollut* 224: 1770-1799.
35. US EPA. (2010). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) : relevant literature. US EPA, Las Vegas, NV (disponible: <http://www.epa.gov/ppcp/lit.html>).
36. Braund R, Peake BM, Shieffelbein L (2009). Disposal practices for unused medications in New Zealand. *Environ Internat* 35 : 952- 955.
37. Cooper ER, Siewicki TC, Phillips K. (2008). Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment. *Sci Total Environ* 398: 26-33.
38. Martinez JL. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut* 157: 2893-2902.
39. Seiler JP. (2007). Pharmacodynamic activity of drugs and ecotoxicology - Can the two be connected ?. *Toxicol Lett* 131: 105-115.
40. Valdés ME, Amé MV, Bistoni MA, Wunderlin DA. (2014). Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquía river basin (Córdoba, Argentina). *Sci Total Environ* 472: 389-396.

41. Zhou L-J, Ying G-G, Zhao J-L, Yang J-F, Wang L, Yang B, Liu S. (2011). Trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in the sediments of the Yellow River, Hai River and Liao River in Northern China. *Environ Pollut* 159: 1877-1885.
42. Cleuvers M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol Environ Saf* 59 : 309-315.
43. Fatta-Kassinos D, Kalavrouziotis IK, Koukoulakis PH, Vasquez MI. (2011). The risks associated with wastewater reuse and xenobiotics in the agroecological environment. *Sc Total Environ* 409:3555-3563.
44. Sanchez W, Sremski W, Piccini B, Palluel O. *et al.* (2011). Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. *Environ Internat* 37: 1342-1348.
45. Sanderson H, Thomsen M. (2009). Comparative analysis of pharmaceuticals versus industrial chemicals acute aquatic toxicity classification according to the United Nations classification system for chemicals. Assessment of the (Q)SAR predictability of pharmaceuticals acute aquatic toxicity and their predominant acute toxic mode-of-action. *Toxicol Lett* 187: 84-93.
46. Sirés Y, Brillas E. (2012). Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies : a review. *Environ Internat* 40: 212-229.
47. ter Laak TL, van der Aa M, Houtman CJ, Stoks P. *et al.* (2010). Relating environmental concentrations of pharmaceuticals to consumption : a mass balance approach for the river Rhine. *Environ Internat* 36: 403-409.
48. Veach AM, Bernot MJ. (2011). Temporal variation of pharmaceuticals in an urban and agriculturally influenced stream. *Sc Total Environ* 409: 4553-4563.
49. Magner J, Filipovic M, Alsberg T. (2010). Application of a novel solid-phase-extraction sampler and ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry for determination of pharmaceutical residues in surface sea water. *Chemosphere* 80: 1255-1260.
50. Robinson BJ, Hui JPM, Soo EC, Hellou J. (2009). Estrogenic compounds in seawater and sediment from Halifax harbour, Nova Scotia, Canada. *Environ Toxicol Chem* 28: 18-25.
51. Calisto V, Esteves VI. (2009). Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere* 77: 1257-1274.
52. Rodríguez-Mozaz S, Weinberg HS. (2010). Pharmaceuticals in water. An interdisciplinary approach to a public health challenge. *Environ Health Persp* 118: 1016-1020.
53. Daughton CG, Ruhoy IS. (2009). Environmental footprint of pharmaceuticals: the significance of factors beyond direct excretion to sewers. *Environ Toxicol Chem* 28: 2495-2521.
54. Elorriaga Y, Marino DJ, Carriquiriborde P, Ronco AE. (2013a). Human pharmaceuticals in wastewaters from urbanized areas of Argentina. *Bull Environ Contam Toxicol* 90: 397-400.
55. Elorriaga Y, Marino DJ, Carriquiriborde P, Ronco AE. (2013b). Screening of pharmaceuticals in surface water bodies of the Pampas region of Argentina. *Internat J Environ Health* 6: 330-339.
56. Sodr e FF, Montagner CC, Locatelli MAF, Jardim WF. (2007). Ocorr encia de interferentes end crinos e produtos farmaceuticos em  guas superficiais da regio  de Campinas (SP, Brasil). *J Braz Soc Ecotoxicol* 2: 187-196.
57. Standley LJ, Rudel RA, Swartz CH, Attfield KR, *et al.* (2008). Wastewater-contaminated groundwater as a source of endogenous hormones and pharmaceuticals to surface water ecosystems. *Environ Toxicol Chem* 27: 2457-2468.
58. Stumpf M, Ternes TA, Wilken RD, Rodrigue SV, Baumann W. (1999). Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci Total Environ* 22: 135-141.
59. Agumbiade FO, Moodley B. (2014). Pharmaceuticals as emerging organic contaminants I Umgeni River water system, KwaZulu-Natal, South Africa. *Environ Monit Assess* (in press).
60. Coetsier C, Lin L, Roig B, Touraud E. (2006). Integrated approach to the problem of pharmaceutical products in the environment: an overview. *Anal Bioanal Chem* 387 : 1163-1166.
61. Eissa BL, Ossana NA, Ferrari L, Salibi n A. (2014). Effect of Ibuprofen on swimming pattern of *Cyprinus carpio*. *Fresenius Environ Bull* (in press).
62. Hallgren S, Volkova K, Reyhanian N, Ols n KH, H llstr m IP (2011). Anxiogenic behavior induced by 17 - ethynylestradiol in male guppies (*Poecilia reticulata*). *Fish Physiol Biochem* 37: 911-918.

63. Gottschall N, Topp E, Metcalfe C, Edwards, M. *et al.* (2012). Pharmaceutical and personal care products in groundwater, subsurface drainage, soil, and wheat grain, following a high single application of municipal biosolids to a field. *Chemosphere* 87: 194-203.
64. Gros M, Petrovic M, Ginebreda A, Barceló D. (2010). Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environ Internat* 36: 15-26.
65. Kümmerer K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment. A review. Part II. *Chemosphere* 75: 435-441.
66. Matamoros V, Hijosa M, Bayona JM. (2009). Assessment of the pharmaceutical active compounds removal in wastewater treatment systems at enantiomeric level. Ibuprofen and Naproxen. *Chemosphere* 75: 200-205.
67. Ribeiro AR, Afonso CM, Castro PML, Tiritan ME. (2013). Enantioselective biodegradation of pharmaceuticals, alprenolol and propranolol, by an activated sludge inoculum. *Ecotoxicol Environ Saf* 87: 108-114.
68. Walters E, McClellan K, Halden RU (2010). Occurrence and loss over three yers of 72 pharmaceuticals and personal care products from biosolids-soil mixtures in outdoor mesocosms. *Water Res* 44 : 6011-6020.
69. Jelic A, Gros M, Petrovic M, Ginebreda A, Barceló D. (2012). Occurrence and elimination of pharmaceuticals during conventional wastewater treatment. En: Guasch H *et al.* (Editors), *The Handbook of Environmental Chemistry, 19. Emerging and Priority Pollutants in Rivers*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 1-23.
70. Zubillaga MS. 2013. El destino de los residuos sólidos urbanos de la Ciudad de Buenos Aires. Breve diagnóstico y algunas alternativas. *Rev Agron Ambiente* 33 :79-89.
71. Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Vicent T, Caminal G. (2009). Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 74: 765-772.
72. Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Cruz-Morató C, Cannunal G, *et al.* (2010). Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. *J Hazard Mater* 176:836-842.
73. Park KJ, Müller CT, Markman S, Swinscow-Hall O, *et al.* (2009). Detection of endocrine disrupting chemicals in aerial invertebrates at sewage treatment works. *Chemosphere* 77: 1459-1464.
74. Brown JN, Paxéus N, Forlin L, Larsson DGJ. (2007). Variations in bioconcentration of human pharmaceuticals from sewage effluents into fish blood plasma. *Environ Toxicol Pharmacol* 24 : 267-274.
75. Zuccato E, Castiglioni S, Bagnati R, Chiabrando C. *et al.* (2008a). Illicit drugs, a novel group of environmental contaminants. *Water Res* 42: 961-968.
76. European Commission (EC) (2001). Community code relating to medicinal products for human use. *European Parliament and Council- Directive 2001/83/EC*.
77. Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. (2009). Illicit drugs and pharmaceuticals in the environment. Forensic applications of environmental data. Part 1: estimation of the usage of drugs in local communities. *Environ Pollut* 157: 1773-1777.
78. Thomas KV, Bijlsma L, Castiglioni S, Covaci A. *et al.* (2012). Comparing illicit drug use in 19 European cities through sewage analysis. *Sci Total Environ* 432: 432-439.
79. UNODOC (UN Office on Drugs and Crime). World Drug Report, 2011.
80. Parolini M, Pedriali A, Riva C, Binelli A. (2013). Sub-lethal effects caused by the cocaine metabolite benzoylecgonine to the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Sci Total Environ* 444: 43-50.
81. van Nuijs ALN, Castiglioni S, Tarcomnicu I, Postigo C, *et al.* (2011b). Illicit drug consumption estimations derived from wastewater analysis: a critical review. *Sci Total Environ* 409: 3564-3577.
82. Gielen GJHP, van den Heuvel MR, Clinton PW, Greenfield LG. (2009). Factors impacting on pharmaceutical leaching following sewage application to land. *Chemosphere* 74: 537-542.
83. Mendoza A, Valcárcel Y. (2013). Presencia de contaminantes emergentes (drogas de abuso y benzodiazepinas) en el agua fluvial y potable de la zona Centro de España. *Revista de Toxicología* (España) 30: 36-38.
84. Reid MJ, Baz-Lomba JA, Ryu Y, Thomas KV. (2014). Using biomarkers in wastewater to monitor community drug use : a conceptual approach for dealing with new psychoactive substances. *Sc Total Environ* 487: 651-658.

85. Lai FY, Ort C, Gartner C, Carter S, *et al.* (2011). Refining the estimation of illicit drug consumptions from wastewater analysis : co-analysis of prescription pharmaceuticals and uncertainty assessment. *Water Res* 45: 4437-4448.
86. Coetsier CM, Spinelli S, Lin L *et al.* (2009). Discharge of pharmaceutical products (PPs) through a conventional biological sewage treatment plant:MECs vs PECs ?*Environ Internat* 35: 787-792.
87. Tong AYC, Peake BM, Braund R. (2011). Disposal practices for unused medications around the world. *Environ Internat* 37: 292-298.
88. McClellan K, Halden RU. (2010). Pharmaceuticals and personal care products in archived U.S. biosolids from the 2001 EPA National sewage sludge survey. *Water Res* 44: 658-668.
89. Wu C, Spongberg AL, Witter JD, Fang M. *et al.* (2010). Detection of pharmaceuticals and personal care products in agricultural soils receiving biosolids application. *Clean-Soil, Air, Water* 38: 230-237.
90. Wehmas LC, Cavallin JE, Durhan EJ, Kahl MD *et al.* (2011). Screening complex effluents for estrogenic activity with the T47D-KBLUC cell bioassay: assay optimization and comparison with in vivo responses in fish. *Environ Toxicol Chem* 30: 439-445.
91. Rabinowitz JR, Goldsmith MR, Little SB, Pasquinelli MA. (2008).Computational molecular modeling for evaluating the toxicity of environmental chemicals : prioritizing bioassay requirements.*Environ Health Perspect* 116: 573-577.
92. WHO (World Health Organization) (2012). *Pharmaceuticals in drinking-water*. Geneva.
93. Leung HW, Jin L, Wei S, Tsui MMP, Zhou B *et al.* (2013). Pharmaceuticals in tap water: human health risk assessment and proposed monitoring framework in China. *Environ Health Perspect* 121: 839-846.
94. Suzuki S, Hoa PTP. (2012). Distribution of quinolones, sulfonamides, tetracyclines in aquatic environment and antibiotic resistance in Indochina. *Frontiers Microbiol* 3:1-8.
95. van Nuijs ALN, Mougél J-F, Tarcomnicu I, Bervoets L, *et al.* (2011 a). Sewage epidemiology - A real-time approach to estimate the consumption of illicit drugs in Brussels, Belgium. *Environ Internat*37 : 612-621.
96. Villanueva CM, Kogevinas M, Cordier S, Templeton MR *et al.* (2014). Assessing exposure and health consequences of chemicals in drinking water : current state of knowledge and research needs. *Environ Health Perspect* 122: 213-221.

## REVISTA FARMACÉUTICA : RECOMENDACIONES PARA LOS AUTORES

Revista Farmacéutica, órgano de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica, considerará la publicación de trabajos vinculados directa o indirectamente a las Ciencias Farmacéuticas y ó Bioquímicas, en la forma de Reviews (Revisiones).

Los trabajos deben remitirse al Comité Editor de Revista Farmacéutica, Junín 956 (1113) en Buenos Aires – Argentina, por escrito a renglón por medio. El autor deberá enviar una versión electrónica a acad@ffyb.uba.ar, conteniendo el archivo correspondiente en Word for Windows.

La presentación deberá ajustarse a las siguientes normas generales:

La extensión del trabajo, incluyendo gráficos, cuadros, tablas, etc. y referencias bibliográficas, no deberá superar 20 carillas.

Configuración de páginas: El texto debe ser presentado en el procesador de texto Microsoft Word, con un tamaño de papel A4, con márgenes superior, izquierdo, inferior y derecho de 2,5 cm e interlineado de 1,5 con alineación justificada, numeradas en el ángulo inferior derecho de cada página. En cada punto y aparte dejar sangría. La letra a emplear es Arial, estilo normal, tamaño 11.

Título: debe ser conciso y suministrar la mayor información sobre el contenido del trabajo, en la primera línea de la primera página. Debe ser claro, descriptivo y no exceder las 20 palabras, sin abreviaturas, alineación centrada, en negrita. Letra Arial, tamaño 14.

Los trabajos en español, deberán incluir una traducción del título en inglés, que se incluirá dentro del Summary.

Autores: debajo del título deberán consignarse los nombres y apellidos completos de los autores, separados por una coma y en negrita, con indicación (\*) de quien es el autor a quien dirigir la correspondencia. A continuación deberá señalarse lugar de pertenencia o afiliaciones y direcciones completas de los mismos, indicando con superíndices en números la relación entre un autor y su afiliación y dirección.

Resumen: en la segunda página escribir la palabra “RESUMEN” en negrita. El resumen deberá contener de 200 a 300 palabras con interlineado 1,5. No debe presentar abreviaturas. Debe reflejar claramente y de manera concisa los temas tratados en el trabajo. A continuación se incluirá un summary en inglés.

Deberán incluirse tres palabras clave o key words en español e inglés, respectivamente luego del resumen correspondiente.

Tabla de contenidos: incluirá los subtítulos de cada sección que componga el cuerpo del manuscrito:

Resumen –Summary

Introducción

Desarrollo (incluyéndose los diferentes ítems que lo componga)

Conclusiones

Referencias Bibliográficas

Agradecimientos (si corresponde)

Cuerpo del manuscrito: Cuando se hagan referencias en el texto a cantidades nunca deberán expresarse en letras. Para cantidades decimales deberá utilizarse la coma (,) incluso cuando se trate de una cita en inglés (Ej: 33506,20). Valores porcentuales deberán ser expresados con dos cifras decimales. Las unidades de cualquier dato deben seguir el sistema de unidades internacionales. Se pueden incluir abreviaturas de términos que se repetirán a lo largo del trabajo. Cuando se emplee por primera vez una abreviatura deberá estar precedida de los términos completos

Los nombres científicos completos deberán ser colocados en su primera mención. En posteriores menciones se usará solo la letra inicial del género más la especie sin agregar el clasificador (abreviaturas “*var.*”, “*subsp.*”, etc.). Los nombres comunes de especies bien conocidas pueden ser usados una vez que hayan sido identificados con los nombres científicos completos en su primera mención. Toda locución latina deberá ir en letra cursiva (Ej.: *et al.*, *in vitro*, *Opuntia boldinghii*).

Citas en el texto: En el texto, las referencias se colocarán con números consecutivos, entre paréntesis, de acuerdo con el orden en que se presenten y deberán ser ordenadas numéricamente en las correspondientes referencias bibliográficas.

Tablas y cuadros: Se citarán con numeración arábiga con su correspondiente título y epígrafe. Los títulos de las tablas deberán colocarse por encima de las mismas y serán numeradas con números arábigos. En el texto, la palabra “Tabla” no debe ser abreviada. Las abreviaturas dentro de las tablas deberán ser identificadas con una nota al pie de la misma.

Resultados gráficos que se toman de bibliografías de trabajos publicados, deberán presentar autorización del autor o del editor que los publicó, y se consignará el crédito de la procedencia en el manuscrito.

Figuras: Los archivos de las figuras deben tener extensión TIFF, BMP o JPEG, con un tamaño aproximadamente de 12 cm. de alto y con una resolución de 300dpi. Pueden ser figuras en color. Los títulos de las figuras deberán colocarse por debajo de las mismas y ser numeradas con números arábigos.

En el texto la palabra “Figura” debe ser abreviada a “Fig.”. Las abreviaturas dentro de las figuras deben ser identificadas con una nota al pie de la misma.

## ENTIDADES COOPERADORAS DE LA ACADEMIA

- Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Bs. As.
- Confederación Farmacéutica Argentina (COFA)
- Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos
- Fundación Rene Barón
- Asoc. Argen. de Farm. y Bioq. Industrial (SAFYBI)
- CAEME
- Laboratorios Abbot
  - Bagó S.A.
  - Casasco S.A.I.C.
  - Roemmers S.A
  - Roux Ocefa S.A.
  - Britania S.A.

La Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica expresa su agradecimiento a las Entidades Cooperadoras que permiten el cumplimiento de sus objetivos, “la promoción y el progreso de las Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas”, y la publicación de la “REVISTA FARMACÉUTICA” Y “ANALES DE LA ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA”