

INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

MONOGRAFÍA XX

ENFERMEDADES METABÓLICAS

Editores:

Federico Mayor Zaragoza
y
María Cascales Angosto



Madrid, 2006

ISBN: 84-934430-2-6 • Depósito legal: M. 16.452-2006

Impreso en Realigraf, S.A. - Pedro Tezano, 26 - 28039 Madrid

Índice

	<i>Págs.</i>
Relación de participantes	5
Prólogo. Juan Manuel Real Tejada	11
Introducción. Federico Mayor Zaragoza y María Cascales Angosto ..	13
Diabetes tipo I. Ramón Gomis Barbará	17
Resistencia a la Insulina. Diabetes tipo II. Manuel Benito de las Heras.....	37
Síndrome metabólico: una situación multifactorial (genes y ambiente). De los criterios diagnósticos a la prevención y tratamiento. Arturo Corbatón Anchuelo, Rafael Cuervo Pinto, Nerea Pérez Méndez y Manuel Serrano Ríos	57
Regulación de la ingesta y de la homeostasis energética. Pedro García Barreno	91
Alteraciones genéticas de la FAD monooxigenasa microsómica. Trimetilaminuria. María Cascales Angosto y Federico Mayor Zaragoza	127
Metabolismo y alteraciones en la regulación del calcio. Antonio L. Doadrio Villarejo.....	151
Osteoporosis. Manuel Díez Curiel, María Jesús Moro Álvarez y José Espinoza Pineda	171
Osteomalacia y Raquitismo. María Jesús Moro Álvarez, Manuel Díez Curiel y José Espinoza Pineda	209
Hemocromatosis. José María Fernández-Rañada, Juan José Gil Fernández, Carlos Blas López	223

ÍNDICE

	<i>Págs.</i>
Enzimopatías eritrocitarias. Amando Garrido Pertierra	245
Patología del metabolismo oxidativo del propionato. Celia Pérez Cerdá, Pilar Rodríguez Pombo, Begoña Merinero, Lourdes Ruiz Desviat, Belen Pérez y Magdalena Ugarte Pérez	269
Fenilcetonuria. Belen Pérez, Lourdes Ruiz Desviat, María José García y Magdalena Ugarte Pérez	291
Patología molecular de los sistemas de señalización beta-adrenérgicos. Antonio S. Tutor, Petronila Penela y Federico Mayor Menéndez ..	315
Metabolismo en la etapa perinatal y sus implicaciones en enfermedades del adulto. Emilio Herrera Castellón	339
Alteraciones del desarrollo postnatal del cerebro. Preematuridad y daño hipóxico-isquémico José María Medina Jiménez	367

Relación de participantes

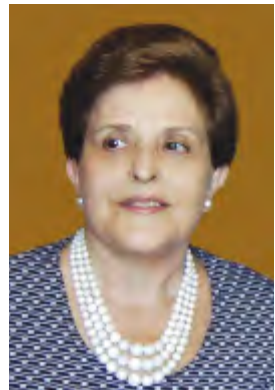


MANUEL BENITO DE LAS HERAS

Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Catedrático de la Universidad Complutense.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II
Facultad de Farmacia.
Plaza de Ramón y Cajal s/n.
28040 Madrid
Teléfono 91-3941777
benito@farm.ucm.es

MARÍA CASCALES ANGOSTO

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia
Doctora «Ad honorem» del CSIC
Farmacia 11,
28004 Madrid
Teléfono 91-5310307
mcascales@insde.es



RELACIÓN DE PARTICIPANTES



MANUEL DIEZ CURIEL

Unidad de Enfermedades Metabólicas
Óseas. Fundación Jiménez Díaz.
Profesor Asociado de Medicina. Facultad
de Medicina de la UAM
Servicio de Medicina Interna. Fundación
Jiménez Díaz.
Avda Reyes Católicos 2
28040 Madrid
Teléfono 91 5504919
FAX 91 5448729
mdcuriel@fjd.es

ANTONIO DOADRIO VILLAREJO

Académico de Número de la Real Academia
Nacional de Farmacia.
Departamento de Química Inorgánica.
Facultad de Farmacia, Universidad Complutense.
Plaza de Ramón y Cajal s/n.
28040 Madrid
Teléfono 91-5310307
FAX 91-5310307
adoadrio@raf.es



JOSÉ MARÍA FERNÁNDEZ-RAÑADA

Servicio de Hematología y Hemoterapia.
Hospital Universitario de la Princesa.
Universidad Autónoma.
Diego de León 62
28006 Madrid
Teléfono 91 5202421 y 91 5202316
FAX 91 5202326
hematologia.hipre@salud.madrid.org

RELACIÓN DE PARTICIPANTES



PEDRO GARCÍA BARRENO

Académico de Número de la Real Academia de Ciencias.
Catedrático de la Universidad Complutense.
Hospital General Universitario «Gregorio Marañón».
Doctor Esquerdo 46
28007 Madrid
Teléfono 91-5344702
pgbarreno@insde.es

AMANDO GARRIDO PERTIERRA

Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Catedrático de la Universidad Complutense.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV
Facultad de Veterinaria.
28040 Madrid
Teléfono 91-3943830
FAX 91- 3943824
agarrido@vet.ucm.es



RAMÓN GOMIS BARBARÁ

Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona.
Director de Investigación del Hospital Clínico.
Presidente de la Sociedad Española de Diabetes.
Departamento de Endocrinología y Diabetes.
Villarroel 170
08036 Barcelona
Teléfono 93 2279846-84
FAX 96 4516838
asalgot@clinic.ub.es

RELACIÓN DE PARTICIPANTES

EMILIO HERRERA CASTRILLÓN



Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular .
Universidad San Pablo CEU
Carretera Boadilla del Monte, km 5300
28668 Boadilla del Monte. Madrid
Teléfono 913724730
FAX 91 3510496
eherrera@ceu.es

FEDERICO MAYOR MENÉNDEZ

Catedrático de la Universidad Autónoma de Madrid.
Director del Departamento de Biología Molecular .
Centro de Biología Molecular .
28049 Cantoblanco. Madrid.
Teléfono 91-4974865
FAX 91-4974799
fmayor@cbm.uam.es



FEDERICO MAYOR ZARAGOZA

Académico de Número de la Real Academia Nacional
de Farmacia.
Farmacia 11
28004 Madrid
Teléfono 91 5310307
FAX 91 5310306
f.mayor@inves.es

RELACIÓN DE PARTICIPANTES

JOSÉ MARÍA MEDINA JIMÉNEZ



Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Catedrático de la Universidad de Salamanca.
Departamento de Bioquímica Y Biología Molecular.
Edificio Departamental.
Plaza de los Doctores de la Reina s/n
37007 Salamanca
Teléfono 923 294781
FAX 923 294564
medina@usal.es

MANUEL SERRANO RÍOS

Catedrático de la Universidad Complutense.
Servicio de Medicina Interna II
Hospital Clínico «San Carlos»
Universidad Complutense.
Martín Lagos s/n.
28040 Madrid
Teléfono 91 3303387
FAX 91 3303385
mserrano.hcsc@salud.madrid.org



MAGDALENA UGARTE PÉREZ



Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Catedrática del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma
Directora del Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM).
Facultad de Ciencias.
Universidad Autónoma.
28049 Cantoblanco. Madrid
Teléfono 91 734701 1
FAX 91 734 7797
mugarte@cbm.uam.es

Prólogo

JUAN MANUEL REOL TEJADA

Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia

Dentro del capítulo de Actividades, la Real Academia Nacional de Farmacia presenta hoy una nueva Monografía ENFERMEDADES METABÓLICAS. Es la XX de la colección, cuya publicación se inició en el año 1994 y cuya aceptación por los profesionales del área sanitaria ha sido importante.

Enfermedades metabólicas trata de aquellas patologías causadas por anomalías en sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo intermediario. Las anomalías pueden ser congénitas o adquiridas. Las congénitas son producidas por alteraciones genéticas que van a dar lugar a enzimas defectuosas (errores congénitos del metabolismo), mientras que las adquiridas son debidas a enfermedades de órganos endocrinos o al fallo de órganos metabólicamente activos. En las enfermedades metabólicas hereditarias el diagnóstico precoz es importante para conseguir un tratamiento efectivo. En este último aspecto hay que destacar que Federico Mayor Zaragoza, editor de esta obra, y Magdalena Ugarte, coautora de dos capítulos, pusieron en marcha en 1977 el Plan Nacional de Prevención de la Subnormalidad, para evitar, mediante el diagnóstico precoz, metabolopatías que cursan con deterioro mental. Gracias a esta iniciativa muchísimos niños españoles se han salvado de la subnormalidad.

Viví ese Plan como sanitario (Jefe de la Sección de Análisis de los Servicios Provinciales de Sanidad del Estado en Burgos). Creo que esta es, sin duda, la más importante contribución de Federico Mayor a la Sanidad española y fue un orgullo para los farmacéuticos sanitarios que un compañero, Catedrático de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, fuera su creador e impulsor. Recuerdo que Federico Mayor me relataba la emoción de S.M. La Reina cuando conoció el caso de una niña que gracias al Plan pudo evitarse que su error congénito del metabolismo le produjera una oligofrenia fe-

nilpirúvica. Es ahora, también, una gran satisfacción para mí que la Real Academia Nacional de Farmacia, que me honro en presidir edite esta magnífica publicación y que en ella figuren unas palabras introductorias del Profesor Mayor Zaragoza.

En el volumen que hoy presentamos, se abordan una serie de temas de grandísimo interés. Algunos de ellos se dedican a enfermedades de gran incidencia en nuestra sociedad, tales como la Diabetes tipo I, Resistencia a la insulina, Síndrome metabólico Osteoporosis, Osteomalacia y Raquitismo.

Alteraciones en el metabolismo y regulación del calcio. Hemocromatosis, Obesidad, etc. Otras se dedican a enfermedades que pueden ser diagnosticadas antes del nacimiento (Fenilcetonuria y Patología del metabolismo oxidativo del propionato) y otras de escasa incidencia como la trimetilaminuria, enfermedad debida a un defecto genético en la monooxigenasa dependiente del flavina 3 (FMO3) encargada del metabolismo de numerosos fármacos. También se incluyen otros tres capítulos de una gran repercusión patológica tales como: “Patología molecular de los sistemas de señalización adrenérgicos”, “Metabolismo en la etapa perinatal y sus repercusiones en enfermedades del adulto” y “Alteraciones en el desarrollo postnatal del cerebro”.

Desde aquí quiero agradecer a todos los autores, especialistas de primera línea, el esfuerzo que han puesto para la realización de cada capítulo. De manera muy especial este agradecimiento lo dedico a los editores que con su iniciativa y entusiasmo han llevado a cabo desde el principio hasta el final todas las etapas: elegir a los autores, poner fechas, enviar pruebas, etc. La Real Academia Nacional de Farmacia y todos sus miembros, se sienten orgullosos del resultado de este trabajo que es una prueba más de la intensa actividad de nuestra Academia.

No olvidemos, por último, que las enfermedades metabólicas son, en la actualidad, objeto de numerosas investigaciones encaminadas al desarrollo de fármacos destinados a corregir los trastornos tratando de aminorar el deterioro orgánico o reduciendo su impacto en otras patologías.

En esta obra hemos contado también con la colaboración de la Fundación Ramón Areces y la Fundación José Casares Gil, que han financiado la totalidad de los gastos de este volumen. Gracias a todos.

Una vez más ponemos a disposición de la comunidad académica, universitaria y sanitaria, muy especialmente, una obra de gran utilidad e interés.

Introducción

FEDERICO MAYOR ZARAGOZA
Y
MARÍA CASCALES ANGOSTO

Definir es «trazar un círculo en torno». Misión a menudo muy difícil. Otras veces, como la que nos ocupa, prácticamente imposible. ¿Qué enfermedades no son, en último término, «metabólicas»? Sin embargo, una vez advertida la imprecisión de los límites, hemos preferido mantener una denominación que, por su significado convencional, expresa mejor que cualquier otra el propósito de esta obra: reunir una serie de alteraciones que, por su variedad, reflejan el carácter pluridimensional de la patología.

Desde enfermedades condicionadas genéticamente —de manifestación pre o postnatal— a otras de aparición senil, las enfermedades metabólicas constituyen una excepcional fuente de conocimiento e inspiración. Su diagnóstico y tratamiento a tiempo permiten augurar una reducción sustancial de la morbilidad y una mejora de las condiciones crónicas que caracterizan la vida longeva.

En pocas décadas hemos transitado desde tratamientos tradicionales, acreditados a lo largo de muchos años, a los basados en el perfeccionamiento de remedios empíricos y, más recientemente, a los de diseño, acordes con el conocimiento profundo de la disfunción. De la reacción ante la enfermedad a la capacidad de predicción y, lo que es la gran victoria —no sólo en medicina—, la prevención. El simultáneo desarrollo de la física y la posibilidad de «visualizar» el organismo sin los efectos tóxicos de los rayos X, los grandes iniciadores de la prospección diagnóstica exterior, ha permitido avances espectaculares en la eficacia quirúrgica y la concreción de anomalías.

Al descifrarse el lenguaje de la vida no sólo se han abierto inmensas expectativas en favor de la homeostasis y la salud sino que se ha reforzado la autoestima de la especie humana, la única que es capaz de escapar —por su distintiva facultad creadora, intelectual— a la lógica, general y estricta, de la

complementariedad de formas en el espacio. Formas «químicas», según las características del entorno, cuya alteración afecta en mayor o menor grado las reacciones metabólicas y los reguladores, activadores, inhibidores, cofactores... de los que depende el ritmo fisiológico.

Estamos en un momento clave de la lucha en favor de la salud para todos. Frente a las grandes oportunidades que representan los progresos mencionados, se sitúan los igualmente considerables desafíos de nuestro tiempo: las enfermedades propias de la longevidad y del «apuntalamiento» de biología que, sin un apoyo permanente a su precariedad, se hubieran desmoronado mucho antes; y las enfermedades emergentes —*Ébola*, *Legionella*, SIDA, SARS... o re-emergentes (tuberculosis...); y las olvidadas, como la malaria, porque no afectan al mundo próspero; y las muy infrecuentes (menos para quienes las padecen y sus familiares!); y las sociales, como la obesidad y la anorexia; y las somatopsíquicas...

Debe producirse una auténtica inflexión en el establecimiento de prioridades y en las inversiones correspondientes, para que la situación presente a escala mundial —se trata de un destino común, que no reconoce razas, ni edades, ni género, ni color de piel, ni fronteras— pueda mejorarse progresivamente y seamos capaces de entregar a nuestros hijos un mundo menos trastocado y con horizontes más luminosos. No debíamos poder conciliar el sueño sabiendo que más de 40 mil personas mueren de hambre cada día; o de enfermedades que en los barrios acomodados de la aldea global ya han desaparecido hace tiempo; o por la imposibilidad de acceso a medicamentos protegidos por patentes que deberían eliminarse o disminuirse mediante las medidas y acuerdos adoptados internacionalmente a través de los sistemas de concertación apropiados.

Luchar contra el flagelo de la pobreza, la enfermedad y la discriminación no es una misión que corresponda a unos cuantos «utópicos», sino una exigencia ética de quienes pensamos que no podemos dejar a nuestros descendientes un planeta en crisis, donde se invierten fabulosas cantidades cada día en armamentos y se concentra la riqueza y el disfrute de bienes materiales en un 18% de sus habitantes. En donde nos preparamos para la guerra y no para la paz. Para el exterminio y no para la defensa de la vida.

Los derechos humanos son indivisibles, pero hay uno, el derecho a la vida, del que depende el ejercicio de todos los demás. La primera prioridad es la vida. La vida de cada ser humano, único, ese misterio. Y es en la vida y en gozar de buena salud en lo que debe concentrarse una gobernación eficiente. Este compromiso con la vida y la salud debe mantenerse sin desmayo. Sin dejarnos dis-

traer, es apremiante que reivindicemos la igual dignidad de todas las personas y, en particular, de los más vulnerables. De los enfermos. Que recordemos que todas las vidas valen lo mismo. Y todas las muertes.

Ciencia para la sociedad. Conocimientos para aliviar o evitar enfermedades. Contribuir al acervo del conocimiento es la gran misión de las universidades y de los centros de investigación, de los hospitales, de la comunidad científica en general. Saber para mitigar el sufrimiento humano. Para prevenirlo. Siendo conscientes de que, cuando se evita algo, los beneficios que tanto mejoran la calidad de vida son «invisibles». Y «ojos que no ven, corazón que no siente». Sabemos bien, desde que se puso en marcha el Plan Nacional de Prevención de la Subnormalidad la importancia de que todos, los gobernantes y los ciudadanos, sean capaces —como decía el Profesor Lawn, Premio Nobel de la Paz de 1985— de «ver los invisibles para hacer los imposibles.»

Es en este marco de exigencias éticas que se publica esta recopilación de enfermedades causadas por alteraciones metabólicas, congénitas o adquiridas. Disfunciones de la importancia de la diabetes, osteoporosis, enzimopatías perinatales, receptorpatías, errores genéticos, alteraciones en el desarrollo postnatal del cerebro, patología molecular de los sistemas de señalización, etc. Tenemos la seguridad de que esta publicación, dada la singular competencia y experiencia de los distintos autores, permitirá no sólo transmitir el conocimiento que hoy tenemos de estas enfermedades sino, lo que es más importante, aguzar el ingenio para desvelar los enigmas que hoy recubren y esconden todavía las causas de muchas enfermedades, impidiendo las estrategias terapéuticas pertinentes.

Se trata de un combate sin fin pero que va permitiendo no sólo dar más años a la vida de un número progresivamente mayor de personas, sino una mayor calidad, es decir, una salud mejor. Y esta salud, física y mental, es el gran objetivo de la sociedad. Y la gran recompensa de quienes dedican a él sus esfuerzos.

Diabetes mellitus tipo 1

RAMÓN GOMIS BARBARÁ

DIABETES MELLITUS TIPO 1: DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que afecta a la estructura de los tejidos, en especial la vascular, la renal y la retiniana, como consecuencia de un déficit parcial o total de la función de las células beta pancreáticas productoras de insulina, que provoca hiper glicemia. Se trata de una enfermedad prevalente que afecta en algunos países cerca del 20 por ciento de la población general (1).

La diabetes mellitus puede o no dar síntomas. Su presencia está relacionada con el grado de hiper glicemia. Cuando esta es severa el enfermo afectado por la enfermedad presenta sed intensa, con poliuria, polifagia, pérdida de peso y en situaciones extremas cetoacidosis o coma hiperosmolar no cetósico, que de no tratarse de manera adecuada conduce con certeza al estupor, al coma y a la muerte. En general, en la mayoría de formas de presentación la diabetes no da síntomas o éstos son poco severos como para llamar la atención del enfermo y que éste acuda al médico. En consecuencia, muy a menudo la diabetes mellitus se diagnostica en un análisis biológico de rutina o bien cuando el enfermo presenta una complicación de la enfermedad, sea una retinopatía diabética, una neuropatía, una complicación vascular o una insuficiencia renal. En algunos casos la enfermedad aparece durante un período concreto de tiempo y luego remite como sucede en pacientes tratados con esteroides o durante la gestación.

En función de los conocimientos que disponemos sobre la etiopatogenia de la enfermedad podemos clasificar esta de acuerdo a la tabla 1 (2).

TABLA 1

Clasificación de la diabetes mellitus

Tipo 1 Con destrucción de la célula beta y deficiencia absoluta de insulina

A. Autoinmune

B. Idiopática

Tipo 2 Deficiencia relativa de insulina con mayor o menor resistencia a la insulina

Otros tipos de diabetes mellitus :

Diabetes monogénica que afecta a la función beta pancreática.

Defectos genéticos que provocan resistencia a la insulina.

Enfermedades del páncreas exocrino

Endocrinopatías

Diabetes inducida por fármacos o drogas.

Infecciones.

Otras formas poco frecuentes de diabetes mediada por autoinmunidad.

Otros síndromes genéticos asociados

DIABETES GESTACIONAL

La diabetes mellitus tipo 1 es debida a una destrucción amplia de la población de células beta de los islotes pancreáticos. (fig.1) La causa primera que provoca esta forma de diabetes es desconocida. Se sospecha de un factor desencadenante ambiental que, en un territorio genético de predisposición, provocaría una respuesta autoinmune que sería el mediador de la destrucción de las células productoras de insulina. Este proceso de actividad autoinmune puede detectarse años antes de la aparición de la enfermedad por la presencia en el suero de los pacientes que van a sufrirla de anticuerpos contra la decarboxilasa del ácido glutámico (Ab GAD), la insulina (Ab IAA) y tirosin-fosfatasa (Ab IA2) que reflejan la actividad autoinmune que conlleva a la destrucción del islote pancreático. Las personas que sufren de diabetes a los que detectamos anticuerpos contra los péptidos antes señalados decimos que padecen diabetes tipo 1A, para diferenciarlos de aquellas que también sufren una diabetes insulínopénica sin autoinmunidad (diabetes tipo 1 B) (3,4).

La diabetes tipo 1 A muestra una estrecha asociación con haplotipos específicos de los locus DQ-A y DQ-B del complejo de antígenos de histocompati-

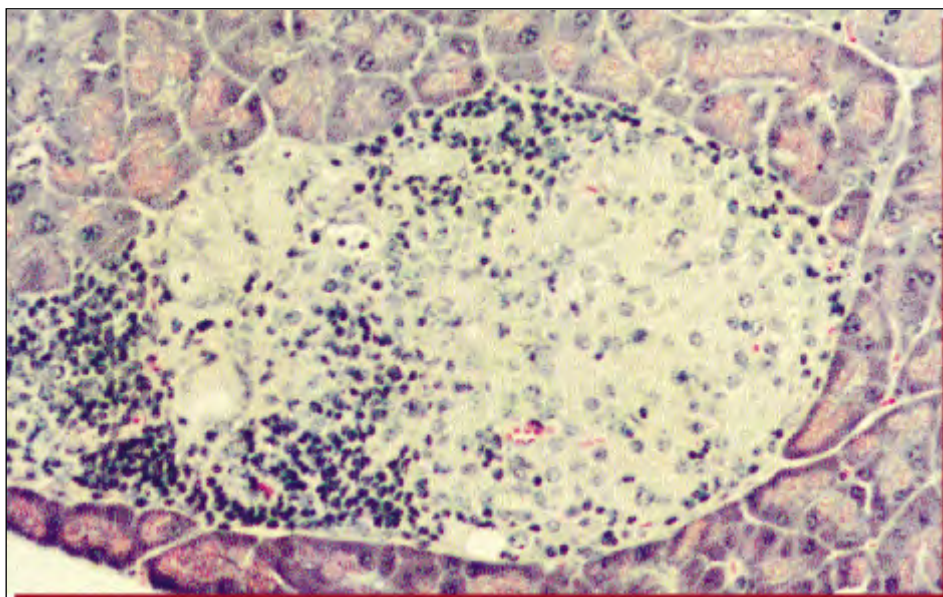


FIGURA 1. *Infiltración Linfocitaria y destrucción del islote pancreático.*

bilidad de clase II (HLA). El proceso que lleva a la insulinopenia total varía de unos individuos a otros. En los niños y adolescentes acostumbra a ser muy rápido lo cual exige un tratamiento inmediato con insulina. En cambio, en los adultos el proceso puede ser más lento, y en algunos casos los pacientes afectados pueden responder con normoglicemia sólo frente a las medidas dietéticas. Esta forma de presentación de la enfermedad recibe el nombre de LADA (Late autoimmune diabetes). En un porcentaje importante de pacientes la diabetes mellitus autoinmune se asocia a otras enfermedades que tienen este desencadenante común como la enfermedad de Graves, la tiroiditis autoinmune, el Addison, la celiacía, el lupus, etc. (5-9).

La diabetes tipo 1 B o idiopática, no deja de ser una definición por exclusión. Se trata de aquellos pacientes que sufren de diabetes mellitus tipo 1 sin marcadores de autoinmunidad y con una evolución clínica de la enfermedad más lenta que la diabetes mellitus tipo 1 A por lo que refiere a la pérdida progresiva de la función de las células β .

La diabetes mellitus tipo 1 tiene una incidencia anual de 10 nuevos casos diagnosticados por cien mil habitantes. Se diagnostica a edades tempranas de la vida, siendo su incidencia máxima en el período puberal.

La diabetes mellitus tipo 2 es la más común de los tipos de diabetes. Se caracteriza por una alteración progresiva en la función del islote pancreático en un ambiente de pérdida de sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina. La etiología de esta forma de diabetes no es conocida si bien se atribuye al ambiente un papel desencadenante de la enfermedad en relación especial a la ingesta calórica, al sedentarismo, y al proceso general de envejecimiento. En el momento del diagnóstico la mayoría de ellos pueden tratarse sólo con dieta y aumento de actividad física y más a medio plazo con antidiabéticos orales. El tratamiento con insulina a diferencia de lo que ocurre con la diabetes mellitus tipo 1 sólo es necesario en fases ya más avanzadas de la enfermedad. La mayoría de personas que sufren de diabetes tipo 2 son obesas y de hecho esta última enfermedad contribuye en gran manera a la aparición de la resistencia a la insulina, que es un elemento clave en el desarrollo de la enfermedad. A diferencia de la diabetes mellitus tipo 1, en sus fases iniciales la diabetes mellitus tipo 2 apenas da manifestaciones clínicas, por cuya razón la persona que la padece puede estar largo tiempo sin ser diagnosticada y, a menudo, en algunas ocasiones el diagnóstico se establece cuando se detecta alguna complicación que se da clínica, como por ejemplo la enfermedad cardiovascular, la retinopatía diabética y otras complicaciones. El riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2 aumenta con la edad, la obesidad y la vida sedentaria. Asimismo existe una importante carga hereditaria si bien no existe una herencia autosómica dominante. Las personas que la padecen acostumbran a tener antecedentes familiares de la propia diabetes tipo 2 o de enfermedades que se le asocian como la propia obesidad, la hipertensión arterial o la dislipemia y mujeres con historia de diabetes gestacional. La prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 en España varía de unos estudios a otros, entre un 6 a un 10 por cien entre la población general de más de 20 años.

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 que no son obesos deben ser objeto de especial atención. Se puede tratar de pacientes con anticuerpos antiislote circulante o contra péptidos del islote, ya hemos referido los Ab GAD, Ab insulina y Ab IA-2. En tal caso estamos frente a una diabetes de características muy similares a la diabetes mellitus tipo 1, tanto por su etiopatogenia como por su fisiopatología, y que puede requerir como en el caso de la diabetes mellitus tipo 2 tratamiento con insulina (10,1 1).

DIAGNÓSTICO

La diabetes mellitus tipo 1 se diagnostica por su clínica. Se trata de personas jóvenes que manifiestan sensación de cansancio, con pérdida de peso, po-

liuria, polidipsia y sin pérdida de apetito. Esta clínica les induce a consultar al médico que confirma el diagnóstico de diabetes con la determinación de una glicemia en sangre venosa casual —es decir en cualquier momento del día igual o superior a 200 mg/ml (11,1 mmol/L)— o en ayunas igual o superior a 126 mg/dl (7,0 mmol/L). Para definir que se trata de una diabetes mellitus tipo 1 es necesario practicar una cetonemia o una cetonuria, que será un indicador del aumento de la concentración plasmática de α -hidroxibutirato y acetoacetato. Si la cetonuria es positiva junto el valor de glicemia elevado y la clínica manifiesta, podemos asegurar el diagnóstico de la enfermedad y con ello iniciar sin más premuras el tratamiento. De no hacerlo y posponerlo hasta tener realizados estudios de autoinmunidad o hormonales se corre el riesgo de que la disfunción metabólica por falta de insulina progrese y el paciente entre en cetoacidosis, episodio que puede comprometer la vida del enfermo. No obstante, una vez iniciado el tratamiento debería etiquetarse la diabetes mellitus tipo 1 de acuerdo con la clasificación establecida, es decir, deberíamos evidenciar la presencia o no de marcadores de autoinmunidad. En la práctica clínica sólo se acostumbra a realizar estudios de anticuerpos en suero y, en especial aquellos anticuerpos que reaccionan frente a la insulina (Ab IAA), frente a la decarboxilasa del ácido glutámico (Ab GAD) y frente a la tirosin-fosfatasa (Ab IA2). Asimismo se debería practicar una prueba de función pancreática para conocer qué grado de función β pancreática se mantiene y ello debería hacerse con la administración de 1 mg. de glucagon endovenoso y a la determinación del Péptido C (el mejor marcador de insulina endógena) en situación basal y a los 6 minutos del estímulo hormonal. Además sería recomendable investigar desde el inicio de la enfermedad la presencia de otras enfermedades asociadas (12,13).

La diabetes mellitus tipo 1 A se asocia a otras enfermedades autoinmunes (la enfermedad de Graves y la tiroiditis autoinmune, la celiaquía, el Addison, el vitíligo, la anemia perniciosa). Es por ello que resulta necesario, en el momento del diagnóstico, explorar la presencia de anticuerpos antitiroideos para descartar una tiroidopatía autoinmune, antimucosa gástrica para descartar una anemia perniciosa, antiadrenales para hacerla con la enfermedad de Addison entre otros. Tampoco debería olvidarse el estudio del patrón lipídico en base al elevado riesgo cardiovascular que presentan las personas que sufren diabetes (14-16).

Una vez diagnosticado el paciente y tratado, se prestará especial atención para prevenir y detectar precozmente cualquier complicación que en el transcurso de la historia natural de la enfermedad diabética pueda surgir, tanto complicaciones agudas como la cetoacidosis y el coma hipoglicémico, como crónicas, sea la retinopatía diabética, la neuropatía periférica o vegetativa, la

nefropatía o la enfermedad cardio-vascular . Para ello deberán practicarse exámenes periódicos de fondo de ojo, de función renal con estudio de microalbuminuria, exploración de pulsos y sensibilidades en extremidades inferiores y análisis de registros cardiovasculares (ECG, doppler , MAPA).

HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD

La diabetes mellitus es una enfermedad que empieza años antes que aparezcan sus síntomas. En un determinado sustrato genético aún no bien conocido, desencadenantes diversos son capaces de generar una respuesta autoinmune contra la morfología del islote, en especial sobre la población de células β pancreáticas. En un primer momento esta agresión genera una destrucción parcial que no compromete la homeostasis del metabolismo y sólo comporta la presencia de autoanticuerpos contra proteínas del islote pancreático. Más adelante, incluso tras varios años, un segundo brote de autoinmunidad o una agresión mantenida supone la pérdida de masa celular en una cantidad que si bien no supone una insulinopenia que genere trastornos clínicos si que puede provocar trastornos metabólicos menos graves, tales como una intolerancia hidrocarbonada a la sobrecarga oral con glucosa o la pérdida de la pulsatilidad o de la fase rápida tras estímulo en la secreción de insulina. En poco tiempo esta pérdida de masa celular se agrava y la capacidad funcional del islote es insuficiente para mantener un adecuado metabolismo de los principios inmediatos y ya aparecen síntomas claros de diabetes mellitus tipo 1. De no mediar intervención terapéutica esta insulinopenia va a provocar acidosis y deshidratación con estupor, coma y shock que conduce a la muerte del paciente.

El desarrollo de la historia natural de la enfermedad diabética sufrió un cambio importante tras el descubrimiento de la insulina y su aplicación en el tratamiento de los enfermos que sufren diabetes. Gracias a este descubrimiento la diabetes mellitus tipo 1 pasó de ser considerada una enfermedad aguda a una crónica y los pacientes mejoraron su esperanza de vida, si bien son dependientes de la administración de la hormona exógena. De ahí que la diabetes mellitus tipo 1 fuera señalada durante un tiempo como diabetes insulino-dependiente. No obstante, lejos de las esperanzas iniciales tras el tratamiento de la diabetes con el uso de la insulina se ha observado que si bien los pacientes se encuentran libres de síntomas, con el tiempo aparecen complicaciones algunas de ellas específicas de la enfermedad tales como la retinopatía diabética, la neuropatía diabética y la nefropatía diabética. La prevalencia de estas complicaciones está muy relacionada con el grado de control metabólico obtenido. Sabemos que a

mejor control metabólico menor riesgo de complicaciones específicas e incluso hoy día tenemos estrategias terapéuticas que pueden modificar la evolución natural de la retinopatía (laserterapia del fondo de ojo) y la nefropatía (tratamiento antihipertensivo especialmente inhibiendo o bloqueando el sistema renina-angiotensina).

Frente a esta historia natural muchos clínicos se preguntan sino sería más eficiente la prevención de la enfermedad que el tratamiento. No hay duda que llevan razón. Sin embargo, la prevención de la enfermedad diabética, con medidas generales que pudieran modificar la aparición de la autoinmunidad, o mediante la modulación de la actividad autoinmune o la protección de la célula β frente la apoptosis inducida, ha resultado un fracaso. Ninguno de los tratamientos aplicado, que resultaron eficientes en animales de experimentación, ha dado resultados de interés en humanos. Se ha ensayado modificar los hábitos nutricionales (excluyendo proteína bovinas en la alimentación de los recién nacidos), inducir inmunotolerancia mediante la administración precoz de insulina u otros péptidos en personas asintomáticas con marcadores de autoinmunidad, proteger la pérdida de masa celular mediante inhibidores de poli-ADP-ribosa como la nicotinamida y/o barrenderos de radicales libres y nada ha resultado exitoso. Aquellos tratamientos que podían dar buenos resultados como algunos inmunodepresores (ciclosporina, azatioprina, algunos monoclonales) tienen un perfil de seguridad que no permite darlos en prevención de la enfermedad. Con los actuales conocimientos sólo somos capaces de prevenir las complicaciones y ello podemos hacerlo de varias maneras algunas ya señaladas, pero la más importante de todas es alcanzar un buen control metabólico de la diabetes mellitus (17-20).

Diversos autores ya habían señalado que la presentación de complicaciones no estaba relacionada ni con el diagnóstico ni con el tiempo de evolución de la enfermedad. Había datos que sugerían que la aparición de complicaciones estaba relacionado con las glucosurias, las glicemias basales y los perfiles glicémicos. El descubrimiento que el análisis del grado de glicosilación de una proteína renovable como la hemoglobina permitió disponer de un indicador del grado de control metabólico de los pacientes con diabetes. Asimismo facilitó el diseño del primer estudio prospectivo de calidad donde se investigó el grado de control metabólico medido por la hemoglobina glicada en dos cohortes de pacientes, unos con control metabólico convencional y otro con tratamiento intensificado con dosis múltiples de insulina o infusores de la hormona. Se suponía y, así se observó, que el grupo con tratamiento convencional tenía una hemoglobina glicada más alta que el grupo con tratamiento intensivo, lo cual era indicador de un peor control metabólico.

Los resultados de este estudio Diabetes Control Therapeutic Trial (DCTT) demostraron que a mejor control metabólico menor incidencia de retinopatía, neuropatía y nefropatía diabética. Existe un antes y un después de este estudio, el paradigma quedó establecido, a mejor control, protección frente a las complicaciones. Además dio un soporte definitivo al uso de la hemoglobina glicada como el patrón oro para definir el estatus de control metabólico y por tanto para proponer cambios en el diseño terapéutico, por ejemplo dosis múltiples de insulina. Asimismo señaló la importancia de la educación terapéutica para lograr que el propio paciente colaborara activamente en el control y tratamiento de la propia enfermedad (21,22).

TRATAMIENTO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 1

La diabetes mellitus tipo 1 es una enfermedad con un déficit casi total de secreción de insulina tanto en condiciones basales como postprandiales. Por consiguiente el tratamiento base de esta forma de diabetes es la administración exógena de insulina. De no hacerlo se compromete la vida del paciente. Sentada esta premisa debemos manifestar que el tratamiento es mucho más complejo que la simple administración de insulina ya que se requieren otras medidas necesarias para lograr el objetivo de alcanzar un buen control metabólico y con ello prevenir en lo posible las complicaciones crónicas.

La dieta fue durante años el único tratamiento eficaz para prolongar la vida de las personas que sufrían de la hoy llamada diabetes mellitus tipo 1. Las dietas que se prescribían tenían escasa cantidad de hidratos de carbono y en su lugar aportaban una cantidad importante de grasas. Tras el uso terapéutico de insulina se han sugerido otras pautas nutricionales con las siguientes premisas: a) mantener un aporte de hidratos de carbono superior como mínimo al 50%, es decir muy parecido al sugerido para la población general. b) reducir el aporte de hidratos de carbono de absorción rápida y sustituirlos por hidratos de carbono complejos con fibra. c) mantener un aporte de grasas y proteínas similar al recomendado para la población general haciendo especial énfasis en la reducción del aporte calórico de grasas saturadas. d) distribuir los hidratos de carbono a lo largo de un mínimo de tres ingestas al día, recomendando en determinados pacientes la toma de un suplemento a media mañana, la merienda o una colación antes de acostarse. e) diseñar una dieta que facilite una integración plena a la vida social y laboral.

El segundo punto clave del tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 es la prescripción de una buena dosis de educación diabetológica que permita reali-

zar correctamente la dieta, adecuarla a distintos estilos de vida, a la actividad laboral, a la aparición de enfermedades intercurrentes, al ejercicio físico y a los viajes a otras culturas. Además esta educación terapéutica debe permitir no sólo a que el paciente se autoadministre la insulina sino que a modifique su dosis en función de los valores de glicemia capilar que obtenga tanto en situaciones basales como postprandiales. Por otra parte debe permitir al paciente resolver los episodios de hipoglicemia mediante la administración de bebidas azucaradas y debe instruir a familiares y amigos, a la administración de glucagon para resolver la hipoglicemia en caso de que a consecuencia de esta el enfermo pierda el conocimiento y adaptar la pauta a situaciones mayor o menor demanda sea el ejercicio físico, sea un síndrome febril o un episodio de gastroenteritis. Será también necesario enseñarlo el cuidado de sus pies con el objeto de evitar roces o rasguños que pudieran comprometer en el futuro la integridad de su pie, en caso de sufrir neuropatía y/ o vasculopatía periférica. En algunos casos la educación terapéutica debe enseñar la carga del infusor de insulina, la colocación del catéter subcutáneo, el manejo de los algoritmos de tratamiento, y la solución de pequeños problemas en el mecanismo de infusión (23-26).

El tercer pilar del tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 es la administración de insulina. Las primeras insulinas aplicadas eran extractos ácido-alcohol de páncreas de animales con posterior cristalización de los hexámeros de insulina. Debían administrarse por inyección subcutánea o intramuscular, ya que la insulina por administración oral no tenía ningún efecto antidiabético. Las insulinas obtenidas tenían origen bovino o porcino, y su duración no iba más allá de la cuatro a seis horas. No fue hasta más tarde que se logró una insulina de más larga acción, modificando la concentración de Zinc, el pH, y añadiendo protamina. La más conocida de estas insulinas es la neutra protamina zinc de Hagerdon, o NPH. Más adelante se modificó la insulina mediante tampones acetato y aparecieron una insulinas semilentas, lentas, y ultralentas. Todas ellas son historia a excepción de la NPH que en versión moderna sigue siendo de gran utilidad. Las insulinas de procedencia animal eran inmunogénicas y en los primeros años de su administración provocaban frecuentes reacciones alérgicas. El desarrollo de la biología molecular permitió sintetizar insulina humana a partir de bacterias y levaduras, y de esta forma se evitaron los problemas inmunogénicos y la fuente de obtención de insulina quedó asegurada al margen de cualquier enfermedad que afectara a las cabañas de cerdos o bueyes. Asimismo se garantizó la no transmisión de enfermedades de animales a la especie humana. No obstante el perfil de las insulinas siguió siendo el mismo, es decir aquel ya descrito para las insulina procedentes de animales; una insulina regular de acción rápida (4-6 horas) y un panel de insulinas intermedias y prolongadas con

una biodisponibilidad muy variable, de las cuales destaca por su eficiencia y reproductibilidad la antes referida como NPH. No obstante, el conocimiento de la biología molecular también permitió aplicar la mutagénesis dirigida y lograr análogos de insulina con un perfil de acción que permitiera mimetizar con mayor aproximación las excursiones secretoras de insulina en las personas sanas y con ello limitar en lo posible los picos de hiperglicemia. En la actualidad se disponen de análogos de insulina de acción corta y acción larga con perfiles, en la mayoría de casos, más óptimos para lograr la normoglucemia sin hipoglucemia. Es más, hoy día están en desarrollo análogos de insulina que permiten administrarse por vía respiratoria o a través de las mucosas, con una biodisponibilidad que permite su aplicación futura a la clínica práctica.

Uno de los temas de más interés en diabetes es el análisis de cuales son las mejores pautas para el tratamiento de la diabetes tipo 1. En la actualidad existe un consenso general, en el sentido que el tratamiento óptimo de esta forma de diabetes exige la administración de insulina en dosis múltiples o a través de un infusor continuo de insulina, también llamado bomba de insulina. Entre las distintas pautas de insulina la más utilizada es aquella que aplica una insulina de acción rápida o análogo antes del desayuno, de la comida y de la cena, y una insulina de acción intermedia NPH o análogo de acción prolongada antes de acostarse. No obstante no siempre se consigue un buen control con esta pauta y hay otras alternativas que pueden ser tanto o más eficaces. Algunos pacientes responden bien a la administración de mezclas de insulinas de acción rápida e intermedia antes del desayuno y comida, con una rápida antes de la cena y una intermedia antes de acostarse. En cualquier caso el médico debe conocer bien la biodisponibilidad y los perfiles farmacocinéticos de cada una de las insulinas para indicar las más adecuadas a cada tipo de paciente en función de su fenotipo y su estilo de vida. Este tipo de tratamiento se ha simplificado mucho desde que pueden utilizarse plumas para la administración de insulina, es decir, instrumentos que contienen un reservorio de insulina, un sistema de dosificación mecánico que puede ajustarse con facilidad y agujas de pequeño calibre que duelen mucho menos.

Una alternativa a las dosis múltiples de insulina es la administración de insulina a través de infusores continuos que pueden programarse individualmente. Este tipo de instrumentos que se aplican a través de un pequeño catéter en el tejido subcutáneo, tienen la ventaja que permiten la infusión continua de insulina (se recomienda un análogo de absorción rápida) y la administración de pulsos de insulina antes de las comidas bien sean las principales (desayuno, comida y cena) bien sean la secundarias (merienda, colaciones, snacks). Este tipo

de administración puede resultar más cómoda para el paciente, en especial porque permite horarios más flexibles y en algunos casos puede permitir un mejor control sin riesgo de hipoglicemia. Su coste —sin duda alguna— es superior al tratamiento optimizado con dosis múltiples (27-30).

Un comentario aparte debe dedicarse a los controles de glicemia. Desde la aparición de distintos sistemas de lectura de la glicemia capilar a través de tiras reactivas colorimétricas con lector específico, la determinación de la glucosa en sangre capilar es un instrumento capital para conseguir un control óptimo. Ello exige, cualquiera que sea el sistema de administración de insulina que se emplee, la determinación de la glucosa capilar varias veces al día. Esta prueba no es incruenta, duele, y algunos pacientes no alcanzan un control óptimo de las excursiones glucémicas no tanto porque no acepten la administración de dosis múltiples o la prescripción de un infusor continuo de insulina sino porque no soportan los controles de glucemia capilar varias veces al día. Por esta razón se están desarrollando nuevos sistemas de monitorización continua de la glicemia que a la vez que mejoran el control habitual de la glucosa capilar permiten hacerlo sin dolor (31-34).

La motivación personal y el soporte del entorno son básicos para el buen tratamiento del diabético tipo 1. Los mejores resultados se alcanzan con equipos interdisciplinarios en los que participa un médico especialista, una enfermera educadora y un psicólogo especializado, y en algunos casos puede necesitarse la ayuda de una nutricionista o un entrenador físico. Todos ellos son claves para permitir que el paciente adquiera los conocimientos necesarios, para que quiera aplicarlos y lo haga sin merma de su calidad de vida. A lo largo de la historia natural de la diabetes otros especialistas van a ser necesarios: el podólogo, el nefrólogo, el oftalmólogo etc. Debe entenderse bien que la diabetes por su complejidad necesita el trabajo en equipo, asumiendo un papel responsable cada uno de los profesionales que le atiendan con un liderazgo claro de su médico especialista, que en algunos casos por la cronicidad de la enfermedad y su larga evolución se convierte en su consultor médico.

COMPLICACIONES AGUDAS

La diabetes mellitus tipo 1 puede complicarse. La complicación más común es la hipoglicemia que puede deberse a una aplicación mayor de insulina que la necesaria o a la falta de ingesta, en especial de hidratos de carbono. Una insulinemia superior a la necesaria puede ser debida a cambios en la biodisponibilidad de una misma dosis de insulina, porque la inyección lo fue a mayor pro-

fundidad de la esperada o que se inyectó en una zona muy vascularizada, o en un miembro que participa en un ejercicio físico intenso. También puede deberse a errores en la dosis administrada o a la falta de precisión de algunos dispositivos que tienen un coeficiente de variación muy amplio. No obstante la mayoría de hipoglicemias son debidas a una ingesta de alimentos inferior a la programada, por inapetencia, por vómitos o por errónea proporción de hidratos de carbono en la ingesta. También es frecuente la hipoglicemia por un aumento de necesidades de nutrientes no programada o mal diseñada, por ejemplo cuando se practica ejercicio. En otros casos se trata de un simple retraso en la programación de una comida, que en lugar de efectuarse a una hora por los motivos que fuere se retrasa (35-39).

La mayoría de estas hipoglicemias son leves. El paciente se da cuenta de la situación por los síntomas de la hipoglicemia y actúa en consecuencia, es decir, se autoadministra una dosis suplementaria de hidratos de carbono de absorción rápida. Los síntomas que alertan al paciente son diversos, pueden variar de un individuo a otro y están relacionados no sólo con la concentración de glucosa en los tejidos sino también con la brusquedad de la caída. Todos los síntomas expresan un estatus hiperadrenérgico, con sudoración, temblor, agresividad y taquicardia. Además, el paciente nota sensación de hambre y falta de atención y concentración para ejercer sus habilidades. En algunos casos sufre somnolencia. Estos síntomas son detectados por el paciente, que entrenado actúa en consecuencia y convierte la hipoglicemia en un malestar pasajero. Aquellas que suceden mientras el paciente duerme acostumbran a despertarlo y ello le permite corregir la situación metabólica. Si la hipoglicemia no se detecta o ésta es mucho más intensa, el paciente que la sufre puede entrar en un estado de confusión y coma que no le permite tomar las decisiones adecuadas. En estos casos necesita la ayuda de una segunda persona que conviva con el paciente, dada la emergencia de la situación. En estos casos el familiar, el amigo o el compañero que convive con el enfermo debe saber qué actitud tomar. Por regla general el estado de confusión permite la ingesta de un líquido azucarado, lo más recomendable es una solución de glucosa y el aumento inmediato de las concentraciones de glucosa permite recuperar la conciencia y ampliaría la ingesta a un hidrato de carbono de absorción rápida. En otros casos el paciente está en coma y cualquier ingesta podría causar problemas al paciente. En tal caso debe de disponerse en el domicilio o en el lugar de trabajo del paciente un inyectable de glucagon que aplicado por vía parenteral va a permitir la recuperación momentánea de la conciencia y la ingesta de un líquido azucarado. De no responder al glucagon, la administración de glucosa endovenosa debe ser lo más precoz posible y continuada hasta la recuperación de la conciencia por parte del paciente (40,41).

La hipoglicemia grave es poco frecuente, pero en algunos casos puede llegar a causar la muerte del paciente, en especial si se debe a una administración errónea de insulina y ésta sucede durante la noche persistiendo la hipoglicemia durante horas. Sin embargo, contra lo que pudiera parecer, son más graves las hipoglicemias por antidiabéticos orales, tipo sulfonilureas, en especial afectan a personas mayores con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2.

La otra complicación de la diabetes mellitus tipo 1 es la cetoacidosis diabética. Es consecuencia de un déficit en las concentraciones de insulina. Puede aparecer antes del diagnóstico de la enfermedad o tras el diagnóstico porque la dosis administrada es insuficiente para mantener las necesidades biológicas, en algunos casos por abandono de la administración, otros por errores, otros por aumento en las necesidades.

El paciente en insulinopenia presenta hiperglicemia con aumento de cuerpos cetónicos y deshidratación. De no corregirse esta situación el cuadro persiste con pérdida de bicarbonatos, acidosis metabólica, y deshidratación más acusada. En estas condiciones el paciente sufre obnubilación, pérdida de habilidades, puede presentar shock y más adelante coma y muerte.

El tratamiento de base consiste en corregir la deshidratación, corregir la acidosis con suma prudencia, corregir el aporte de electrolitos, tanto de sodio, como pasados los primeros treinta o sesenta minutos, de potasio. Por añadidura administrar insulina endovenosa por perfusión a razón de 6 a 10 unidades hora o en bolus cada treinta minutos. Asimismo deberán tomarse las medidas necesarias para corregir los factores causales (una infección por ejemplo que aumentara las necesidades) o las enfermedades intercurrentes que puedan aparecer en el transcurso del episodio (42-45).

Una buena educación del paciente previene la mayoría de casos de cetoacidosis.

COMPLICACIONES CRÓNICAS

Las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus cabe atribuir las a la hiperglicemia crónica. Esta hiperglicemia crónica es glucotóxica para diversos tejidos, tanto por su capacidad de glicosilación no enzimática de las proteínas, como de inducir la actividad de radicales libres y contribuir con ello a la inflamación de distintas dianas moleculares. Además, en otros tejidos el exceso de glucosa sin insulina provoca un aumento en la actividad de la vía del sorbitol y el acúmulo de éste en determinadas estructuras comprometiendo su integridad.

La retinopatía acompaña a la mayoría de pacientes que sufren de diabetes mellitus tipo 1. Podríamos señalar que si un diabético tipo 1 vive el tiempo suficiente a lo largo de su biografía va a presentar en un grado mayor o menor retinopatía diabética. La retinopatía diabética se inicia por una lesión de los pericitos de los vasos capilares, que puede provocar microaneurismas, microhemorragias y exudados. De persistir esta situación el flujo sanguíneo a determinadas áreas de la retina va a quedar comprometido con lo cual van a sufrir de isquemia. Esta isquemia estimula factores de crecimiento lo que estimula la neoproliferación de diversos vasos, es lo que llamamos retinopatía proliferativa. Esta lesión ya puede comprometer la agudeza visual, pues los neovasos son frágiles, sangran con facilidad y aparecen hemorragias de vítreo que enturbian los humores y la visión se entorpece. Además los neovasos facilitan el desprendimiento de la retina y ellos mismos emiten proliferaciones que obstaculizan la visión macular (46-48).

El tratamiento de la retinopatía diabética en sus fases iniciales es la fotocoagulación de las zonas isquémicas para evitar la aparición de proliferaciones a la vez que se protege la retina. Más adelante cuando aparece la hemorragia de vítreo es necesaria la vitrectomía por lo general con fotocoagulación asociada.

La nefropatía diabética es otra complicación específica de la diabetes mellitus. La hiperglicemia crónica favorece un aumento del filtrado glomerular que es reversible. El aumento de la presión inducido por esta hiperglicemia favorece una hipertensión glomerular, y una lesión esclerosa del propio glomerulo. El primer indicador de este aumento de tensión en la microcirculación renal es la aparición de microalbuminuria. Esta fase también puede ser reversible con tratamiento hipotensor en especial está bien documentado para tratamientos con IECAS y ARA-II. Mas adelante la lesión es irreversible y aparece proteinuria y daño renal con afectación del propio filtrado glomerular que conduce a la insuficiencia renal. Los pacientes pueden llegar a la insuficiencia renal terminal y el único tratamiento es la diálisis y el trasplante (49-52).

La neuropatía puede afectar a los nervios periféricos o al sistema nervioso vegetativo. En el primer caso afecta por lo general las extremidades inferiores, con sensación de hiperestesia o anestesia, con pérdida de la percepción térmica y de la sensibilidad nerviosa profunda. El paciente puede sufrir dolores nocturnos en ambas extremidades, con sensación de quemazón y/u hormigueo. La sintomatología es diversa pero siempre simétrica y de preferencia nocturna. En los estadios más iniciales pueden aparecer calambres. No hay un tratamiento causal, si bien parece que la normalización de la glicemia favorece la disminución de la sintomatología. El tratamiento es sintomático mediante analgesia y anti-

depresivos. La complicación más grave de la neuropatía periférica es el pie diabético, por pérdida de sensibilidad y artropatía de Charcot. El paciente debe adiestrarse en el cuidado de los pies, en especial si hay anestesia térmico-dolorosa como consecuencia de una neuropatía periférica. La prevención también en esta complicación es más eficaz que el tratamiento (53-55).

La neuropatía vegetativa se manifiesta por hipotensión ortostática, gastroparesia, estreñimiento pertinaz con desplomes diarreicos e incontinencia fecal, vejiga neurógena e hiperhidrosis supraumbilical. Pueden aparecer todos los síntomas o sólo uno de ellos. Los tratamientos son sintomáticos ya que no existe un tratamiento causal. La complicación más grave es la alteración neurovegetativa con afectación cardiovascular que puede comprometer la función cardíaca en situaciones complejas como por ejemplo durante la anestesia. Es por ello que en estos pacientes se recomiendan pruebas de función cardiovascular antes de las intervenciones quirúrgicas (56-58).

La enfermedad cardiovascular se asocia a la diabetes mellitus tipo 1, es más frecuente y precoz en esta población, pero no puede considerarse una complicación específica de la enfermedad.

En su conjunto las complicaciones específicas en la diabetes mellitus tipo 1 deben prevenirse mediante el control lo más estricto posible de la hiperglicemia y de aparecer tratarse en sus fases más incipientes (59).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Gavin JR III, Alberti KGMM, Davidson MB, et al. (1997) Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **20**, 1183-1197.
- (2) WHO Study Group. Diabetes mellitus. Technical Report Series 727. Geneva: World Health Organization, 1985.
- (3) Rewers M, Norris, JM, Eisenbarth GS, et al. (1996) Beta-cell autoantibodies in infants and toddlers without IDDM relatives: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *J Autoimmun* **9**, 405-410.
- (4) Bingley PJ, Christie MR, Bonifacio E, et al. (1994) Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. *Diabetes* **43**, 1304-1310.
- (5) Nepom GT, Kwok WW. (1998) Perspectives in diabetes: molecular basis for HLA-DQ associations with IDDM. *Diabetes* **47**, 1177-1184.

- (6) Thorsby E. (1997) Invited anniversary review: HLA associated diseases. *Hum Immunol* **53**,1-11.
- (7) Foulis AK, McGill M, Farquharson MA. (1991) Insulinitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man —macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells. *J Pathol* **165**, 97-103.
- (8) Noble JA, Valdes AM, Cook M, et al. (1996) The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. *Am J Hum Genet* **59**, 1134-1148.
- (9) Todd JA (1999) From genome to aetiology in a multifactorial disease, type 1 diabetes. *Bioassays* **21**, 164-174.
- (10) Harris MI, Flegal KM, Cowie CC, et al. (1998) Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994 *Diabetes Care* **21**, 518-524.
- (11) DeFronzo RA, Ferrannini E. (1991) Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* **14**, 173-194.
- (12) Verge CF, Stenger D, Bonifacio E, et al. (1998). Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibody) in type 1 diabetes: combinatorial islet autoantibody workshop. *Diabetes* **47**,1857-1866.
- (13) Abiru N, Takino H, Yano M, et al. (1996) Clinical evaluation of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients with autoantibodies to glutamic acid decarboxylase. *J Autoimmun* **9**, 683-688.
- (14) Neufeld M, Maclaren NK, Blizzard RM. (1981) Two types of autoimmune Addison's disease associated with different polyglandular autoimmune (PGA) syndromes. *Medicine (Baltimore)* **60**, 355-362.
- (15) Yu L, Brewer KW, Gates S, et al. (1999) DRB1*04 and DQ alleles: expression of 21 hydroxylase autoantibodies and risk of progression to Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 328-335.
- (16) Victoria JC, Castano L, Rica I, et al. (1998) Association of insulin-dependent diabetes mellitus and celiac disease: a study based on serologic markers. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **27**, 47-52.
- (17) Eisenbarth GS. (1986) Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* **314**, 1360-1368.
- (18) Srikanta S, Ganda OP, Jackson, RA, et al. (1983) Type I diabetes mellitus in monozygotic twins: chronic progressive beta cell dysfunction. *Am Intern Med* **99**, 320-326.

- (19) Srikanta S, Ganda OP, Rabizadeh A, et al. (1985) First-degree relatives of patients with type I diabetes mellitus. Islet cell antibodies and abnormal insulin secretion *N Engl J Med* **313**, 461-464.
- (20) Colman PG, McNair P, Steele C, et al. (2000) Linear decline in insulin production prior to development of type 1 diabetes – a reality . *Diabetes* **49**, A36 (abst).
- (21) DCCT Research Group. (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* **329**, 977-986.
- (22) Gras AL. (1993) The child, the adolescent, and the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* **16**, 1515-1516.
- (23) Mortensen HB, Vestermark S, Kastrup KW (1982) Metabolic control in children with insulin dependent diabetes mellitus assessed by hemoglobin A1c. *Acta Paediatr Scand* **71**, 217-222.
- (24) Tubiana-Rufi N, Moret L, Czernichow P, et al. (1995) Risk factors for poor glycaemic control in diabetic children in France. *Diabetes Care* **18**, 1479-1482.
- (25) DCCT / EDIC Research Group. (2002) Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus. *JAMA* **287**, 2563-2569.
- (26) Lalli C, Ciofetta M, Del Sindaco P, et al. (1999) Long-term intensive treatment of type 1 diabetes with the short-acting insulin analog lispro in variable combination with NPH insulin at mealtime. *Diabetes Care* **22**, 468-477.
- (27) Wolfsdorf JI, Laffel LM, Pasquarello C, et al. (1991) Split-mixed insulin regimen with human ultralente before supper and PH (isophane) before breakfast in children and adolescents with IDDM *Diabetes Care* **14**, 1100-1106.
- (28) Boland EA, Grey M, Oesterle A et al. (1999) Continuous subcutaneous insulin infusion. A new way to lower risk of severe hypoglycemia, improve metabolic control, and enhance coping in adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care* **22**, 1799-1784.
- (29) Continuous subcutaneous insulin infusion (2003) *Diabetes Care* **26**, Suppl S125.
- (30) Kanc K, Janssen MM, Keulen ET, et al. (1998) Substitution of night-time continuous subcutaneous insulin therapy for bedtime NPH insulin in a multiple injection regimen improves counterregulatory hormonal responses and warning symptoms of hypoglycaemia in IDDM. *Diabetologia* **41**, 322-329.
- (31) Schafer LC, Glasgow RE, McCaul KD, et al. (1983) Adherence to IDDM regimens: relationship to psychosocial variables and metabolic control. *Diabetes Care* **6**, 493-498.
- (32) Temple MY, Bar-Or O, Riddell MC (1995) The reliability and repeatability of the blood glucose response to prolonged exercise in adolescent boys with IDDM. *Diabetes Care* **18**, 326-332.

- (33) Kaufman FR (1998) Diabetes in children and adolescents. Areas of controversy. *Med Clin North Am* **82**,721-738.
- (34) Tests of glycemia in diabetes.(2003) *Diabetes Care* **26**, S106-S108..
- (35) Kitabchi A, Umpierrez G, Murphy M, et al. (2001) Management of hyperglycemic crises in patients with diabetes. *Diabetes Care* **24**, 131-153.
- (36) Javor K, Kotsanos J, McDonald R, et al. (1997) Diabetic ketoacidosis charges relative to medical charges of adult patients with type I diabetes. *Diabetes Care* **20**, 349-354.
- (37) Murphy C, Faulkenberry E, Rumpel J, et al. (1985) The use of country hospital emergency room by diabetic patients. *Diabetes Care* **8**, 48-51.
- (38) White NH, Skor DA, Cryer PE, et al. (1983) Identification of type I diabetic patients at increased risk for hypoglycemia during intensive therapy. *N Engl J Med* **308**, 485-491.
- (39) Amiel SA, Sherwin RS, Simonson DC, et al. (1988) Effect of intensive insulin therapy on glycemic thresholds for counterregulatory hormone release. *Diabetes* **37**, 901-907.
- (40) Shalwitz RA, Farkas-Hirsch R, et al. (1990) Prevalence and consequences of nocturnal hypoglycemia among conventionally treated children with diabetes mellitus. *J Pediatr* **116**, 685-689.
- (41) Beregszaszi M, Tubiana-Rufi N, Benali K, et al. (1997) Nocturnal hypoglycemia in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus: prevalence and risk factors. *J Pediatr* **131**, 27-33.
- (42) Heller SR, Amiel SA, Mansell P (1999) Effect of the fast-acting insulin analog lispro on the risk of nocturnal hypoglycemia during intensified insulin therapy: U.K. Lispro Study Group. *Diabetes Care* **22**, 1607-1611.
- (43) Mohn A, Matyka KA, Harris DA, et al. (1999) Lispro or regular insulin for multiple injection therapy in adolescence: differences in free insulin and glucose levels overnight. *Diabetes Care* **22**, 27-32.
- (44) Kaufman FR, Halvorson M, Kaufman ND (1995) A randomized, blinded trial of uncooked cornstarch to diminish nocturnal hypoglycemia at diabetes camp. *Diabetes Res Clin Pract* **30**, 205-209.
- (45) Tattersall RB, Gill GV (1991) Unexplained deaths of type 1 diabetic patients. *Diabet Med* **8**: 49-58.
- (46) Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, et al. (1987) Epidemiologic approach to the etiology of type I diabetes mellitus and its complications. *N Engl J Med* **317**, 1390-1398.

- (47) Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. The Diabetes Control and Complications Trial / Epidemiology of Diabetes Interventions of Complications Research Group. (2000) *N Engl J Med* **342**, 381-389.
- (48) Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, et al. (1986) Risk of proliferative diabetic retinopathy in juvenile-onset type I diabetes: a 40-yr follow-up study. *Diabetes Care* **9**, 443-452.
- (49) Mathiesen ER, Ronn B, Storm B, et al. (1995) The natural course of microalbuminuria in insulin-dependent diabetes: a 10-year prospective study. *Diabet Med* **12**, 482-487.
- (50) Coonrod BA, Ellis D, Becker DJ, et al. (1993) Predictors of microalbuminuria in individuals with IDDM. *Diabetes Care* **16**, 1376-1383.
- (51) Risk factors for development of microalbuminuria in insulin dependent diabetic patients: a cohort study. Microalbuminuria Collaborative Study Group, United Kingdom. (1993) *BMJ* **306**, 1235-1239.
- (52) Krolewski AS, Warram JH. (1995) Glycated hemoglobin and risk of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* **332**, 1251-1255.
- (53) Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, et al. (1993) The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology* **43**, 817-824.
- (54) Tesfaye S, Stevens LK, Stephenson JM, et al. (1996) Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and its relation to glycaemic control and potential risk factors: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia* **39**, 1377-1384.
- (55) Maser RE, Steenkiste AR, Dorman JS, et al. (1989) Epidemiological correlates of diabetic neuropathy. Report from Pittsburgh Epidemiology of Diabetic Complications Study. *Diabetes* **38**, 1456-1461.
- (56) Maser RE, Mitchell BD, Vinik AI, Freeman R. (2003) The association between cardiovascular autonomic neuropathy and mortality in individuals with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* **26**, 1895-1901.
- (57) Wegener M, Borsch G, Schaffstein J, et al. (1990) Gastrointestinal transit disorders in patients with insulin-treated diabetes mellitus. *Dig Dis* **8**: 23-36.
- (58) McCulloch DK, Campbell IW, Wu FC, et al. (1980) The prevalence of diabetic impotence. *Diabetologia* **18**: 279-283.
- (59) Effect of intensive diabetes therapy on the development and progression of neuropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Research Group. (1995) *Ann Intern Med* **122**, 561-568.

Resistencia a la insulina. Diabetes tipo II

MANUEL BENITO DE LAS HERAS

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes tipo II es una compleja enfermedad metabólica de naturaleza poligénica, con un componente medio ambiental, la cual se caracteriza por una hiperglucemia resultante de una inadecuada actividad de la insulina, que se desencadena cuando la secreción de insulina por parte del páncreas no puede compensar la resistencia a la misma en los tejidos periféricos. De hecho, la resistencia a la insulina es la característica fisiopatológica más importante en muchos estados prediabéticos, y es un componente clave junto con la hipertensión arterial, la hiperlipemia, la hiperglucemia, la obesidad y la diabetes tipo-II del llamado síndrome metabólico o síndrome de resistencia a la insulina. Dicha enfermedad metabólica constituye una auténtica epidemia en los albores del tercer milenio, pudiendo afectar a más del 20% de la población mundial, con el resultado clínico final de daño cardiovascular. La patogénesis de la diabetes tipo-II implica, por tanto, defectos no solo en la acción periférica de la insulina sino también en la secreción de la misma por las células beta pancreáticas. Esto es debido a que la resistencia a la insulina, causa primera del proceso diabético de tipo-II, tiende a ser compensada con el aumento de la secreción de la misma por parte del páncreas endocrino (hiperinsulinemia). Una moderada hiperinsulinemia puede ser tolerada durante un tiempo limitado. Sin embargo, la hipersinsulinemia crónica contribuye directamente al fracaso de la célula beta pancreática y, consiguientemente, al desencadenamiento de la diabetes manifiesta (1). La manipulación genética de organismos vivos ha permitido la obtención de modelos animales de diabetes tipo-II, los cuales han permitido identificar genes individuales que juegan un papel relevante en la señalización de la insulina implicada en la regulación de la homeostasia glucídica (2, 3) De entre ellos, el desarrollo de ratones carentes del receptor de insulina, de manera tejido-especi-

fica, ha tenido una especial significatividad de cara al mejor entendimiento de la etiopatología de la diabetes tipo-II. Dichos modelos de ratón, nos han permitido a nosotros y a otros laboratorios el establecer la acción específica de tejido de la insulina, la contribución de los diferentes tejidos objeto de estudio a la resistencia global a la insulina in vivo y , finalmente, los mecanismos compensatorios desarrollados en cada caso (4). Además, hemos utilizado algunos modelos de ratón como fuente de líneas celulares establecidas en cultivo. Este capítulo revisa los mecanismos moleculares de acción, resistencia y sensibilidad a la insulina utilizando dichos modelos animales y celulares.

2. ESPECIFICIDAD TISULAR DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA

La cascada de señalización de la insulina/IGF-I juega un papel esencial en la regulación del crecimiento celular a lo largo del desarrollo, así como en la regulación del metabolismo intermediario implicado en el almacenamiento y liberación de la energía en los tejidos. Los sustratos del receptor de la insulina 1 (IRS-1) y 2 (IRS-2) son mediadores claves de la acción tisular de la insulina, especialmente en lo que a su crecimiento y metabolismo glucídico se refiere. La insulina desencadena una cascada de activación de quinasas celulares que median la acción transcripcional y posttranscripcional de la misma en el hígado y en los tejidos extrahepáticos (5). La cascada se inicia con la fosforilación del receptor de la insulina tras la unión de la insulina, la cual desencadena la fosforilación en tirosina de los IRSs. Los IRSs fosforilados unen proteínas con dominios SH2, tales como la subunidad reguladora p85 del complejo enzimático PI 3 quinasa (PI3K) (6), un dímero formado por la subunidad catalítica p110 kDa y una subunidad reguladora de 50-, 55-, o 85 kDa, respectivamente. El complejo enzimático PI 3 quinasa juega un papel central en la acción tisular de la insulina, pues su carencia tanto en tejidos humanos como en tejidos de modelos animales guarda una estrecha correlación con la resistencia a la insulina in vivo (7). El producto de su reacción, tanto el fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) como el fosfatidilinositol trifosfato (PIP3), asocian a una serie de serina/treonina quinasas a la membrana celular, entre las que se encuentran la quinasa dependiente de fosfatidilinositoles tipo I (PDK1), y tipo 2 (PDK2), y al menos tres isoenzimas de la proteína quinasa B (o AKT) (8). La proteína quinasa B (o AKT) fosforila en serinas y/o treoninas una serie de sustratos tales como la proteína BAD (implicada en muerte celular), la enzima glucógeno sintasa quinasa 3b (GSK3b) (reguladora del crecimiento celular y de la síntesis de glucógeno) y el factor transcripcional «forkhead» Foxo1 (implicado en muerte celular y en la regulación del

metabolismo glucídico) (9). La insulina/IGF-I regulan la transcripción celular fundamentalmente a través de dos rutas de transducción de señales, a saber , la ruta ras/p42/p44 MAPKs que regula la expresión de los factores transcripcionales Elk1 y fos implicados en la regulación positiva del ciclo celular , y la ruta PI 3 quinasa/AKT que regula a los factores transcripcionales Foxo implicados en la regulación negativa del metabolismo glucídico (10, 11). Esta señalización es particularmente relevante en relación con la regulación del metabolismo glucídico hepático, a través de la activación de la glucogenosíntesis y de la inhibición de la gluconeogénesis. En efecto, un mecanismo por el que la insulina inhibe la glucogenólisis hepática es a través de la activación de la glucogeno sintasa (GS) y , consiguientemente, de la glucogenosíntesis. Dicho efecto de la insulina está mediado por la activación de la PKB (AKT), la cual fosforila e inactiva a la GSK3b, con el resultado de la activación de la GS en estado defosforilado (12). En relación con la gluconeogénesis hepática (producción de glucosa), la acción inhibitoria de la insulina sobre la expresión y actividad de las enzimas gluconeogénicas fosfoenolpiruvato quinasa (PEPCK) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6Pase) es dependiente de la actividad PI3K (13). Así, en condiciones basales, el factor transcripcional Foxo1 se localiza en el núcleo celular y se une a secuencias consenso del ADN, transactivando constitutivamente la expresión de genes tales como PEPCK, tirosine aminotransferasa (TAT) y G6Pasa. En presencia de insulina, la proteína PKB (AKT) se transloca al núcleo y fosforila la factor Foxo1, el cual es excluido del núcleo hacia el citoplasma, acumulándose en el mismo y siendo degradado en el proteasoma (14). La inactivación de Foxo 1 por la insulina también promueve la supervivencia celular de los hepatocitos a través de la inhibición del gen proapoptótico ligando de Fas (Fas-L) (15).

La manipulación genética de los organismos, en relación con genes candidatos de resistencia a insulina, ha permitido obtener una serie de modelos murinos válidos para el estudio de la diabetes tipo-II. La delección de los sustratos del receptor de la insulina o IRSs ha tenido una especial relevancia. Así, el ratón carente de IRS-1(IRS-1^{-/-}) mostraba un severo retraso en el desarrollo. Además, dichos ratones mostraban una resistencia a la insulina. Sin embargo, solo presentaban una ligera intolerancia a la glucosa. Por tanto, los ratones no mostraban un fenotipo diabético. El estudio del páncreas endocrino reveló que el ratón carente de IRS-1 desarrollaba una marcada hiperplasia de sus células beta pancreáticas, responsable de los altos niveles de insulina circulantes (hiperinsulinemia) (16, 17). Dicho aumento en la secreción de insulina compensaba la resistencia a la misma a lo largo de toda la vida del animal. Esta acción remanente de la insulina en el ratón IRS-1^{-/-} condujo al descubrimiento de un nuevo sustrato del receptor de la insulina, el IRS-2, como proteína alternativa de se-

ñalización de la insulina (18, 19). Dicho nuevo sustrato jugaba un papel destacado en el hígado, ya que los ratones carentes de IRS-1 no desarrollaban resistencia hepática a la insulina (20). De esta forma, el IRS-1 regulaba la señalización de la insulina fundamentalmente en el músculo esquelético y en el tejido adiposo blanco, jugando un papel secundario en el hígado. De esta manera, el IRS-2 podía compensar la carencia de IRS-1 más eficientemente en el hígado y en las células beta que en el músculo o en el tejido adiposo (21). El ratón carente de IRS-2 (IRS-2^{-/-}), desarrolla una severa diabetes a las 8-10 semanas en los machos y a las 25 semanas en las hembras. Dicho fenotipo diabético guarda una estrecha relación con una severa hipoplasia de las células beta-pancreáticas. Dichos resultados apuntaban hacia un papel crucial del IRS-2 en el desarrollo de los islotes en el páncreas (22, 23). Sin embargo, los machos deficientes en IRS-2 desarrollaban una transitoria hiperinsulinemia antes de las 10 semanas de vida, lo cual sugería la aparición de una resistencia a la insulina muy temprana (1). De hecho, el ratón carente de IRS-2 desarrolla una severa resistencia hepática a la insulina, la cual no puede ser compensada por las células beta del páncreas (24). Recientemente, nuestro laboratorio ha contribuido a dilucidar el papel del IRS-2 en la señalización de la insulina en los hepatocitos. Así, el IRS-2 en respuesta a la acción de la insulina señala a través de dos rutas divergentes, a saber, la ruta PI 3 quinasa/AKT y la ruta Grb2/ras/MAPKs. En lo que a la ruta PI 3 quinasa/AKT se refiere, resulta crítica la producción de PIP₃. En efecto, los hepatocitos carentes de IRS-2 pierden la señalización de AKT en respuesta a la insulina. Dichos hepatocitos son incapaces de generar PIP₃ en respuesta a la insulina. La pérdida de señalización a través de la ruta PI 3 quinasa/AKT tiene importantes consecuencias metabólicas. Así, la proteína GSK3b no se fosforila en respuesta a la insulina, lo cual conlleva una pérdida del control de la síntesis del glucógeno por parte de la insulina. Igualmente, la proteína Foxo1 no se fosforila en respuesta a la insulina, con lo que se pierde la regulación por la insulina de la expresión de los genes responsables de la gluconeogénesis hepática. Finalmente, la proteína BAD no se fosforila, con lo que la insulina pierde el control de la expresión del proteína ligando de FAS (14). Por otro lado, se ha investigado las consecuencias de la falta de IRS-2 en células beta aisladas. Así, la pérdida de señalización de la insulina a través de Foxo1 supone una pérdida de expresión del factor ductal pancreático (PDX-1) (25), la cual a su vez está asociada a la expresión de IRS-2 (26). Un dato clave es la haploinsuficiencia de PDX-1. En efecto, el ratón heterocigoto para dicho gen no es capaz de desarrollar la hiperplasia compensatoria propia de los ratones heterocigotos para IR/IRS-1 y del ratón LIRKO carente del receptor de insulina en el hígado (27).

Por otro lado, gracias a la tecnología de la recombinación genética por la recombinasa, se han podido obtener ratones carentes del receptor de insulina de manera específica de tejido. Ello, ha permitido establecer el papel del receptor de la insulina en relación con los tejidos diana de la insulina más relevantes. En el hígado, el ratón carente del receptor de insulina de manera tejido-específica (LIRKO) induce una severa resistencia a la insulina, la cual evoluciona en una franca intolerancia a la glucosa, hiper glucemia e hiperinsulinemia, todo ello relacionado con un incremento de la producción de glucosa por el hígado. Este fenotipo de diabetes manifiesta fue aparente a los dos meses de vida (28). Además, los ratones LIRKO presentaban «in vivo» un menor consumo de glucosa en respuesta a la insulina en respuesta al ensayo de «clamping» hiperinsulinémico/euglicémico, cuando se les comparaba con los ratones controles. Igualmente, la producción hepática de glucosa (HGP) no se inhibía en dicho ensayo, tal y como ocurría en los ratones controles (29). Sin embargo, el fenotipo diabético se revertía progresivamente entre cuatro y seis meses de vida, de manera que a los seis meses se restablecía por completo el metabolismo normoglicémico. Esta regresión de la intolerancia a la glucosa era debida a un aumento paralelo del consumo de glucosa hepático, probablemente debido a una disfunción hepática (28).

En el músculo esquelético, la falta del IR de manera tejido-específica (el ratón MIRKO) no produjo efecto alguno sobre la tolerancia a la glucosa. Estos resultados resultaron sorprendentes, dada la importancia del músculo esquelético en el consumo de glucosa insulino-dependiente. Ello, fue debido al desarrollo de mecanismos compensatorios en relación con el consumo de glucosa por parte del tejido adiposo blanco. Dicho aumento resultó en un aumento de la masa adiposa y, consiguientemente, en un aumento del peso corporal y obesidad. (30). La delección del IR en el tejido adiposo blanco de manera tejido-específica, produjo una disminución de la masa adiposa blanca, sin afectar la tolerancia a la glucosa o a la insulina. Sin embargo, los ratones FIRKO mostraban resistencia a desarrollar obesidad tanto en respuesta al envejecimiento, a lesiones hipotalámicas o a la dieta hiperlipídica. (31). La delección específica del IR en tejido adiposo marrón (BATIRKO), mostró un 50% de ratones diabéticos y otro 50% sin fenotipo. Los ratones diabéticos presentaban un defecto en la secreción de insulina, sin mostrar resistencia a la insulina. Dicho defecto fue observado tanto in vivo en respuesta a la insulina (test de secreción de la insulina), como en islotes aislados de ratones diabéticos en respuesta a glucosa 16.5 mM (32).

En las células beta del páncreas, la delección tejido-específica del IR origina a un defecto en la secreción de insulina, lo cual desencadena una progresiva

intolerancia a la glucosa e hiper glucemia (33) (el ratón BIRKO). Este defecto estaba relacionado con una respuesta inadecuada a la insulina in vivo, lo cual es una característica del fenotipo diabético tipo-II. Con posterioridad, se definieron dos grupos de ratones en relación con el test de secreción de insulina. Uno mostraba una marcada reducción en la secreción de insulina en páncreas aislado en respuesta a los secretagogos e intolerancia a la glucosa (fenotipo diabético), y otro no (fenotipo no diabético). Sin embargo, todos los ratones mutantes mostraban un menor contenido de insulina en el páncreas, una menor masa de células beta y un menor número de islotes, en comparación con los ratones controles. Además, la expresión de GLUT2 y glucoquinasa estaba disminuida en todos los ratones mutantes (34). Todos estos datos apuntan a un papel dual del receptor de la insulina en la célula beta pancreática, en relación con el crecimiento de las células beta y con la maduración de la maquinaria de sensibilidad a la glucosa implicada en la secreción de la insulina. La delección del receptor de IGF-I (IGF-IR) tejido-específica de células beta pancreáticas origina, igualmente, un defecto en la secreción de insulina en respuesta a secretagogos. Dicho defecto está relacionado con una pérdida de expresión de GLUT2 y glucoquinasa en los islotes beta, lo cual se traduce en un defecto en la secreción de insulina inducida por glucosa y en una intolerancia a la glucosa. Sin embargo, no se produjo ningún efecto en relación con la masa de células beta o el número de islotes en los mutantes comparados con los ratones control (35). Estos resultados sugieren que el receptor IGF-IR no es esencial para el desarrollo beta pancreático, pero participa en la diferenciación de la maquinaria de secreción de la insulina en respuesta a la glucosa en las células beta.

3. MODELOS CELULARES PARA EL ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA

Además del tejido adiposo blanco, los Mamíferos poseen tejido adiposo marrón, el cual juega un papel muy importante en el consumo energético corporal, a través de la generación de calor (termogénesis). Dicha termogénesis responde a dos estímulos fisiológicos de gran importancia, a saber: La hipotermia a través de la termogénesis inducida por el frío, y el exceso de aporte calórico corporal a través de la termogénesis inducida por la dieta. Morfológicamente, los adipocitos marrones se caracterizan por la presencia de gotas de grasa de distribución multilocular y un abundante contenido en mitocondrias (36).

La capacidad termogénica singular del tejido adiposo marrón está asociada a la expresión específica de tejido de la proteína desacoplante (UCP-1), en la

cara interna de la membrana interna mitocondrial. Dicha expresión es máxima en el recién nacido de los pequeños mamíferos, los cuales desarrollan una importante termogénesis en respuesta a la hipotermia postnatal (37). La función de la UCP-1 es desacoplar el gradiente electroquímico de protones generado por la cadena respiratoria mitocondrial de la síntesis de ATP, colapsar el gradiente de protones mitocondrial, y consiguientemente, la producción de calor. Además, el tejido adiposo marrón sintetiza lípidos, siendo los ácidos grasos el sustrato clave en la regulación de la capacidad termogénica del tejido (38). De esta manera, y a diferencia con el tejido adiposo blanco, el tejido adiposo marrón utiliza la reserva lipídica para activar la termogénesis en respuesta a la hipotermia y a la dieta hipercalórica, contrarrestando el frío y el sobrepeso corporal respectivamente. Ambos estímulos llegan al tejido por vía simpática, a través de la liberación de noradrenalina. La noradrenalina, a través de los receptores beta-adrenérgicos, incrementa los niveles de AMPc celular, lo cual se traduce en una activación de la triglicérido lipasa sensible a hormonas, con el resultado de un aumento de la lipólisis. Los ácidos grasos liberados actúan como sustratos de la respiración mitocondrial, activando a la UCP-1. De esta manera, la síntesis lipídica y el consumo energético están conectados y balanceados en el tejido adiposo marrón. En humanos, el tejido adiposo marrón sufre un gran desarrollo durante el periodo perinatal, al igual que en otros mamíferos. Sin embargo, en adultos dicho tejido queda restringido a pequeños reservorios diseminados entre el pániculo adiposo blanco (39). En consecuencia, el papel del tejido adiposo marrón en el consumo energético es materia de controversia.

Tanto el adipocito blanco como el marrón son dianas de la insulina. Nuestro laboratorio, en los últimos años, ha realizado una sustancial contribución al conocimiento de la acción de la insulina y de su resistencia en el adipocito marrón. Estos estudios, han puesto de manifiesto que el adipocito marrón fetal es un excelente modelo para estudiar los mecanismos moleculares mediados por la insulina y el IGF-I, en relación con los procesos de proliferación y diferenciación celular (40, 41). La insulina o el IGF-I, de manera independiente, aumentan la expresión de los genes lipogénicos, con el resultado de un aumento de la síntesis lipídica celular. Dicho efecto está mediado por la insulina o el IGF-I a través de la vía de señalización IRS-1/2/PI 3K (42). Además, se requiere la señalización sinérgica de las vías PI 3 quinasa y Ras/p42/p44MAPK quinasa para inducir la expresión de la UCP-1 (43).

Globalmente, la acción de la insulina/IGF-I sobre el crecimiento y diferenciación de los adipocitos marrones es muy compleja. Ello, requiere la identificación de las vías de señalización intracelular que regulan estos procesos. A

este respecto, diversos laboratorios han dedicado un considerable esfuerzo a dilucidar el papel de diversos genes candidatos a mediar la acción y resistencia a la insulina. Entre ellos, merecen especial mención los genes de los sustratos de la insulina o IRSs. Concretamente, los ratones delecionados para cada uno de los cuatro sustratos de la acción de la insulina identificados hasta la fecha, IRS-1, IRS-2, IRS-3 and IRS-4, han resultado de gran utilidad a tal fin (3). Nuestro laboratorio ha desarrollado durante los últimos años diversos modelos celulares carentes en dichos genes IRSs. Dos de ellos, han sido objeto de un detallado estudio. A saber, los adipocitos marrones (modelo de célula mesenquimal) carentes de IRS-1 o IRS-2 y los hepatocitos (modelo de célula epitelial) carentes de IRS-2. Estas líneas celulares han resultado ser herramientas únicas para estudiar la acción tejido-específica de la insulina.

3.1. Papel esencial de los IRSs en la acción de la insulina en los adipocitos marrones

El ratón deficiente en IRS-1 desarrolla una resistencia a la insulina, particularmente en tejidos extrahepáticos tales como el músculo esquelético o el tejido adiposo blanco. Sin embargo, no desarrolla intolerancia a la glucosa debido a la puesta en marcha de mecanismos compensatorios relacionados con la hipersecreción de insulina por parte de las células beta del páncreas. (15, 16). Estos resultados sugerían, indirectamente, que el IRS-1 podía jugar un papel central en la acción de la insulina en tejidos extrahepáticos, pero no el hígado. Por ello, decidimos desarrollar un modelo celular donde verificar dicha hipótesis. El adipocito marrón fue el modelo celular elegido. Con tal fin, generamos líneas celulares controles y carentes de IRS-1. Los adipocitos marrones deficientes en IRS-1 mantenían el fenotipo típico celular, mostrando su característica distribución de gotas de grasa multilocular. Sin embargo, el contenido lipídico celular valorado citofluorimétricamente era significativamente menor en las células mutantes (44). En relación con la maquinaria de señalización celular de la insulina, los adipocitos marrones deficientes en IRS-1 mostraban un aumento en el contenido en IRS-2 y en su señalización en respuesta a la insulina. En concreto, se producía un aumento en la actividad PI 3 quinasa asociada a IRS-2. No obstante, la actividad PI 3 quinasa total estaba disminuida en un 30%. Esta pérdida de actividad PI 3 quinasa asociada a IRS-1 conllevó una pérdida de señalización a través de la proteína AKT, sin afectar al de la proteína p70S6 quinasa. Dado que la actividad PI 3 quinasa total estaba disminuida muy parcialmente, estos resultados sugieren una especificidad tisular de la acción de la insulina en los adipocitos marrones, en relación con la señalización a través del

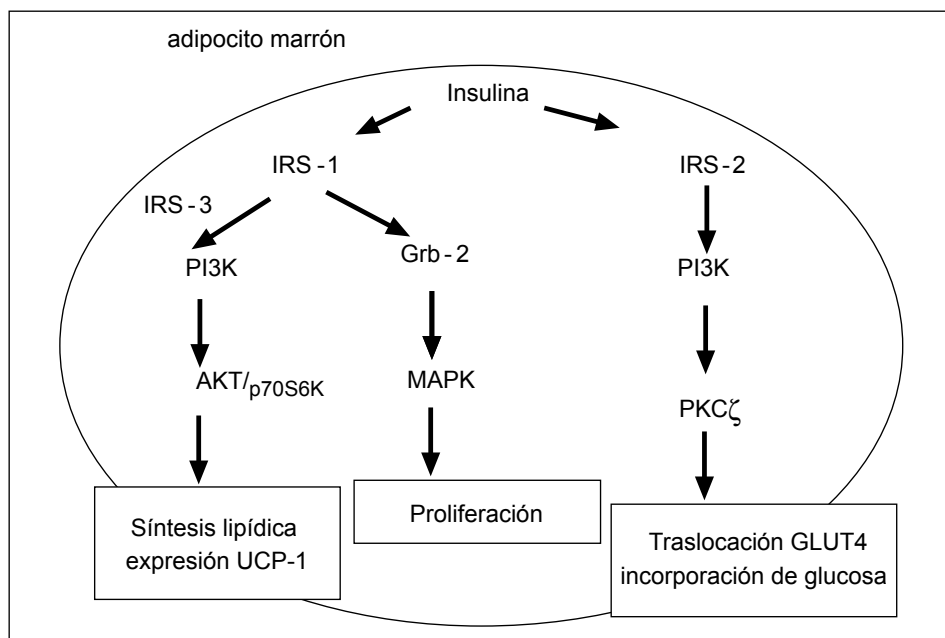


FIGURA 1. *Papel específico de las proteínas IRS en la señalización por la insulina en adipocitos marrones. IRS-1 dirige la señalización de la insulina hacia la proliferación, síntesis lipídica y expresión de UCP-1. Sin embargo, en adipocitos marrones deficientes en IRS-1, IRS-3 puede modular la síntesis lipídica a través de PI3K/AKT/SREBP-1c pero no puede reconstituir la expresión de UCP-1 inducida por insulina. IRS-2 mantiene la señalización de la insulina a través de PI3K/PKC ζ , lo que resulta en un incremento de la incorporación de glucosa y traslocación de GLUT4*

IRS-1. Mientras que el aumento de IRS-2 parece compensar la señalización de p70S6 quinasa, no ocurre así con la de la proteína AKT. Nuestros resultados apuntan a que esta pérdida de actividad AKT está relacionada con la falta de generación de PIP3 en respuesta a insulina, en las células carentes de IRS-1. A su vez, estos resultados podrían interpretarse en base a una compartimentación diferencial de los IRSs, de manera que solo el IRS-1 sería capaz de señalizar desde la membrana celular, generando el PIP3 imprescindible para la activación de la vía PI 3 quinasa/AKT. Igualmente, la falta de IRS-1 se tradujo en una falta de respuesta a la insulina en términos de síntesis lipídica. Estos resultados eran coherentes con el menor contenido lipídico de los adipocitos marrones, tanto homocigóticos como heterocigóticos para IRS-1 (44). Además, la insulina era incapaz de aumentar la expresión de la ácido graso sintasa (FAS) en las células carentes de IRS-1, en comparación con las células salvajes. La reconstitución con IRS-1 revertió dicho efecto (45). Estos resultados sugerían que la carencia de IRS-1 produce resistencia a la insulina en relación con la síntesis lipídica celular. En la Figura 1, se resume el papel central que el IRS-1 juega en la seña-

lización de la insulina en relación con la síntesis lipídica en los adipocitos marrones. Finalmente, el IRS-1 es clave en el proceso de diferenciación celular de los adipocitos marrones. Así, los preadipocitos marrones fetales carentes de IRS-1 no completan su proceso de diferenciación adipogénica «in vitro», en comparación con los preadipocitos marrones controles (46).

Además del papel esencial del IRS-1 en relación con la diferenciación adipogénica, el IRS-1 es un intermediario clave en la mediación de la señalización de la insulina en relación con la diferenciación termogénica. Así, la insulina no es capaz de aumentar la expresión de la UCP-1 y de transactivar a su promotor en las células carentes de IRS-1. La reconstitución de las células deficientes en IRS-1 con un mutante carente de los 18 restos de tirosina reguladores del IRS-1, excepto de los sitios 608, 628 and 658 necesarios para la unión de la subunidad reguladora p85 α de la PI 3 quinasa, produjo la recuperación de la señalización IRS-1/PI3K/AKT. Además, la reconstitución propició tanto la transactivación del promotor de la UCP-1 como el aumento de su expresión en respuesta a la insulina (45). Estos resultados indican que el IRS-1 juega un papel central, a través de su actividad asociada PI 3 quinasa, en relación con el programa de diferenciación termogénico de los adipocitos marrones. Sin embargo, este efecto es tejido-específico, pues solo afecta a la regulación de la UCP-1 (marcador tisular), pero no a las proteínas desacoplantes UCP-2 o UCP-3, inespecíficas de tejido.

El hecho de que el ratón carente de IRS-1 mostrase un severo retraso en su crecimiento (15, 16), junto con la evidencia experimental de que tanto la insulina como el IGF-I son mitógenos completos en los adipocitos marrones primarios de rata (40, 47), nos planteó el interrogante del posible papel del IRS-1 como mediador de la acción de la insulina, en relación con la proliferación de los adipocitos marrones (48). La carencia de IRS-1 impide la activación de la p42/p44 MAPK así como de la proliferación celular, en respuesta a la insulina. La reconstitución de las células carentes de IRS-1 con la proteína salvaje trajo como consecuencia la reconstitución de la respuesta celular perdida. Sin embargo, la reconstitución con el mutante Y895F IRS-1, el cual impide la asociación de IRS-1 con la proteína Grb2, no reestableció la respuesta mitogénica a la insulina. Estos resultados indican que la asociación IRS-1/Grb-2 es esencial en la señalización de la respuesta mitogénica a la insulina en los adipocitos marrones. La inhibición de la actividad PI 3 quinasa reestableció, parcialmente, la señalización mitogénica. Este aumento parcial estaba asociado a la aparición de una asociación IRS-2 /Grb2. Estos resultados sugerían un posible «feedback» de la señalización de la PI 3 quinasa asociada a IRS-2 sobre el propio IRS-2,

impidiendo su señalización mitogénica en condiciones normales en respuesta a la insulina.

El IRS-3 es un miembro de la familia de los IRSs específico del tejido adiposo blanco en roedores, alcanzando niveles de expresión comparables a los del IRS-1 (49). Sin embargo, dicho gen no es funcional en los adipocitos humanos (50). La expresión de IRS-3 es muy baja en el tejido adiposo marrón, así como en los adipocitos marrones salvajes y carentes de IRS-1. La expresión exógena de IRS-3, a niveles comparables a los observados en los adipocitos blancos, restableció la señalización PI 3 quinasa/Akt ausente en los adipocitos marrones carentes de IRS-1. Sin embargo, no lo hizo con la señalización de la p42/p44 MAPK y la mitogénesis. El estudio de la ruta PI 3 quinasa y de sus dianas moleculares, puso de manifiesto que las células que expresan IRS-3 recuperaban la señalización adipogénica, pero no la termogénica, en respuesta a la insulina. De esta manera, los adipocitos que expresan IRS-3 pueden suplir la carencia de IRS-1 en relación con la síntesis lipídica celular, pero no con la capacidad termogénica de las mismas (51). En conclusión, el IRS-1 juega un papel esencial en relación con la señalización de la insulina en los adipocitos marrones, confiriéndole especificidad tisular a la acción de la insulina.

3.2. El IRS-2 media la acción de la insulina en los hepatocitos

La resistencia hepática a la insulina es una característica fisiopatológica común de los algunos modelos animales de diabetes y de la diabetes tipo II. El ratón carente de IRS-2 es un modelo singular de resistencia hepática a la insulina. Cursa con un aumento de la producción hepática de glucosa (HGP) (22, 24) y un fracaso en el desarrollo de las células beta del páncreas por pérdida de la señalización de IGF-I (23). Sin embargo, un modelo de diabetes tan complejo hace difícil establecer con exactitud la causa primera de la misma a lo largo del desarrollo. Por ello, se hizo necesario analizar el efecto directo que la carencia de IRS-2 ejercía sobre el hígado. Recientemente, nuestro laboratorio ha generado hepatocitos neonatales carentes de IRS-2. En dicho modelo, hemos tratado de relacionar las posibles alteraciones en la señalización de la insulina con los defectos metabólicos atribuidos al modelo in vivo (14). Dichos hepatocitos crecen en un medio libre en arginina, lo cual demuestra que poseen un ciclo de la urea funcional. Además, los hepatocitos expresan albúmina, carbamil-fosfato sintetasa y citoqueratina 18 (un marcador de células epiteliales). Dichos hepatocitos son diana de la insulina, ya que expresan abundantemente el receptor de la insulina.

La carencia de IRS-2 conlleva una pérdida del 50% de la actividad PI 3 quinasa total. Dicha pérdida no es compensada por el IRS-1. Sin embargo, la carencia de IRS-2 en músculo esquelético no afectó a la actividad PI 3 quinasa total (24, 52). Estos resultados apoyan el concepto de especificidad tisular de la acción de la insulina, así como la existencia de diferentes mecanismos compensatorios en los distintos tejidos diana de la insulina.

La carencia de IRS-2 tiene una consecuencia directa. Los hepatocitos carentes de IRS-2 no pueden acumular PIP3 en respuesta a la insulina. Un hecho similar al observado en los adipocitos marrones, pero en relación con el IRS-1. En consecuencia, la carencia de IRS-2 trunca la señalización a través de la proteína Akt en respuesta a la insulina. La pérdida de dicha señalización tiene una consecuencia drástica para el hepatocito. La proteína GSK-3 β no se fosforila en respuesta a la insulina. Dicha señalización Akt/ GSK-3 β se restaura en los hepatocitos reconstituidos con IRS-2. Una vez más, estos resultados enfatizan la importancia de la especificidad tisular en relación con los defectos moleculares que desencadenan la resistencia a la acción de la insulina. Sin embargo, la señalización a través de la proteína p70S6K no se afecta por la carencia de IRS-2. Dada la importancia de esta ruta en relación con la síntesis proteica, el hecho de que no se afecte por la carencia de IRS-2, sustrato que media la acción de la insulina a través de la PI 3 quinasa, supone preservar dicha ruta metabólica crucial en determinadas situaciones de resistencia a la insulina (14).

La pérdida de señalización en relación con la ruta Akt/GSK-3 β tiene importantes consecuencias metabólicas. Así, los hepatocitos carentes de IRS-2 no estimulan la síntesis de glucógeno en respuesta a insulina. Dicha respuesta se restaura tras la reconstitución de los mismos con IRS-2. Esta resistencia a la acción de la insulina puede ser una consecuencia directa de la pérdida de la señalización mediada por la PI 3 quinasa asociada al IRS-2 y cuya diana es la GSK-3 β , enzima responsable de la regulación negativa de la síntesis del glucógeno. Sin embargo, la carencia de IRS-2 también afecta negativamente a la activación por insulina de la PKC ζ/λ . En consecuencia, la pérdida de ambas señalizaciones, vía Akt o PKC ζ/λ , puede contribuir a la resistencia a la insulina en relación con la activación de la síntesis glucógeno hepática (14). A la luz de estos resultados, una atractiva aproximación terapéutica para tratar la hiperglucemia postprandial sería la utilización de inhibidores de la GSK-3 β , con objeto de mejorar la resistencia a la insulina en relación con la utilización de la glucosa para la síntesis de glucógeno por el hígado (53).

La hiperglucemia del ayuno en la diabetes tipo II está relacionada con el aumento de la producción de glucosa por el hígado (HGP). Dicho aumento es

consecuencia directa del aumento de las enzimas gluconeogénicas. De hecho, los ratones transgénicos que sobreexpresan la fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK) o la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6Pasa) son resistentes a la acción de la insulina, a pesar del hecho de ser hiperinsulinémicos (54, 55). La pérdida de señalización de la insulina, debido a la carencia hepática de IRS-2, también tiene consecuencias sobre la regulación de la gluconeogénesis. En efecto, los hepatocitos carentes de IRS-2 no son capaces de suprimir la expresión de las enzimas gluconeogénicas PEPCK y G6Pasa, inducidas por glucocorticoides o AMPc, en respuesta a insulina. La reconstitución de los hepatocitos deficientes de IRS-2 con IRS-2 supuso el reestablecimiento de la acción supresora de la insulina sobre la expresión de las enzimas gluconeogénicas (14). Estos resultados podrían explicar el fenotipo diabético de los ratones carentes en IRS-2, como consecuencia de una desregulación de la gluconeogénesis hepática (56). Además, el ratón LIRKO diabético presenta un aumento considerable de la expresión hepática de los genes gluconeogénicos, el cual va acompañado de un aumento del IRS-2 (28). Por otro lado, el ratón transgénico para PEPCK en el hígado presenta un aumento del IRS-2 y una HPG insensible a insulina (57). Todos estos resultados abundan en la importancia de la señalización de la insulina mediada por IRS-2 y GSK-3 β en la regulación negativa de la gluconeogénesis hepática.

Una aproximación al tratamiento de la diabetes tipo-II experimental ha sido la obtención de animales genéticamente manipulados de manera específica de tejido. Un modelo consiste en la sobre expresión por el hígado de animales diabéticos de la glucoquinasa, enzima clave en la utilización hepática de la glucosa de manera independiente de insulina. Dichos animales normalizaban su glucemia a través de un aumento la glucólisis y de la glucógeno síntesis y una inhibición de la gluconeogénesis a nivel del hígado (58). Otro, en la sobre expresión por el hígado del dominante negativo del gene Foxo-1. Dicho gen codifica para un factor transcripcional que controla la expresión de los genes PEPCK and G6Pasa, de manera que su dominante negativo inhibe la gluconeogénesis (59). De hecho, los animales que presentan haploinsuficiencia para dicho gen, corrigen la resistencia a la insulina observada en los ratones diabéticos heterocigotos para el receptor de la insulina. La insulina, a través de la señalización PI 3 quinasa/Akt mediada por IRS-2, fosforila a Foxo-1, provocando su exclusión del núcleo celular y su degradación en el proteasoma (9, 14). Este hecho, conlleva la inhibición de los genes que codifican para las enzimas gluconeogénicas, lo cual se traduce en una disminución de la producción de glucosa por el hígado, de potencial interés terapéutico. Todos los estudios recogidos en este trabajo indican que el IRS-2 es un mediador esencial en la acción

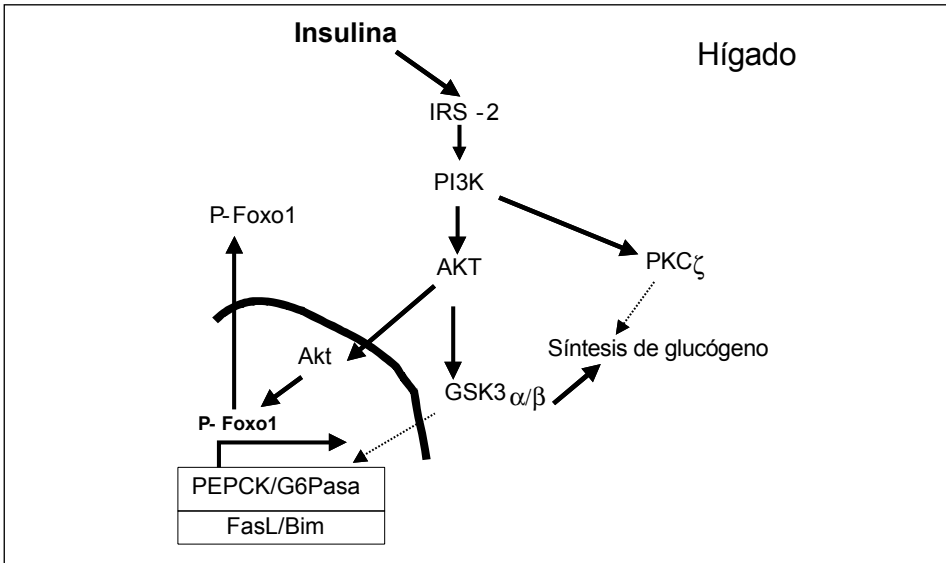


FIGURA 2. Papel de IRS-2 en la cascada señalizadora de la insulina en hepatocitos. Los hepatocitos deficientes en IRS-2 muestran resistencia a la insulina en referencia a la señalización IRS-2/PI3K. Más allá de PI3K, la insulina no puede activar AKT, GSK-3 y PKC ζ en ausencia de IRS-2. A nivel nuclear la fosforilación de Foxo 1 está también alterada. La falta de esta señalización en células hepáticas resultó en la desregulación de la activación de G6P y la inhibición de la expresión del gen gluconeogénico por la insulina.

de la insulina en el hígado. La alteración de su señalización juega un papel clave en la resistencia hepática a la insulina (Figura 2).

REFERENCIAS

- (1) Lee YH, White MF (2004) Insulin receptor substrate proteins and diabetes. *Arch. Phar. Res.* **27**, 361-370.
- (2) Kadowaki T (2000) Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models. *J. Clin. Invest.* **106**, 459-465.
- (3) Nandi A, Kitamura Y, Kahn CR, Accili D (2004) Mouse models of insulin resistance. *Physiol Rev* **84**, 623-647.
- (4) Kitamura T, Kahn CR, Accili D (2003) Insulin receptor knockout mice. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 313-332.
- (5) White MF (2002) IRS proteins and the common path to diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **283**, E413-E422.

- (6) Backer JM, Myers MG, Shoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, Hu P, Margolis B, Skolnik EY, Schlessinger J, White MF (1992) Phosphatidylinositol 3 kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J* **11**, 3469-3479.
- (7) Kim YB, Nikoulina SS, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB (1999) Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3 kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* **104**, 733-741.
- (8) Alessi DR, Cohen P (1998) Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 55-62.
- (9) Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Bleni J, Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-868.
- (10) Kops GJ, Burgering BM (2000) Forkhead transcription factors are targets of signalling by the proto-oncogene PKB (C-AKT). *J. Anat.* **197**, 571-574.
- (11) Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Almonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM (2003) Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature* **424**, 550-555.
- (12) Summers SA, Kao AW, Kohn AD, Backus GS, Roth RA, Pessin JE, Birnbaum MJ (1999) The role of glycogen synthase kinase 3 β in insulin-stimulated glucose metabolism. *J Biol Chem* **274**, 17934-17940.
- (13) Sutherland C, O'Brien RM, Granner DK (1995) Phosphatidylinositol 3-kinase, but not p70/p85 ribosomal S6 protein kinase, is required for the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression by insulin. Dissociation of signaling pathways for insulin and phorbol ester regulation of PEPCK gene expression. *J Biol Chem* **270**, 15501-15506.
- (14) Valverde AM, Burks D, Fabregat I, Fisher T, Carretero J, White MF, Benito M (2003) Molecular mechanisms of insulin resistance in IRS-2-deficient hepatocytes. *Diabetes* **52**, 2239-2248.
- (15) Valverde AM, Fabregat I, Burks DJ, White MF, Benito M (2004) IRS-2 mediates the anti-apoptotic effect of insulin in neonatal hepatocytes. *Hepatology* **40**, 1285-94.
- (16) Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag III BL, Johnson RS, Kahn CR (1994) Alternative pathway of insulin signalling in mice made with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* **372**, 186-190.
- (17) Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Yaburagi Y, Satoh S, Sekihara H, Yoshioka S, Horikoshi H, Furuta Y, Ikawa Y, Kasuga M, Yazaki Y, Aizawa S (1994) Insulin resistance and growth re-

- tardation in mice made with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* **372**, 182-186.
- (18) Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG, Glashee E, Lane WS, Pierce JH, White MF (1995) Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling. *Nature* **773**, 173-177.
- (19) Tobe K, Tamemoto H, Yamauchi T, Aizawa S, Yazaki Y, Kadowaki T (1995) Identification of a 190-Kda protein as a novel substrate for the insulin receptor kinase functionally similar to insulin receptor substrate-1. *J.Biol. Chem.* **270**, 5698-5701.
- (20) Yamauchi T, Tobe K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, Yamamoto-Honda R, Takahashi Y, Yoshizawa F, Aizawa S, Akanuma Y, Sonenberg N, Yazaki Y, Kadowaki T (20) Insulin signaling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate-1-deficient mice. *Mol Cell Biol* **16**, 3074-3084.
- (21) Kahn CR, Bruning JC, Michael MD, Kulkarni RN (2000) Knockout mice challenge our concepts of glucose homeostasis and the pathogenesis of diabetes mellitus. *J. Pediatric. Endocrinol. Metab.* **13**, 1377-1384.
- (22) Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF (1998) Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* **391**, 900-904.
- (23) Withers DJ, Burks DJ, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF (1999) IRS-2 coordinates IGF-I receptor-mediated b-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat. Genetics* **23**, 32-40.
- (24) Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, Tsubamoto Y, Komeda K, Nakano R, Miki H, Satoh S, Sekihara H, Sciacchitano S, Lesniak M, Aizawa S, Nagai R, Kimura S, Akanuma Y, Taylor SI, Kadowaki T (2000) Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* **49**, 1880-1889.
- (25) Kushner JA, Ye J, Schubert M, Burks DJ, Dow MA, Flint CL, Dutta S, Wright CV, Montmini MR, White MF (2000) Pdx1 restores beta cell function in Irs2 knockout mice. *J. Clin. Invest.* **109**, 1193-1201.
- (26) Kitamura T, Nakae J, Kitamura I, Kido Y, Biggs WH, Wright CV, White MF, Arden KC, Accili D (2002) The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *J. Clin. Invest.* **110**, 1839-1847.
- (27) Kulkarni RN, Jhala US, Winnay J, Krajewski S, Montmini M, Kahn CR (2004) PDX-1 haploinsufficiency limits the compensatory islet hyperplasia that occurs in response to insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **114**, 828-836.

- (28) Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Schulman GI, Magnuson MA, Kahn CR. (2000) Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* **6**, 87-97.
- (29) Fisher SJ, Kahn CR (2003) Insulin signaling is required for insulin's direct and indirect action on hepatic glucose production. *J Clin Invest* **111**:463-468.
- (30) Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR. (1998) A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* **2**, 559-569.
- (31) Bluher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, Kahn CR. (2002) Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell* **3**, 25-38.
- (32) Guerra C, Navarro P, Valverde AM, Arribas M, Bruning J, Kozak LP, Kahn CR, Benito M. (2001) Brown adipose tissue specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J Clin Invest* **108**, 1205-1213.
- (33) Kulkarni RN, Bruning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR (1999). Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* **96**, 329-339.
- (34) Otani K, Kulkarni RN, Baldwin AC, Krutzfeld L, Ueki K, Stoffel M, Kahn CR, Polonsky KS. (2004) Reduced beta-cell mass and altered glucose sensing impair insulin-secretory function in beta1RKO mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **286**, E41-E49.
- (35) Kulkarni RN, Holzenberger M, Shih DQ, Ozcan U, Stoffel M, Magnuson MA, Kahn CR. (2002) b-cell-specific deletion of the IGF-1 receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter b-cell mass. *Nat genetics* **31**, 111-115.
- (36) Cannon B, Nedergard J (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* **84**, 277-359.
- (37) Nichols DG, Locke RM. (1984) Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* **64**, 1-64.
- (38) Ricquier D, Bouillaud F. (2000) The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J* **345**, 161-179.
- (39) Champigny O, Ricquier DJ. (1996) Evidence from in vitro differentiating cells that adrenoceptor agonists can increase uncoupling protein mRNA level in adipocytes of adult humans: an RT-PCR study. *Lipid Res* **37**, 1907-1914.
- (40) Lorenzo M, Valverde AM, Teruel T, Benito M (1993) IGF-I is a mitogen involved in differentiation-related gene expression in fetal rat brown adipocytes. *J Cell Biol.* **12**, 1567-75.

- (41) Teruel T, Valverde AM, Alvarez, A, Benito, M, Lorenzo M (1995) Differentiation of rat brown adipocytes during late foetal development: role of insulin-like growth factor I. *Biochem.J.* **310**, 771-776.
- (42) Valverde AM, Lorenzo M, Navarro P, Benito M (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase is a requirement for insulin-like growth factor -I-induced differentiation, but not for mitogenesis, in fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinology* **11**, 595-607.
- (43) Teruel T, Valverde AM, Navarro P, Benito M, Lorenzo M (1998) Inhibition of PI 3-kinase and RAS blocks IGF-I and insulin-induced uncoupling protein 1 gene expression in brown adipocytes. *J Cell Physiol.* **176**, 99-109.
- (44) Valverde AM, Kahn CR, Benito M (1999) Insulin signaling in insulin receptor substrate (IRS)-1-deficient brown adipocytes: requirement of IRS-1 for lipid synthesis. *Diabetes* **48**, 2122-2131.
- (45) Valverde AM., Arribas M, Mur C, Navarro P, Pons S, Cassard-Doulier A. M, Kahn CR, Benito M (2003) Insulin-induced UCP-1 expression is mediated by IRS-1 through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in fetal brown adipocytes. *J Biol Chem* **278**, 10221-10231.
- (46) Fasshauer M, Klein J, Kriauciunas KM, Ueki K, Benito M, Kahn CR (2001) Essential role of insulin receptor substrate 1 in differentiation of brown adipocytes. *Mol Cell Biol* **21**, 319-329.
- (47) Porras A., Alvarez, A.M., Valladares A, Benito M (1998) P42/p44 mitogen-activated protein kinases activation is required for the insulin-like growth factor -I/insulin induced proliferation, but inhibits differentiation, in rat fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol* **12**, 825-834.
- (48) Valverde AM, Mur C, Pons S, Alvarez A, White MF, Kahn CR, Benito M (2001) ^{Y895}IRS-1/GRB-2 association mediates the insulin signaling involved in IRS-1-deficient brown adipocytes mitogenesis. *Mol Cell Biol* **21**, 2269-2280.
- (49) Lavan, B.E., W.S. Lane, G.E. Lienhard (1997) The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* **272**, 11439-11443.
- (50) Bjornholm M, He AR, Attersand A, Lake S, Liu SC, Lienhard GE, Taylor S, Arner P, Zierath JR. (2002) Absence of functional insulin receptor substrate-3 (IRS-3) gene in humans. *Diabetologia* **45**, 1697-1702.
- (51) Arribas M, Valverde AM, Benito M (2003) Role of IRS-3 in the insulin signaling of IRS-1-deficient brown adipocytes. *J Biol Chem* **278**, 45189-99.
- (52) Higaki Y, Wojtaszewski JF, Hirshman MF, Withers DJ, Towery H, White MF, Goodyear LJ (1999) Insulin receptor substrate-2 is not necessary for insulin- and exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle. *J Biol Chem* **274**, 20791-20795.

- (53) Cline GW, Johnson K, Regitting W, Perret P, Tozzo E, Xiao L, Damico C, Shulman GI (2002) Effects of a novel glycogen synthase kinase-3 inhibitor on insulin-stimulated glucose metabolism in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats. *Diabetes* **51**, 2903-2910.
- (54) Valera A, Pujol A, Pelegrin M, Bosch F (1994) Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 9151-9154.
- (55) Trinh KY, O'Doherty RM, Anderson P, Lange AJ, Newgard CB (1998) Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats. *J Biol Chem* **273**, 31615-31620.
- (56) Previs SF, Withers DJ, Ren JM, White MF, Shulman GI (2000) Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *J Biol Chem* **275**, 38990-38994.
- (57) Sun Y, Liu S, Ferguson S, Wang L, Klepeck P, Yun JS, Friedman JE (2002) Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice. *J Biol Chem* **277**, 23301-2330.
- (58) Ferre T, Riu E, Bosch F, Valera A (1996) Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver. *FASEB J* **10**, 1213-1218.
- (59) Nakae J, Kitamura T, Silver DL, Accili D (2001) The forkhead transcription factor foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J Clin Invest* **108**, 1359-1367.

Síndrome metabólico: una situación multifactorial (genes y ambiente). De los criterios diagnósticos a la prevención y tratamiento

ARTURO CORBATÓN ANCHUELO, RAFAEL CUERVO PINTO,
NEREA PÉREZ MÉNDEZ Y MANUEL SERRANO RÍOS

1. CONCEPTO. HISTORIA BREVE.

El Síndrome Metabólico (SM) se caracteriza por la presencia sucesiva o simultánea en el tiempo de alguna de las siguientes alteraciones: resistencia a la insulina, hiperinsulinemia compensadora, tolerancia anómala a la glucosa o intolerancia hidrocabonada o diabetes mellitus tipo 2 (DM 2), dislipemia aterogénica (incremento de triglicéridos plasmáticos, colesterol VLDL, partículas pequeñas de LDL y/o disminución de HDL), obesidad central o visceral, hiperuricemia, alteraciones hemorreológicas y de la fibrinólisis, disfunción endotelial y elevación de marcadores inflamatorios como la proteína C-reactiva (PCR) (figura 1). Los criterios cuali y cuantitativos para definir la presencia de SM en un individuo varían según diferentes grupos de trabajo en la comunidad científica internacional. De las definiciones más en uso (tabla 1) la propuesta por el grupo americano (ATPIII: National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults) difiere de las otras dos (OMS/EGIR) por no incluir el binomio RI/hiperinsulinemia y además destacar la posición central de la obesidad visceral entre los demás criterios.

La AACE (*American Association of Clinical Endocrinologist*) (Tabla 1) establece unos nuevos criterios que podrían considerarse una combinación entre los criterios de la ATP III y la OMS. La AACE, incluye como criterio diagnóstico la sobrecarga oral de glucosa, no incluida en la ATP III por el inconveniente que supone su realización en la práctica clínica. La gran diferencia que entre los criterios AACE y los previos es, en primer lugar, que prescinde del número

de criterios diagnósticos para poder diagnosticar el SM, y en segundo lugar, la inclusión dentro de los mismos de una serie de factores de riesgo como son la edad avanzada, la pertenencia a un grupo étnico de alto riesgo, el sedentarismo o antecedentes familiares o personales de enfermedad coronaria o DM entre otros, que aunque han demostrado gran contribución al desarrollo de SM, son imprecisos y difíciles de objetivar, con importante variabilidad entre facultativos. Esto hace que la clasificación de la AACE, a nuestro juicio, sea poco aplicable de forma estandarizada. La diversidad de estos criterios, no homologables en todas las poblaciones, ha motivado una crítica severa del propio concepto de Síndrome Metabólico e incluso cuestionado la idoneidad de su inclusión en la terminología de la práctica clínica¹. Esta propuesta iconoclasta ha sido rebatida por expertos de la Federación Internacional de Diabetes (IDF). El debate está abierto pero el concepto es, en nuestra opinión, válido para el clínico de Atención Primaria o de otras especialidades (Cardiología, Medicina Interna) por constituir una llamada de alerta sobre la coexistencia “silente” de otros trastornos diferentes al que llevó al paciente a consultarle, sea, por ejemplo, la Diabetes, la Obesidad o la Hipertensión arterial.

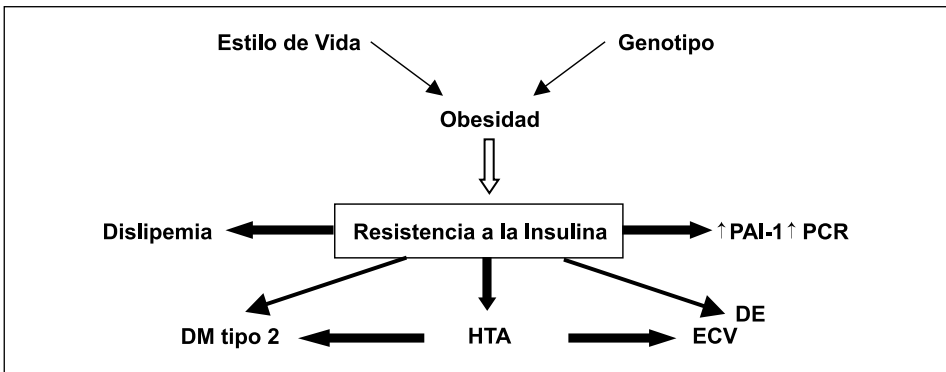


FIGURA 1. Componentes del síndrome metabólico. DM: diabetes mellitus, HTA: hipertensión arterial, ECV: enfermedad cardiovascular, PAI-1: inhibidor del activador de plasminógeno 1, PCR: proteína C reactiva. DE: disfunción endotelial.

La IDF (Tabla 2) ha planteado nuevos criterios para el diagnóstico del SM, considerando por primera vez como requisito, la presencia de obesidad central, y utilizando como medida antropométrica principal el “perímetro de cintura, sencillo de medir en la práctica clínica aunque variable según raza y sexo. Por otro lado la SOG deja de ser un criterio necesario, a pesar de ser recomendable para

un mejor estudio del sujeto, especificando asimismo una serie de criterios adicionales, que aunque no son necesarios para el diagnóstico, si son interesantes para completar el estudio del individuo. Los criterios de la IDF son los primeros que incluyen el tratamiento como criterio diagnóstico. En esta definición tampoco la resistencia insulínica es un criterio fundamental. Y además, ha subrayado una serie de parámetros que parecen estar relacionados con el SM, que deberían ser incluidos en estudios de investigación para ayudar a determinar el poder predictivo del SM en el desarrollo de DM o enfermedades cardiovasculares. La inclusión de estos factores adicionales en las investigaciones permitiría más adelante la modificación de la definición de SM y la validación de la nueva definición en diferentes grupos étnicos.

El perímetro de cintura se incluye como hemos visto en varios criterios diagnósticos de SM. Lo que está por aclarar es la diferencia que existe entre un perímetro de cintura elevado por incremento de la grasa subcutánea y el secundario a un aumento de la grasa visceral. El incremento de la grasa visceral o intrabdominal genera la liberación de gran cantidad de ácidos grasos libres al hígado a través de la circulación esplácnica, mientras que el aumento de grasa subcutánea solo libera productos de la lipólisis a la circulación sistémica, evitando efectos más directos sobre el metabolismo hepático (por ejemplo síntesis de lípidos o glucosa o secreción de proteínas protrombóticas como fibrinógeno o inhibidor del plasminógeno (-PAI-1-). A pesar de estas diferencias secundarias a la diferente distribución del tejido graso abdominal, el diagnóstico clínico actual del SM no distingue entre el aumento de grasa visceral y subcutánea.

El concepto de síndrome metabólico encuentra sus orígenes en los años 20 del siglo pasado, cuando Kylin ² describió por vez primera la frecuente asociación de factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión arterial (HTA), hiperglucemia y la gota. En 1947 Vague constató que la distribución central del tejido adiposo podía corresponder al fenotipo de obesidad asociado a las anomalías metabólicas que se relacionan con la diabetes mellitus (DM) tipo 2 o la enfermedad cardiovascular. Posteriormente, en los años 50 Himsworth y Welborn observaron la existencia de resistencia insulínica en cierto tipo de pacientes diabéticos, hoy llamados del tipo 2. En 1977 Hanefeld ³ describió bajo el término de Síndrome Metabólico la coexistencia de obesidad abdominal o troncular, dislipoproteinemia, intolerancia a la glucosa o diabetes tipo 2, hipertensión arterial, hiperuricemia o gota, hipercoagulabilidad y defectos de la fibrinólisis, hiperandrogenismo, hígado graso, cálculos biliares, osteoporosis y elevada incidencia de enfermedad cardiovascular. Esta definición ya contempló la RI (resistencia a la

insulina) como nexo fisiopatológico común de todos los componentes del complejo sindrómico. Asimismo diversos investigadores en Europa habían sugerido que la insulinoresistencia podía ser un sustrato fisiopatológico de la diabetes mellitus y su frecuente asociación a otros factores de riesgo, confirmando alto riesgo cardiovascular⁴. Pero fue Reaven² quien tras introducir el concepto de resistencia a la insulina, desencadena un flujo imparable de investigaciones epidemiológicas, básicas y clínicas mundiales, de este fenómeno fisiopatológico y sus consecuencias.

Siguiendo el Consenso del Grupo de Trabajo Resistencia a la Insulina de la Sociedad Española de Diabetes (Consenso del Grupo de Trabajo Resistencia a la Insulina de la Sociedad Española de Diabetes, 2002)⁵, “la resistencia a la insulina (RI)” se define como la disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus acciones biológicas en tejidos diana típicos como el músculo esquelético, el hígado o el tejido adiposo [...] Actualmente se considera que la RI crónica o mantenida es la base común de numerosas enfermedades metabólicas y no metabólicas, como la DM tipo 2, la obesidad, la hipertensión arterial (HT A), las dislipemias o la enfermedad cardiovascular”. La RI es, quizá, el componente esencial del SM, si bien RI y SM no son equivalentes.

2. EPIDEMIOLOGÍA.

El estudio epidemiológico del síndrome metabólico está condicionado por la inconsistencia de su definición. Depende por tanto de la definición empleada, grupo étnico de la población estudiada, sexo y distribución por edades. Así por ejemplo, parece ocurrir con más frecuencia en afroamericanos⁶⁻⁹, mexicano-americanos¹⁰, naturales de la India y chinos⁵, aborígenes australianos¹¹ y polinesios/micronesios¹².

En Estados Unidos, el estudio NHANES III¹³ encontró una prevalencia, siguiendo criterios ATPIII de 22,8 % entre los varones y 22,6 % entre las mujeres. Por grupos étnicos, la prevalencia resultó de 13,9 %, 20,8 % y 24,3 % para negros, mexicano-americanos y blancos respectivamente. La diferencia entre el primer grupo y los dos últimos, resultó estadísticamente significativa. Esta diferencia podría explicarse por la separación de los dos criterios lipídicos en la ATPIII, lo que limita el efecto de las mayores tasas de hipertensión arterial e insulinoresistencia entre los afroamericanos¹⁴. En todos los grupos la prevalencia aumentó de forma escalonada con la edad, con pico entre los 50 y 70 años para los varones y 60 a 80 años entre las mujeres.

En Europa, la prevalencia global del SM estimada por criterios de la OMS (excluyendo diabéticos) es del 23 % en varones y 12 % en mujeres, con límites del 7 al 36 % para varones según edad y del 5 al 22% en mujeres entre 40 y 55 años. Al aplicar la definición EGIR ¹²¹ en individuos no diabéticos se ha obtenido en cambio una menor prevalencia, 16 % en varones y 9,7 % en mujeres, similar a la obtenida en población francesa con criterios ATPIII (17 % en varones y 10 % en mujeres)¹⁵. En España, el estudio VIVA (Variability of the Insulin with Visceral Adiposity) encontró resultados similares (OMS 19,3 %, EGIR 15,5 %)¹⁶. En Segovia y sobre población rural y urbana, la prevalencia global siguiendo criterios ATPIII es del 17 %, mayor en mujeres que en varones (18,1 versus 15,7 %), y aumentando con la edad ¹⁷. En la Comunidad Canaria, también con criterios ATPIII la prevalencia global ha resultado del 24,4 % ¹⁸ con notable aumento de prevalencia en los grupos de edad avanzada. En efecto, en el grupo de edad de 18 a 44 años la prevalencia fue del 10,1 %, mientras que en el grupo de 45 a 74 años resultó cuatro veces superior (38,5 %). Así, estudios en población europea¹⁹ y norteamericana¹²² apuntan a una prevalencia mayor del síndrome con la edad, principalmente a partir de los 60 años, y a que tras la menopausia la prevalencia del síndrome entre las mujeres experimenta un incremento mayor y gradual hasta ser comparable a la de los varones alrededor de los 70 años de edad ²⁰. Por otra parte se han visto diferencias por sexos entre Europa y Estados Unidos. Así, el síndrome metabólico es más frecuente en mujeres españolas respecto a las naturales de San Antonio (Estados Unidos), quizá por diferente patrón distributivo de la grasa corporal²¹. Desde hace pocos años se presta creciente atención a un aspecto novedoso del síndrome metabólico: la inflamación subclínica. Y se ha propuesto que el nexo de unión entre inflamación subclínica y enfermedad cardiovascular, podría ser la resistencia a la insulina y/o el síndrome metabólico. En este sentido debemos resaltar que la proteína C-reactiva (PCR) circulante, predictora de riesgo de enfermedad cardiovascular²², presenta una fuerte correlación con el número de componentes del síndrome dismetabólico (dislipemia, adiposidad, resistencia insulínica e hipertensión)²³. Dicha asociación explicará la reducción significativa de PCR circulante en sujetos diabéticos a los que se trató con rosiglitazona (25 %), hipolipemiantes (estatinas)^{24,25} o estatinas en combinación con un inhibidor selectivo de la absorción de colesterol, ezetimibe ²⁶

Probablemente, la conclusión más notoria derivada de los hallazgos epidemiológicos es el espectacular aumento que el síndrome metabólico está teniendo en las sociedades occidentales, en paralelo con el envejecimiento de la población y la prevalencia de obesidad de tipo visceral, lo que conduce inevitablemente a una mayor incidencia de estadios prediabéticos o DM establecida y de enfermedades cardiovasculares.

3. ETIOPATOGENIA.

La insulina es la hormona anabólica y anticatabólica más potente en el ser humano, con efectos sobre diversos órganos y/o tejidos: músculo, tejido adiposo o hígado²⁷. La actuación de la insulina se desencadena tras su unión al dominio extracelular de su receptor (figura 2), lo que induce en este un cambio conformacional, que permite la autofosforilación de residuos de tirosina de la subunidad beta del dominio intracitoplasmático, y la consecuente activación del receptor. El receptor activado induce un aumento de la actividad catalítica de la subunidad beta que a su vez fosforila diversos sustratos proteicos endógenos (IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4, GAB1, Shc) que actúan como proteínas de anclaje para otras proteínas y estimulan una serie de cascadas de reacciones de fosforilación y desfosforilación catalizadas por enzimas como la fosfatidilinositol-3 quinasa, o por enzimas quinasas asociadas a microtúbulos, desencadenándose así todas las

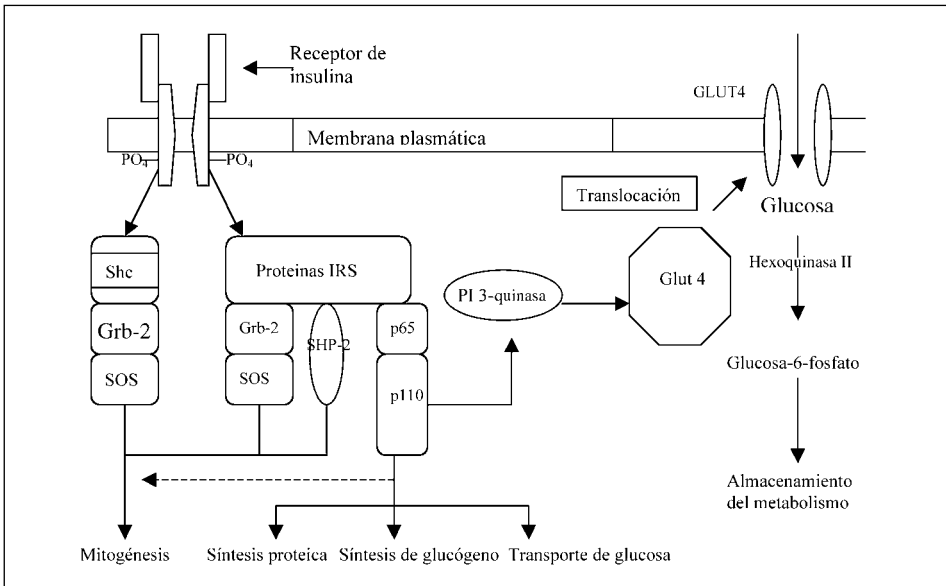


FIGURA 2. Vía de transducción de señales de la insulina. El receptor de insulina posee actividad cinasa intrínseca e interacciona con proteínas sustrato del receptor de insulina (IRS y Shc). Cierta número de proteínas de “atraque” se unen a estas proteínas celulares e inician las acciones metabólicas de la insulina (Grb-2, SOS, SHP-2, p65, p110 y quinasa-3 de fosfato de inositol (PI-3-quinasa). La insulina aumenta el transporte de glucosa a través de la PI-3-quinasa, que promueve la translocación a la membrana plasmática de vesículas intracelulares que contienen el transportador de glucosa GLUT4. Tomado y modificado de Powers AC. Diabetes Mellitus. En: Harrison. Principios de Medicina Interna. 15ª edición. Braunwald, Fauci, Kasper, Hauser, Longo, Jameson Eds. McGraw Hill Interamericana. Vol II: pp2467-2500.

funciones biológicas de la insulina: transporte de glucosa, síntesis de glucógeno, síntesis proteica y de ácidos grasos, crecimiento celular, transcripción y expresión génica (funciones tardías)²⁸. Los mecanismos que conducen a la resistencia a la insulina pueden ser varios y todavía no bien conocidos. Entre las alteraciones que pueden aparecer a nivel postreceptor (más frecuentes que en el nivel de prerreceptor o de unión de la hormona con el receptor), se han encontrado defectos en la vía de transmisión de señales generadas por la unión de la insulina al receptor, antagonismo a la acción de la insulina por adipocitoquinas derivadas del tejido adiposo (TNF- α , leptina, adiponectina), antagonismo por niveles elevados de ácidos grasos no esterificados y/o ácidos grasos libres que acompañan a los estados prediabéticos, de DM tipo 2 y obesidad, interfiriendo en la captación, transporte y utilización de glucosa inducidos por insulina en músculo esquelético y cardíaco y finalmente el estrés oxidativo asociado a la disfunción endotelial que acompaña a componentes del síndrome metabólico como la DM tipo 2 o la obesidad que parece puede inhibir la señalización del receptor de insulina, reduciendo la eficacia de su acción o promoviendo o potenciando resistencia a la insulina (RI).

Estudios “in vitro” en tejidos vasculares indican así mismo que la insulina puede ser tanto protectora como perjudicial para la pared vascular. La insulina estimula la producción de óxido nítrico en la célula endotelial, lo que podría interferir con el desarrollo de aterogénesis²⁹. Estudios en ratones, “in vitro”, han mostrado que el óxido nítrico también inhibe el crecimiento y migración de células de la musculatura vascular^{30,31}. Y por otra parte, al inhibir la expresión de determinadas moléculas de adhesión como la VCAM-1, E-selectina e ICAM, el óxido nítrico atenuaría la reacción inflamatoria³² quizá por la reducción de citoquinas inflamatorias como TNF- α o la proteína de quimioatracción de monocitos-1 así como por reducir la unión de células inflamatorias, monocitos y macrófagos a las células vasculares³³, y la adhesión y agregación plaquetarias^{34,35}.

A pesar de los efectos beneficiosos de la insulina mediados por el óxido nítrico, esta hormona también puede tener (paradójicamente) efecto deletéreo, contribuyendo al desarrollo de aterosclerosis y estenosis. La insulina “per se” tiene un leve-moderado efecto promotor del crecimiento de la musculatura vascular, pero además potencia la actuación del factor promotor del crecimiento plaquetario entre otros promotores del crecimiento³⁶.

3.1. Factores fisiopatológicos “clásicos” y potenciales.

La evidencia clínica y experimental acumulada en los últimos años apunta al depósito grasa intraabdominal como el principal motor de inducción de

RI a través de un flujo excesivo de ácidos grasos no esterificados al hígado por la ineficaz acción lipolítica de la insulina (primer acontecimiento de la RI).

El sobrepeso y la obesidad incrementan el riesgo para otras enfermedades que aumentan la morbimortalidad. Así, la sensibilidad a la insulina y la diabetes mellitus (DM) se correlacionan con el IMC (índice de masa corporal). En la obesidad, la cascada desencadenada tras la unión de la insulina a su receptor es defectuosa y da lugar a anomalías en la lipogénesis y síntesis proteica. El aumento de los ácidos grasos libres (AGL) consecuencia del incremento de la grasa corporal, conduce a hiper glucemia e intolerancia hidrocarbonada, pero también afecta al metabolismo lipídico, con incremento de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), disminución de las de alta densidad (HDL) y aumento de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) pequeñas, capaces de penetrar en la pared arterial donde son oxidadas y producen ateromatosis. El incremento de la mortalidad cardiovascular del obeso viene determinado en parte por su mayor insulinemia basal (Paris Prospective Study) y en este sentido, exige un tratamiento más agresivo de los componentes asociados, como el descenso de la fracción LDL de colesterol hasta niveles mayores, de acuerdo con las últimas recomendaciones ATPIII³⁷.

La hiperinsulinemia ha sido propuesta como el factor común que precede y correlaciona los distintos componentes del síndrome metabólico como son la hipertensión, la disminución del colesterol HDL, la hipertrigliceridemia, la obesidad central, la intolerancia hidrocarbonada; y que a su vez une todos estos factores con la existencia de un mayor riesgo cardiovascular ³⁸. En la pasada década se llevaron a cabo numerosos estudios que dejaron establecido a partir de 1996 ³⁹ una relación directa entre la medición de la resistencia a la insulina y el desarrollo de aterogénesis. Igualmente ha quedado comprobado que la insulina juega un papel fundamental en los mecanismos de la inflamación ⁴⁰⁻⁴² que, a su vez, regulan el proceso de aterosclerosis ^{43 44}

Entre los estudios llevados a cabo en este sentido destaca uno publicado en 1993 ⁴⁵ en el que se relaciona de forma directa la insulinemia, con el recuento leucocitario y la medición de proteína C reactiva en pacientes con angina de pecho. Tal es la importancia que ha cobrado dicha asociación entre la insulina y los factores de la inflamación, y a su vez de estos con el resto de los componentes del síndrome metabólico y con el aumento de los factores de riesgo cardiovascular en dichos pacientes, que en los más recientes estudios se considera el componente inflamatorio subclínico crónico como una parte integrante del mismo síndrome metabólico ⁴⁶

La obesidad juega igualmente un importante papel en el campo de los mecanismos inflamatorios y el desarrollo de aterogénesis, especialmente desde que en los últimos años se ha comprobado que el tejido adiposo, no es tan solo una reserva grasa del organismo, sino un verdadero órgano endocrino capaz de secretar multitud de hormonas, citoquinas, y otros productos metabólicamente activos, así como de intervenir activamente en los mecanismos de resistencia y sensibilidad a la insulina. En este sentido, los adipositos son capaces de sintetizar citoquinas como el TNF-alfa y la IL-6⁴⁷ promoviendo de esta manera la inflamación y el desarrollo de aterogénesis de forma incluso independiente a los efectos de la resistencia a la insulina o alteraciones de las lipoproteínas asociadas a la propia obesidad.

Otros componentes del síndrome metabólico han sido directamente relacionados con los procesos inflamatorios, y por consiguiente, con el desarrollo de aterosclerosis. Así pues, en relación con la dislipemia, se ha comprobado que las partículas VLDL beta pueden activar por sí mismas las funciones inflamatorias de las células endoteliales vasculares^{48, 49}. Con respecto a la hipertensión arterial, destaca el papel de la angiotensina II (AII), que estimula la producción de anión superóxido por parte de células endoteliales y células musculares lisas del tejido vascular⁵⁰. Igualmente dicha AII incrementa la expresión por parte de las células musculares lisas vasculares de citoquinas proinflamatorias como la IL-6, así como de moléculas de adhesión de leucocitos como la VCAM-1 por parte de las células endoteliales⁵¹⁻⁵³

Todo ello pone de manifiesto que los mecanismos de la inflamación crónica y subclínica, han cobrado un papel protagonista en el contexto del síndrome metabólico, no solo como punto de unión entre cada uno de los componentes de dicho síndrome y el desarrollo de aterosclerosis, promovido por cada uno de ellos, sino también como enlace común que explica la frecuente asociación o aparición conjunta de dichos componentes constituyendo el síndrome metabólico en sí.

3.2. Factores ambientales

La evidencia favorable al ejercicio físico, pérdida de peso y dieta adecuada como atenuantes del síndrome metabólico es en la actualidad contundente, como también lo es el impacto que secundariamente tiene en el descenso de la morbimortalidad cardiovascular.

El ejercicio físico provoca aumento en el número de receptores para insulina en la superficie celular, descenso de la acumulación lipídica en músculo es-

quelético y una composición lipídica de la membrana celular de perfil fisiológico más favorable, con mejoría de la eficacia de la insulina. En múltiples estudios ha quedado probado la asociación de forma independiente del sedentarismo, con mayor prevalencia e incidencia de diabetes tipo 2, tanto en hombres como mujeres^{54,55}. El ejercicio físico parece tener efecto reductor sobre la resistencia a la insulina⁵⁶, actuando a diferentes niveles: aumento de transportadores de glucosa (Glut – 4) y del flujo capilar e incremento de la actividad enzimática postreceptor⁵⁷. También se sabe que reduce los niveles de VLDL y LDL colesterol y la presión arterial y aumenta los niveles de HDL colesterol, favoreciendo la función cardiovascular.

En los estudios de prevención de diabetes, una actividad física de grado moderado o superior en conjunción con una dieta saludable se mostró efectiva en la prevención de diabetes. También en ciertos estudios epidemiológicos la actividad física ha sido asociada con una reducción en el riesgo de enfermedad cardiovascular⁵⁸. Recientemente se ha publicado un estudio⁵⁹ sobre 73.743 mujeres menopáusicas (50-79 años), libres al comienzo del mismo de enfermedad cardiovascular establecida o cáncer, que fueron seguidas durante 5,9 años. Se pretendía comprobar el efecto que la actividad física total, el número de horas semanales que se permanecía sentado o en cama, así como el efecto de caminar a paso rápido o la realización de otro tipo de ejercicio físico más intenso, tenían sobre la incidencia de eventos cardiovasculares. El estudio demostró que, al menos en las mujeres menopáusicas, caminar durante 2,5 horas semana puede ir asociado con una reducción de hasta el 30 % en la incidencia de eventos coronarios, si bien este porcentaje se redujo cuando el ejercicio no fue vigoroso, como por ejemplo andar a paso rápido. Respecto a la mejora en el perfil lipídico, el estudio STRRIDE⁶⁰ fue diseñado con la finalidad de dar respuesta a las preguntas de cuánto ejercicio es suficiente y cuál es el óptimo. Realizado sobre un total de 84 pacientes de ambos sexos, sedentarios, con sobrepeso o ligera obesidad, dislipémicos y sin hipertensión arterial confirmó el efecto favorable sobre el perfil lipídico, siendo éste mayor cuanto mayor el ejercicio físico, importando más la cantidad que la intensidad.

Aunque todavía está por evaluar con precisión, el ejercicio físico no solamente reduce el contenido de grasa corporal total, sino también el de grasa intraabdominal (característica esencial de la forma de obesidad más perjudicial, la abdominal – OB–A). Esto es lo que evidencia una reciente investigación realizada en mujeres postmenopáusicas⁶¹. Finalmente, el entrenamiento físico en pacientes con cardiopatía isquémica⁶² mejora la vasodilatación dependiente del endotelio (tanto en arterias coronarias como en vasos de resistencia).

Numerosos datos experimentales, clínicos y epidemiológicos revelan un efecto importante de la calidad/cantidad de la dieta, ingesta de alcohol y tabaquismo en la génesis y desarrollo de la RI, SM y enfermedad cardiovascular. El principal efecto nocivo de una dieta inadecuada parece residir en el exceso de grasa total, grasa saturada y colesterol total. Una dieta rica en ácidos grasos insaturados de cadena larga se asocia a una mayor sensibilidad a la insulina en humanos con o sin enfermedad cardiovascular⁶³ y a una disminución del tejido graso abdominal⁶⁴. También existen evidencias de que una dieta rica en ácidos grasos saturados potencia el riesgo de desarrollar SM y enfermedad cardiovascular⁶⁵. El aumento en la ingesta de carbohidratos en las dietas tiende a elevar la glucemia y por tanto la hiperinsulinemia compensadora, agravando el cuadro de SM. Una dieta con alto contenido en legumbres y hortalizas, que contienen poca cantidad de glúcidos, parece prevenir la enfermedad cardiovascular en diabéticos e individuos sanos⁶⁶.

El tabaquismo por su parte, favorece la progresión de la enfermedad aterosclerótica, probablemente de forma acumulativa e irreversible⁶⁷. Respecto al alcohol, su abuso potencia el riesgo de enfermedad cardiovascular, aunque su ingesta en cantidades moderadas puede ser protectora, al menos en varones^{68,69}.

3.3. Factores genéticos.

Entre los múltiples genes candidatos que se han investigado con mayor profundidad están los relacionados con el metabolismo de la glucosa, de la secreción y acción de la insulina, del metabolismo lipídico y/o de la obesidad central (tabla 3).

Se ha descrito una deposición anómala de glucógeno en el músculo esquelético en pacientes con DM tipo 2 y en sujetos no diabéticos, familiares de individuos con RI⁷⁰. A pesar de ello, los resultados publicados de asociación de diferentes polimorfismos en el gen de la glucógeno sintetasa con los diferentes componentes del síndrome metabólico, son controvertidos. Respecto al sustrato del receptor de la insulina (IRS-1), es uno de los sustratos proteicos endógenos fosforilados por la subunidad β del receptor de insulina, cuyo gen se localiza en el cromosoma 2 (2q36). El polimorfismo Gly972Arg se ha asociado a RI⁷¹, mayor riesgo de desarrollar DM tipo 2⁷² y a enfermedad cardiovascular⁷³. Otras mutaciones en genes que codifican proteínas de la familia del sustrato del receptor de la insulina (IRS-2, IRS-3, IRS-4) y moléculas que intervienen en las cascadas de señales inducidas por la unión de la insulina a su receptor, están ac-

tualmente en estudio y no existen datos suficientes de su relación con alteraciones en la acción de la insulina.

Entre los genes relacionados con la sensibilidad y/o resistencia a la insulina están los que codifican para el receptor PP AR γ y la glicoproteína de membrana PC-1. De los tres subtipos de receptores PP AR(α , β , γ), el que se expresa de forma predominante en tejido adiposo es el PP AR γ , que es activado por ligandos naturales (ácidos grasos y prostanoides) o farmacológicos como las tiazolidinonas que se unen al receptor y estimulan la diferenciación de adipocitos y expresión de genes. Se ha establecido asociación entre el polimorfismo Pro12Ala en el exón B del gen de PP AR γ y una mayor sensibilidad a la insulina, junto a una mayor deposición periférica de tejido adiposo^{74,75}. También se ha descrito interacción entre este gen y la ingesta de ácidos grasos de la dieta, demostrando que cuando el cociente ácidos grasos poli-insaturados/saturados procedentes de la dieta es bajo, la media del IMC en los portadores de la mutación es mayor que en individuos con genotipo normal⁷⁶. La glicoproteína de membrana PC-1 inhibe la actividad tirosina-quinasa del receptor de la insulina. La variante polimórfica K121Q (sustitución de lisina por glutamina en el codón 121) se ha relacionado con RI en estudios realizados en población de origen caucásico^{77,78}, si bien en un estudio de nuestro grupo, el resultado ha sido discordante⁷⁹.

La lipoproteína lipasa (LPL) es una enzima lipolítica del endotelio capilar del músculo y del tejido adiposo. Se han descrito varias mutaciones en el gen de la LPL que parecen condicionar una pérdida total o parcial de la actividad catalítica de la enzima⁸⁰, de tal forma que el polimorfismo Asn291Ser de esta enzima se asociaría con niveles altos de triglicéridos, disminuidos de HDL colesterol y arteriosclerosis prematura⁸¹. La lipasa hepática (LH) hidroliza triglicéridos y fosfolípidos de todas las lipoproteínas. Deficiencias de la LH se asocian también a mayor riesgo cardiovascular. Esto puede ocurrir por mutaciones en el promotor del gen de la LH y en diferentes exones de dicho gen. Así, la sustitución G-250-A en el promotor parece asociarse con dislipemia y RI en individuos sanos y/o pertenecientes a una misma familia con hiperlipemia familiar combinada⁸². El último de los genes relacionados con el metabolismo lipídico que destacaremos es el que codifica la proteína intestinal de unión a ácidos grasos, proteína que se expresa en células del intestino delgado e interviene en la absorción y transporte intracelular de ácidos grasos. Alteraciones en la función de la proteína podrían repercutir en un incremento de la absorción de ácidos grasos y oxidación de los mismos, produciendo RI. El polimorfismo Ala54Thr descrito en el gen de la IFABP se ha asociado con RI en Indios Pima⁸³ y población japonesa⁸⁴ pero no población de origen caucásico⁸⁵.

La obesidad de predominio visceral, también ha sido y es objeto de múltiples estudios con genes candidatos. La variante 3826 Aβ G en la región del promotor del gen de la proteína desacoplante de la termogénesis (UCP-1) se ha relacionado con disminución de expresión de la proteína y subsecuente obesidad⁸⁶. Por su parte, el receptor β 3 adrenérgico juega un rol importante en el gasto energético a través de la estimulación de la termogénesis. El polimorfismo Trp64Arg del gen de este receptor β localizado en el cromosoma 8 (8p12-p11.2)- se ha asociado con obesidad visceral⁸⁷. El principal receptor lipolítico en el tejido adiposo blanco es el receptor β2 adrenérgico⁵³, cuya codificación se lleva a cabo en el cromosoma 5 (5p31-q32). Es factible que el polimorfismo Gln27Glu juegue un papel relevante en el fenotipo de obesidad y DM tipo 2⁸⁸ y que la asociación descrita del alelo Glu27 con dichos fenotipos difiera en función de naturaleza étnica, sexo y grado de obesidad. El TNFα es una citoquina mediadora de la respuesta inflamatoria en adipocitos y músculo esquelético, que produce RI por inhibición de la autofosforilación de residuos de tirosina de la subunidad β del receptor de la insulina⁸⁹. El polimorfismo en la región del promotor del gen codificante (308G/A) en el cromosoma 6 (6p21.3) parece asociarse a RI y obesidad⁹⁰, si bien estos datos son iniciales y precisan confirmación. Ninguna mutación en la leptina – actúa en el hipotálamo informando del nivel de reservas grasas- ni en su receptor ha podido finalmente relacionarse con obesidad en humanos excepto en casos excepcionales de obesidad familiar infantil con hipogonadismo⁹¹. Sin embargo, algún papel debe de jugar, quizás significativo. Así, en un estudio reciente en sujetos sanos, una menor ingesta calórica durante semanas condujo a una pérdida de peso de alrededor de 3 kg con un descenso asociado del 60 % de los niveles de leptina de forma estadísticamente significativa⁹², también de un 16 % en la adiponectina. La adiponectina es una proteína específica del tejido adiposo con un peso molecular de 30 Kda que parece expresarse en menor cuantía en obesos⁹³. Sus niveles en plasma se relacionan de forma inversa con la RI. Se han encontrado variantes polimórficas del gen codificante localizado en el cromosoma 3q27 que parecen asociarse con RI en determinados sujetos –portadores de genotipos G/G en posiciones 45 y 276- y riesgo para DM tipo 2⁹⁴. En este mismo estudio el alelo G en la posición 276 se asociaba linealmente con menores niveles plasmáticos de adiponectina. Puesto que la hipoadiponectinemia se ha asociado con RI y obesidad, se sugiere que pueda ser un defecto determinado genéticamente que contribuye a las alteraciones del SM. Finalmente, la calpaína 10 es una proteasa que se expresa en músculo y páncreas. En sujetos no diabéticos que presentan el genotipo G/G del polimorfismo UCSNP-43 la calpaína 10 está disminuida. En los indios Pima se ha relacionado con desarrollo de DM tipo 2.

4. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO.

Es posible prevenir y/o retrasar la aparición de SM, RI, DM tipo2 y el desarrollo de enfermedad cardiovascular . Una dieta con bajo contenido calórico y equilibrada de acuerdo con las recomendaciones de las guías internacionales, la práctica de ejercicio regular moderado y la abstención o ingesta de cantidades moderadas de alcohol pueden conseguir estos objetivos, tal como ha quedado demostrado recientemente en estudios con un amplio número de participantes (tabla 4).

El estudio DPP ⁹⁵ fue diseñado para investigar los beneficios de metformina, troglitazona⁹⁶ y dieta y ejercicio, frente a un grupo sin tratamiento. Cada una de las cuatro ramas contó con 1000 sujetos. La rama de troglitazona fue discontinuada al segundo año por toxicidad hepática. La reducción de la incidencia de DM tipo 2 fue mayor en el grupo de individuos que habían modificado su estilo de vida siguiendo las indicaciones que se les habían dado (dieta con bajo contenido en grasas y calorías así como ejercicio físico moderado-intenso), que en aquellos que habían sido tratados con metformina (850 mg/12 horas): 58 % vs. 31 %. Sin embargo, el estudio más antiguo de prevención de DM tipo 2 con dieta y ejercicio se llevó a cabo hace ya más de una década en la ciudad sueca de Malmö⁹⁷. La dieta y el ejercicio juntos consiguieron una reducción del riesgo de desarrollo de DM del 51 % en seis años de seguimiento. La incidencia acumulada de DM tipo 2 entre los sujetos incluidos en el grupo control fue doble respecto de los incluidos en el grupo de intervención activa. Otro estudio de capital importancia es el finés ⁹⁸, en el que la reducción del riesgo de DM alcanzó el 58 % (tabla 3).

Así pues, en el ámbito de la prevención y pese a las dificultades que entraña el objetivo de conseguir un “estilo de vida” saludable al no obtenerse objetivos a corto plazo, se debe insistir sin paliativos en estas modificaciones, ya que el empleo de fármacos, además de no resultar superior a las modificaciones dietéticas y ejercicio físico, conlleva el riesgo no despreciable de posible desarrollo de efectos secundarios a largo plazo e implica mayor coste económico. En definitiva, la medida más coherente será el establecer a nivel de la población general –en el ámbito familiar y escolar -, programas nutricionales y de ejercicio físico encaminados a disminuir la incidencia en la vida adulta del SM. No olvidemos, que si queremos establecer unos hábitos “sanos” de vida, esto sólo es factible en los primeros años de vida.

El National Cholesterol Education Program (NCEP) en sus últimas directrices apunta a la gran importancia del tratamiento del individuo con SM para

prevenir los eventos cardiovasculares. Entre los objetivos que el tratamiento farmacológico debe perseguir se encuentran el aumento de la sensibilidad a la insulina, la atenuación del efecto compensatorio hiperinsulinémico y la mejora del resto de componentes del complejo sindrómico.

El tratamiento no farmacológico es tan importante o más en el tratamiento de la RI y del SM. El sobrepeso y la inactividad física son los enemigos a batir por lo que el primer objetivo de todo algoritmo terapéutico debe ser la modificación del estilo de vida (dieta y actividad física principalmente) del individuo diagnosticado de RI o SM. Con la disminución de peso se favorece la reducción de los niveles de colesterol-LDL y de todos los factores de riesgo asociados al SM. La *Obesity Education Initiative* ha establecido unas recomendaciones a seguir en caso de sobrepeso u obesidad. Respecto a la actividad física, recomendaciones precisas se recogen en el *US Surgeon General's Report on Physical Activity*.

Las estrategias farmacológicas para el tratamiento del SM incluyen el uso de drogas anti-iskémicas, antihipertensivos, hipolipemiantes y/o insulinosensibilizantes. Una revisión exhaustiva de todos ellos sobrepasa el objetivo de este capítulo. Sin embargo, comentaremos brevemente cada uno de estos grupos, haciendo especial hincapié en los estudios más relevantes y/o recientes.

Entre los fármacos para el tratamiento de la HT A, los diuréticos han sido el tratamiento de elección durante años. Su efectividad a bajas dosis es incuestionable. En el estudio SHEP (Programa de Tratamiento de Hipertensión Sistólica en la vejez) la clortalidona ha probado disminuir el riesgo de ictus, infarto agudo de miocardio (IAM) y otros tipos de eventos cardiovasculares y mortalidad total tanto en población general como diabéticos tipo 2⁹⁹. A pesar de que se ha invocado un efecto negativo sobre el perfil glucémico/metabólico, la realidad parece confirmar que este efecto es despreciable y que disminuyen la progresión de la nefropatía diabética¹⁰⁰. Finalmente, el ALLHAT^{101,102} es el estudio realizado de reducción de TA en mayor número de sujetos. El diurético tiazídico a bajas dosis demostró ser igual de eficaz que el IECA para la mayoría de los puntos cardiovasculares finales y superior respecto a la incidencia de insuficiencia cardiaca.

Los antagonistas de los receptores alfa son antihipertensivos con un impacto favorable sobre la sensibilidad a la insulina y el control glucémico. Parecen ser eficaces en el control de la hipertensión arterial en DM, pero no hay resultados concluyentes de su efecto positivo sobre la microalbuminuria o la protección renal. Se ha sugerido que el bloqueo adrenérgico podría inducir pequeñas eleva-

ciones de vasopresina, hormona que por su acción vasopresora podría inducir fallo cardíaco e isquemia miocárdica ¹⁰³.

Los betabloqueantes son una familia con más de 14 moléculas, ampliamente utilizada en pacientes no diabéticos. En diabéticos se han empleado con precaución porque se sabe que pueden producir algún grado de RI, dificultad para la detección de hipoglucemia, empeoramiento del metabolismo lipídico y del flujo sanguíneo periférico con eventual empeoramiento de la disfunción eréctil. Estos fármacos se asocian con disminución de la morbimortalidad cardiovascular^{104,105}.

Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAS) han sido objeto de recientes y amplios estudios. Entre ellos, el estudio HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation) ¹⁰⁶ ha demostrado que el tratamiento con ramipril reduce la incidencia de eventos cardiovasculares en pacientes diabéticos.

Los bloqueantes selectivos del receptor de angiotensina II permiten la activación de la angiotensina II induciendo vasodilatación, descenso de presión glomerular y alteración de la proliferación y fibrosis, lo que protege el riñón. Son seguros y de perfil de eficacia similar a los IECAS, tanto en diabéticos como no diabéticos, con la ventaja de que parecen ser mejor tolerados. El estudio LIFE¹⁰⁷ ha demostrado que el losartán es más efectivo en reducir la morbimortalidad cardiovascular en pacientes diabéticos que el atenolol (beta-bloqueante), con independencia de las cifras de presión arterial. En el estudio IRMA ¹⁰⁸ se ha encontrado beneficio significativo en el tratamiento con irbersartán de los sujetos diabéticos hipertensos con microalbuminuria. La renoprotección resultó independiente de los efectos antihipertensivos.

Finalmente, los bloqueantes de los canales de calcio son un grupo de eficacia antihipertensiva probada pero de efecto renoprotector a largo plazo poco probado y con resultados negativos para eventos cardiovasculares en individuos diabéticos en algunos estudios ^{109,110}.

Las estatinas constituyen el grupo de fármacos hipolipemiantes más empleado en la actualidad con mucho, por su baja incidencia de efectos adversos y por la reducción contundente de la frecuencia de eventos cardiovasculares tanto en diabéticos como no diabéticos ^{111,112}. Los fibratos son agonistas de los receptores PPAR α y actúan aumentando los niveles de cHDL y disminuyendo los de tricéridos (TG). El tratamiento con gemfibrozilo se asocia con una reducción significativa del 24 % en la frecuencia de muerte por enfermedad cardiovascular, infarto de miocardio no fatal, y de ictus en pacientes diabéticos y no diabéticos¹¹³. La niacina aumenta los niveles de c-HDL y disminuye los niveles

de TG. La conveniencia del uso de niacina en sujetos con DM tipo 2 o SM es discutible ya que en exceso produce RI, empeorando el control de la glucemia. Los resultados del estudio ADMIT¹¹⁴ apuntan a que la niacina puede emplearse en diabéticos ajustando la medicación hipoglucemiante, si bien esto no es recomendable en individuos con SM ya que puede inducir la aparición de diabetes. El ezetimibe es un nuevo hipolipemiante que inhibe selectivamente la absorción de colesterol en el enterocito y que parece ser eficaz en la mejoría del perfil lipídico con una baja incidencia de efectos secundarios^{115,116}. También ha sido valorado en administración conjunta con estatinas, siendo los resultados publicados hasta el momento excelentes¹¹⁷.

La metformina es un agente sensibilizante de la acción de la insulina cuyo mecanismo de acción no es bien conocido. Reduce la producción hepática de glucosa y la expresión de enzimas lipogénicas. Los resultados del estudio UKPDS¹¹⁸ muestran que el uso prolongado de metformina reduce la hemoglobina glicosilada induciendo menor aumento de peso que las sulfonilureas, lo cual reduce el riesgo cardiovascular. Las tiazolidindionas es un grupo amplio de fármacos que disminuyen la RI. Estimulan la diferenciación de adipocitos uniéndose al receptor PPAR γ . Tienen un efecto insulinoimético disminuyendo la glucemia basal y posprandial de los pacientes con DM tipo 2 sin provocar hipoglucemia ni modificar sustancialmente las concentraciones de insulina en plasma. Tienen también efectos favorables sobre el metabolismo de las lipoproteínas, la fibrinólisis, la función endotelial e inflamatoria. Estos fármacos tienen efectos secundarios (retención hídrica, insuficiencia cardiaca congestiva, carcinoma esporádico de colon) que hacen que estén contraindicados en individuos con insuficiencia cardiaca en situación funcional III o IV de la NYHA (New York Heart Association) y en pacientes con poliposis adenomatosa familiar de colon¹¹⁹. Los inhibidores de la α -glucosidasa (acarbosa y miglitol) regulan la absorción intestinal inhibiendo esta enzima. Se utilizan principalmente para reducir la glucemia posprandial. Se ha demostrado que la administración de acarbosa puede prevenir a largo plazo la transición de un estado de intolerancia a la glucosa a DM tipo 2, e incluso atenuar el riesgo cardiovascular asociado¹²⁰. La acarbosa no se absorbe en el intestino, por lo que no actúa directamente sobre los tejidos diana.

5. CONCLUSIÓN.

El SM es una situación clínica poligénica y multifactorial cuya prevalencia e incidencia aumenta notablemente en los últimos 5 años en paralelo con la de DM tipo 2, obesidad visceral y enfermedad cardiovascular. Este auge está ocu-

riendo fundamentalmente en los países desarrollados, donde han proliferado hábitos dietéticos y de vida poco saludables (dieta rica en grasas saturadas, ingesta excesiva de alcohol, tabaquismo e inactividad principalmente) a los que España no es ajena. En este sentido son necesarias medidas urgentes que fomenten entre la población un estilo de vida saludable con una dieta adecuada para cada edad y situación profesional, acompañado de ejercicio físico aeróbico regular por su importante efecto reductor de la resistencia a la insulina.

TABLA 1
Criterios de SM según cada Grupo de Trabajo o Sociedad Científica.

Criterios OMS¹²¹
Se considera que existe SM si se dan los siguientes criterios: intolerancia a la glucosa, DM tipo 2 o resistencia a la insulina junto con 2 o más de las siguientes alteraciones: <ul style="list-style-type: none">• Presión arterial $\geq 140/90$ mm Hg• Dislipemia: definida por hipertrigliceridemia ≥ 150 mg/dL o descenso del colesterol HDL (♂ 35 mg/dL; ♀ 39 mg/dL)• Obesidad central o visceral• Microalbuminuria (excreción urinaria de albúmina ≥ 20 $\mu\text{g}/\text{min}$ o cociente albúmina/creatinina > 30 mg/g)
Criterios EGIR¹²² (aplicados a población general no diabética)
Presencia de RI o hiperinsulinemia en ayunas (superior al percentil 75), y dos o más de las siguientes alteraciones: <ul style="list-style-type: none">• Hiperglucemia (glucemia en ayunas ≥ 110 mg/dL, pero no en el rango diabético)• Presión arterial $\geq 140/90$ mm Hg o estar recibiendo tratamiento para hipertensión.• Dislipemia (triglicéridos ≥ 180 mg/dL o c-HDL < 40 mg/dL)• Obesidad central (cociente cintura/cadera ♂ ≥ 94 cm; ♀ ≥ 80 cm o IMC > 30 kg/m²)
ATPIII¹²³
Presencia de tres o más de los siguientes criterios: <ul style="list-style-type: none">• Obesidad abdominal: perímetro de la cintura > 102 cm en ♂ y > 88 cm en ♀• Hipertrigliceridemia ≥ 150 mg/dL• cHDL < 40 mg/dL en ♂ o < 50 mg/dL en ♀• Presión arterial $\geq 130/85$ mm Hg• Glucemia basal ≥ 100 mg/dL

TABLA 1 (continuación)
Criterios de SM según cada Grupo de T. trabajo o Sociedad Científica.

AACE ¹²⁴
<p>Obesidad/sobrepeso: BMI \geq 25 kg/m²</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hipertrigliceridemia \geq 150 mg/dL • cHDL $<$ 40 mg/dL en ♂ o $<$ 50 mg/dL en ♀ • Presión arterial \geq 130/85 mm Hg • Glucemia basal \geq 100 mg/dL • Glucemia tras sobrecarga oral de glucosa (2 h) \geq 140 <p>Otros factores de riesgo: Historia familiar de diabetes tipo 2, hipertensión o enfermedad coronaria. Síndrome de Ovario Poliquístico, Sedentarismo, Edad avanzada, historia personal de DM tipo 2 o de enfermedad coronaria, pertenecer a un grupo étnico de alto riesgo.</p>

TABLA 2.
Criterios para la definición de SM y criterios accesorios aplicables en el campo de la investigación y como coadyuvantes para determinar de forma individualizada el riesgo de enfermedad cardiovascular o de diabetes. Según la Federación Internacional de diabetes (IDF)

<p>OBESIDAD CENTRAL (Perímetro de la cintura \geq 94 cm para varones europeos y \geq 80 cm para mujeres europeas) junto con 2 o más de los siguientes criterios</p> <ul style="list-style-type: none"> • Elevación de triglicéridos $>$150 mg/dl, o tratamiento específico para dicha alteración lipídica. • HDL - c bajo ($<$ 40 mg/dl en varones y $<$ 50 mg/dl en mujeres) o estar en tratamiento específico para esta anomalía lipídica. • Hipertensión arterial (TAS \geq 130 o TAD \geq 85) o estar en tratamiento o previamente diagnosticado de hipertensión arterial. • Glucemia basal alterada \geq 100 mg/dl o diagnóstico previo de diabetes mellitus tipo 2. Si hay alteración de la glucemia basal es recomendable realizar una sobrecarga oral de glucosa pero no es imprescindible para definir la presencia del SM. 	
<p>Criterios metabólicos adicionales para la investigación</p>	
<p>Distribución anormal de la grasa corporal</p>	<p>Distribución general de la grasa corporal Distribución central Biomarcadores del tejido adiposo: leptina, adiponectina Hígado graso</p>
<p>Dislipemia ateo génica (además de la elevación de triglicéridos y el descenso de HDL)</p>	<p>ApoB (o colesterol no HDL- c) Partículas LDL pequeñas</p>

TABLA 2. (continuación)

Criterios para la definición de SM y criterios accesorios aplicables en el campo de la investigación y como coadyuvantes para determinar de forma individualizada el riesgo de enfermedad cardiovascular o de diabetes. Según la Federación Internacional de diabetes (IDF)

Criterios metabólicos adicionales para la investigación		
Intolerancia hidrocarbonada		Sobrecarga oral de glucosa (SOG)
Resistencia Insulínica (Diferente de la glucemia basal alterada)		Elevación de los niveles de insulina/pro-insulina en ayunas. HOMA-IR Resistencia insulínica según el BMM (<i>Bergman Minimal Model</i>) Elevación de ácidos grasos libres (en ayunas y durante una SOG)
Alteración en la regulación vascular (Diferente de la hipertensión arterial)		Medición de la disfunción endotelial Microalbuminuria
Estado proinflamatorio		Elevación de la PCR ultrasensible Elevación de citoquinas inflamatorias (TNF-alfa, IL-6 etc...) Disminución de los niveles plasmáticos de adiponectina
Estado Protrombótico		Factores fibrinolíticos (PAI-1, etc)
País/Grupo étnico		
Perímetro de cintura		cm
EUROPEOS	♀	≥ 80
	♂	≥ 94
ASIATICOS DEL SUR	♀	≥ 80
Basado en Chinos, Malasios,	♂	≥ 90
e Indios asiáticos		
Chinos	♀	≥ 80
	♂	≥ 90
Japoneses	♀	≥ 85
	♂	≥ 90
Americanos del Norte y Americanos del Sur		Utilizando datos del sur de Asia hasta que se disponga de datos más específicos.
Africanos Subsaharianos		Utilizando datos europeos hasta que se disponga de datos más precisos.
Mediterráneo Oriental y Oriente medio.		Utilizando datos europeos hasta que se disponga de datos más precisos.

TABLA 3

Algunos genes potencialmente candidatos para inducción de resistencia insulínica. Modificado de Pedersen O. Genetic components of insulin resistance. Exp Clin Endocrinol Diabetes 1999;107:113-8.

Metabolismo de la glucosa /DM tipo 2	Metabolismo lipídico	Acción de la insulina	Vías de la sensibilización/desensibilización insulínica	Tejido adiposo/Obesidad
GLUT - 1	Lipasa hepática	IRS -1, 2	PPAR- γ 2	Leptina
GLUT - 4		Shc		Receptor de leptina
Hexoquinasa II	FABP2	Fosfatidil inositol 3 quinasa (α , β)	Receptores	Receptores de leptina β 2/ β 3 adrenérgicos
Fosfofructoquinasa				Proteínas UCP1, UCP2
Glicógeno NPY sintetasa				Receptor NPY
G-S 2 inhibidor				Isoformas TNF α
Glicogenina				Receptor TNF α
Calpaína - 10				Resistina

TABLA 4

Estudios sobre hábitos dietéticos y ejercicio, en la prevención de la DM. C : control D: dieta E: ejercicio M: metformina IG: intolerancia glucídica *Modificado de Pallardo Sánchez LF, Herranz de la Mor ena L. Prevención de la diabetes mellitus tipo 2 y de sus complicaciones microangiopáticas. Cardiovas Risk Factors. 2003;12(2):112-26.*

Estudio	Seguimiento/años	Incidencia acumulada	Reducción riesgo %
Malmö (Suecia) 1991	6	C : 21,4 % D + E : 10,6 %	D + E : 51 %
Da Quing (Est. Vida) 1997	6	C : 67,7 % D : 43,8 % E : 41,1 % D + E : 46 %	D : 31 % E : 46 % D + E : 42 %
Finés (Est. Vida) ³⁰ 2001	3,2	C : 23 % D + E : 11 %	58 % D + E : 58 %
DPP (Est. Vida) ⁹⁹ 2002	2.8	C : 28,9 % D + E : 14,4 % M : 21,7 %	(> 60 años, 71) M : 31 %
Look Ahead	12	¿?	¿?

BIBLIOGRAFIA

- (1) Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M (2005); American Diabetes Association; European Association for the Study of Diabetes. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. Sep; **28** (9): 2289-304.
- (2) Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004; **33**: 351-75.
- (3) Hanefeld M. (1997) The Metabolic Syndrome: roots, myths, and facts. En: Hanefeld M, Leonhardt W, eds. The metabolic syndrome; pp 13-24.
- (4) Stern M. The insulin resistance syndrome. En: Alberti KGMM, Zimmet P, DeFronzo RA, eds. International textbook of diabetes mellitus, 2nd ed. Chichester: Wiley and Sons, 1997; pp 255-75.
- (5) Grupo de Trabajo Resistencia a la insulina de la Sociedad Española de Diabetes. Resistencia a la Insulina y su implicación en múltiples factores de riesgo asociados a diabetes tipo 2. *Med Clin (Barc)* 2002; **119** (12): 458-63.
- (6) Zimmet PZ, Collins VR, Dowse GK, Alberti KGMM, Tuomilehto J, Knight LT, Gareboo H, Chitson P, Fareed D: Is hyperinsulinemia a central characteristic of a chronic cardiovascular risk factor syndrome? Mixed findings in Asian Indian, Creole and Chinese Mauritians. *Diabetic Med* 1994; **11**: 388-96.
- (7) Kaplan NM. (1989) The deadly quartet: upper body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med* ; **149**: 1514-20.
- (8) DeFronzo RA, Ferrannini E: Insulin Resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; **14**: 173-94.
- (9) Banerji MA, Lebovitz HE (1989): Insulin-sensitive and insulin resistant-variants in NIDDM. *Diabetes*; **14**: 173-94.
- (10) Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA, Stern MP. Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes* 1992; **41**: 715-22.
- (11) O'Dea K, Lion RJ, Lee A, Traianedes K, Hopper JL, Rae C. (1990) Diabetes, hyperinsulinemia and hyperlipidemia in small aboriginal community in Northern Australia. *Diabetes Care*; **13**: 830-35.

- (12) Zimmet P, Serjeantson S (1992): The epidemiology of diabetes mellitus and its relationship with cardiovascular disease. En: Lefebvre PJ, Standl E, eds. *New Aspects in Diabetes*. Berlin, Walter de Gruyter, pp 5-21.
- (13) Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield SB. The Metabolic Syndrome. Prevalence and Associated Risk Factor Findings in the US Population From the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med* 2003 ; **163**: 427-36.
- (14) Haffner S, Taegtmeier H. (2003) Epidemic Obesity and the Metabolic Syndrome. *Circulation*; **108**: 1541-45.
- (15) Balkau BJ, Vernay M, Mhamdi I, Novak M. The frequency and incidence of the NCEP (National Cholesterol Education Program) metabolic syndrome in the French DESIR study. The European Association for the Study of Diabetes. Abstract. Volume of 38th annual Meeting 2002; A15-37.
- (16) Gabriel R, Serrano Rios M, Vega S, Segura A, Horcajo P, Muñoz J et al. Relationship between visceral adiposity, body size and fat distribution indexes with fasting insulin levels in the Spanish general population. *Can J Cardiol* 1997; **13 (suppl B)**: 280B.
- (17) Martínez Larrad MT, Fernández Pérez C, González Sánchez JL, López A, Fernández-Alvarez J, Riviriego J, Serrano Rios M for the Segovia (Primary Care), Insulin Resistance Study Group. Prevalencia del Síndrome Metabólico (criterios del ATP-III). Estudio de base poblacional en áreas rural y urbana de la provincia de Segovia. *Med Clin(Barc)* 2005; **125**: 481-6.
- (18) Alvarez León EE, Ribas Barba L, Serra Majem L. Prevalencia del síndrome metabólico en la población de la Comunidad Canaria. *Med Clin (Barc)* 2003; **120**: 172-74.
- (19) Lakka HM, Laasonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT . (2002) The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA*; **288** (21): 2709-16.
- (20) Isomma B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lathi K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L. (2001) Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*; **24**: 683-9.
- (21) Lorenzo C, Serrano-Rios M, Martinez-Larrad MT , Gabriel R, Williams K, Gomez-Gerique JA, Stern MP, Haffner SM. Central Adiposity Determines Prevalence Differences of the Metabolic Syndrome. *Obes Res*. 2003 ; **11** (12): 1480-1487.

- (22) Ridker PM, Rifai N, Rose L, et al. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Eng J Med* 2002 ; **347**: 1557-65.
- (23) Festa A, D'Agostino RJ, Howard G et al. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin ResistanceAtherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 2000; **102**: 42-47.
- (24) Jialal I, Stein D, Balis D et al. Effect of hydroxymethyl glutaryl coenzyme a reductase inhibitor therapy on high sensitive C-reactive protein levels. *Circulation* 2001; **103**: 1933-35.
- (25) Santar N, Gaw A, Scherbakova O, et al. Metabolic syndrome with and without C-reactive protein as a predictor of coronary heart disease and diabetes in the west of Scotland coronary prevention study. *Circulation* 2003; **108**: 414-19.
- (26) Sager P, Melani L, Lipka L, Strony J, Suresh R, Veltri E for the Ezetimibe Study Group. C-Reactive Protein is Reduced During Ezetimibe Co-Administration with Simvastatin in Patients with Primary hypercholesterolemia. Presented at American College of Cardiology, Chicago, April 02 2003. http://www.acc.org/2003ann_meeting/home/home.htm.
- (27) Zierath JR, Krook A, Wallberg-Henriksson H. Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetologia* 2000; **43**: 821-35.
- (28) Kenneth L. Glucose homeostasis and insulin action. Principles and practice of endocrinology and metabolism. Becher Ed. 3er ed: pp 1303-6.
- (29) Baron AD. Vascular reactivity. *Am J Cardiol* 1999; **84**: 25J-27J.
- (30) Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989 ; **83**: 1774-77.
- (31) Sarkar R, Meinberg EG, Stanley JC, Gordon D, Webb RC. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1996; **78**: 225-30.
- (32) De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation: Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995; **96**: 60-68.

- (33) Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-UTZ B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* 1995; **76**: 980-86.
- (34) Loscalzo J. Antiplatelet and antithrombotic effects of organic nitrates. *Am J Cardiol* 1992; **70** (suppl): 18B-22B.
- (35) Radomski MW, Moncada S. The biological and pharmacological role of nitric oxide in platelet function. *Adv Exp Med Biol* 1993 ; **344**: 251-64.
- (36) Banskota NK, Taub R, Zellner K, King GL. Insulin, insulin – like growth factor I and platelet derived growth factor interact additively in the induction of the protooncogene c-myc and cellular proliferation in cultured bovine aortic smooth muscle cells. *Mol Endocrinol* 1989; **3**: 1183-90.
- (37) Grundy SM, Bairey Merz CN, Brewer B, Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC, Stone NJ. Implications of Recent Clinical Trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *Circulation* 2004; **110**: 227-39.
- (38) Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; **37**: 1595-1607.
- (39) Howard G, O'Leary Dh, Zaccasro D. Insulin sensitivity and atherosclerosis. *Circulation* 1996; **93**: 1809-17.
- (40) Piickup JC, Mattock MB, Chusney GD. NIDDM as a disease of the innate immune system:association of the acute-phase reactants and interleukin 6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 1997; **40**: 1286-92.
- (41) Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes a disease in the innate immune system? *Diabetologia* 1998; **41**: 1241-48.
- (42) Festa A, Dágostino R, Howard G. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance síndrome:the insulin resistance atherosclerosis study (IRAS). *Circulation* 2000; **102**: 42-47.
- (43) Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease? *N Engl J Med* 1999 ; **340**: 115-126.
- (44) Danesh J, Whincup P, Walter M. Low grade inflammation and coronary heart disease:a prospective study and updated metaanalyses. *BMJ* 2000; **321**: 199-204.
- (45) Juhan-Vague I, Thompson SG, Jespersen J. Involvement of the hemostatic system in the insulin resistance syndrome. A study of 1500 patients

- with angina pectoris. The ECAT Angina Pectoris Study Group. *Arterioscler Thromb* 1993; **13**: 1865-73.
- (46) Lindsay RS, Krakoff, Hanson RL. Gamma globulin levels predict type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Diabetes* 2001; **50**: 1598-1603.
- (47) Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; **19**: 972-78.
- (48) Dichtl W, Nilsson L, Goncalves I, et al. Very low-density lipoprotein activates nuclear factor-kappa betha in endothelial cells. *Circ Res.* 1999; **84**: 1085-94.
- (49) Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, et al. Paraoxonase and coronary heart disease. *Curr opin Lipidol.* 1998; **9**: 319-24.
- (50) Griedling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, et al. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle:new concepts. *Hypertension.* 1997; **29**: 366-73.
- (51) Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeifer CA, et al. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; **19**: 1623-29.
- (52) Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor kappa betha activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 1997; **95**: 1532-41.
- (53) Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, et al. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: a potencial link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circ Res.* 1999; **84**: 489-97.
- (54) Tuomilehto J, Tuomilehto-Wolf E, Zimmet P, Alberti KGMM, Knowler WC. Primary prevention of diabetes mellitus. En: Alberti KGMM, Zimmet P, DeFronzo RA, Keen H, Eds. International Textbook of Diabetes Mellitus, 2nd Ed. Wiley, Chichester, 1997: pp 1799-1827.
- (55) Kriska A, Bennett PH. An epidemiological perspective of the relationship between physical activity and NIDDM: from activity assessment to intervention. *Diabetes Metab Rev* 1992; **8**: 355-72.

- (56) Harding AH, Williams DE, Hennings SH, Mitchell J, Wareham NJ. Is the Association between dietary fat intake and insulin resistance modified by physical activity? *Metabolism* 2001; **50**: 1186-92.
- (57) Sigal RJ, Kenny GP, Koivisto VA. Exercise and diabetes mellitus. En: Pickup JC, Williams G, Eds. Textbook of diabetes 1, 3^a Ed. Blackwell Science, Oxford 2003. Chptr 37: pp 1-19.
- (58) Berlin JA, Colditz GA. A meta-analysis of Physical Activity in the Prevention of Coronary Heart Disease. *Am J Epidemiol* 1990 ; **132**: 612-28.
- (59) Manson JE, Greenland P, LaCroix AZ, Stefanick ML, Mouton CP , Oberman A, Perri MG, Sheps DS, Pettinger MB, Siscovick DS. Walking Compared with Vigorous Exercise for the Prevention of Cardiovascular Events in Women. *N Eng J Med* 2002 ; **347**: 716-72S.
- (60) Kraus WE, Houmard JA, Duscha BD, Knetzger KJ, Wharton MB, McCartney JS, Bales cW, Henes S, Samsa GP, Otvos JD, Kulkarni KR, Stenz CA. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *N Eng J Med* 2002 ; **347**: 1483-92.
- (61) Irwin ML, Yasui Y, Ulrich CM, Bowen D, Rudolph RE, Schwartz RS, Yukawa M, Alello E, Potter JD, Tiernan A. Effect of exercise on total and intra-abdominal body fat in postmenopausal women. *JAMA* 2003; **289**: 323-30.
- (62) Hambrecht R, Wolf A, Gielen S, Linke A, hofer J, Erb S, Schoene N, Schuler G. Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N Eng J Med* 2000 ; **342**: 454-80.
- (63) Vessby B, Tegblad S, Lithell H. The insulin sensitivity is related to he fatty acids of the serum lipids and of the skeletal musckle phspolipids in 70 ye-ars old men. *Diabetologia* 1994; **37**: 1044-50.
- (64) Summers L, Fielding BA, Bradshaw HA, Ilic V, Beysen C, Clark ML et al. Substituting dietary saturated fat with polyinsaturated fat changes abdominal fat distribution and improves insulin sensitivity . *Diabetologia* 2002; **45**: 369-77.
- (65) Soinio M, Laakso M, Lehto S, Hakala P , Ronnema T. Dietary fats predict coronary heart disease events in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003; **26**: 619-24.
- (66) Rizkalla SW, Bellisle F , Slama G. Helath benefitis of low glycaemic index foods, such as pulses, in diabetic patients and healthy individuals. *Br J Nutr* 2002 : **88** (Suppl. 3): S255-62.

- (67) Howard G, Wagenknecht LE, Cai J, Cooper L, Kraut MA, Toole JF. Cigarette smoking and progression of atherosclerosis. *JAMA* 1998; **279**: 119-24.
- (68) Perry IJ, Wannamethee SG, Walker MK, Thomson AG, Whincup PH, Shaper AG. Prospective study of risk factor for development of non-insulin dependent in middle aged British men. *Br Med J* 1995 ; **310**: 560-64.
- (69) Ajani UA, Hennekens CH, Spelsberg A, Manson JE. Alcohol consumption and risk of type 2 diabetes mellitus among US male physicians. *Arch Inter Med* 2000 ; **160**; 1025-30.
- (70) Schalin-Jäntti C, Härkönen M, Groop LC. Impaired activation of glycogen synthase in people at increased risk of developing NIDDM. *Diabetes* 1992; **41**: 598-604.
- (71) Hribal ML, Fedrici M, Porzio O, Lauro D, Borboni P , Accili D, Lauro R, Sesti G. The GlyArg72 amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 affects glucose metabolism in skeletal muscle cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 ; **85**: 2004-13.
- (72) Sigal RJ, Doria A, Warram JH, Krolewski AS. Codon 972 polymorphism in the insulin receptor substrate-1 gene, obesity , and risk of non insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1996 ; **81**: 1657-9.
- (73) Baroni MG, D'Andrea MP, Montali A, Pannitteri G, Barilla F , Campagna F, Mazzei E, Lovari S, Seccareccia F , Campa PP, Ricci G, Pozzilli P , Urbinati G, Arca M. A common mutation on the insulin receptor substrate-1 gene is a risk factor for coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; **19**: 2975-80.
- (74) Frederiksen L, Brodback K, Fenger M, Jørgensen T, Borch-Johnsen K, Madsbad S, Urhammer SA. Comment: studies of the Pro12Ala polymorphism of the PP AR-gamma gene in the Danish MONICA cohort: homozygosity of the Ala allele confers a decreased risk of the insulin resistance syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 ; **87**: 3989-92.
- (75) González Sánchez JL, Serrano Rios M, Fernández Pérez C, Laakso M, Martínez Larrad MT . Effect of the Pro12Ala polymorphism on the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 gene on adiposity , insulin sensitivity and lipid profile in the Spanish population. *Eur J Endocrinol* 2002; **147**: 495-501.
- (76) Luan J, Browne PO, Harding AH, Halsall DJ, O'Rahilly S, Chatterjee VK, Wareham NJ. Evidence for gene-nutrient interaction at the PP ARgamma locus. *Diabetes* 2001 ; **50**: 686-9.

- (77) Gu HF, Almgren P, et al. Association between the human glycoprotein PC-1 gene and elevated glucose and insulin levels in a paired-sibling analysis. *Diabetes* 2000; **49**: 1601-03.
- (78) Kubaszek A, Pihlajamaki J, Karhapaa P, Vauhkonene I, Laakso M. The K121Q Polymorphism of the PC-1 gene is Associated With Insulin Resistance but not With Dyslipemia. *Diabetes Care* 2003; **26**: 464-7.
- (79) González Sánchez JL, Martínez Larrad MT, Fernández Pérez C, Kubaszek A, Laakso M, Serrano Rios M. K121Q PC-1 Gene polymorphism is not associated with insulin resistance in a spanish population. *Obes Res* 2003; **11**: 603-5.
- (80) Ukkola O, Tremblay A, Bouchard C. Lipoprotein lipase polymorphisms and responses to long-term overfeeding. *J Intern Med* 2002; **251**: 429-36.
- (81) Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Liprotein lipase mutations, plasma lipids, lipoproteins, and risk of ischemic heart disease. A meta-analysis. *Circulation* 1999; **99**: 2901-7.
- (82) Pihlajamaki J, Karjalainen L, Karhapaa P, Vauhkonen I, Taskinen MR, Deeb SS, Laakso M. G-250A substitution in promoter of hepatic lipase gene is associated with dyslipidemia and insulin resistance in healthy control subjects and in members of families with familial combined hyperlipidemia. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**: 1789-95.
- (83) Baier LJ, Sacchettini JC, Knowler WC, Eads J, Paolisso G, Tataranni PA, Mochizuki H, Bennett PH, Bogardus C, Prochazka M. An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increase fatty acid binding, increase fat oxidation, and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; **95**: 1281-7.
- (84) Yamada K, Yuan X, Ishiyama S, Koyama K, Ichikawa F, Koyanagi A, Koyama W, Nonaka K. Association between Ala54Thr substitution of the fatty acid binding protein 2 gene with insulin resistance and intra-abdominal fat thickness in Japanese men. *Diabetologia* 1997; **40**: 706-10.
- (85) Erkkila AT, Lindi V, Lehto S, Pyorala K, Laakso M, Uusitupa MI. Variation in the fatty acid binding protein 2 gene is not associated with markers of metabolic syndrome in patients with coronary heart disease. *nutr metab Cardiovasc Dis* 2002; **12**: 53. 9.
- (86) Proenza AM, Poissonnet CM, et al. Association of sets alleles of genes encoding beta3-adrenoceptor, uncoupling protein 1 and lipoprotein lipase

- with increase risk of metabolic complications in obesity . *Int J Obes Relat Metabo Disord* 2000; **24**: 93-100.
- (87) Arner P, Hoffsted F. Adrenoreceptor genes in human obesity . *J Inter Med* 1999; **6**: 667-672.
- (88) Meirhaeghe A, Helbecque N, Cottel D, Amouyel P. Impact of polymorphisms of the human beta2-adrenoceptor gene on obesity in a French population. *Int J Obes Relat Metab Disor d* 2000; **24**: 382-7.
- (89) Liu LS, Spelleken M, Rohrig K, hauner H, Eckel J. Tumor necrosis factor-alpha acutely inhibits insulin signaling in human adipocytes: implication of the p 80 tumor necrosis factor recpetor . *Diabetes* 1998; **47**: 515-22.
- (90) Fernández Real JM, Gutierrez C, Ricart W, Casamitjana R, Fernández Castañer M, Vendell J, Richart C, Soler J. The TNF-alpha gene NcoI polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum levels. *Diabetes* 1997; **46**: 1468-72.
- (91) Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosber g AD. A leptin missense mutation associated with hypogondism and morbid obesity . *Nat Genet* 1998; **18**: 213-5.
- (92) Wolfe BE, Jimerson DC, Orlova C, Mantzoros CS. Ef fect of dieting on plasma leptin, soluble leptin receptor, adiponectin and resistin levels in healthy volunteers. *Clin Endocrinol* 2004; **61**: 332-38.
- (93) Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM. Weight reduction increases plasma levels of an adipos-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**: 3815-9.
- (94) Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe K, Dina C, Yasuda K, Yamauchi T, Otake S, Okada T, Eto K, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Yazaki Y, Nagai R, Taniyama M, Matsubara K, Yoda M, Nakano Y, Tomita M, Kimura S, Ito C, Froguel P, Kadowaki T. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 2002; **51**: 536-40.
- (95) Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Eng J Med* 2002; **346**: 393-403.
- (96) Agonista PPAR_, retirado de uso clínico por haberse descrito varios casos de fracaso hepático fulminante. Actualmente ya hay en farmacia otros dos compuestos de la misma familia, rosiglitazona y pioglitazona.

- (97) Pallardo Sánchez LF, Herranz de la Morena L. Prevención de la diabetes mellitus tipo 2 y de sus complicaciones microangiopáticas. *Cardiovas Risk Factors*. 2003; **12** (2): 112-26.
- (98) Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uustupa M. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Eng J Med* 2001; **344**: 1343-50.
- (99) Curb JD, Pressel SL, Cutler JA, Savage PJ, Applegate WB, Black H et al. Effect of diuretic based antihypertensive treatment on cardiovascular disease risk in older diabetic patients with isolated systolic hypertension. Systolic hypertension in the Elderly Program Cooperative Research Group. *JAMA* 1996; **276**: 1886-1892.
- (100) MacLeod MJ, McLay J. Drug treatment of hypertension complicating diabetes mellitus. *Drugs* 1998; **56**: 189-202
- (101) Baszily JJ, Jones JJ, Davi BR all forAllhat Collaborative Research Group: Baseline characteristics of the Diabetic participants in the antihypertension and Lipid lowering treatment to prevent Heart Attack. Trial (ALLHAT). *Diabetes Care* 2001; **24**: 654-658.
- (102) Davis BR, Cutler JA, Gordon DJ, et al: Rationales and Design for the Antihypertensive and Lipid lowering treatment to prevent Heart Attack Trial (ALLHAT) *Am J Hypertens* 1996 ; **9**: 342-60.
- (103) Gavras I, Gavras H. Benefits and side effects of blood pressure lowering treatment: what was wrong with doxazosin in the ALLHAT trial? *Curr Control Trials Cardiovasc Med* 2001 ; **2**: 257-59.
- (104) Jonas M, Reicher-Reiss H, Boyko V, Shotan A, Mandelzweig L, Goldbourt U, Behar S. Usefulness of beta-blocker therapy in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus and coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1996; **77**: 1273-7.
- (105) UKPDS 38: thigh blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. UK prospective Diabetes Study Group. *BMJ* 1998; **317**: 703-13.
- (106) Heart outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study Investigators: Effects of Ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with Diabetes Mellitus: Results of the HOPE and the MICROHOPE substudy. *Lancet* 2000; **355**: 253-59.

- (107) Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H; The LIFE study group. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention for Endpoint reduction in hypertension study . *Lancet* 2002; **359**: 995-1003.
- (108) Parving HH, Lehnert H, Bröchner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S, and Arner P, for the Irbesartan in Patients with Type 2 Diabetes and Microalbuminuria Study Group: The effect of Irbesartan on the Development of Diabetic Nephropathy in Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2001; **345**: 870-876.
- (109) Tatti P, Pahor M, Byington RP, Di Mauro P, Guarisco R, Strollo G, et al. Outcome results of the Fosinopril versus Amlodipine Cardiovascular Events Randomized Trial (FACET) in patients with hypertension and NIDDM. *Diabetes Care* 1998; **21**: 597-603.
- (110) Pahor M, Psaty BM, Alderman MH, Applegate WB, Williamson JD, Cavazzini C, Furberg CD: Health outcomes associated with calcium antagonist compared with other first-line antihypertensive therapies: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet* 2000; **356**: 1949-54.
- (111) Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; **344**: 1.383-89.
- (112) Shepher J, Cobbe SM, Ford I and the West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Eng J Med* 1995; **333**: 1301-7
- (113) Rubins HB, Robins SJ. Conclusions from the VA-HIT study. *Am J Cardiol* 2000; **86**: 543-5.
- (114) Elam MB, Hunninghake DB, Davis KB, Garg R, Johnson C, Egan D, Kostis JB et al. Effect of niacin on lipid and lipoprotein levels and glycemic control in patients with diabetes and peripheral arterial disease: the ADMIT Study: a randomized trial. *JAMA* 2000; **284**: 1263-70.
- (115) Ballantyne C. Ezetimibe: efficacy and safety in clinical trials. *Eur Heart J* 2002; **4** (Suppl J): J5-J15.
- (116) Dujovne CA, Ettinger MP, McNeer JF, et al. Efficacy and safety of a potent of a potent new selective cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, in patients with primary hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2002.

- (117) Ballantyne C. Evolving concepts and a new approach for management of hyperlipemia. *Eur Heart J* 2002 ; **4** (Suppl J): J1-J3.
- (118) UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes mellitus (UKPDS 33). *Lancet* 1998; **352**: 837-53.
- (119) Marso EP. Mejoras en la farmacopea del diabético: más allá de la aspirina y la insulina. *JACC* 2003; **12**: 68-77.
- (120) Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Manefeld M, Karasik A, Laakso M. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised study. *Lancet* 2002; **359**: 2072-7.
- (121) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation, 1999.
- (122) The European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). The frequency of the WHO metabolic syndrome in European Cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabet Med* 2002 ; **28**: 364-76.
- (123) Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the Metabolic Syndrome Among US Adults. Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2002; **287**: 356-9.
- (124) Einhorn D, Reaven GM, Cobin RH, et al. American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocr Pract.* 2003; **9**: 237-52

Regulación de la ingesta y de la homeostasis energética

PEDRO GARCÍA BARRENO

1. INTRODUCCIÓN

En los animales adultos el peso corporal y su contenido graso tienden a mantenerse bastante estables; ello a pesar de las marcadas fluctuaciones de la comida diaria. Aunque pueden inducirse cambios importantes en la adiposidad del organismo mediante restricciones o excesos de la ingesta calórica, el peso corporal recupera el valor de partida en cuanto se retorna a la dieta habitual. Estudios clásicos en animales parabióticos, en los que sustancias circulantes pueden moverse entre ellos, demostraron que uno o varios factores transportados humoralmente estaba o estaban involucrados en la regulación del comportamiento alimentario (Figura 1).

Aunque son numerosas las señales que pueden contribuir a la regulación de la ingesta y del peso corporal, debe señalarse que los balances a corto y a largo plazo de aquella están controlados por mecanismos distintos aunque interaccionantes. Según este esquema, algunas señales (nutrientes y hormonas gastrointestinales) actúan primariamente como determinantes de saciedad y a efectos de limitar la cuantía de cada comida. Las señales que operan a corto plazo tienen una función completamente diferente a la de los reguladores a largo plazo de la homeostasis energética; los últimos son activados en proporción a las reservas de tejido adiposo y a la cantidad de energía consumida en periodos prolongados de tiempo. La insulina y la leptina son dos miembros representativos de las señales a largo plazo; ambas regulan la ingesta de alimentos y el gasto calórico para asegurar la estabilidad de la homeostasis energética y, también, que el peso y la adiposidad corporales se mantengan relativamente constantes. Las señales a corto plazo no son determinantes primarios de la adiposidad cor-

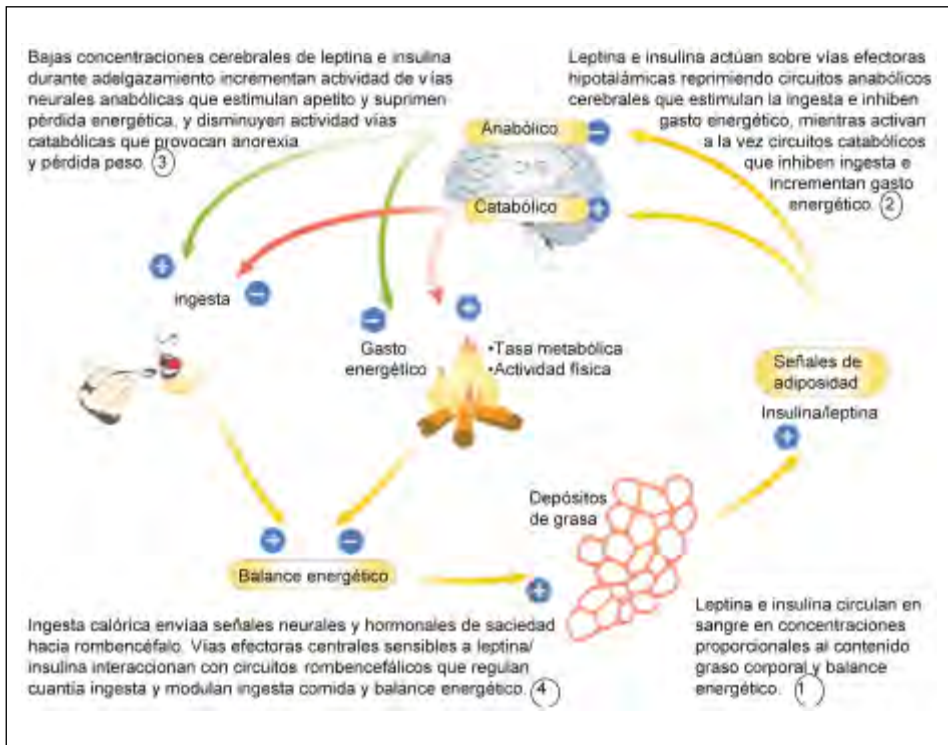


FIGURA 1. El esquema muestra cómo un cambio en la adiposidad corporal se acopla a modificaciones que compensan la ingesta de alimentos. Leptina e insulina son señales adipocíticas secretadas en proporción al contenido de grasa corporal y actúan en el hipotálamo induciendo un estímulo catabólico e inhibiendo vías anabólicas. Los circuitos catabólicos y anabólicos ejercen efectos opuestos sobre el balance energético (diferencia entre calorías ingeridas y gasto energético) que, a su vez, determinan la cantidad de combustible que se almacena como grasa (Modificada de: ¹¹, pg 662 fig 1).

poral; ello porque están supeditadas al control a largo plazo. Sin embargo, los mecanismos que operan a corto y a largo plazo necesitan operar de manera coordinada para integrar la ingesta y el gasto calóricos, con la finalidad de asegurar la homeostasis energética (Figuras 2 y 3).

REGULACIÓN A CORTO PLAZO

Nutrientes. Una hipótesis glucostática o glucopriva fue propuesta por J Mayer¹ hace cincuenta años: la hipoglucemia incrementa la sensación de hambre y

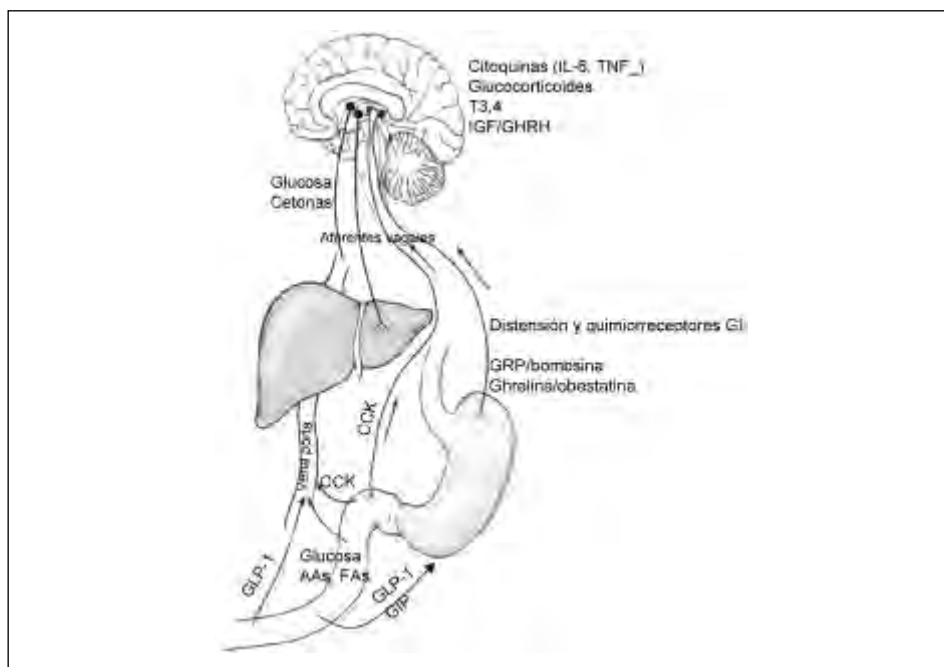


FIGURA 2. Regulación a corto plazo de la ingesta de comida. Señales aferentes que viajan por el nervio vago desde mecanorreceptores y desde quimiorreceptores activados por la presencia de nutrientes en el estómago e intestino delgado proximal, están involucradas en el cese de la ingesta alimentaria. Metabolitos que alcanzan el hígado vía portal pueden provocar allí señales aferentes vagales. La glucosa puede modular la ingesta de comida actuando sobre neuronas centrales de respuesta a la glucosa. Las cetonas parecen calmar el apetito. El intestino proximal, en respuesta al estímulo provocado por los nutrientes, libera colecistoquinina (CCK) que alcanza el hígado vía portal y el sistema nervioso central vía circulación sistémica; CCK puede actuar sobre receptores de CCK tipo A en ambas localizaciones provocando saciedad. Células endocrinas L en el íleon liberan péptido tipo glucagón 1 (GLP-1) que inhibe la ingesta actuando a nivel hepático o provocando distensión gástrica. El péptido pre-pro-ghrelina, producido y liberado por el estómago, es precursor de ghrelina (estimulante del apetito) y obestatina (anoréxica). Las señales que operan a corto plazo no provocan modificaciones sustanciales en la ingesta de precursores energéticos ni en la adiposidad corporal (Modificada de: ¹², pg 964 fig 1).

la ingesta en humanos. Neuronas de respuesta dependiente de glucosa se localizan en las regiones ventromedial y lateral del hipotálamo, y cuya destrucción desemboca, en el ratón, en un síndrome de obesidad e hiperfagia. La bioquímica de la respuesta neuronal a la glucosa es similar a la respuesta de las células beta pancreáticas a la glucosa. Sin embargo, los modelos glucostáticos y glucodinámicos de regulación de la ingesta no son suficientes, por sí mismos, para explicar la compleja regulación del comportamiento alimentario.

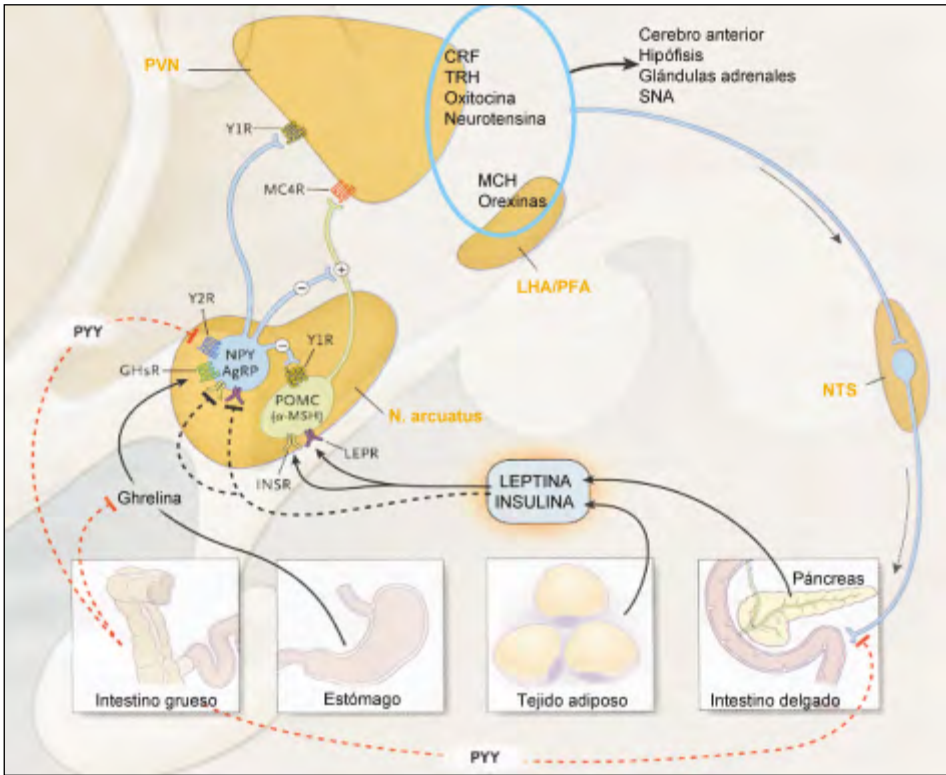


FIGURA 3. Interacciones entre vías hormonales y neurales, que regulan la ingesta y la masa corporal grasa. Los núcleos hipotálamicos paraventricular (PVN) y ar queado (N. arcuatus) y las áreas hipotálamicas lateral (LHA) y paraformical (PFA), contienen neuronas capaces de estimular o inhibir la ingesta de comida. El péptido YY₃₋₃₆ (PYY) se produce y segrega postprandialmente por células neuroendocrinas L ubicadas en el epitelio del ileon y del colon, en proporción a la ingesta calórica. PYY inhibe neuronas que expresan neuropéptido Y (NPY) y proteína pseudoagouti (AgRP), a través de la inhibición de receptores de NPY tipo 2 (Y2R); ello desinhibe neuronas adyacentes que expresan proopiomelanocortina (POMC) y, con ello, disminuye la ingesta de comida. MC4R, receptor de melanocortina tipo 4; GhsR, receptor de secretago de hormona de crecimiento o receptor de ghrelina; α-MSH, hormona estimulante de melanocitos-?; LEPR, receptor de leptina; INSR, receptor de insulina; CRF, factor liberador de corticotrofina; TRH, hormona liberadora de tirotrópina; MCH, hormona concentradora de melanina; SNA, sistema nervioso autónomo; NTS, núcleo del tracto solitario. —>: inhibición; ? : estimulación (Modificada de: Judith Korner y Rudolph L. Leibel 2003, pg 927 fig 1¹³).

Las proteínas de la dieta inducen saciedad, y el consumo de dietas deficientes en aminoácidos incrementa el apetito por comidas ricas en proteínas. Aunque el mecanismo no está bien estudiado, la administración de fenilalanina –precursor de monoaminoneurotransmisores– suprime el apetito en humanos. Los

aminoácidos pueden influir en la ingesta por una acción directa sobre el sistema nervioso central (SNC) o a través de receptores localizados en el hígado o en la vena porta; mecanismos también propuestos para la glucosa.

La administración parenteral de sustratos lipídicos, cuyos triglicéridos son degradados por la lipoproteinlipasa en ácidos grasos libres y glicerol, disminuye la ingesta. Sin embargo, debe aclararse si el incremento concomitante de cetonas –resultado del aporte de ácidos grasos al hígado– que pueden utilizarse como sustrato metabólico por el SNC e inhiben el apetito, contribuye al efecto anoréxico de la infusión de lípidos. El bloqueo a la utilización de ácidos grasos con inhibidores de la oxidación de grasas estimula la ingesta, un efecto denominado ingesta lipopriva. De manera similar a los efectos de la inhibición del metabolismo de la glucosa, la inhibición del metabolismo lipídico incrementa la producción del neuropéptido orexigénico hormona melaninoconcentrante en el hipotálamo lateral. Sin embargo, a diferencia de la glucoprivación, no induce la expresión de neuropéptido Y (NPY) ni de péptido pseudoagouti en el núcleo raqueado, ambos productos orexigénicos. Otra molécula relacionada con los lípidos y potencialmente involucrada en la regulación de la ingesta es la apolipoproteína ApoA-IV, cuya producción en el intestino se estimula por la absorción grasa, y su administración inhibe el apetito. La Apo A-IV también se produce en el hipotálamo pudiendo jugar algún papel en la regulación de la ingesta.

Junto a la glucosa, los aminoácidos y los ácidos grasos, otros productos metabólicos influyen en la regulación de la ingesta: lactato, piruvato y cetonas inhiben la sensación de hambre. La cetonemia severa que ocurre durante la restricción energética prolongada (inanición o hambruna), puede abolir la sensación de hambre en tan extrema situación.

Señales emitidas por el tracto gastrointestinal. En 1973, J Gibbs ² y cols propusieron que señales generadas durante la comida (factores de saciedad), que incluyen péptidos secretados por el tracto gastrointestinal (GI), proporcionarían información al cerebro conducente a inhibir la ingesta y terminar la comida. Quimiorreceptores GI responden a diferentes productos de la digestión: azúcares, ácidos grasos, péptidos y aminoácidos. Además, la entrada de comida en el estómago y en el intestino proximal activa receptores de distensión y mecanorreceptores. Señales emitidas por esos receptores GI avanzan a través de ramas aferentes vagales hacia el tronco cerebral donde ocurre la integración de esta aportación visceral. Las características físicas y químicas de lo ingerido pueden jugar un papel importante en la regulación a corto plazo o inmediata de la ingesta, limitando la cantidad de una comida y, a lo sumo, de la siguiente.

Numerosas hormonas GI han sido involucradas en la regulación de la ingesta de comida. Con la excepción de una de las hormonas GI más recientemente descubierta –ghrelina-, el resto de los péptidos GI inhiben el apetito. Es importante resaltar que la mayoría de tales hormonas GI y sus receptores respectivos se encuentran en diferentes regiones del SNC y participan en la regulación del comportamiento alimentario; ello entorpece definir la ubicación de las dianas primarias de las hormonas GI. Es probable que la producción y la acción periférica y en el SNC de los péptidos GI representen vías paralelas en la modulación del comportamiento ingestivo. Las principales señales GI involucradas en la regulación a corto plazo de las sensaciones de hambre y de saciedad son la colecistoquinina, el péptido YY y la ghrelina, que responden a deformaciones mecánicas, a la presencia de macronutrientes y características de pH y tonicidad del contenido, y a la acción regional de hormonas específicas.

La colecistoquinina (*cholecystokinin*, CCK) es secretada por células endocrinas localizadas en la capa mucosa del intestino delgado proximal; su liberación está condicionada a la presencia de grasa, pequeños péptidos y aminoácidos, resultantes de la digestión gastroduodenal. La CCK inhibe el apetito a través de la activación del subtipo A del receptor de CCK (CCKA). Un modelo animal de obesidad –rata obesa Otsuka Long-Evans Tokushima- que exhibe un comportamiento hiperfágico, tiene un defecto en el receptor CCKA. La CCK, actuando sobre receptores localizados en el píloro y en el hígado induce señales aferentes vagales hacia el tronco cerebral. Como la CCK es un potente inhibidor del vaciamiento gástrico, alguno de sus efectos puede ser secundario a la distensión gástrica provocada por la retención de alimentos. La CCK también es producida y secretada por neuronas hipotalámicas durante la ingesta provocando sensación de hartura. A la larga, CCK interacciona con reguladores a largo plazo del balance energético.

El péptido YY₃₋₃₆ (PYY) es secretado postprandialmente por las células endocrinas intestinales de tipo L ubicadas en la mucosa del ileon distal y del colon, en proporción a las calorías ingeridas. En individuos obesos la respuesta está disminuida aunque consumen un gran número de calorías. La liberación inicial de PYY ocurre inmediatamente después de la ingesta, presumiblemente a través de mecanismos neurales y antes que los nutrientes ingeridos hayan alcanzado el ileon; una segunda oleada del péptido se libera cuando los nutrientes alcanzan la porción distal del ileon. El PYY atenúa la ingesta mediante la inhibición de la motilidad intestinal, actuando como un freno ileal que causa sensación de saciedad, y por medio de aferentes vagales. El PYY interacciona con receptores Y2 inhibiendo neuronas que expresan NPY y proteína pseudoa-

gouti; ello desinhibe neuronas adyacentes que expresan proopiomelanocortina (POMC) provocando saciedad.

La ghrelina es una hormona producida por el estómago y por el hipotálamo, relacionada estructuralmente con la motilina. La ghrelina es un péptido acilado de 28 aminoácidos, secretado por las células oxínticas del fundus gástrico. Actuando sobre receptores secretagogos de hormona de crecimiento incrementa la secreción de hormona por la hipófisis, y, a diferencia de los efectos anorexigénicos del resto de las hormonas GI, la administración central o periférica de ghrelina incrementa el apetito. La administración de anticuerpos antighrelina lo inhibe. Por su parte, su administración central incrementa la expresión hipotalámica del gen *NPY* cuyo producto es orexigénico, y su administración periférica induce un incremento progresivo de peso debido a una disminución mantenida de la oxidación grasa; ello sugiere la participación de la ghrelina en la regulación del peso corporal a largo plazo.

Además de CCK, PYY y ghrelina, otras señales GI inciden en la regulación de la ingesta. El péptido-1 tipo glucagón (*glucagon-like peptide-1*, GLP-1) es secretado por las células L ubicadas en el íleon, en respuesta a la entrada de nutrientes en el intestino delgado. GLP-1 puede inhibir la ingesta interactuando con receptores de GLP-1 en el hígado y/o en el tracto GI que activen nervios aferentes vagales hacia el SNC, y, también, a través de la disminución de la motilidad gastrointestinal. Sin embargo, dado que el GLP-1 se produce en la periferia y en el hipotálamo, el papel de ambas fuentes en la regulación fisiológica de la ingesta es incierta. Por su parte, el GLP-1, actuando en colaboración del polipéptido inhibidor gástrico (*gastric inhibitory polypeptide*, GIP), secretado por las células endocrinointestinales K, puede contribuir a la secreción de insulina inducida por los nutrientes; por ello se consideran hormonas incretinas. El polipéptido liberador de gastrina (*gastrin-releasing polypeptide*, GRP), producido por células endocrinas de la mucosa gástrica, es el homólogo en los mamíferos de un péptido (bombesina) aislado inicialmente en la piel de los anfibios. Además de regular la secreción de gastrina y enlentecer el vaciamiento gástrico, la administración enteral o parenteral de GRP disminuye el apetito.

Durante la ingesta, glucagón y polipéptido pancreático (PP) son segregados por las células A y F, respectivamente, de los islotes pancreáticos; ello aunque no está aclarada su participación en la regulación del apetito. La administración, periférica o central, de somatostatina produce saciedad; un efecto similar se consigue con la amilina, que se cosegrega con insulina por las células beta pancreáticas, y con el péptido relacionado con el producto del gen calcitonina. Por su parte, la administración crónica de enterostatina inhibe selectivamente la ingesta de grasa.

Otros reguladores de la ingesta y del balance energético . La administración, enteral o parenteral, de algunas citoquinas –específicamente interleuquina 6 (*interleukin 6*, IL-6) y factor de necrosis tumoral α (*tumor necrosis factor α* , TNF α)– inhibe el apetito. Aunque las citoquinas, en especial TNF α , están involucradas en la anorexia asociada con la infección y con el cáncer , su papel en la regulación de la ingesta en condiciones normales está cuestionado. Las citoquinas pueden incidir en este proceso a través de sus acciones sobre la sensibilidad a la insulina o la producción de leptina.

Aunque los glucocorticoides son primariamente catabólicos en la periferia, tienen efectos anabólicos en el SNC, donde actúan incrementando el apetito y , con ello, la ingesta de alimentos. En el hipotálamo, glucocorticoides y leptina e insulina tienen efectos antagónicos. La enfermedad de Addison se acompaña de anorexia; los pacientes con enfermedad de Cushing presentan hiperfagia, y la hiperfagia de los animales con déficit de leptina o con ausencia del receptor de leptina se atenúa mediante adrenalectomía. Todo ello sugiere importantes relaciones entre leptina y el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal.

Los mecanismos por los que las hormonas tiroideas influyen en el comportamiento alimenticio no se comprenden bien. Las hormonas tiroideas inducen una marcada estimulación de la tasa metabólica basal, creando un estado de balance energético negativo con pérdida de grasa y reducción de las concentraciones de insulina y de leptina circulantes, que podría ser la causa del incremento de la ingesta.

Por último, el eje hormona del crecimiento hipotalámica-factor de crecimiento tipo insulina (*insulin-like growth factor*, IGF) tiene efectos importantes sobre el balance energético: la hormona del crecimiento incrementa y el IGF atenúa la ingesta; si tales efectos están mediados a través de interacciones con el receptor de insulina no está aclarado. Otra posibilidad es que la hormona del crecimiento y el IGF ejerzan su efecto a través de la hormona liberadora de hormona del crecimiento (*growth hormone releasing hormone*, GHRH).

REGULACIÓN A LARGO PLAZO

Insulina. Stephen C Woods y cols³ propusieron por vez primera a la insulina como un regulador a largo plazo de la ingesta, del balance energético y de la adiposidad corporal. La ingesta de comida estimula la secreción de insulina por las células β del páncreas; ello es un efecto coordinado mediado a través de la activación de los nervios parasimpáticos que inervan el páncreas, del efecto

directo de los nutrientes ingeridos, en especial la glucosa y los aminoácidos, y el estímulo de las incretinas GIP y GLP-1. La concentración de insulina plasmática en ayunas y la respuesta insulínica a la ingesta de comida se correlacionan con la adiposidad corporal. La grasa de la dieta no estimula la secreción de insulina, aunque la presencia de algún ácido graso específico parece necesaria para una respuesta secretora plena de la insulina a la glucosa; sin embargo, los ácidos grasos perturban el transporte de insulina por el cerebro. Aunque el SNC no produce insulina si dispone de receptores de insulina, a los que alcanza tras un periodo de varias horas una vez que la insulina ha alcanzado concentraciones plasmáticas máximas tras la ingesta. Los efectos de la insulina para disminuir la ingesta implican interacciones con varios neuropéptidos hipotalámicos que, también, participan en la regulación por leptina y que incluyen los ligandos neuropéptido Y (NPY) y melanocortina y sus receptores. Además de aplacar el apetito y disminuir la ingesta, la insulina incrementa el tono neural simpático y el gasto energético; así, la insulina modula el balance energético inhibiendo la ingesta de precursores energéticos e incrementando la termogénesis. Debe destacarse la interacción de la insulina, una señal a largo plazo, en la regulación del balance de energía con la CCK, una señal a corto plazo: la sensibilidad al efecto de la CCK para inducir saciedad se potencia por la acción de la insulina en el SNC.

Leptina. En 1953, G C Kennedy⁴ propuso que el peso corporal está regulado, a la larga, por un factor humoral producido por los adipocitos en proporción a la cuantía de lípidos almacenada en el tejido adiposo. Luego, estudios de parabiosis llevados a cabo por Coleman⁵ mostraron que el ratón genéticamente obeso *ob/ob* era incapaz de producir él o los factores que regulan la ingesta. La leptina (*leptos* = delgado) fue descubierta en 1994, cuando Jeffrey M Friedman y cols⁶ lograron el clonaje posicional del gen responsable de la obesidad en el ratón *ob/ob*. Este gen se expresa primariamente en el tejido adiposo y codifica una proteína de 16 kDa denominada leptina (Figura 4). Pocos meses después, Louis A Tartaglia y cols⁷ clonaron el gen del correspondiente receptor, detectándose mutaciones de él en los ratones *db/db* y en la rata Zucker *fa/fa*. Se han identificado varios subtipos del receptor de los que la denominada forma larga (OB-Rb), que utiliza la vía JAK-STAT de transducción de señales, es esencial para la acción inhibitoria central de la leptina sobre la ingesta de comida. La administración de leptina disminuye drásticamente el apetito e induce pérdida de peso; esto último en cuantía superior a la que cabría esperar de la reducción de la ingesta. El mecanismo de la leptina es doble: disminución de la ingesta e incremento del gasto energético vía de la activación del sistema nervioso simpático. Por otro lado, el que la concentración plasmática de leptina esté elevada en la mayoría de los obesos, indica que el sobrepeso se debe



FIGURA 4. Jeffrey M Friedman, profesor de la Universidad de Rockefeller e investigador asociado del Instituto de Medicina Howard Hughes, identificó, con diferentes colaboradores, el péptido leptina (leptos = delgado) y clonó el gen correspondiente. Los dos ratones mostrados tienen un defecto en un gen denominado obeso (ob). Esta mutación condiciona un fenotipo obeso con una acumulación importante de grasa. La administración de la proteína codificada por ob, denominada leptina, reduce el peso y el exceso de grasa del ratón ob/ob[®] (Amgen Inc). El peso normal de los ratones silvestres es de, aproximadamente, 24 g. A las 4.5 semanas del nacimiento, el ratón izquierdo ob/ob, sin tratamiento alguno, pesó 67 g, mientras que el ratón derecho ob/ob y de la misma camada que el anterior, pero que recibió leptina, pesó 35 g¹⁴.

a una resistencia a las acciones de la leptina; resistencia que puede resultar de un bloqueo del transporte de leptina al SNC o a la dificultad de la transducción de la señal. Al igual que la insulina, la acción de la leptina es sinérgica con la de la CCK. Las concentraciones plasmáticas de leptina se correlacionan estrechamente con los índices de contenido corporal graso, existiendo una clara diferencia de género; las mujeres presentan concentraciones tres-cuatro veces superiores a las de los hombres en relación con el índice de masa corporal y sin que existan diferencias entre pre y postmenopáusicas. Insulina y glucosa incrementan la expresión génica y la secreción de leptina, pero la interferencia del metabolismo de la glucosa (transporte

o glicolisis) bloquea el efecto del metabolito y de la hormona. Con todo, el determinante más importante del patrón circadiano y de la influencia de la ingesta energética sobre las concentraciones de leptina circulante, en humanos, parece ser el efecto estimulador de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa en el tejido adiposo. Junto con sus acciones metabólicas, la leptina, incrementando la actividad de neuronas simpáticas hipotalámicas estimula la liberación de noradrenalina o norepinefrina en las terminaciones noradrenérgicas óseas; aquí, el neurotransmisor se une a receptores β_2 -adrenérgicos sobre los osteoblastos inhibiendo su actividad. De esta manera la leptina reduce la masa ósea. También la leptina regula la reproducción; proyecciones de neuronas del núcleo arqueado que exponen receptores de leptina estimulan, tras su activación por leptina, neuronas que secretan hormona liberadora de gonadotropina (*gonadotrophin-releasing hormone*, GnRH). GnRH actúa sobre la hipófisis que libera hormona foliculoestimulante (*follicle-stimulating hormone*, FSH) y hormona luteinizante (*luteinizing hormone*, LH). Los efectos de la leptina en humanos fueron demostrados, en pacientes con lipodistrofia, por Farooqi y cols ⁸.

Otros factores adipocíticos. La proteína estimuladora de la acilación (*acylation stimulating protein*, ASP), producida por los adipocitos como resultado de la interacción de los factores del complemento C3 y B y de la adiposina, incrementa la eficacia de la síntesis de triacilgliceroles; la carencia de ASP retrasa el aclarado postprandial de lípidos. Ratones con noqueo génico C3/ASP presentan depósitos grasos reducidos y un elevado gasto energético. La carencia de diacilglicerol aciltransferasa (DAG-AT) acarrea delgadez y resistencia a la obesidad inducida por hiperfagia. Por su parte, los animales con noqueo del gen que codifica perilipina y por ello con una actividad elevada de lipasa sensible a hormona, son hiperfágicos y delgados y tienen adipocitos de tamaño pequeño. En resumen, ASP, DAG-AT y perilipina son agentes orexigénicos.

INTEGRACIÓN POR EL SNC DE LAS SEÑALES DE SACIEDAD Y OREXIGÉNICAS

Distintos neuropéptidos integrantes de vías hipotalámicas han emergido como candidatos mediadores de las acciones de leptina e insulina sobre el sistema nervioso central (SNC). Moléculas orexigénicas son aquellas que inducen un incremento en la ingesta de precursores energéticos; ello a través del estímulo del apetito: NPY, proteína pseudoagouti (*agouti-related protein*, AGRP) y hormona concentradora de melanina (*melanin-concentrating hormone*, MCH); también se han incluido en este capítulo los compuestos galanina y orexinas o

hipocretinas. Anorexigénicas son aquellas señales que inducen saciedad y, por ello, disminuyen la ingesta alimentaria; el principal representante es la hormona estimulante de melanocitos- α (*α -melanocyte-stimulating hormone*, α -MSH). También son péptidos que promueven un balance energético negativo: hormona liberadora de corticotropina (*corticotropin-releasing hormone*, CRH), hormona liberadora de hormona tirotrópica (*thyrotropin-releasing hormone*, TRH), transcritto regulado por cocaína y anfetamina (*cocaine- and amphetamine-regulated transcript*, CART), neurotensina, péptido tipo glucagón-1 (*glucagon-like peptide-1*, GLP-1) e interleuquina-1 β (IL-1 β). Atractina, el ortólogo humano del producto del gen *mahogany*, pudiera modular el efecto de AGRP.

Aunque leptina e insulina participan probablemente en el control de la homeostasis energética por parte del SNC, los datos disponibles señalan a la primera como actor principal. La hipótesis que la obesidad pueda deberse a resistencia a la leptina se sugirió por el hallazgo de concentraciones plasmáticas elevadas de la hormona en pacientes con sobrepeso. Esta hipótesis apunta a que algunos casos de obesidad humana pueden deberse a una acción reducida de la leptina sobre el SNC, y que los individuos afectados son incapaces de responder al tratamiento farmacológico con leptina. Tal tipo de resistencia está bien documentada en ratón (por ejemplo, *db/db*) y rata (por ejemplo, *fa/fa*) que presentan receptores de leptina mutados. Pero también existen fenotipos obesos por otras razones; ellos incluyen animales con ablación génica de tejido adiposo marrón, carentes de receptores de melanocortina tipo 4 (MC4R) o el ratón agouti (*A^y/a*). Varios mecanismos pueden contribuir a la resistencia a la leptina; entre ellos, la discapacidad de la leptina para entrar en el líquido cefalorraquídeo (LCR) por alteración del transporte de leptina a través de las células endoteliales de la barrera hemato-encefálica. Como la insulina, la entrada de leptina al SNC está facilitada por receptores específicos expresados por las células endoteliales citadas que funcionan como transportadores de la hormona; si la disfunción de este tipo de transporte puede conducir a obesidad debe ser aclarado, pero el que humanos obesos tengan niveles de leptina en LCR menores que en plasma apuntan en esa dirección. Un bloqueo, total o parcial, de la transducción de la señal provocada por el receptor es otra posibilidad potencial de resistencia a leptina. Como otros receptores de citoquinas, la activación del receptor de leptina induce la expresión de una proteína – supresora de la señal de citoquina (*supresor of cytokine signalling-3*, SOCS-3) – que actúa como mecanismo de retroalimentación del sistema; la hiperexpresión de SOCS-3 en la patogenia de la obesidad es un tema abierto. Tras la activación del receptor de leptina en el SNC se requieren una serie de respuestas neuronales integradas a efectos de controlar la ingesta y el balance energético. Cualquier fallo en el circuito se manifestará como un cuadro de resistencia a la leptina.

Varias vías que contienen neuropéptidos hipotalámicos son candidatos mediadores de las acciones de la insulina y de la leptina en el SNC. La vía de efecto anabólico más representativa es un circuito que contiene neuropéptido Y: la inyección de NPY en los ventrículos cerebrales o directamente en el hipotálamo estimula el apetito e incrementa la ingesta y reduce el gasto energético a la vez que induce la síntesis de enzimas lipogénicas en hígado y en tejido adiposo blanco. Por ello, la administración central, continua o repetida, de NPY induce un cuadro de obesidad. Dado que el péptido NPY hipotalámico incrementa durante la depleción de las reservas grasas y/o durante la reducción de señales insulina/leptina al SNC, el NPY reúne los criterios de una molécula de señalización anabólica. El hallazgo de que un ratón con noqueo NPY puro, con niveles de insulina y de leptina normales, presenta un comportamiento alimentario normal ha cuestionado el papel protagonista de NPY. La proteína AgRP, la orexina o hipocretina y la MCH, han sido añadidas a la lista de moléculas efectoras anabólicas candidatas (Figura 5).

Por su parte, las moléculas efectoras catabólicas presentan un conjunto de características opuestas. Melanocortinas como α -MSH, y CRH, TRH, CART e IL-1 β integran la lista creciente de péptidos que promueven un balance energético negativo. La síntesis neuronal de esos péptidos aumenta en respuesta al incremento en la llegada al SNC de señales de adiposidad. Entre ellas, el sistema melanocortínico destaca por su complejidad e importancia en la homeostasis energética. Las melanocortinas como α -MSH son péptidos productos de la escisión de la molécula precursora POMC, que ejercen sus funciones a través de su unión a miembros de una familia de receptores melanocortínicos. MC4R es el receptor involucrado, y el fenotipo correspondiente al noqueo génico es hiperfágico y obeso. Estudios del ratón *agouti*, un modelo de obesidad genética autosómica dominante caracterizado por una coloración amarillenta y obesidad han corroborado la importancia del sistema melanocortínico. El gen *agouti* codifica una proteína que funciona como un antagonista del receptor cutáneo MC1R que, normalmente, es expresado por los folículos pilosos. El bloqueo de la señal MC1R por *agouti* aclara el color de la piel. El ratón *agouti* expresa ectópicamente el gen en el SNC, donde antagoniza MC4R y, con ello, induce obesidad. Aunque NPY se describe como la molécula endógena con mayor potencia orexigénica a corto plazo, la AgRP es la más robusta a largo plazo (Figura 6).

Estudios de lesión/estimulación identificaron el núcleo ventromedial hipotalámico como el «centro de saciedad» y el área hipotalámica lateral (AHL) como el «centro de hambre». La estimulación eléctrica del primero suprime la ingesta y su destrucción bilateral induce hiperfagia y obesidad; por el contrario, el estímulo y la destrucción del AHL se siguen de efectos opuestos. Conforme

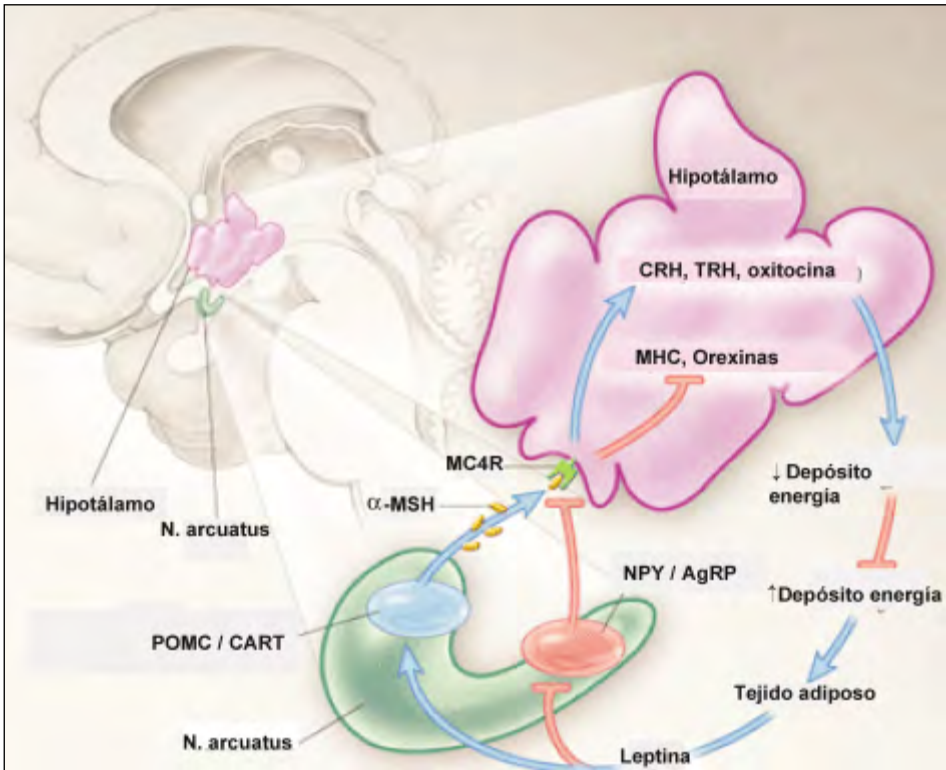


FIGURA 5. Circuitería homeostática reguladora del balance energético a través del receptor de melanocortina tipo 4 (MC4R). El incremento de adiposidad conduce a un aumento de la producción de leptina por el tejido adiposo. La leptina estimula neuronas en el núcleo arqueado (N. arcuatus) del hipotálamo que coexpresan hormonas anorexigénicas: hormona estimulante melanocítica- α (α -MSH), un producto de la escisión programada de proopiomelanocortina (POMC), y el transcrito regulado por amfetamina y cocaína (CART). La leptina también inhibe neuronas en el núcleo arqueado que coexpresan hormonas orexigénicas: proteína pseudoagouti (AgRP) y neuropéptido Y (NPY). Las neuronas del núcleo arqueado proyectan sus señales a otras regiones del hipotálamo – núcleo paraventricular (PVN) y áreas hipotalámicas lateral y paraventricular (LHA/PFA) –, donde α -MSH se une a su receptor (MC4R) y provoca la expresión de efectores anorexigénicos: factor liberador de corticotropina (CRF), hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y oxitocina, e inhibe la expresión de efectores orexigénicos: hormona concentradora de melanina (MCH) y orexinas. La proteína pseudoagouti (AgRP) actúa como un antagonista de MC4R (**Modificada de:** ¹⁵, pg 1161 fig 1).

se ha ido ampliando el conocimiento de las subpoblaciones neuronales específicas involucradas en la homeostasis energética del organismo, la noción de «centros» específicos del SNC que controlan la ingesta de comida y el peso corporal ha sido reemplazada por el de vías discretas neurales que generan respuestas integradas aferentes en relación con las reservas energéticas.

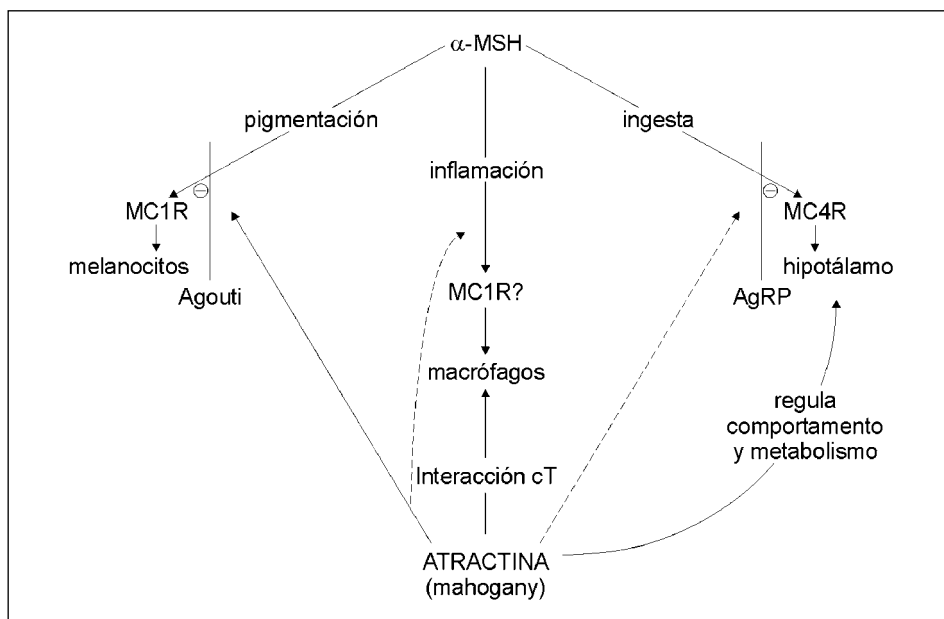


FIGURA 6. Interacciones propuestas entre atractina, hormona estimulante de melanocitos-? (α -MSH), receptores de melanocortina (MC1R, MC4R) y las proteínas agouti y pseudoagouti (AgRP), involucradas en la pigmentación cutánea, inflamación y comportamiento alimentario. Las células pigmentarias cutáneas expresan MC1R, cuya estimulación es necesaria para la síntesis de eumelanina oscura que colorea piel y pelos. La ausencia del receptor resulta en la producción de melanina amarilla o roja. MC4R se expresa en el hipotálamo, y sus defectos se traducen en obesidad. Los efectos de α -MSH sobre MCRs pueden estar modulados por antagonistas endógenos: agouti y AgRP. El pelo produce, normalmente, agouti que antagoniza MC1R en los melanocitos vecinos; ello resulta en la síntesis de melanina amarilla. Algunas mutantes murinas que hiperexpresan agouti presentan pelo amarillento y obesidad; ello debido al antagonismo con MCRs. AgRP se produce en el hipotálamo y está involucrada en el comportamiento alimentario; su hiperexpresión induce obesidad. Junto a α -MSH y AgRP una tercera proteína entra en la ecuación: ratones que hiperexpresan agouti y a los que se transfecta gen mahogany mutado, reversionen el fenotipo obeso. Atractina es el ortólogo humano de mahogany (*Modificada de*: ¹⁶, pg430 fig 1).

Situado inmediatamente por debajo del suelo del tercer ventrículo, el núcleo arqueado es una colección elongada de cuerpos neuronales que ocupan aproximadamente la mitad de la longitud del hipotálamo. NPY y AgRP se colocan en neuronas del núcleo arqueado, demostrando que un único tipo neuronal puede contener múltiples moléculas efectoras anabólicas. El que POMC y CART se colocan en un subconjunto distinto pero adyacente de neuronas del mismo núcleo hipotalámico indica que los circuitos originados en esta área cerebral tienen papeles muy especializados en la homeostasis energética. La casi to-

alidad de las neuronas NPY/AgRP y de las POMC/CART expresan receptores de leptina con lo que ambos tipos de neuronas están regulados por leptina pero de manera opuesta. Las neuronas NPY/AgRP son inhibidas por leptina y consecuentemente activadas en situaciones de privación de la hormona; aunque peor caracterizado, el déficit de insulina parece activar, también, esas neuronas. Los hallazgos acumulados indican que el núcleo arqueado es un lugar importante para translucir la información aferente proporcionada por la leptina y la insulina circulantes en una respuesta neuronal.

Las neuronas NPY/AgPR (orexigénicas) y POMC/CART (anorexigénicas) se ubican en el núcleo arqueado y representan las neuronas de primer orden en el complejo sistema homeostático energético. Por su parte, las áreas cerebrales inervadas por las neuronas del núcleo arqueado son los lugares en los que se localizan las neuronas de segundo orden involucradas en el circuito homeostático energético; un circuito que se presenta una y otra vez mayor complejidad y que está probablemente formado por vías integradas y redundantes en vez de por una serie de conjuntos discretos de neuronas conectados en serie unos con otros.

Las áreas hipotalámicas que incluyen el núcleo paraventricular (NPV), zona incierta, área perifornical (APF) y AHL reciben numerosos axones provenientes de neuronas NPY/AgPR y POMC/CART ubicadas en el núcleo arqueado. La estimulación de NPV inhibe y la de AHL/APF provoca, la ingesta de alimentos; al contrario, la destrucción bilateral de NPV provoca un síndrome de obesidad por hiperfagia, y las lesiones bilaterales de AHL/APF causan anorexia y pérdida de peso. Tales observaciones sugieren que moléculas señales anorexigénicas y orexigénicas deben sintetizarse en NPV y AHL/APF, respectivamente. De acuerdo con ello, varios neuropéptidos producidos en neuronas NPV inducen anorexia y pérdida de peso cuando se administran centralmente. Ellos incluyen CRH, que causa anorexia y activa el sistema nervioso autónomo simpático además de su papel como el principal regulador del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal; TRH, que provoca hiporexia además de estimular el eje tiroideo, y oxitocina, que reduce la ingesta además de regular la función uterina.

La hipótesis que involucra neuronas de segundo orden residentes en ALH/APF en el circuito anabólico se apoya en estudios de MCH, un péptido orexigénico localizado en esta área cerebral. La síntesis de MCH incrementa con la restricción calórica y el déficit de leptina; y animales con noqueo génico MCH comen muy poco y son excesivamente delgados. Todo ello corrobora el modelo propuesto. El receptor MCH es un receptor acoplado a proteína Gi (conocido como SLC-1) que opera a través de la inhibición de cAMP y de pro-

teína quinasa A (PKA). Este efecto es opuesto al mediado por la activación de receptores que ejercen acciones anoréxicas como los receptores MC4 o CRH, que se acoplan a Gs e incrementan cAMP y PKA. Dos péptidos adicionales se expresan exclusivamente en AHL, zona incierta y APF: hipocretinas 1 y 2 u orexinas A y B. La delección del gen *hipocretina/orexina* en el ratón induce narcolepsia; de acuerdo con ello el efecto anoréxico podría ser una inducción de sueño que corta la ingesta. Las neuronas MCH e hipocretina/orexina son inhibidas por la señal POMC o CART y activadas por señal NPY, desde el núcleo arqueado.

Mientras que el hipotálamo juega un papel principal en la interpretación y la respuesta a las señales de adiposidad, no es probable que participe en el procesamiento de las señales de saciedad procedentes del tracto digestivo. La información de saciedad generada en el transcurso de una comida es transportada al rombencéfalo a través de fibras aferentes vagales y otras procedentes del tracto GI que viajan vía del ganglio cervical superior y la columna cervical. Esta información confluye en el núcleo del tracto solitario (NTS), un área del tronco cerebral que integra sensaciones sensoriales procedentes del tracto GI y de las vísceras abdominales, e información gustativa de la cavidad oral. Las señales inductoras de saciedad que alcanzan el NTS se inician por el estímulo mecánico o químico del estómago e intestino durante la ingesta de comida, información neural inducida por el metabolismo energético hepático y señales humorales como CKK producidas por el estímulo de células secretoras neuroendocrinas ubicadas en el epitelio intestinal. Por su parte, leptina e insulina facilitan el efecto de saciedad de la CKK en el NTS, que es una central de integración de las señales de saciedad ascendentes provenientes del aparato digestivo y descendentes que parten del prosencéfalo (Figuras 7 y 8).

Por último, al menos tres neurotransmisores monoaminérgicos participan en la regulación de la ingesta. La noradrenalina es un claro efector anabólico en el control del SNC de la homeostasis energética. El comportamiento de la dopamina es complejo, pues su papel en áreas cerebrales diferentes es poco definido; las vías dopaminérgicas mesolímbicas contribuyen al efecto de recompensa ante comidas apetitosas, pero en el hipotálamo inhiben el apetito. El mantenimiento de una homeostasis energética normal exige una señalización serotoninérgica intacta; agonistas del receptor de serotonina son potentes anorexigénicos. En términos generales, los sistemas neurotransmisores aminérgicos ejercen efectos ambiguos sobre la ingesta de alimentos pero proporcionan dianas efectivas ante diferentes estrategias para el tratamiento farmacológico de la obesidad.

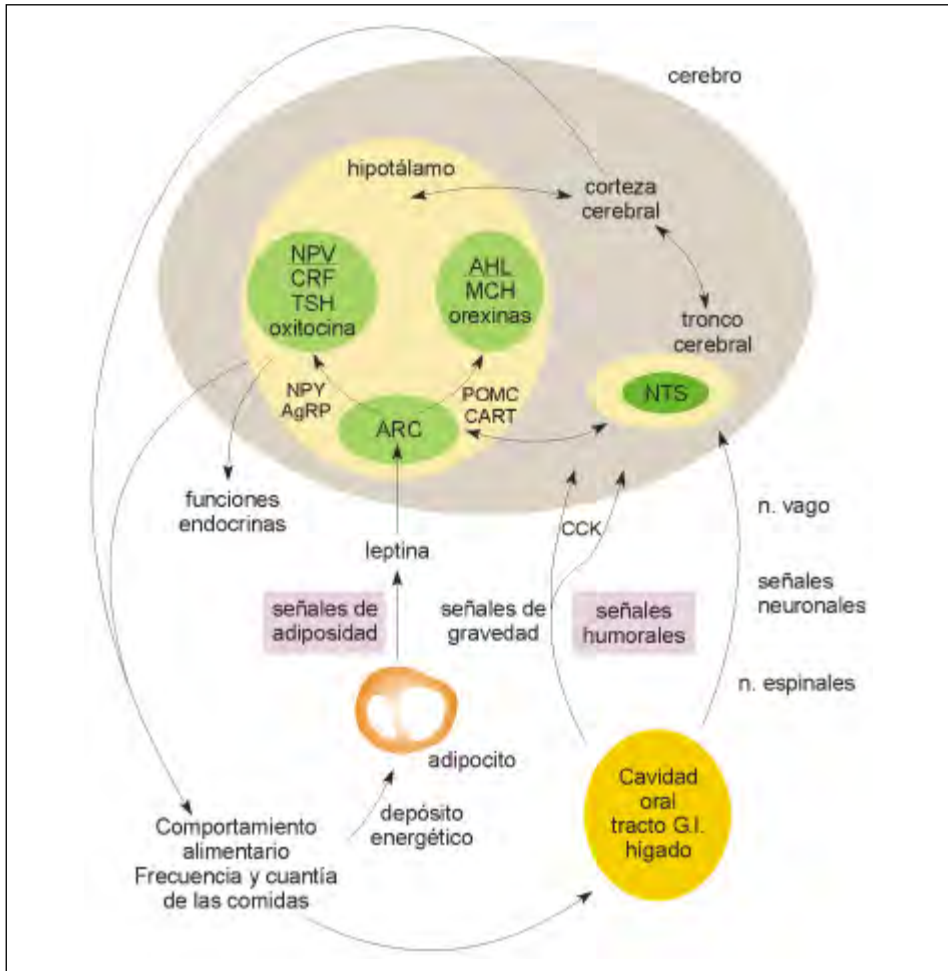


FIGURA 7. Esquema neuroanatómico de las vías por las que señales adipocíticas –leptina secretada por adipocitos e insulina secretada por el páncreas endocrino, en proporción a la adiposidad corporal – interactúan con circuitos autonómicos centrales regulando la cuantía de la ingesta. Leptina e insulina activan vías catabólicas – neuronas proopiomelanocortínicas (POMC) – e inhiben otras anabólicas – neuronas neuropeptídicas Y (NPY) –, que se originan en el núcleo arqueado (ARC). Ambas vías se proyectan hacia centros autonómicos del prosencéfalo donde se procesan las señales de saciedad. Información aferente de saciedad proveniente del hígado, tracto gastrointestinal (GI) y péptidos GI como colecistoquinina (CCK) son transmitidas por el nervio vago y fibras simpáticas (SNS) hacia el núcleo del tracto solitario (NTS), donde son integradas con la información descendente desde el hipotálamo. El resultado neuronal neto tras el procesamiento informativo por el NTS y otras áreas del prosencéfalo es el cese de la ingesta, lo que es potenciado por proyecciones catabólicas del núcleo paraventricular (NPV) e inhibido por señales procedentes de las áreas hipotalámicas lateral (AHL) y paraformical (APF) (**Modificada de:** ¹⁷, pg 248 fig 1).

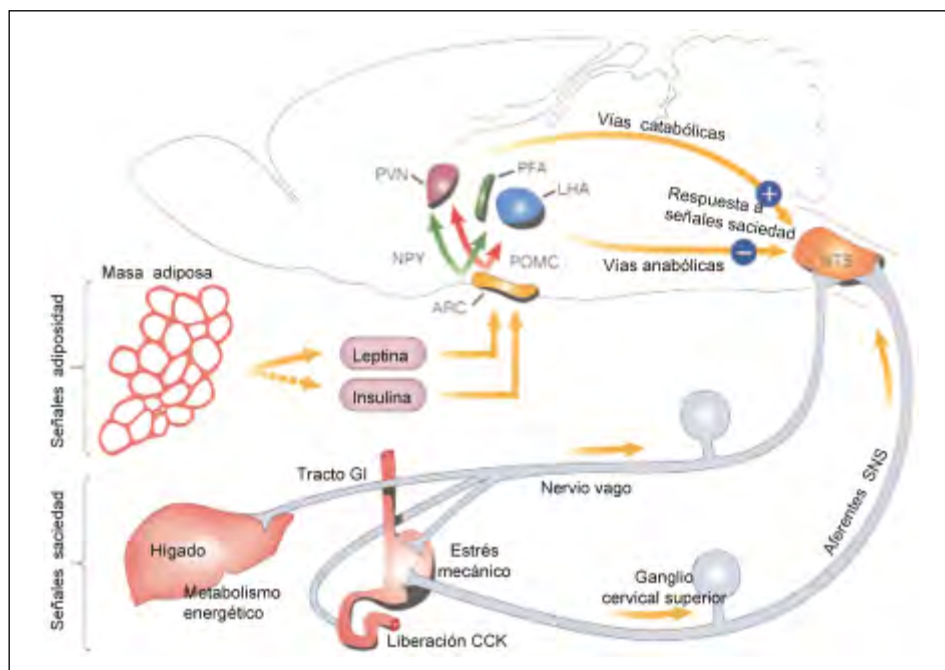


FIGURA 8. Señales reguladoras a largo plazo de la ingesta de comida y de la homeostasis energética. Leptina e insulina son los protagonistas de este sistema regulador: Ambas actúan sobre el sistema nervioso central inhibiendo el apetito e incrementando el gasto energético; ello activando el sistema nervioso autónomo simpático (SNS). La insulina es secretada por células pancreáticas en respuesta a metabolitos circulantes (glucosa y aminoácidos) y a las hormonas incrementinas polipeptido insulino-trópico dependiente de glucosa (GIP) y péptido tipo glucagón 1 (GLP-1), que son liberadas durante el proceso digestivo. La insulina puede actuar de manera indirecta estimulando la producción de leptina por el tejido adiposo vía incremento del metabolismo de glucosa; la leptina puede inhibir la secreción de insulina por el páncreas. Por el contrario, la grasa de la dieta y la fructosa no estimulan la secreción de insulina ni la producción de leptina. La hormona gástrica ghrelina incrementa el apetito y disminuye la oxidación de las grasas con lo que puede jugar cierto papel anabólico en la regulación de la ingesta a largo plazo. Leptina actúa en el núcleo arqueado (ARC) en el hipotálamo. Aquí se inicia una cascada cuya finalidad es regular el comportamiento alimentario, aunque también está involucrada en la regulación de varios sistemas endocrinos y otras funciones. La leptina afecta directamente a un conjunto de neuronas—neuronas de primer orden—en el que se localizan, por un lado, los péptidos anorexigénicos proopiomelanocortina (POMC) y transcripto regulado por cocaína y por anfetamina (CART), y, por otro, las moléculas orexigénicas neuropéptido Y (NPY) y la proteína tipo agouti (AgRP). Las neuronas que contienen los péptidos indicados y que son regulados de manera opuesta por leptina, se proyectan hacia otras áreas hipotálamicas: las neuronas de segundo orden ubicadas en el núcleo paraventricular (NPV) sintetizan factor liberador de corticotrofina (CRF), neuropéptido tipo CRF o urocortina, hormona liberadora de tirotrina (TRH), neuromedina U y oxitocina, y las localizadas en las áreas hipotálamica lateral y paraformical (AHL/APF) producen hormona concentradora de melanina (MCH) y orexinas (ORXs). APV y ALH/APF se comunican con la corteza y el tronco cerebrales. En el último se aloja el núcleo del tracto solitario (NTS) que recibe también estímulos periféricos, vías humorales (ghrelina, Grh, y colecistoquinina, CCK) y neural (nervios vago y espinales), y actúa con una central de integración (Modificada de: ¹¹, pg 668 fig 6).

DIFERENCIACIÓN ADIPOCÍTICA

La obesidad es un trastorno neuro-endocrino-metabólico que resulta del exceso de tejido adiposo blanco (TAB), y representa el principal factor de riesgo para el desarrollo de la diabetes tipo 2 (*non-insulin dependent diabetes mellitus*, NIDDM), dislipemia (incremento de triglicéridos y disminución de lipoproteínas de alta densidad) y de enfermedad cardiovascular (hipertensión y aterosclerosis); conjunto de entidades médicas al que suele referirse, colectivamente, como «síndrome X». La lipoatrofia o lipodistrofia, menos frecuente, se caracteriza por la parquedad de tejido adiposo y su asociación con diabetes tipo 1 (diabetes resistente a insulina). El TAB fue originalmente considerado como un tejido inerte formado por un número fijo de adipocitos; se pensó que actuaba como un depósito pasivo de energía que almacena o libera lípidos bajo la influencia de varias hormonas. Sin embargo, el TAB es un órgano endocrino dinámico con funciones pleiotrópicas.

Los adipocitos secretan factores que juegan un papel central en la regulación del balance energético, la sensibilidad a la insulina, las respuestas inmunológicas y de la reactividad vascular. Además, la expansión del TAB durante la edad adulta resulta de hipertrofia e hiperplasia adipocíticas, y células vasculares estromales derivadas del TAB retienen la capacidad de diferenciación en células adipogénicas, condrogénicas, biogénicas y osteogénicas en presencia de factores de inducción que especifican diferentes linajes celulares; todo ello refuerza la plasticidad del TAB, que contiene pseudofibroblastos comprometidos con el linaje adipocítico (preadipocitos) y células precursoras multipotentes.

La adquisición progresiva del fenotipo adipocítico se asocia con cambios en la expresión de más de dos mil genes. Varias familias de factores de transcripción que exhiben modos diferentes de activación y función son reguladores claves del proceso adipogénico, y miembros de la familia C/EBP (*CAATT/enhancer binding protein- α*) y PPAR- γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2*) están implicados en la diferenciación terminal de los preadipocitos en una cascada transcripcional. Además de los factores de transcripción, otras moléculas involucradas en el proceso de transducción de señales –pref-1 y Wnts– también regulan la diferenciación adipocítica. Pref-1 es un inhibidor de la diferenciación adipocítica y se sintetiza como una proteína de membrana; pref-1 se expresa en preadipocitos pero no en adipocitos. Wnt-1 participa en el destino preadipocítico de células mesodérmicas. PPAR se muestra en otras dos isoformas (PPAR- α y PPAR- δ/β), de tal manera que esta superfamilia de receptores nucleares representa una intrincada red de factores de transcripción que regula de manera integrada el metabolismo intermediario (Figura 9).

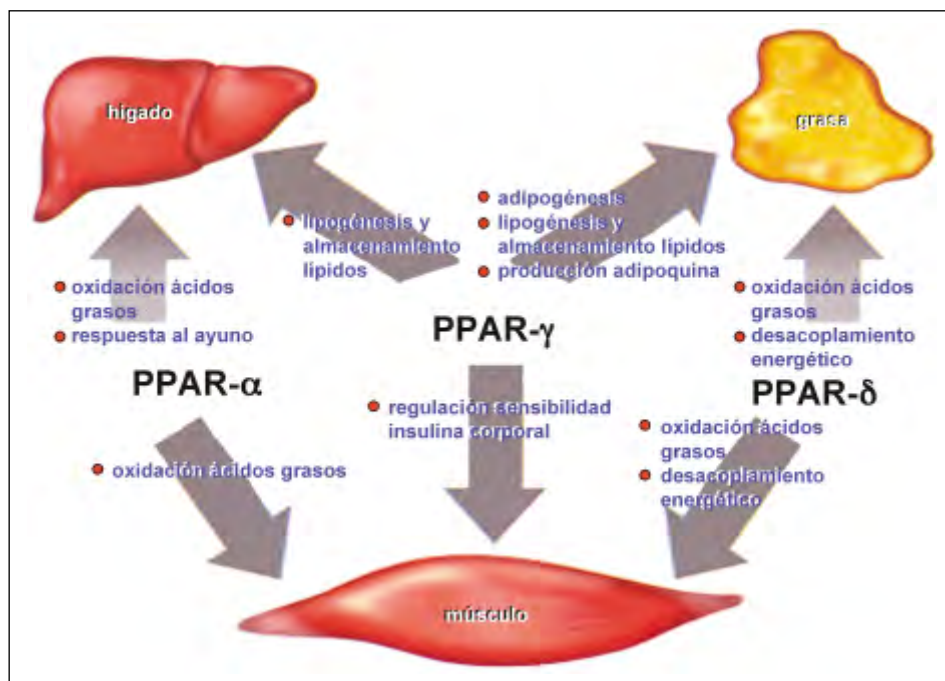


FIGURA 9. Integración metabólica por PPARs. Las tres isoformas PPAR regulan la homeostasis de lípidos y de glucosa a través de acciones coordinadas en hígado, músculo y tejido adiposo (Modificada de: ¹⁸, pg 358 fig 3).

Los adipocitos maduros, el componente principal del TAB, están perfectamente equipados para funcionar plenamente en el depósito y balance energético bajo estricto control hormonal. Sin embargo, el descubrimiento de la intensa actividad secretora del adipocito ha hecho del TAB un órgano extremadamente dinámico. Además de las proteínas involucradas en el metabolismo lipídico y lipoproteico, citoquinas y factores de crecimiento, los adipocitos sintetizan productos que participan en la regulación de la ingesta de alimentos y en la homeostasis energética. Los factores producidos y secretados por los adipocitos incluyen: leptina, adipina, ASP, proteína agouti, angiotensina II, prostaglandinas, factor de necrosis tumoral- α (*tumor necrosis factor*, TNF- α), factor inhibidor de la migración de macrófagos (*macrophage migration inhibitory factor*, MIF), resistina, adiponectina, proteína secretada ácida y rica en cisteína (*secreted protein acidic and rich in cystein*, SPARC), PPAR γ *angiopoietin related* (PGAR) / *fasting-induced adipose factor* (FIAF) y vistafina.

La resistina es un péptido de 114 aminoácidos que contiene una región rica en restos cisteína similar a los existentes en los factores de crecimiento

to secretados; es un producto exclusivamente adipocítico –aunque macrófagos activados lo secretan - que ha sido involucrado en la resistencia a la insulina en el obeso. La adiponectina (*adipocyte-complement-related protein* - Acrp30, ApM-1 o adipoQ), relacionada con el factor C1q de la vía clásica de activación del complemento sérico, reduce sus concentraciones plasmáticas en los humanos obesos. La administración de adiponectina induce pérdida de peso en ratones con dieta con alto contenido graso pero sin provocar anorexia, un efecto asociado con un incremento de la oxidación de ácidos grasos libres por el músculo. SP ARC, osteonectina o BM-40 pertenece al grupo de proteínas matricelulares que modulan la adhesión celular, diferenciación y angiogénesis; no es un producto específico de los adipocitos y su expresión se limita a la remodelación tisular (consolidación de fracturas), tumorogénesis y fibrogénesis (cicatrización). También está involucrado en la regulación de los niveles del inhibidor I del activador del plasminógeno (*plasminogen activator inhibitor I*, PAI-I), pudiendo ser el responsable del incremento plasmático de PAI-I observado en la obesidad; también participa en la hiperplasia y neovascularización del TAB. PGAR/FIAF es el producto de un gen diana de receptores activados por proliferadores de peroxisomas, y es una proteína secretada del tipo fibrinógeno/angiopoyetina, que se produce predominantemente en el tejido adiposo y en la placenta; su concentración plasmática se eleva durante el ayuno y disminuye con la ingesta crónica de grasa, lo que sugiere un papel en la regulación del metabolismo en condiciones de ayuno.

En resumen, resistina, junto con TNF- α e IL-6 inducen resistencia a la insulina: TNF- α es una citoquina proinflamatoria que suprime la expresión de genes adipocíticos específicos; resistina mantiene los niveles de glucemia durante el ayuno, y la producción de IL-6 incrementa en obesidad y en diabetes. Adiponectina y visfatina son adipoquinas que trabajan sinérgicamente con insulina para incrementar la captación y el metabolismo de glucosa en el músculo y para bloquear la formación de glucosa (gluconeogénesis) en el hígado. Adiponectina activa a la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), modula las vías de señales controladas por el factor de transcripción NF- κ B, incrementa la oxidación de ácidos grasos por el músculo, protege a las células endoteliales, y está reducida en diabéticos y en obesos. Visfatina, secretada por la grasa visceral, se une al receptor de insulina en un sitio independiente al que se acopla insulina y actúa como un mimético natural de insulina. Leptina activa AMPK y actúa a niveles central y periférico regulando el metabolismo y reduciendo la ingesta de alimentos, y está reducida en individuos con raros cuadros de obesidad con base genética.

PAPEL DE LOS TEJIDOS PERIFÉRICOS EN EL BALANCE ENERGÉTICO

Aunque la idea predominante es que el tejido adiposo crece con la ingesta y se consume con el ejercicio, una forma de tejido adiposo denominada *marrón* es un actor importante en el control de la obesidad. En 1961, Eric G Ball y Robert L Jungas⁹ propusieron la propiedad termogénica del tejido adiposo marrón (TAM); desde entonces, numerosos trabajos han mostrado la distintiva capacidad de este tejido para responder a diversos estímulos ambientales generando calor a partir de la energía metabólica almacenada. En respuesta a la estimulación del sistema nervioso autónomo simpático, el TAM orquesta una expansión hiperplásica e hipertrófica, incrementa el flujo de sangre y recluta lípidos e hidratos de carbono con destino al metabolismo oxidativo. Un elemento crítico en la termogénesis del TAM es su mecanismo para disipar el gradiente de protones mitocondrial; un sistema que gobierna la proteína desacoplante mitocondrial (*uncoupling protein*, UCP) específica del TAM, también denominada termogénina. Esta proteína, ahora denominada UCP1 controla la pérdida de protones con el propósito de producir calor a expensas de abortar la producción de ATP. El desacoplamiento mitocondrial (producción de calor y bloqueo de la producción de ATP) se activa por los ácidos grasos libres liberados como resultado de la lipólisis hormonodependiente. La hiperexpresión de UCP1 en los tejidos adiposos blanco y marrón, hace a los animales transgénicos resistentes a la obesidad (Figura 10).

Receptores β -adrenérgicos (β ARs) acoplados a proteínas G (pG) controlan la capacidad de la noradrenalina para estimular lipólisis y termogénesis en los adipocitos. Existen tres subtipos: β 1AR, β 2AR y β 3AR. Los subtipos 1 y 2 se expresan universalmente; sin embargo, la expresión de β 3AR en los adipocitos es una función de la diferenciación y, como otros genes específicos de adipocitos, requiere la coexpresión de C/EBP α para su inducción y mantenimiento. Dos características de este sistema son: los modelos animales de obesidad (ratón *ob/ob*, rata Zucker *fa/fa*) presentan una perturbación de la función de los β ARs; y β 3AR tiene la propiedad única de acoplarse simultáneamente a pGs y pGi con la consecuente activación, también simultánea, de las vías de transcripción de señales que involucran la proteína quinasa A (PKA) y la vía MAP quinasa (MAPK), respectivamente. La activación combinada de PKA y MAPK es responsable de la aparición de adipocitos marrones termogénicamente activos en TAB y de la regulación integrada de ciertas acciones metabólicas de los β 3-agonistas como la activación de la lipasa sensible a hormonas y el programa general de lipogénesis versus lipólisis. β ARs, a través de la

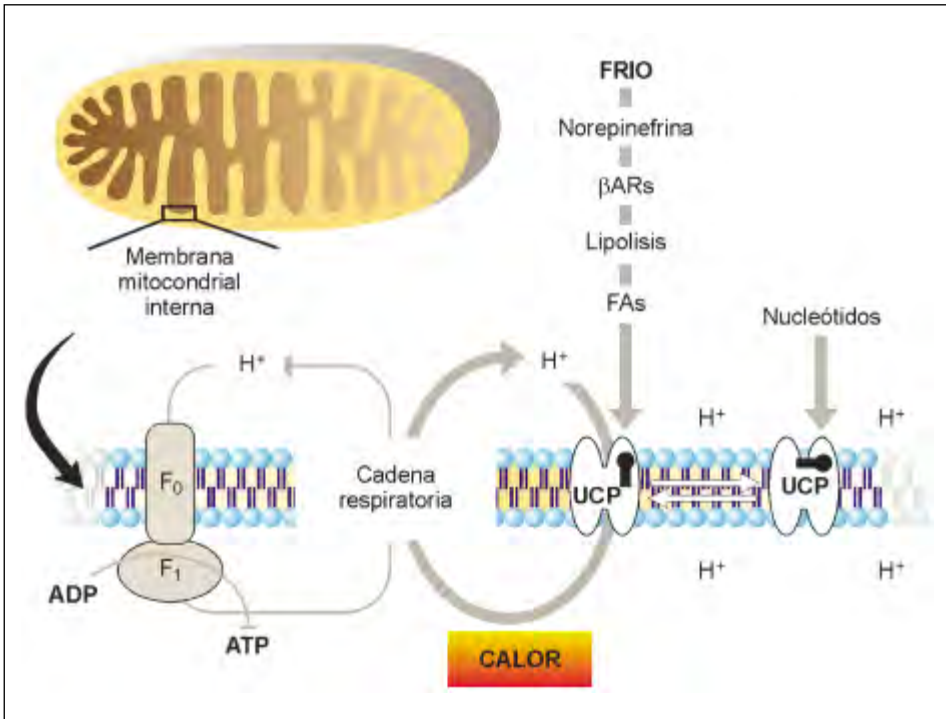


FIGURA 10. Mecanismos de la acción de la proteína desacoplante mitocondrial UCP1. La estimulación por nervios simpáticos de receptores β -adrenérgicos en los adipocitos marrones, ocurre como respuesta al frío o al exceso de ingesta de comida. Ello provoca lipólisis y activación del mediador termogénico UCP1 por los ácidos grasos liberados en el proceso lipolítico; la activación de UCP1 es bloqueada por nucleótidos de guanina. El desacoplamiento de la respiración oxidativa mitocondrial de la producción de ATP resulta en un incremento de la pérdida neta de energía calórica por molécula de ATP producida, lo que genera calor como producto final (Modificada de: ¹⁹, pg 984 fig 2).

vía pGs/adenilato ciclasa (AC) \rightarrow cAMP \rightarrow PKA, estimulan lipólisis mediante la activación de la lipasa sensible a hormona (*hormone-sensitive lipase*, HSL); los ácidos grasos libres producidos incidirán sobre UCP1 provocando desacoplamiento oxidativo mitocondrial y termogénesis. Por otro lado, el incremento de la PKA también incita un incremento en la transcripción del gen UCP1; ello a través de la hiperexpresión del coactivador 1 del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (*peroxisome proliferator activated receptor γ* (PPAR- γ) *co-activator-1* (PGC-1)). Por otro lado, el sistema nervioso autónomo parasimpático se opone a la lipólisis favoreciendo el depósito de grasa; un efecto predominantemente nocturno (Figura 1 1).

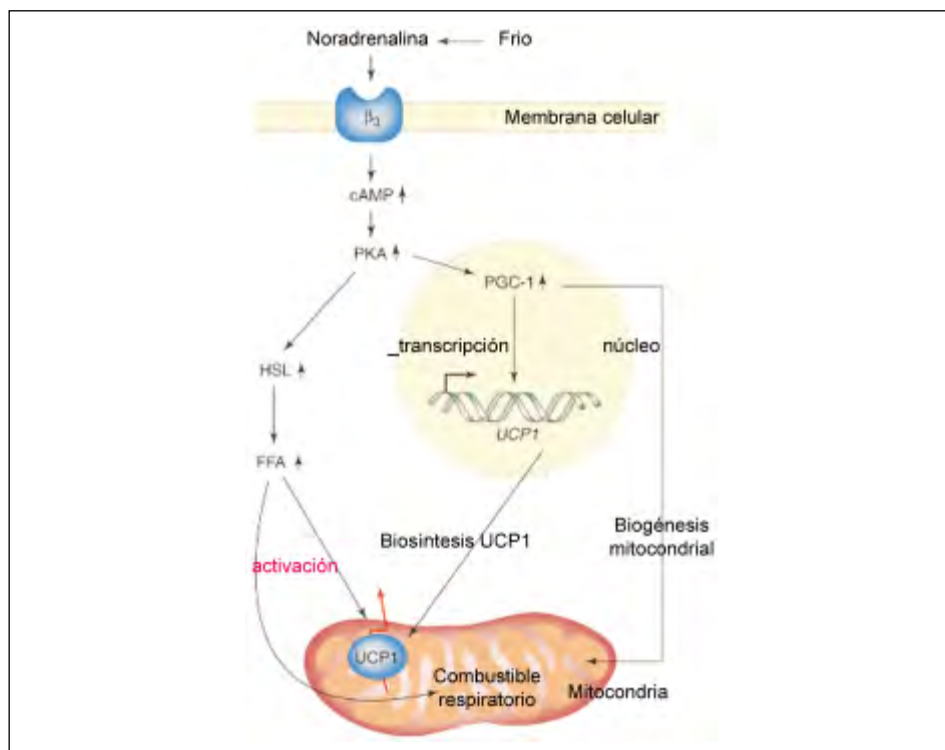


FIGURA 11. Regulación de la termogénesis en el tejido adiposo marrón (TAM). El TAM tiene la función específica de la termogénesis. Agonistas adrenocéptores (noradrenalina) actúan sobre los adrenocéptores- β_3 que inducen la activación de una proteína mitocondrial denominada proteína desacoplante-1 (UCP1). UCP1 es específica de adipocitos marrones y residen en la membrana mitocondrial interna donde disipa el gradiente de protones acoplado al metabolismo oxidativo, con lo que se genera calor (flecha roja). La activación aguda de UCP1 ocurre vía interacción de la proteína con ácidos grasos libres (FFAs) derivados de una actividad incrementada de la lipasa sensible a hormona (HSL). Además, existe un incremento a largo plazo de la expresión del gen UCP1. Esta expresión está mediada por la inducción dependiente de cAMP de un factor nuclear, el coactivador PGC-1, que también induce biogénesis mitocondrial. PGC-1 = coactivador del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (Modificada de: ¹⁷, pg 251 fig 2).

Proteínas homólogas (UCP2, UCP3) a UCP1 han sido identificadas en otros tejidos. Se ha propuesto una conexión entre el desacoplamiento mitocondrial y la producción de especies reactivas o radicales libres de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS); una relación para la que se ha involucrado a UCP2 en células fagocíticas: células de Kupffer en el hígado y en macrófagos. La presencia de UCPs plantea la posibilidad de que puedan existir mecanismos termogénicos en otras células fuera del tejido adiposo marrón.

SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA DE LA REGULACIÓN DEL PESO CORPORAL

La mayoría de las formas sindrómicas de obesidad – Cohen, Prader -Willi, Bardet-Biedl, Alstrom – han sido mapeadas genéticamente pero los genes causales no han sido clonados. Los genes obesos clonados hasta la fecha corresponden a sus respectivos productos: leptina, receptor de leptina, **pro-opiomelanocortina (POMC)**, receptor de **melanocortina tipo 4 (MC4R)** y **proconvertasa 1 (PC1)**. El gen de leptina o gen *ob* codifica una hormona sintetizada y secretada por adipocitos en proporción a su contenido en grasa. En el hipotálamo la leptina se une a su receptor – codificado por el gen *db* – y, entre sus efectos, estimula la expresión del gen *POMC*. La enzima PC1 escinde POMC para formar hormona adrenocorticotrófica (*adrenocorticotropic hormone*, ACTH y hormona estimulante de melanocitos- α (*α -melanocyte-stimulating hormone*, α -MSH); esta última reduce la ingesta de comida cuando se une a su receptor MC4R (vía antiorexigénica). El que no se hayan identificado - en cuadros de obesidad humana monogénica - mutaciones en la vía orexigénica de la compleja regulación de la ingesta energética, puede apuntar a que sea la vía de la leptina la llave reguladora primaria del balance energético en el humano.

Los cinco genes humanos causantes de obesidad monofactorial caen en dos categorías sobre la base de su prevalencia. La primera incluye los genes que codifican leptina, receptor de leptina, POMC y una forma muy rara de obesidad recesiva que se asocia a disfunción endocrina hipofisaria. El fenotipo de obesidad mórbida de estas entidades se inicia en las primeras semanas de vida e incluye hiperfagia constante e hipogonadismo hipogonadotrófico; el tratamiento con leptina recombinante provoca saciedad y una rápida pérdida de masa grasa sin alteraciones de la masa magra. El segundo grupo de formas monogénicas de obesidad no sindrómica lo componen una serie de mutaciones del gen *MC4-R*, que puede considerarse como un gen eficiente: un gen cuyo producto induce eficiencia energética. Recientemente se ha identificado un gen que incide en la vía orexigénica: la hiperexpresión del gen *GAD2* conduce a una producción exagerada del neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA) que, interaccionado con el neuropéptido Y , estimula el apetito. Respecto a las formas de obesidad poligénica, más frecuentes, las indagaciones se centran en la búsqueda de genes candidatos; variaciones en los genes de receptores β_3 -adrenérgicos, que son estimulados por noradrenalina, pueden modificar la activación de la proteína desacopladora 1. Cierta variante del gen del receptor adrenérgico ha sido identificada en la población con obesidad mórbida en ambientes determinados; sin embargo, los polimorfismos del gen citado pueden ser condición necesaria pero

no suficiente para inducir obesidad. Iguales conclusiones pueden derivarse del estudio de los polimorfismos de PPAR γ . Por su parte, estudios de determinados grupos poblacionales obesos han proporcionado información sobre posibles regiones candidatas: 3q27 (síndrome metabólico/resistencia insulina), 10p11 y 20q13 (familias francesas, alemanas y americanos negros y blancos) o 11q (indios pimas). En resumen, la obesidad se manifiesta como una enfermedad oligogénica cuyo desarrollo puede modularse por varios genes modificadores poligénicos y por factores ambientales.

CIRUGÍA BARIÁTRICA

La cirugía bariátrica (*baros* = peso + *iatrikē* = medicina) es una subespecialidad de la cirugía del aparato digestivo que ha evolucionado de manera continuada desde unos inicios esporádicos y casi experimentales en la década de los 1950s. El primer procedimiento bariátrico precedido por estudios experimentales en animales, presentado a una sociedad quirúrgica reconocida y publicado en una revista con comité de selección, fue el realizado por Arnold Kremen y col¹⁰ en 1954. El caso presentado fue una derivación (*bypass*) yeyuno-ileal, consistente en una anastomosis entre el yeyuno proximal y el íleon terminal, cortocircuitando un largo segmento del intestino delgado involucrado en la absorción de alimentos que, posteriormente fue modificada una y otra vez (Figura 12).

Obesidad mórbida (obesidad clínicamente grave) es una enfermedad por exceso de reservas de energía en forma de grasa. Obesidad mórbida se define por un índice de masa corporal (*body mass index*: BMI) $\geq 40 \text{ kg / m}^2$, o BMI $\geq 35 \text{ kg / m}^2$ asociado a condiciones comórbidas: apnea del sueño, insuficiencia pulmonar (síndrome de Pickwick), hipertensión o diabetes, o problemas que interfieren con el estilo de vida (relaciones sociales o familiares). Tal situación se relaciona con problemas físicos reales bien reconocidos; el más obvio es un incremento de la tasa de mortalidad. La obesidad representa un problema para la salud porque se asocia con un incremento en la prevalencia de factores de riesgo cardiovascular: hipertensión, diabetes mellitus tipo II, hipertrigliceridemia y disminución de lipoproteínas de alta densidad. Además, la obesidad mórbida incrementa las tasas de mortalidad por cáncer: endometrio, vesícula, cerviz, ovario y mama en la mujer, y colorrectal y de próstata en el hombre.

La obesidad mórbida es una enfermedad cuyo tratamiento quirúrgico tiene por objetivos la pérdida de peso y la prevención de sus complicaciones secundarias. El tratamiento quirúrgico de la obesidad mórbida es médicamente necesario

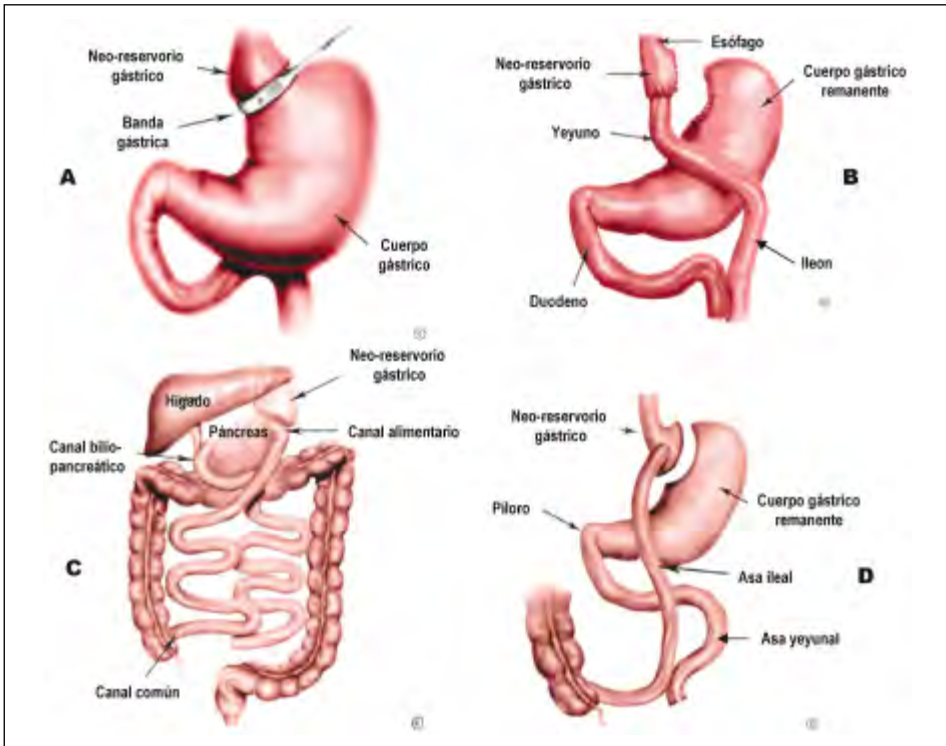


FIGURA 12. Cirugía bariátrica. **A)** Gastroplastia con banda horizontal: cirugía restrictiva pura (reducción del reservorio gástrico, que impone una reducción de la cantidad de alimentos ingerida, pero se mantiene la continuidad anatómica del tracto digestivo; es decir, el alimento recorre el tracto intestinal sin interferir la secuencia digestiva y absorptiva, que se mantienen intactas). **B)** Derivación en Y de Roux: se considera el estándar de oro del tratamiento quirúrgico de la obesidad mórbida. Es una técnica en principio restrictiva (se crea un neo-reservorio gástrico pero se reseca de parte alguna del estómago) que limita la cantidad de alimentos ingerida con la consiguiente disminución de la ingesta calórica; sin embargo, se asocia el principio de malaabsorción porque se impide al alimento contactar plenamente con las secreciones gástrica, biliar, pancreática y duodeno-yeyunal. El alimento sólo tiene oportunidad de contactar con tales secreciones lejos del lugar anatómico prefijado, con lo que llega al yeyuno distal mal digerido y, por lo tanto, difícil de absorber. Este procedimiento quirúrgico se introdujo en la década de 1960s y, desde entonces, ha sufrido numerosas modificaciones. **C)** Derivación bilio-pancreática: la técnica reseca, aproximadamente, 2/3 partes del estómago (se extirpan el cuerpo y antrum gástricos y se mantiene el fondo y la porción de salida) con lo que se reducen la ingesta de alimentos y la producción ácida, y se secciona el intestino delgado a nivel del ileon. La boca distal del intestino delgado se anastomosa al remanente del fondo gástrico, creándose el denominado canal alimentario de la derivación. Por ello se mueve el alimento ingerido, aunque la absorción, por las mismas razones que las apuntadas en (B), es muy escasa. La bilis y el jugo pancreático circulan a través del canal biliopancreático, que desembocará a nivel del ileon terminal, en el denominado canal común. El cirujano puede variar la longitud del canal común para regular la cantidad de proteínas, grasas y vitaminas liposolubles absorbidas. **D)** Derivación ampliada en Y de Roux: es una combinación de las técnicas B y C (Modificado de: <http://www.crownsurgery.com/procedure/procedure.html>).

porque es el único método que se ha mostrado eficaz para controlar el peso a largo plazo. El abordaje quirúrgico de la obesidad no es cirugía estética ni un mero procedimiento cosmético; la cirugía bariátrica no elimina tejido adiposo (grasa) por succión (liposucción) o mediante excisión. La cirugía bariátrica implica la reducción del tamaño del reservorio gástrico, con o sin cierto grado de malabsorción asociada (exclusión de parte del intestino delgado involucrado en la absorción alimentaria). El comportamiento alimentario mejora drásticamente (saciedad), lo que reduce la ingesta calórica. Los riesgos del tratamiento quirúrgico de la obesidad contemplan complicaciones per- y peri-operatorias y a largo plazo. La gran experiencia acumulada con técnicas clásicas (laparotomía) señala que la mortalidad perioperatoria inmediata es relativamente baja. La morbilidad en el periodo perioperatorio temprano (infección de la herida quirúrgica, dehiscencias, fallo de las suturas gástrica y/o intestinal, estenosis del estoma, úlceras marginales, problemas pulmonares y tromboflebitis profunda de los miembros inferiores) ronda el 10%, aunque el riesgo agregado de las dos complicaciones principales (fallo de las suturas y tromboflebitis profunda) es menor que el 1%. Las tasas de mortalidad y morbilidad de las reintervenciones son muy superiores a las de las intervenciones primarias. Por su parte, las técnicas de invasión mínima (laparoscopia) ofrecen una disminución significativa de todo tipo de complicaciones (Figura 13).

La pérdida de peso alcanza el máximo a los 18-24 meses de la intervención. El estudio de series extensas (mil pacientes) a largo plazo (diez años) señalan una pérdida de peso entre el 50% y el 70%. Además, la cirugía reductora mejora las condiciones comórbidas: hipoventilación, hipertensión, intolerancia a la glucosa y diabetes mellitas instaurada, y dislipemias. Por su parte, los pacientes mejoran su carácter, afectividad interpersonal, autoestima y calidad de vida. Las relaciones maritales mejoran si existían preoperatoriamente; si existía algún conflicto, la mejora de la imagen suele conducir al divorcio postoperatorio. Deben utilizarse métodos anticonceptivos durante el periodo de rápida pérdida de peso, pues la malnutrición materna puede afectar el desarrollo fetal; ello tiene especial importancia debido a que la fertilidad suele incrementar tras la pérdida de peso. Es más, una de las indicaciones de cirugía bariátrica es la imposibilidad de embarazo.

La cirugía gástrica restrictiva en paciente motivado y cooperador, que ha sido educado en las necesidades nutritivas para una ingesta proteica/calórica/mineral/vitaminica adecuada, suele seguir un curso postoperatorio sin incidentes; ello, aunque existe algún déficit proteico durante los tres primeros meses postoperatorios que se resuelve no más allá de los 18 meses, tiempo en el que el paciente recupera la masa magra adecuada a su peso corporal. Técnicas restrictivas puras

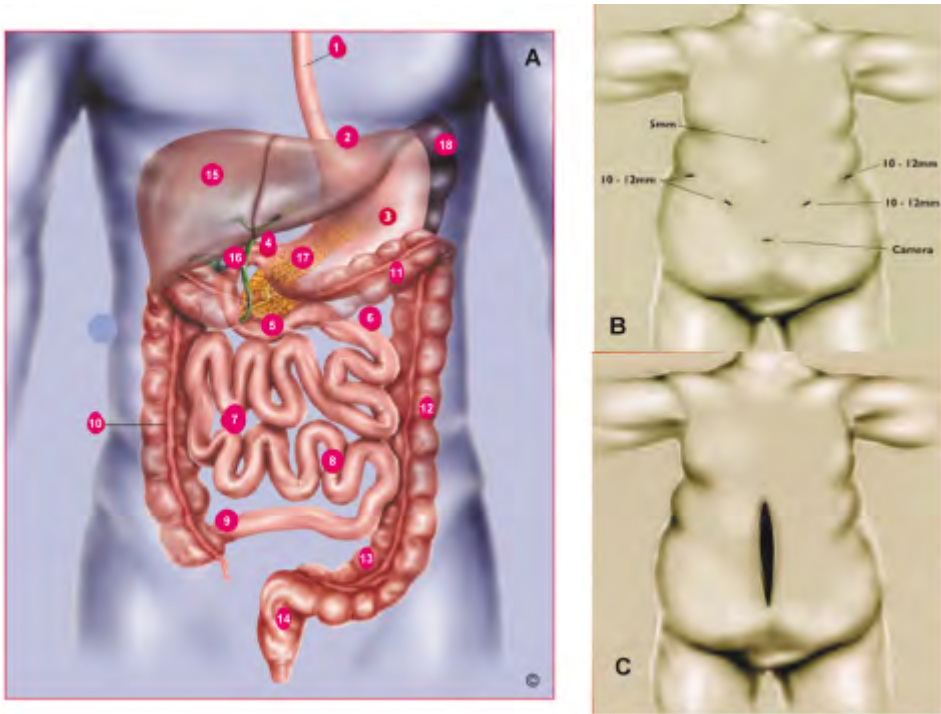


FIGURA 13. *A) Sistema digestivo humano. 1: esófago. 2: cuerpo gástrico. 3: unión esófago-gástrica. 4: píloro. 5: duodeno. 6: yeyuno. 7: tramo yeyuno-ileal. 8: íleon. 9: íleon terminal y unión ileocecal. 10: colon ascendente. 11: colon transverso. 12: colon descendente. 13: sigma. 14: r ecto. 15: hígado. 16: vía biliar. 17: páncreas. 18: bazo. B) Acceso laparoscópico (cirugía de invasión mínima) para cirugía intra-abdominal. C) Acceso mediante laparotomía (cirugía clásica) para cirugía intra-abdominal (Modificada de: http://www.genesishealth.com/services/digestive_system.aspx).*

gástricas, como la gastroplastia mediante banda vertical o la gastroplastia anillada consiguen reducir el peso al restringir el volumen de comida ingerido. En los procedimientos de exclusión gástrica con Y-Roux el alimento evita prácticamente el estómago, así como el duodeno y parte del yeyuno proximal. En consecuencia, tales pacientes tienen el riesgo de desarrollar hiposideremia secundaria a la carencia de contacto del hierro alimentario con el ácido gástrico y la reducción consecuente en la conversión de formas ferrosas relativamente insolubles a la forma férrica fácilmente absorbible. El mismo problema es aplicable a la vitamina B12. Por su parte, la vitamina D y el calcio, que se absorben a través del yeyuno proximal pueden, de igual modo, ver afectada su absorción. Los suplementos multivitamínicos y de minerales son necesarios durante toda la vida. Las derivaciones biliopancreáticas están indicadas cuando se pretende incorporar un cuadro de

máxima malabsorción junto con una cirugía gástrica restrictiva; estrategia que consigue la máxima pérdida de peso pero que se asocia con una alta incidencia de problemas metabólicos que exigen una vigilancia especializada continuada. Por último, debe indicarse la necesidad de evaluación pre- y de apoyo post-operatorio, psicológico y aunque no se han identificado factores predictores. Sólo se han encontrado dos relaciones validadas, que los pacientes más estresados por su obesidad son los que suelen perder más peso, y que la existencia de trastornos psiquiátricos serios son una contraindicación para la cirugía. Con todo ello, la *NIH Consensus Conference*, en 1985, estableció que la «reducción de peso puede ser decisiva en pacientes con obesidad extrema, definida arbitrariamente como un peso doble al deseable o 45 kg sobre el peso teórico. Cuando la obesidad se acompaña de manifestaciones cardiopulmonares severas, como síndrome de Pickwick, la reducción de peso debe ser una emergencia médica».

Las conclusiones de la Conferencia citada apuntan la evidencia de que «la obesidad, definida como un excesivo almacenamiento energético en forma de grasa, tiene efectos adversos sobre la salud y la longevidad. La obesidad se asocia con hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes mellitus independiente de insulina e incremento de la incidencia de determinados cánceres y otros problemas médicos. Los índices de masa corporal superiores a 27 (incrementos de peso superiores al 20% del teórico) exigen un tratamiento agresivo. Cuando existen diabetes y/o hipertensión o antecedentes familiares de ambas condiciones, el tratamiento sólo aportará beneficios aún cuando los grados de obesidad sean menores. La investigación debe dirigirse hacia la definición de marcadores biológicos, factores reguladores de la distribución regional de grasa, estudios sobre regulación energética y otros que utilicen técnicas antropológicas, psiquiátricas y las ciencias sociales». Por su parte, Caren G Solomon y Robert G Dluhy concluyen que «la cirugía bariátrica es, hoy, la aproximación más eficaz para rescatar pacientes con obesidad mórbida y revertir o prevenir el desarrollo de enfermedades graves que se asocian con obesidad», y el meta-análisis de Henry Buchwald y col insiste en la «efectiva pérdida de peso lograda en pacientes con obesidad mórbida sometidos a cirugía bariátrica. Una mayoría significativa de pacientes con diabetes, hiperlipemia, hipertensión y/o apnea obstructiva durante el sueño, experimenta una completa resolución y una mejora significativa».

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Mayer J (1953) Glucostatic mechanism of regulation of food intake: a glucodynamic theory of food intake. *N Eng J Med* **249**, 13-16.

- (2) Gibbs J, Young RC y Smith GP (1973) Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol* **84**, 488-495.
- (3) Woods SC, Decker E y Vasselli JR (1974) Metabolic hormones and regulation of body weight. *Psychol Rev* **81**, 26-43.
- (4) Kennedy GC (1953) The role of the fat depot in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc Roy Soc Lond B Biol Sci* **140** (901), 578-596.
- (5) Coleman DL (1973) Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* **9** (4), 294-298
- (6) Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold MD y Friedman J (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432.
- (7) Tartaglia RA, Dembrski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wolf EA, Monroe CA y Tepper RI (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, *OB-R*. *Cell* **83**, 1263-1271.
- (8) Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA y O'Rahilly S (1999) Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* **341**, 879-884.
- (9) Ball E y Jungas R (1961) On the action of hormones which accelerate the rate of oxygen consumption and fatty acid release in rat adipose tissue in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **47**, 932-941.
- (10) Kremen AJ, Linner JH y Nelson CH (1954) An experimental evaluation of the nutritional importance of proximal and distal small intestine. *Ann Surg* **140**, 439-448.
- (11) Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seely RJ y Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**, 661-671.
- (12) Havel PJ (2001) Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Proc Soc Exper Biol Med* **226**, 962-977.
- (13) Korman J y Leibel RL (2003) To eat or not to eat – How the gut talks to the brain. *N Engl J Med* **349**, 926-928.
- (14) <http://www.rockefeller.edu/labheads/friedman/research.htm>
- (15) List JF y Habener JF (2003) Defective melanocortin receptors in hyperphagia and morbid obesity. *N Engl J Med* **348**, 1160-1163.
- (16) Jackson IJ (1999) The mahogany mouse mutation. Further links between pigmentation, obesity and the immune system. *Trends Genet* **15**, 429- 431.

- (17) Chiesi M, Huppertz C y Hofbauer KG (2001) Pharmacotherapy of obesity: targets and perspectives. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 247-254.
- (18) Evans RM, Barish GD y Wang Y-X (2004) PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med* **10**, 355-361
- (19) Collins S, Cao W, Daniel KW, Dixon TM, Medvedev A, Onuma H y Surwit R (2001) Adrenoceptors, uncoupling proteins, and energy expenditure. *Proc Soc Exper Biol Med* **226**, 982-990.

Lecturas recomendadas

- Aitman TJ (2003) Genetic medicine and obesity. *N Eng J Med* **348**, 2138-2139.
- Baldelli R, Dieguez C y Casanueva FF (2002) The role of leptin in reproduction: experimental and clinical aspects. *Ann Med* **34**, 5-18.
- Banerjee RR y Lazar MA (2003) Resistin: molecular history and prognosis. *J Mol Med* **81**, 218-226.
- Birnbaum (2003) Lipolysis: more than just a lipase. *J Cell Biol* **161**, 1011-1012.
- Brody F (2004) Minimally invasive surgery for morbid obesity. *Cleveland Clinic J Med* **71** (4), 289-298.
- Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K y Shoelles K (2004) Bariatric surgery. A systematic review and meta-analysis. *JAMA* **292** (14): 1724-1737.
- Campbell P y Dhand R (Eds). Nature insight: Obesity. *Nature* **404** (2000).
- Friedman JM. Obesity in the new millennium. 632-634.
- Kopelman PG. Obesity as a medical problem. 635-643.
- Barsh GS y cols. Genetics of body-weight regulation. 644-651.
- Lowell BB y col. Toward a molecular understanding of adaptive thermoregulation. 652-660.
- Schwartz MW y cols. Central nervous system control of food intake. 661-671.
- Bray GA y col. Medicinal strategies in the treatment of obesity. 672-677.
- Chehab FF (2000) Leptin as a regulator of adipose mass and reproduction. *Trends Pharm Sci* **21**, 309-314.
- Dinulescu DM y Cone RD (2000) Agouti and agouti-related protein: analogies and contrasts. *J Biol Chem* **275**, 6695-6698.

- Dove A (2001) Biotech weighs up the options in obesity . *Nature Biotech* **19**, 25-28.
- Dulloo AG (2002) A sympathetic defense against obesity . *Science* **297**, 780-781.
- Fajas L (2003) Adipogenesis: a cross-talk between cell proliferation and cell differentiation. *Ann Med* **35**: 79-85.
- Fantuzzi G y Faggioni R (2000) Leptin in the regulation of immunity , inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* **68**, 437-446.
- Flier JS (2002) Is brain sympathetic to bone? *Nature* **420**, 619-622.
- Friedman JM y Halaas JL (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**, 763-770.
- Horwitz BA (Ed) Obesity Smposium. *Proc Soc Exper Biol Med* **226** (2001).
- Horwitz BA. Introduction: Physiology , pathophysiology , and genetics of body weight/adiposity regulation. 961-962.
- Havel PJ. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. 962-977.
- Schwartz MW. Brain pathways controlling food intake and body weight. 978-981.
- Collins S, Cao W, Daniel KW, Dixon TM, Medvedev A, Onuma H, Surwit R. Adrenoceptors, uncoupling proteins, and energy expenditure. 982-990.
- Froguel P, Boutin P. Genetics of pathways regulating body weight in the development of obesity in humans. 991-996.
- Gregoire FM. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. 997-1002.
- Hug C y Lodish HF (2005) Visfatin: a new adipokine. *Science* **307**, 366-367.
- Hwang C-S, Loftus TM, Mandrup S y Lane MD (1997) Adipocyte differentiation and leptin expression. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 231-259.
- Kaira SP (2001) Commentary: Circumventing leptin resistance for weight control. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 4279-4281.
- Kelner K y Helmuth L (Eds) Obesity. *Science* **299** (2003).
- Nestle M. The ironic politics of obesity (Editorial). 781.
- Kelner K y col. Obesity-What is to be done?. 845.
- Marx J. Cellular warriors at the battle of the bugle. 846-849.
- Gura T. Obesity drug pipeline not so fat. 849-852.
- Hill JO y cols. Obesity and the environment: where do we go from here?. 853-855.
- Friedman JM. A war on obesity, not the obese. 856-858.
- Pi-Sunyer X. A clinical view of the obesity problem. 859-860.

- Kiberstis PA y Marx J (Eds) Regulation of body weight. *Science* **280** (1998).
- Wickelgren I. Obesity: How big a problem? 1364-1367.
- Taubes G. As obesity rates rise, experts struggle to explain why . 1367-1368.
- Gura T. Uncoupling proteins provide new clue to obesity' s causes. 1369-1370.
- Hill JO, Peters JC. Environmental contributions to the obesity epidemic. 1371-1374.
- Comuzzie AG, Allison DB. The search for human obesity genes. 1374-1377.
- Woods SC y cols. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. 1378-1383.
- Campfield LA y cols. Strategies and potential molecular targets for treatment. 1383-1387.
- Walsh BT y cols. Eating disorders: progress and problems. 1387-1390.
- Korner J y Aronne LJ (2003) The emerging science of body weight regulation and its impact on obesity treatment. *J Clin Invest* **111**, 565-570.
- Lafontan M. (2005) Fat cells: Afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. *Annu Rev. Pharmacol Toxicol* **45**, 119-146.
- Luft FC (2003) Nectar from adipocytes. *J Mol Med* **81**, 389-391.
- MacGregor A (2002) The story of surgery for obesity. **En:** www.asbs.org/html/story/chapter1.html
- National Institutes of Health. Consensus development conference statement. *Health Implications for Obesity* 1985. **En:** http://consensus.nih.gov/cons/049/049_statement.htm
- Nogueiras R. y Tschöp M. (2005) Separation of conjoined hormones yields appetite rivals. *Science* **310**, 985-986.
- Rosenbaum M, Leibel RL, Hirsch J (1997) Obesity . *N Engl J Med* **337**, 396-407.
- Saltiel AR (2001) You are what you secrete. *Nature Med* **7**, 887-888.
- Schwartz MW (1999) Mahogany adds color to the evolving story of body weight regulation. *Nature Med* **5**, 374-375.
- Shuldiner AR, Yang R y Gong D-W (2001) Resistin, obesity, and insulin resistance – The emergence role of the adipocyte as an endocrine organ. *N Engl J Med* **345**, 1345-1346.
- Solomon CG y Dluhy RG (2004) Bariatric surgery – Quick fix or long-term solution? *N Engl J Med* **351**, 2751-2753.
- Tartaglia LA (1997) The leptin receptor. *J Biol Chem* **272**, 6093-6096.
- Taubes G (2001) The soft science of dietary fat. *Science* **291**, 2536-2545.

Alteraciones genéticas de las monooxigenasas microsómicas dependientes de flavina.

Trimetilaminuria

MARÍA CASCALES ANGOSTO Y FEDERICO MAYOR ZARAGOZA

RESUMEN

Las monooxigenasas microsómicas dependientes de flavina (FMO) oxidan aquellos xenobióticos o fármacos que contengan un grupo nucleófilo débil, generalmente con nitrógeno, azufre, fósforo o selenio. Estas monooxigenasas, al igual que las dependientes del citocromo P-450 (CYP), utilizan equivalentes reductores, en forma de NADPH, para formar agua con uno de los átomos del oxígeno molecular y para oxidar el sustrato con el otro átomo. Ambas monooxigenasas exhiben la misma localización subcelular y tisular, muestran especificidad por el sustrato y existen como múltiples enzimas. Las flavinmonooxigenasas no requieren la reductasa para transferir los electrones del NADPH, y su ciclo catalítico es completamente diferente del de las CYP. Otra característica de las FMO es su menor capacidad para ser inducidas por xenobióticos.

Aunque se considera que las CYP juegan el papel más importante en el metabolismo oxidativo de los xenobióticos, la actividad de las FMO es cada vez más significativa en el caso de muchos fármacos, que a menudo, al oxidarse por esta vía, originan metabolitos reactivos con consecuencias toxico-farmacológicas importantes.

Las funciones fisiológicas de las FMO no están del todo esclarecidas. Tres de los cinco genes *FMO* humanos expresados, exhiben polimorfismo genético. El más estudiado es el *FMO3* del hígado humano adulto, en el cual alelos mutantes contribuyen a una enfermedad conocida como trimetilaminuria.

INTRODUCCIÓN

La mayor parte de la biotransformación de los xenobióticos, catalizada por los enzimas de la fase I, se verifica por las monooxigenasas microsómicas dependientes del citocromo P450 (CYP), una gran superfamilia de hemo-proteínas-tiolato. Sin embargo, existe otra familia de monooxigenasas, las dependientes de flavina o FMO (EC 1.14.13.8), que juegan un papel significativo en la oxidación de numerosos fármacos, con repercusión importante en la salud y la enfermedad (1-3). Las FMO catalizan la oxidación de una serie de nucleófilos débiles que contienen azufre, nitrógeno, fósforo y selenio. En el caso del nitrógeno, las aminas terciarias son sustratos excelentes de este sistema, que al oxidarse se convierten en derivados *N*-óxido.

Gran parte de las investigaciones preliminares sobre las FMO, denominadas entonces «amina oxidasas de función mixta», se realizaron en el laboratorio de Ziegler, con un enzima purificado de hígado porcino (4), que catalizaba la *N*-oxidación de la dimetilaminilina. La flavoproteína purificada resultó ser inmunológicamente distinta de la NADPH citocromo c reductasa y diferente en que esta última contiene cantidades equimoleculares de FAD y FMN, mientras que el grupo prostético de la flavoproteína purificada por Ziegler y Mitchell contiene sólo FAD. El peso molecular de dicha flavoproteína es de 65.000 kDa por mol de FAD. Más tarde, dos laboratorios independientemente (5, 6) purificaron una flavina monooxigenasa de pulmón de conejo, con propiedades diferentes de la de hígado de cerdo. Es en la década de los noventa cuando se caracterizaron por clonación del cDNA las FMO2 y FMO3 de hígado humano adulto (7, 8) y posteriormente, se han conseguido caracterizar cinco isoenzimas funcionales y cinco isoformas que comprenden cinco familias de genes de un miembro cada una. Las secuencias ortólogas comparten un 81-89% de identidad y las homólogas un 52 a 58% (9, 10). Se ha descrito una isoforma más, la FMO6, pero estudios recientes sugieren que el *FMO6* es un pseudogen que codifica una FMO no funcional (11). Los *FMO* se localizan en el brazo largo del cromosoma 1 (q23-25). También en este cromosoma aparece otro grupo de 5 pseudogenes, aunque en ratón, tres de estos pseudogenes, son funcionales (12).

CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA *FMO*

Las FMO son en gran parte responsables de la oxidación de los agentes nucleofílicos débiles, incluyendo las aminas endógenas. Entre los sustratos de esta familia se encuentran la trimetilamina, la amina terciaria (*S*)-nicotina y fármacos

tales como los antipsicóticos tricíclicos, la cimetidina, la ranitidina y el verapamilo. La familia FMO comprende una serie de enzimas asociadas a membrana, que se han detectado en todos los tipos celulares secretores examinados (1, 2, 10).

La FMO1 es la isoforma predominante en hígado de la mayoría de los mamíferos. Los primates y ciertas variedades de ratón difieren en que tienen la FMO3 como forma predominante en hígado adulto. En hígado de primates y de ratón se ha detectado después del nacimiento, un cambio de FMO1 a FMO3, de manera que en hígado fetal se expresa la FMO1, pero en algún momento la expresión de la FMO1 se reprime y la FMO3 llega a convertirse en la isoforma dominante. La FMO1 permanece como forma dominante en riñón de primates adultos, mientras que la forma que se encuentra en mayor proporción en pulmón es la FMO2, cuya expresión se encuentra controlada por el desarrollo. Tanto en conejo como en humano, la FMO1 representa una vía importante del metabolismo de xenobióticos en riñón e intestino adultos (1, 11).

Los cinco genes *FMO* de mamíferos poseen diferente expresión tisular y regulación y las FMO que codifican poseen una distinta especificidad por una amplia variedad de sustratos. La variación interindividual en el metabolismo de fármacos mediado por la FMO se debe más a efectos genéticos que a efectos ambientales. Las FMO parece que han surgido de una familia ancestral de genes con seis tipos diferentes que comparten al menos 52% de identidad en la secuencia de aminoácidos. Las FMO de humanos, poseen de 532 a 558 aminoácidos. Una serie de residuos específicos de aminoácidos están conservados en todas las especies, en particular los aminoácidos 4 al 32 y 186 al 213, que contienen dominios de unión al FAD- y al NADPH-, respectivamente. (2).

Hasta la fecha se han aislado los cDNA que codifican cinco FMO humanas y se han investigado la distribución de cada mRNA en tejido fetal y adulto. Los resultados de estas investigaciones han demostrado que los genes que codifican las FMO 1, 2, 3 y 5 están sujetos a regulación tisular y ontogénica, lo que va a dar lugar a diferentes tipos de expresión génica. Tal diversidad en la expresión sugiere que las FMO pueden también tener funciones fisiológicas en las que se encuentran implicados sustratos endógenos. (13-15).

En hígado adulto de humanos la forma que predomina es la FMO3, aproximándose al 0,5% de las proteínas microsómicas totales. La FMO3 posee una amplia especificidad que le permite aceptar gran variedad de sustratos aminas primarias, secundarias y terciarias. Los compuestos nucleofílicos que contienen sulfuro son oxigenados por la FMO3 humana de manera eficiente y estereoselectiva. También es importante la *N*-oxigenación de las aminas primarias con for-

mación de hidroxilaminas y la posterior oxigenación de las hidroxilaminas a oximas. En mamíferos, la oxidación de hidroxilaminas a oximas es una vía que sirve para determinar la actividad farmacológica de las aminas primarias.

La actividad de la FMO3 humana depende de las propiedades químicas y de la estructura del sustrato. Aunque se ha postulado que es necesario solo un punto de contacto entre sustrato y enzima, se ha demostrado la existencia de interacciones adicionales a la hora de determinar la formación del producto. Generalmente la V_{max} para una gran variedad de sustratos es similar, y la K_m es variable, pero no precisamente es función de un tipo de clase o estructura.

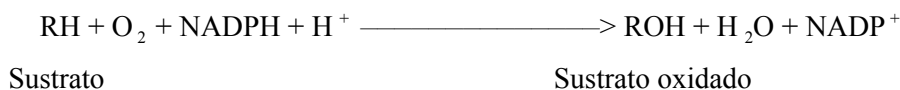
Son sustratos de la FMO3 la trimetilamina y la (*S*)-nicotina. Otros compuestos que contienen heteroátomos son oxidados selectivamente por la FMO3 humana. Por ejemplo, el tamoxifeno, la xanomelina y el N-desacetil cetoconazol. La metionina es también S-oxidada por la FMO3, pero sólo a concentraciones elevadas (10 mM), mientras que la FMO4 la oxida a concentraciones mucho más bajas, en el rango micromolar (16)

MECANISMO CATALÍTICO DE LAS *FMO*

La familia de las monooxigenasas dependientes de flavina (FMO), tiene como grupo prostético el flavín adenin dinucleótido (FAD). Cataliza la oxidación de una amplia variedad de compuestos, entre los que se incluyen componentes integrantes de la dieta, tales como trimetilamina y metionina; pesticidas como fonfos y forato; agentes terapéuticos como la imipramina, cimetidina y cetoconazol; y alcaloides de plantas como la nicotina

Las flavinas son pigmentos amarillos cuya importancia biológica radica en su capacidad para sufrir reducción con un electrón que las convierte en radicales estables semiquinonas. Esto las capacita para actuar de mediadoras entre las oxidasas comunes de dos electrones del par $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ y las oxidaciones de un electrón llevadas a cabo por los grupos hemo o hierro-sulfuro de las proteínas. Una característica que distingue a las flavoenzimas es que el grupo flavina permanece estrechamente unido al sitio activo durante todo el ciclo catalítico. La consecuencia de esto es que el sustrato y el cofactor redox tienen que distribuirse en el sitio activo.

Estas enzimas catalizan la oxidación de compuestos orgánicos por el oxígeno molecular utilizando el equivalente reductor NADPH como fuente de electrones en la reducción de uno de los átomos del oxígeno para formar agua y el otro átomo para la oxidación del sustrato, según la siguiente reacción:



Las FMO nativas unidas a membrana son extremadamente lipofílicas (16). El análisis de la secuencia indica la existencia de motivos estructurales generales y dominios de unión al cofactor para el NADPH y el FAD. Por análisis de espectrometría de masas se ha demostrado que la FMO1 de cerdo posee un residuo acetilo en el terminal N y que está N-glicosilada en posición Asp 120 (17).

Las FAD, al igual que las CYP, son proteínas de membrana que se encuentran principalmente en el retículo endoplásmico. Sin embargo, el mecanismo catalítico de las FMO difiere del de las CYP en que las primeras reaccionan con el NADPH y el oxígeno en ausencia de sustrato, para formar un intermediario 4 α -hidroperóxido flavin enzima. Al contrario que las enzimas CYP, que requieren la unión al sustrato antes de que el flujo de electrones alcance el sitio activo del grupo prostético, las FMO se encuentran en forma preactiva y lista para oxidar, tan pronto como entre en contacto con un sustrato nucleofílico que posea los requerimientos estéricos apropiados. Esta característica es digna de destacar porque indica que las FMO tienen que poseer un mecanismo estabilizador de la forma reactiva y lábil hidroperoxiflavina, incluso en presencia del ambiente fuertemente reductor de la célula, que permita acceder a esta forma estabilizada, mediante un dominio de enlace, sólo a un cierto tipo de nucleófilos. Por ejemplo, las FMO rechazan los nucleófilos fisiológicos como el glutatión, pero aceptan otros (18). Por tanto, las FMO se encuentran en la célula en forma activa, y esta forma activa estabilizada tiene que interactuar con el grupo nucleofílico, amina, tiol o fosfato del sustrato, para completar el ciclo catalítico. Todo lo que se requiere para la formación del producto es poner en contacto el sustrato (RH) con el oxígeno terminal del 4 α -hidroperóxido de la flavina. La capacidad de las FMO para permanecer estables por períodos relativamente largos (a escala biológica), en condición peroxidada, mientras encuentra equilibrio en un estado activo, puede explicar la amplia especificidad de sustratos del enzima.

Las etapas del ciclo catalítico de las FMO se conocieron a partir de estudios del espectro de los intermediarios enzimáticos (19). El ciclo sigue un orden secuencial, donde la oxidación del NADPH y la incorporación del oxígeno preceden a la interacción del sustrato con el enzima. El sustrato oxidado (ROH) se libera inmediatamente, antes de que lo hagan el coenzima oxidado (NADP⁺) y el agua (Figura 1). Este modelo ofrece una explicación al espectro

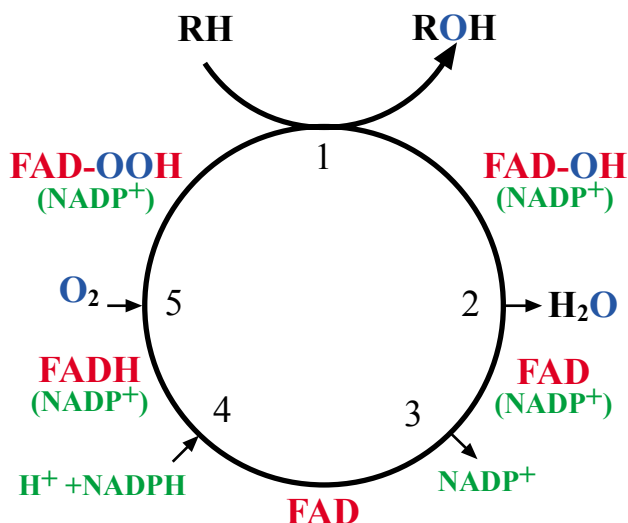


FIGURA 1. Etapas principales en el ciclo catalítico de las FMO. El producto oxidado (ROH) se forma por reacción del sustrato (RH) con el oxígeno terminal del hidroxiperóxido-flavina con previa rotura del peróxido (1). La liberación de H₂O (2) y de NADP⁺ (3) son etapas limitantes para la actividad monooxigenasa. La incorporación del NADPH, la reducción de la flavina por el NADPH (4) y la adición de oxígeno (5) completan el ciclo catalítico una vez regenerado el intermediario hidroxiperóxido (FAD-OOH). (16).

que muestra esta proteína en presencia de NADPH y oxígeno, que es virtualmente idéntico al de la 4- α -hidroperoxiflavina descrito por Kemal y Bruice (20). El derivado hidroperoxiflavina es un poderoso agente oxidante, que se muestra excepcionalmente estable cuando se une al sitio catalítico de la proteína. Como no se requiere el sustrato para la formación de la 4- α -peroxiflavina, la energía requerida para llevar a cabo la reacción está presente en el enzima antes de que el xenobiótico se ponga en contacto con la forma peroxidada del flavoenzima. Por tanto, cualquier sustrato que no sea rechazado del sitio activo, será monooxidado y liberado inmediatamente. Beaty y Ballon (21, 22) han demostrado que la etapa siguiente, la liberación del agua, es 10 veces más lenta que ninguna de las otras etapas. Así que, con la FMO1 de hígado porcino, esta etapa es la limitante y la responsable de que la V_{max} sea esencialmente la misma para todos los sustratos que no sean alquilaminas terciarias (23). La liberación del NADP⁺ (etapa 3) es la etapa previa a la formación de la forma peroxidada, que implica la entrada secuencial del NADPH (etapa 4) y el oxígeno molecular (etapa 5).

El ciclo catalítico de las FMO de mamíferos que forman intermediarios peroxiflavina estables es similar al que se muestra en la figura 1. Sin embargo, es de esperar que cualquier isoforma capaz de formar un intermediario estable sea capaz de catalizar la oxidación de compuestos orgánicos simples de sulfuro y selenio como sustratos, y que cualquier isoforma que acepte metimazol, tiourea o dimetilselenio como sustrato, podrá oxidarlos siempre que forme un intermediario estable con enzima. En ciertos casos esta regla no se cumple, y una serie de interacciones adicionales pueden alterar la etapa limitante (24, 25). Si por cualquier razón el complejo FAD-NADP⁺ abandona la superficie del enzima, la peroxiflavina puede desacoplarse y participar en otras reacciones de oxidación.

Al estudiar la relación estructura/actividad de estas enzimas se ha observado que además de la nucleofilicidad, son también importantes otros parámetros tales como, el tamaño y la carga del sustrato, los cuales pueden influir en el acceso del sustrato a la forma activa del enzima. El mecanismo de acción de las isoformas FMO1, 2, 3 y 4 es similar y las diferencias en la especificidad del sustrato pueden atribuirse a diferencias en la dimensión de la hendidura o canal que limita el acceso a la hidroperoxiflavina (26). Este modelo proporciona un mecanismo satisfactorio para la oxidación de compuestos que contienen un heteroátomo nucleófilico débil, pero no para otros como el átomo de N de las aminas. Hasta el momento se desconoce de qué forma el sustrato amina puede aumentar su nucleofilicidad y convertirse en una forma capaz de ser atacada por la hidroperoxiflavina.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS *FMO*

La regulación de la transcripción de estas enzimas contribuye significativamente a la capacidad metabólica específica del tejido y de las especies interindividuales, como también a la diferente susceptibilidad a agentes tóxicos terapéuticos y ambientales. Las FAD se expresan en elevadas concentraciones en diversos tejidos y en todas las especies animales examinadas. En humanos se han detectado variaciones de hasta 10 veces en la actividad interindividual de las FMO (27, 28). Sin embargo, al contrario que las CYP, cuya variación interindividual puede ser debida a la exposición ambiental, la expresión de los genes *FMO* no aparece afectada por agentes exógenos. Experimentos recientes del grupo de Cascales (29) han demostrado que la actividad de la FMO se induce, de manera significativa en hígado de rata por efecto de un nucleófilo débil con capacidad hepatotóxica, la tioacetamida, y esto puede explicar, en parte, las va-

riaciones interindividuales a las que nos referíamos anteriormente (28). La expresión de las diferentes isoformas FMO es selectiva del tejido y de la especie y puede estar influenciada por esteroides endógenos y también por variabilidad genética (30, 31).

Estudios sobre los mecanismos moleculares específicos que controlan la expresión de los genes *FMO*, han identificado un elemento YY1 (Ying Yang), en el interior del promotor principal del *FMO1* de conejo, y han demostrado que este factor de transcripción no es indispensable para la expresión basal del *FMO*. Se ha observado que el homeodominio que contiene el factor HNF1 α (factor nuclear hepático 1 α), el factor nuclear huérfano HNF4 α (factor nuclear hepático 4 α) y la proteína dedo de zinc YY1, juegan papeles importantes en el control de la expresión del *FMO1* de conejo. Se ha identificado un sitio de enlace YY1 en el promotor principal del *FMO1* de conejo (posición -8 a -2), dos sitios HNF1 α que se solapan (posición -132 a -105), y dos sitios HNF4 α (posición -467 a -454 y -195 a -182). Utilizando la cotransfección con vectores de expresión HNF1 α y HNF4 α se ha observado que cada uno de estos factores de transcripción intensifican la actividad del promotor del *FMO*. Por el contrario, se ha detectado que el elemento YY1 no es indispensable para la actividad basal del promotor, sino que suprime la capacidad de los dominios anteriores a dicho promotor. En contraste con los HNF, la proteína YY1 se expresa de manera ubicua, y participa en la regulación positiva o negativa de un gran número de genes (33). La mayoría de los elementos YY1 son distales al promotor sirviendo como intensificadores o silenciadores de la actividad promotora basal. Estos elementos reguladores de la transcripción están muy conservados en todas las especies, de manera que, con excepción del sitio más distal del HNF4 α , cada una de las secuencias ortólogas humanas fue capaz de competir con los elementos *cis*, de unión específica de las proteínas del gen *FMO1* de conejo.

Estos resultados no ofrecen demasiadas evidencias de la diferencia interespecies que controla la expresión del *FMO1*. La expresión del *FMO1* es indetectable en hígado humano adulto, ya que es la FMO3 la forma que predomina en hígado adulto, mientras que es el gen *FMO1* el que se expresa en hígado fetal humano (34, 35). Dado el papel reconocido del HNF1 y el HNF4 durante el desarrollo (36), ambos factores pueden jugar papeles importantes en la expresión del *FMO1* en hígado fetal humano, pero dado el grado de conservación entre los genes *FMO1* humanos y de conejo, no es probable que estos factores reguladores sean críticos para el cambio hacia la expresión del *FMO3* que se observa en hígado humano adulto.

Hasta la fecha no se han identificado polimorfismos para el gen *FMO1*. Sin embargo se han identificado variaciones en la secuencia para los genes

HNF1 α y *HNF1 α* , alguno de los cuales presentan alelos raros, mientras que otros presentan polimorfismos. Cada vez es mayor el interés por el estudio de estas variantes, al haberse detectado algunas mutaciones en estos genes en casos de diabetes (37), y demostrado que las mutaciones que conllevan la pérdida de la función de HNF4 α pueden alterar dramáticamente la expresión de genes implicados en el transporte y metabolismo de la glucosa (38).

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LAS *FMO*

El interés terapéutico de la farmacogenética va en aumento al haberse descubierto una serie de polimorfismos genéticos en los enzimas de las fases I y II del metabolismo de fármacos. En muchos casos la expresión de alelos variables con capacidad metabólica aumentada o disminuida, se relaciona con factores étnicos. La expresión polimórfica puede ejercer profundos efectos en la eficacia y toxicidad de los medicamentos y en la susceptibilidad a enfermedades inducidas por xenobióticos.

Hasta el momento se han detectado polimorfismos genéticos en dos familias, las *FMO2* y *FMO3*. En el caso de la *FMO3* se ha observado una serie de alelos mutantes, alguno de los cuales juega un papel importante en la etiología de la trimetilaminuria. Además de actuar como agente causal de esta enfermedad, los pacientes muestran alteraciones en el metabolismo de los medicamentos que utilizan la *FMO3* como ruta principal de detoxificación y bioactivación. Es un hecho conocido que los pacientes con trimetilaminuria tienen alterado el aclaramiento de la nicotina y de los antidepresivos tricíclicos.

Ya se ha comentado anteriormente que existen al menos cinco formas de *FMO* de mamíferos, algunas de ellas pueden estar presentes en muchos tejidos del mismo organismo. En humanos existe considerable variabilidad interindividual e interétnica en los niveles de *FMO*. Las cinco isoformas de la *FMO* humana están, cada una de ellas, codificada por su propio gen, que exhibe identidad del 48 al 58% de aminoácidos a través de las especies, que es consistente con la evolución de esta familia genética. Por el contrario la identidad de las formas ortólogas oscila entre el 76 y el 86%, sugiriéndose un elevado grado de conservación. En humanos los genes *FMO1*, 2, 3, y 4 se localizan en un solo grupo de 257 kbp en el cromosoma 1q23-25. El *FMO5* se localiza en 1q21. Un sexto miembro putativo de esta familia genética, el *FMO6*, se ha identificado como parte del proyecto del genoma humano (acceso n.º AL021026), pero estudios recientes sugieren que este

gen no codifica una FMO funcional debido a muchos eventos alternativos en su procesamiento. La proteína codificada por el gen *FMO6* ha revelado que comparte el 70 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la FMO3, pero, aún no se conoce una función para esta proteína (11, 39).

La descripción de las diferentes formas de las FMO se ha conseguido al conocer la secuencia primaria de los aminoácidos que las componen y de los nucleótidos que se integran en los genes que las codifican. Las variantes alélicas han sido observadas para una FMO que generalmente posee solo cambios en una sola base. Otros mutantes, sin sentido, contrasentido, deleción o truncación, pueden también afectar la función enzimática (39).

Las mutaciones identificadas en individuos con fenotipos extremadamente raros no pueden ser típicas de la variación genética de la población. Para determinar si la variación de un gen contribuye a un mayor riesgo de la enfermedad, ha de evaluarse con anterioridad la cantidad y organización de la variación genética en el gen en individuos de la población. Es probable que muchas variaciones genéticas comunes (el alelo menos frecuente mayor del 1% en la población general), que tengan efectos menores sirven para determinar la fracción principal de variación en la susceptibilidad a enfermedad humana en la población total (38, 39). Se ha examinado la prevalencia de los polimorfismos más prominentes del *FMO3* humano en poblaciones de canadienses franceses y de australianos caucásicos (40), de europeos (41) y asiáticos (42). Cashman *et al* (43) han estudiado las frecuencias relativas de sitios sencillos o múltiples en las configuraciones alélicas, haplotipos y genotipos de los tres polimorfismos principales comunes del *FMO3* humano en muestras de caucásicos no hispanos, americanos africanos, asiáticos e hispanos, determinados sin mirar su estado de salud.

Existe una considerable variabilidad interindividual en la actividad *in vitro* de la FMO3 microsómica de humano adulto (variabilidad de 7 veces en la N-oxigenación de aminas y de 3 veces en la S-oxigenación de sulfuros). Como se considera que la FMO3 humana no se induce aparentemente por administración de agentes químicos o fármacos, las diferencias en el metabolismo selectivo de la FMO3 tienen que ser debidas a efectos genéticos. Se han observado variaciones considerables en las frecuencias relativas de alelos sencillos y múltiples, haplotipos y genotipos del *FMO3* a partir de muestras de individuos sanos. Algunas de las variantes comunes del *FMO3* se recogen en la Tabla 1 (43).

TABLA 1

Lista de cambios en aminoácidos y actividad r relativa a partir de la r egi3n codificadora del FMO3 humano. Variaciones en poblaciones de americanos, africanos y caucásicos (43)

<i>Cambio en aminoácidos</i>	<i>Actividad enzimática aparente (in vitro/in vivo)</i>
D132H	Disminuida
S147S	Normal
E158K	Disminuida
V257M	Normal
N285N	Normal
E308G	Disminuida

El gen *FMO3* no es el único gen que posee variaciones genéticas significativas. Hasta la fecha se han observado variaciones en el DNA genómico de todos los genes *FMO*. Por ejemplo los genes *FMO1*, *FMO2*, *FMO3*, *FMO4* y *FMO5* tienen 34, 57, 40, 30 y 40 variantes en la secuencia del cromosoma 1 de humano. No se sabe si esta heterogeneidad genética predispone a las poblaciones a metabolismo anormal o adverso de fármacos, predominantemente por el *FMO3*, pero esta posibilidad existe y se conoce la relativa a la trimetilaminuria (44).

ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE LA *FMO3*. TRIMETILAMINURIA

Ciertas mutaciones del gen *FMO3* humano se han relacionado con anomalías en el metabolismo de fármacos y agentes químicos. Por ejemplo, la *N*-oxigenación anormal de la trimetilamina se ha demostrado que va unida a mutaciones del gen *FMO3*. Se desconoce si existen bases farmacogenéticas para explicar el metabolismo anormal de fármacos por la *FMO3* (45). Estas variaciones interindividuales contribuyen a la susceptibilidad a reacciones adversas a agentes químicos o a exageradas respuestas clínicas. Un ejemplo extremo de este fenómeno es el error innato del metabolismo que causa la defectuosa *N*-oxigenación de la trimetilamina derivada de la dieta (44). La destoxicación de la trimetilamina a su metabolito no volátil y benigno, la trimetilamina *N*-óxido,

ocurre normalmente con un 97 % de eficiencia dando lugar a un cociente trimetilamina N-óxido/trimetilamina de 97/3. Hasta la fecha se han descrito unas 17 mutaciones del *FMO* humano de las cuales 13 se asocian con la trimetilaminuria (45-47). Además del fenotipo de trimetilaminuria severa, la evidencia de una alteración menos severa puede estar relacionada con disfunción hepática u otras condiciones, o debida a otros polimorfismos humanos no tan severos.

La trimetilaminuria fue descubierta en 1970 por Humbert (48), en una niña de seis años con infecciones pulmonares múltiples, en la que se encontró una deficiencia en la oxidación de la trimetilamina en una biopsia hepática. El gen mutado, responsable de la enfermedad fue identificado en 1997 por Dolphin (46), como el gen que codifica la *FMO3*. En condiciones normales la colina y el óxido de trimetilamina se ingieren en la dieta y se degradan por las bacterias del intestino produciendo trimetilamina, la cual se absorbe y transporta al hígado donde se oxida por la *FMO3* a trimetilamina- *N*-óxido y se excreta por orina. En casos de trimetilaminuria, existe una deficiencia en la actividad *FMO3*, lo que ocasiona una menor oxidación de la trimetilamina, la cual se acumula y tiene que ser eliminada como tal por orina, sudor y aliento, lo cual origina el síndrome de olor corporal.

La posibilidad de otras reacciones idiopáticas relacionadas a genes humanos *FMO3* raros surge de la observación que los individuos que sufren de trimetilaminuria severa tienen síntomas adicionales tales como hipertensión, reacciones adversas a la tiramina y depresión (49). En un modelo animal de actividad *FMO3* disminuida, la *N*-oxigenación del tamoxifeno y la nicotina decrecieron significativamente (50). Se ha observado que las ratas tratadas con los indoles quimiopreventivos presentes en las crucíferas como el indol-3-carbinol o sus productos de condensación ácida, similares a los que se producen en el contenido ácido del estómago, reducen significativamente la destoxicación de la nicotina. Esto concuerda con lo observado en dos pacientes que sufrían trimetilaminuria, que mostraban también alteraciones en la oxidación de la nicotina (51). Para el tamoxifeno, la inhibición de la *N*-oxidación, puede disminuir el riesgo de desarrollar efectos colaterales tóxicos si la *N*-oxidación catalizada por la *FMO* es la responsable de la unión covalente a las proteínas, dependiente del tamoxifeno (52). Es posible, por tanto, que individuos con menor actividad *FMO3* tengan el potencial de alterar la toxicidad de los fármacos o agentes químicos y de inducir reacciones adversas.

La trimetilamina es un producto natural derivado de alimentos ricos en colina, tales como pescado marino, yema de huevo, legumbres, soja o guisantes. Cada individuo posee dos copias del gen *FMO3*, heredadas de los progenitores. El padecimiento de la trimetilaminuria aparece cuando ambas copias son de-

fectuosas. Aunque esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1970, hasta la fecha son pocos los casos recogidos en la literatura y el fenotipo no ha sido todavía bien definido. Los individuos afectados pueden presentar síntomas en la infancia y en la pubertad. Los síntomas aparecen con una variabilidad de expresiones y agudeza muy distintas entre las poblaciones. Algunos pacientes no presentan los síntomas típicos hasta la edad adulta. En suma, hay un severo estigma asociado a esta enfermedad, que incluye problemas dermatológicos y un amplio rango de síntomas neurológicos. Por otro lado la trimetilaminuria ha sido observada en pacientes con afecciones renales y hepáticas, en alteraciones del metabolismo de la carnitina y la colina, anomalías hematológicas y deficiencia en la *N*-oxidación nicotínica, entre otras enfermedades. La verdadera incidencia y prevalencia ha sido imposible de evaluar exactamente hasta el momento. Aunque en Inglaterra se sabe que afecta a uno de cada 25.000, la incidencia puede variar según la población, por ejemplo en Ecuador y en Guinea es mayor (53).

El descubrimiento del origen genético de la enfermedad no ofrece una cura inmediata, pero ofrece una esperanza genética o terapia basada en enzimas para el futuro. En el presente, los que sufren esta enfermedad pueden encontrar mejoría por restricción en su dieta de alimentos ricos en colina.

La trimetilaminuria se asocia algunas veces con problemas específicos de salud: disfunciones del hígado, diabetes, problemas digestivos (parásitos, etc.) e infecciones con levadura, y en estas condiciones requieren la atención de un profesional. Un estudio médico en el Imperial College de Londres nos muestra como algunos pacientes presentaron desequilibrios en la flora intestinal. Si esos microorganismos resultan afectados por agentes terapéuticos (antibióticos y esteroides) o un exceso de azúcar, un elevado nivel de grasa, mucha carne roja, o baja dieta en fibra, se registra un empeoramiento en la enfermedad así como otros numerosos problemas. La repoblación del intestino con bacterias beneficiosas puede ayudar a normalizar la flora intestinal. Los enfermos con trimetilaminuria deberían suplementar la dieta con *Lactobacillus acidophilus* y bifidobacterias, para estimular su flora intestinal. Los cambios en la dieta, reduciendo alimentos ricos en carnitina, lisina, lecitina, y colina pueden reducir la intensidad del problema en casos severos (53).

La trimetilaminuria es una enfermedad metabólica transmisible por herencia como un rasgo genético autosómico dominante. Puede también ser una enfermedad adquirida de forma secundaria al tratamiento con grandes dosis de L-carnitina, o cualquier derivado de dicho aminoácido. La trimetilamina se produce en condiciones normales por las bacterias intestinales encargadas del desdoblamiento de la colina de la dieta. La trimetilamina formada, se oxida en el hígado

do por la acción de la FMO3. La trimetilamina *N*-óxido carece de olor y se elimina por la orina. El déficit de esta enzima produce una eliminación masiva de trimetilamina por la orina, por el sudor y por la respiración, lo cual confiere un olor corporal desagradable, con importantes consecuencias psíquicas y sociales. La restricción en la dieta de pescado, hígado, huevos y otras fuentes de colina, como nueces y cereales, disminuye el desagradable olor corporal de forma importante (51, 52).

El diagnóstico se hace determinando trimetilamina y trimetilamina *N*-óxido en orina de 24 horas y el tratamiento consiste en una dieta baja en colina, y por breves períodos se puede indicar neomicina o metronidazol para reducir la actividad de la flora intestinal y suprimir así la producción de trimetilamina. Es fundamental advertir a los pacientes y familiares que los estados febriles, la menstruación, y el estrés, pueden agravar los síntomas. La determinación de trimetilaminuria en todas sus formas y manifestaciones no es fácil. Algunos individuos pueden controlar su enfermedad por la dieta, pero hay otros que no responden a la dieta. Como es frecuente que se encuentren involucrados varios sistemas orgánicos, la prevención y tratamiento de toda variedad de síntomas asociados y sus tratamientos pueden ser complejos (53).

CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD

Esta enfermedad se puede clasificar en dos grandes grupos: las de etiología genética, hormonal o yatrogénica, y las que se deben al incremento de la concentración de sustrato. Ciertos aspectos de estas dos categorías se relacionan íntimamente y factores de ambas pueden actuar juntos. Otra clasificación divide esta enfermedad en las siguientes: genéticas, adquiridas, infantiles, transitorias, debidas a incremento de precursores y debidas a estados de enfermedad (53).

Genéticas primarias. Como la FMO3 responsable de la *N*-oxidación de la trimetilamina es muy polimórfica, algunas mutaciones solas o en combinación, se asocian con la actividad alterada de este sistema. Parece que existen combinaciones de polimorfismos intragénicos que determinan formas menos severas del padecimiento.

Formas adquiridas. Se han detectado algunos casos donde la condición diagnosticada emerge en la edad adulta. Estos pacientes no tenían antecedentes familiares ni historia previa del padecimiento durante la infancia. Sin embargo, existía una evidencia común, un episodio de hepatitis de posible naturaleza ví-

rica. Esta infección puede ser la causa de la trimetilaminuria vía un mecanismo genético que puede ser permanente.

Formas infantiles. La alimentación con una dieta rica en colina a niños prematuros originó la aparición de un olor fuerte y desagradable que desapareció cuando se eliminó la fuente de colina. Cuando la fórmula que contenía colina se administró a esos mismos niños ocho semanas después, el olor no reapareció y el problema se atribuyó a la inmadurez inicial del enzima *N*-oxigenante (48). Han sido descritos otros casos de formas infantiles que han revelado un componente de heterocigosidad para diversas mutaciones, más frecuente que lo que se había reconocido previamente (53, 54).

Formas transitorias (exceso de precursores, menstruación)

En algunas mujeres se ha observado que sus problemas de hedor corporal se debían a que la trimetilaminuria se exacerba al inicio de la menstruación. Existen evidencias de la influencia de las hormonas esteroideas sobre la actividad de la FMO en roedores y en humanos (53, 55). En algunos casos la forma transitoria de este padecimiento se atribuye a un incremento de precursores que saturan los niveles de FMO3 existentes. Diversos pacientes se han quejado de emitir olor desagradable después de dosis orales terapéuticas de colina (8-20g/día), administradas para tratar la corea de Huntington, debido a que la gran cantidad de colina ingerida, superaba la capacidad de la FMO de convertir la trimetilamina en su derivado *N*-óxido (56). Un paciente que recibía terapia con colina para la enfermedad de Alzheimer también sufría el desagradable olor de esta enfermedad (48). Los precursores de la trimetilamina, son recomendados a menudo en dosis bastante elevadas como suplementos alimenticios y dietas alternativas.

Formas debidas a estados de enfermedad

La función hepática alterada o la existencia de anastomosis portosistémicas en pacientes con cirrosis hepática pueden interferir considerablemente con el aclaramiento de la trimetilamina absorbida por el tubo digestivo. En estos pacientes la concentración de trimetilamina sanguínea se eleva, jugando quizás un papel en el desarrollo de la encefalopatía hepática y en el estado de coma (57, 58). En pacientes urémicos el crecimiento anormal de bacterias en el intestino delgado incrementa de manera notable la liberación de trimetilamina a partir de los precursores alimenticios.

FMO Y ENFERMEDAD HEPÁTICA CRÓNICA

La menor actividad de la FMO3 se debe a defectos hereditarios en el gen *FMO3* (forma primaria) o a enfermedades hepáticas crónicas (forma secundaria o adquirida). Es un hecho conocido que los pacientes con hepatitis crónica vírica presentan olor desagradable, asociado con actividades muy disminuidas de FMO.

La hepatitis crónica vírica se caracteriza por infiltración de linfocitos T citotóxicos en el parénquima hepático, y también por la presencia abundante de citoquinas proinflamatorias en hígado, como el $\text{TNF}\alpha$, $\text{IF}\gamma$ y moléculas de adhesión en el hígado. Las citoquinas inflamatorias elevan la expresión de la iNOS, y los niveles de NO, lo cual conlleva una disminución en el contenido hepático del mRNA P-450 o bien produce una directa inhibición de la propia actividad P-450 microsómica (59, 60).

La superproducción de NO, por inyección intraperitoneal de lipopolisacárido a ratas e inducción de la iNOS, disminuyó también el contenido hepático de FMO1 *in vivo*, por supresión de la expresión de su gen sin interaccionar directamente con el grupo prostético derivado de la flavina (61). Morgan *et al* (62) han evaluado la actividad de la FMO en voluntarios sanos y en enfermos diagnosticados de hepatitis vírica, cirrosis y hepatocarcinoma y han encontrado que el mRNA de la iNOS, no detectable en hígado normal, se encontraba muy elevado en hígado cirrótico y canceroso (63). Por el contrario, los niveles del mRNA y de la FMO eran más elevados en hígado normal que en hígado cirrótico o canceroso. Estos resultados sugieren que la superproducción de NO puede ser la causa de la supresión, *in vivo* de la expresión del gen *FMO3* hepático, lo cual causa una reducción en la actividad FMO3. Posteriormente se ha demostrado que el NO puede modular la actividad de la FMO3 por nitrosilación reversible de los residuos de cisteína presentes en la proteína FMO3. Además, en presencia de peroxinitrito, que se genera en caso de inflamación por reacción del NO con el radical superóxido, se produce la nitración irreversible de los residuos de tirosina. Combinando estos resultados se propone que la superproducción de NO inhibe la FMO3 por dos vías: *reversible* (modulación), por nitrosilación de los residuos de cisteína e *irreversible* (nitración y destrucción), mediante la formación de peroxinitrito, por nitración de los residuos de tirosina.

Estos hallazgos (69) indican que la menor actividad FMO3 observada en pacientes con hepatitis crónica vírica, puede ser causada indirectamente por una superproducción de NO resultante de la inducción de la expresión de la iNOS en hepatocitos de estos enfermos, la cual hace descender la expresión del mRNA

del FMO3 (supresión) o directamente por nitrosilación reversible de los residuos de cisteína, cuando el radical superóxido está ausente (modulación). El NO puede también causar la destrucción de la proteína FMO3 por nitración irreversible de los residuos de tirosina, en este caso en presencia del radical superóxido. En el hígado de estos enfermos, estos mecanismos pueden operar concertadamente (destrucción, modulación y supresión) comprometiendo la actividad FMO3 y causando la forma secundaria de trimetilaminuria observada en casos de hepatitis crónica vírica (63).

TRATAMIENTO

El tratamiento primario de la trimetilaminuria se basa en la restricción de la colina de la dieta. La exclusión de alimentos con alto contenido en colina puede disminuir la producción de trimetilamina y mejorar los síntomas (64). Sin embargo, la correlación colina de la dieta y trimetilaminuria no siempre es absoluta. Los polimorfismos en la FMO3 defectiva hepática pueden influir sobre la tolerancia de los pacientes a la colina (65). Otras influencias fisiológicas y ambientales conocidas o desconocidas, tales como microflora intestinal, estrés, inicio de la pubertad, menstruación, etc., pueden agravar los síntomas.

Antes de entrar a discutir las dietas restringidas en colina en pacientes con trimetilaminuria, es importante revisar el papel que juega la colina en el organismo. La colina es un componente fundamental requerido para la síntesis de fosfolípidos, transferencia de grupos metilo y síntesis de la acetilcolina (neurotransmisor). En base a su funcionalidad, la colina interviene de manera importante en la función hepática y cardiovascular, la reproducción y el desarrollo del cerebro (65). Se ha considerado un compuesto esencial/condicional porque puede ser sintetizado por el organismo vía metilación de la fosfatidiletanolamina y porque no se conoce una verdadera deficiencia en humanos. Existen numerosas evidencias que demuestran de qué manera es esencial la colina, ya que es un hecho reconocido que concentraciones disminuidas de colina plasmática se relacionan con hígado graso en humanos con alimentación deficitaria en colina. En condiciones normales la colina libre se absorbe por el intestino delgado, pero un exceso de colina puede sobrepasar la capacidad de absorción del lumen y será metabolizada a trimetilamina por las bacterias del colon. Por tanto, los pacientes con trimetilaminuria que consumen colina en cantidades superiores a su capacidad de absorción se recomienda lo siguiente: restricción dietética de los precursores de la trimetilamina (colina, carnitina, fosfatidilcolina y lecitina); suplemento farmacológico de riboflavina para elevar la actividad hepática de la FMO3; elimina-

ción del exceso de trimetilamina intestinal mediante la administración de antibióticos como el metronidazol por vía oral, para disminuir la flora intestinal anaerobia, e incrementar el tránsito intestinal mediante laxantes (lactulosa).

Se aconseja el suplemento de folato en pacientes que mantienen una dieta restringida en colina, ya que esta restricción eleva el requerimiento de folato, donador de grupos metilo. Desde el punto de vista teórico, los pacientes con un defecto en FMO3 podrían beneficiarse con un suplemento dietético de riboflavina, que puede ayudar a estabilizar la actividad residual de la FMO3 incrementando su vida media. Las mujeres con trimetilaminuria que se encuentren en estado de embarazo o lactancia no deben restringir la colina de la dieta. Este compuesto es crítico para el desarrollo del cerebro y las células nerviosas del feto. Durante el embarazo se transfieren al feto grandes cantidades de colina a través de la placenta, lo que origina una concentración diez veces mayor en el líquido amniótico que en la sangre de la madre. Este flujo tan elevado de colina a través de la placenta trae consigo una depleción de las reservas de colina maternas. El requerimiento de cantidades elevadas de colina persiste en el neonato que la consigue de la leche materna.

En resumen, muchos estudios en la actualidad se ocupan de las dietas restringidas en colina, pero la información sobre el contenido de colina de las dietas es limitado ¿Qué cantidad de colina debe ingerirse para reducir los síntomas en pacientes con trimetilaminuria? Se necesita conocer cómo alcanzar un cuidadoso equilibrio entre la teoría y los requerimientos de los pacientes para una intervención nutricional que sea efectiva y reporte beneficio a nivel clínico.

ABREVIATURAS

cDNA: DNA complementario.

CYP: monooxigenasas microsómicas dependientes del citocromo P-450.

FAD: dinucleótido de flavina y adenina.

FMN: mononucleótido de flavina.

FMO: monooxigenasas microsómicas dependientes de flavina o flavin monooxigenasas.

GSSG: glutation oxidado.

HNF1 α : Factor nuclear hepático 1 α . Factor de transcripción.

HNF4 α : Factor nuclear hepático 4 α . Factor de transcripción.

IF γ : Interferón gamma.

mRNA: RNA mensajero.

NADP⁺: dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado.

NADPH: dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido. Equivalente reductor.

NO: óxido nítrico.

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible.

TNF α : Factor de necrosis tumoral α . Citoquina.

YY1: Factor de transcripción, proteína dedo de Zn (Ying Yang).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Cascales M (2001) Monooxigenasas microsómicas de función mixta. En : *Mecanismos de hepatotoxicidad*. Real Academia de Doctores. Madrid ISBN 84-920377-4-1 pp 73-98.
- (2) Cascales M (2005) Otras monooxigenasas microsómicas: Las dependientes de flavina. En Citocromo P-450 (editoras M Cascales y MJ Gómez-Lechón) Real Academia Nacional de Farmacia/Instituto de España. Madrid ISBN 84-85558-76-2. pp 281-311.
- (3) Krueger SK y Williams DE (2005) Mammalian flavin-containing monooxygenases: Structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacology & Therapeutics* **106**, 357-387.
- (4) Ziegler DM y Mitchell CH (1972) Microsomal oxidase IV : properties of mixed function amine oxidase isolated from pig liver microsomes. *Arch Biochim Biophys* **150**, 116-125.
- (5) Williams DE, Ziegler DM, Nordin DJ, Hale SE, Masters BSS (1984) Rabbit lung flavin-containing monooxygenase is immunochemically and catalytically distinct from the liver enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **125**, 116-122.
- (6) Tines RE, Sabourin PJ, Hodgson E (1984) Identification of distinct hepatic and pulmonary forms of microsomal flavin-containing monooxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* **126**, 1069-1075.
- (7) Lomri N, Gu Q y Cashman JR (1992) Molecular cloning of the flavin-containing monooxygenase (form II) cDNA from adult human liver. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 1685-1689.

- (8) Phillips IR, Dolphin CT, Clair P, Hadley MR, Hutt AJ, McCombie RR, Smith RL y Shephard EA (1995) The molecular biology of the flavin-containing monooxygenase of man. *Chem Biol Interact* **96**, 17-32.
- (9) Hines RN, Cashman JR, Philpot RM, Williams DE y Ziegler DM (1994) The mammalian flavin-containing monooxygenases: Molecular characterization and regulation of expression. *Toxicol Appl Pharmacol* **125**, 1-6.
- (10) Rettie AE y Fisher MB (1999) Transformation enzymes: oxidative, non-P450. En: *Handbook of drug metabolism* (ed Woolf TF) pp 132-151. Marcel Dekker, Inc, Nueva York.
- (11) Hines RN, Hopp KA, Franco J, Saeian K y Begun FP (2002) Alternative processing of the human FMO6 gene renders transcripts incapable of encoding a functional flavin-containing monooxygenase. *Mol Pharmacol* **62**, 320-325.
- (12) Hernández D, Janmohamed A, Chandan P, Phillips IR y Shephard EA (2004) Organization and evolution of the flavin containing monooxygenase genes of human and mouse. Identification of novel gene and pseudogene clusters. *Pharmacogenetics* **14**, 117-130.
- (13) Dolphin C, Shephard EA, Povey S, Palmer CAN, Ziegler DM, Ayes R, Smith RL, Phillips IR (1991) Cloning, primary sequence, and chromosomal mapping of a human flavin-containing monooxygenase (FMO1). *J. Biol. Chem.* **266**, 12379-12385.
- (14) Shephard EA, Dolphin C, Povey S, Smith R, Phillips I. (1991) The genes encoding the flavin-containing monooxygenases FMO1 and FMO2 are located on human chromosome 1q. (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet.* **58**, 1863.
- (15) Shephard EA, Dolphin CT, Fox MF, Povey S, Smith R y Phillips IR (1993) Localization of genes encoding three distinct flavin-containing monooxygenases to human chromosome 1q. *Genomics* **16**, 85-89.
- (16) Ziegler DM. Flavin-containing monooxygenases: enzymes adapted for multisubstrate specificity. (1990) *Trends Pharmacol Sci* **11**, 321-324.
- (17) Korsmeyer KK, Guan S, Yang ZC, Falick AM, Ziegler DM, Cashman JR. (1998) N-Glycosylation of pig flavin-containing monooxygenase form 1: determination of the site of protein modification by mass spectrometry *Chem Res Toxicol.* **11**, 1145-1153.
- (18) Ziegler DM. Recent studies on the structure and function of multisubstrate flavin-containing monooxygenases. (1993) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **33**, 179-199.
- (19) Poulsen DD y Ziegler DM (1995) Multisubstrate flavin-containing monooxygenases: Applications of mechanism to specificity. *Chem Biol Interact* **96**, 57-73.
- (20) Kemal C y Bruice (1976) Simple síntesis of a 4-hydroperoxy adduct of a 1.5-dihydroflavine. Preliminary studies of a model for bacterial luciferase. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**, 995-999.

- (21) Beatty N y Ballou D (1981) The reductive half-reaction of liver microsomal FAD-containing monooxygenase. *J Biol Chem* **256**, 4611-4618.
- (22) Beatty N y Ballou D (1981) The oxidative half-reaction of liver microsomal FAD-containing monooxygenase. *J Biol Chem* **256**, 4619-4625.
- (23) Ziegler DM y Poulsen DD (1998) Catalytic mechanism of FMO-catalyzed N- and S- oxidations. En: *Drug Metabolism toward the next millennium*. (ed NJ Gooderham) IOS Press Amsterdam pp 30-38.
- (24) Cashman JR (1998) Stereoselectivity in S- and N- oxygenation by the mammalian flavin-containing and cytochrome P-450 monooxygenases. *Drug Metab Rev* **30**, 675-707.
- (25) Cashman JR (2002) Human and plant flavin-containing monooxygenase N-oxygenation of amines: detoxication vs. bioactivation. *Drug Metab Rev* **34**, 513-521.
- (26) Ziegler DM (2002) An overview of the mechanism, substrate specificities, and structure of FMOs. *Drug Metab Rev* **34**, 503-511.
- (27) Overby LH, Carver GC y Philpot RM (1997) Quantitation and kinetic properties of hepatic microsomal and recombinant flavin-containing monooxygenases 3 and 5 from humans. *Chem Biol Interact* **106**, 29-45.
- (28) Cashman JR (2000) Human flavin-containing monooxygenase: substrate specificity and role in drug metabolism. *Curr Drug Metab* **1**, 181-192.
- (29) Zaragoza A, Andrés D, Sarrión D y Cascales M (2000) Potentiation of thioacetamide hepatotoxicity by phenobarbital in rats. Inducibility of FAD monooxygenase system and age effect. *Chem Biol Interact* **124**, 87-101.
- (30) Whetstone JR, Yueh M-F, McCarver DG, Williams DE, Park C-S, Cha Y-N, Dolphin CT, Shephard EA, Phillips IR e Hines RN (2000) Frequency determination of a premature stop codon mutation in the human flavin-containing monooxygenase 2 gene (FMO2) and detection of expressed protein in African-Americans. *Toxicol App Pharmacol* **168**, 216-224.
- (31) Luo Z e Hines R W (2001) Regulation of flavin-containing monooxygenase1 expression by Ying Yang 1 and hepatic nuclear factor 1 and 4. *Mol Pharmacol* **60**, 1421-1430.
- (32) Thomas MJ y Seto E (1999) Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? *Gene* **236**, 197-208.
- (33) Dolphin CT, Cullingford TE, Shephard EA, Smith RL y Phillips IR (1996) Differential development and tissue-specific regulation of expression of the gene encoding three members of the flavin-containing monooxygenase family of man. FMO1, FMO2 and FMO4. *Eur J Biochem* **235**, 683-689.

- (34) Yeung CK, Lang DH, Thummel Key retie AE (2000) Immunoquantitation of FMO1 in human liver, kidney and intestine. *Drug Metab Dispos* **28**, 1107-1111.
- (35) Cereghini S (1996) Liver - enriched transcription factors and hepatocyte dif ferentiation *FASEB J* **10**, 267-282.
- (36) Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M y Bell GI (1996) Mutations in hepatocyte nuclear factor 4a gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Nature (Lond)* **384**, 458-460.
- (37) Chevre J-C, Hani EH, Boutin P, Vaxillaire M, Blanche H, Vionnet N, Pardini VC, Timsit J, Larger E y Charpentier G (1998) Mutation screening in 18 caucasian families suggest the existence of Other MODY genes. *Diabetologia* **41**, 1017-1023.
- (38) Stoffel M y Duncan SA (1997) The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4alpha regulates the expression of genes required for glucose transport and metabolism *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 13209-13214.
- (39) Cashman JR (2002) Interindividual dif ferences of human flavin containing monooxygenase 3: genetic polymorphism and functional variation. *Drug Metab Disp* **30**, 1043-1052.
- (40) Risch N y Merikangas K (1996) The future genetic studies of complex human diseases, *Science (Wash DC)*, **273**, 1516-1517.
- (41) Sachse C, Ruschen S, Dettling M, Scheley J, Bauer S, Muller -Oerlinghausen B, Roots I y Brockmoller J (1999) Flavin monooxygenase 3 (FMO3) polymorphism in a white population all mutation linkage, functional effects on clozapine and caffeine metabolism. *Clin Pharmacol Ther* **66**, 431-438.
- (42) Kang JH, Chung WG, Lee KH, Park CS, Shin IC, Roh HK, Dong MS y Back HM (2000) Phenotypes of flavin-containing monooxygenase activity determined by ranitidine oxidation are positively correlated with genotypes of linked FMO3 gene mutations in a Korean population. *Pharmacogenetics* **10**, 67-78.
- (43) Cashman JR, Zhang J, Leushner J y Braun A (2001) Population distribution of human flavin-containing monooxygenase form 3: gene polymorphisms. *Drug Metab Disp* **29**, 1629-1637.
- (44) Mitchel SC, Zhang AQ, Noblet JM, Gillespie S, Jones N y Smith RL (1997) Metabolic disposition of [14C]trimethylamine N-oxide in rat: variation with dose and route of administration. *Xenobiotica* **27**, 1187-1197.
- (45) Cashman JR, Bi Y-A, Lin J, Youil R, Knight M, Forrest S y Treacy E (1997) Human flavin-containing monooxygenase form 3: cDNA expression of the enzymes containing aminoacid substitutions observed in individuals with trimethylaminuria. *Chem Res Toxicol* **10**, 837-841.

- (46) Dolphin CT, Riley JH, Smith RL, Shephard EA y Phillips IR. (1997) Structural organization of the human flavin-containing monooxygenase 3 gene (FMO3), the favored candidate for fish-odor syndrome, determined directly from genomic DNA. *Genomics* **46**, 260-267.
- (47) Dolphin CT, Janmohamed A, Smith RL, Shephard EA y Phillips IR (2000) Compound heterozygosity for missense mutations in the flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) gene in patients with fish-odour syndrome. *Pharmacogenetics* **10**, 799.
- (48) Humbert JA, Hammond KB y Hathaway WE (1970). Trimethylaminuria: the fish-odour syndrome. *Lancet* **2**, 770-771.
- (49) Treacy EP, Akerman BR, Chow LML, Youil R, Bibeau C, Lin J, Bruce AG, Knight M, Danks DM, Cashman JR y Forrest SM (1998) Mutations of the Flavin-containing monooxygenase gene (FMO3) cause trimethylaminuria, a defect in detoxication. *Human Mol Genetics* **7**, 839-845.
- (50) Umemoto A, Monden Y, Kamaki K, Suwa M, Kanno Y Suzuki M, Lin C-X, Ueyama Y, Momen MA, Ravindernath A y Shibutani S (1999) Tamoxifen-DNA adducts formed by amoxifen N-oxide. *Chem Res Toxicol* **12**, 1083-1089.
- (51) Cashman JR, Xiong Y, Lin J, Verhagen H, van Poppel G, van Bladeran PJ, Laqr-sen-Su S y Williams DE (1999) *In vitro* and *in vivo* inhibition of human flavin-containing monooxygenase form 3 (FMO3) in the presence of dietary indoles. *Biochem Pharmacol* **58**, 1047-1055.
- (52) Cashman JR, Camp K, Fakharzadeh SS, Fennessey PV, Hines RN, Mamer OA, Mitchell SC, Preti G, Schlenk D, Smith RL, Tjoa SS, Williams DE y Yannicelli SY (2003) Biochemical and clinical aspects of human flavin-containing monooxygenase form 3 (FMO3) related to trimethylaminuria, *Curr Drug Metab* **4**, 151-170.
- (53) Mitchell S, Ayesh R, Barret T, y Smith R (1999) Trimethylaminuria and foetor hepaticus. *Scand J Gastroenterol* **34**, 524-528.
- (54) Mayatepek E y Kohlmuller D (1998) Transient trimethylaminuria in childhood. *Acta Pediat* **87**, 1205-1207.
- (55) Ayesh R, Mitchell SC y Smith RL (1995) Dysfunctional N-oxidation of trimethylamine and the influence of testosterone treatment in man. *Pharmacogenetics* **5**, 244-246.
- (56) Growdon JH, Cohen EL y Wurtmann RJ (1977) Huntington's disease: clinical and chemical effects of choline administration. *Ann Neurol* **1**, 418-422.
- (57) Marks R, Dudley F, y Wan A (1978) Trimethylamine metabolism in liver disease. *Lancet* **1**, 508-509.
- (58) Mitchell S (1999) Trimethylaminuria: susceptibility of heterozygotes. *Lancet* **354**, 2164-2165.

- (59) Wink DA, Osawa Y, Darbyshire JF, Jones CR, Eshenaur SC y Nims R W (1993) Inhibition of cytochrome P-450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent *Arch Biochem Biophys* **300**, 115-123.
- (60) Carlson TJ and Billings RE (1996) Role of nitric oxide in the cytokine-mediated regulation of cytochrome P-450. *Mol Pharmacol* **49**, 796-801.
- (61) Park C-S, Baek H-M, Chung W-G, Lee K-H, Ryu S-d y Cha Y-N (1999) Suppression of flavin containing monooxygenase by overproduced nitric oxide in rat liver. *Mol Pharmacol* **56**, 507-514.
- (62) Morgan ET, Ullrich V, Daiber A, Schmidt P, Takaya N, Shoun H, McGiff JC, Oye-kan A, Hanke CJ, Campbell WB, Park CS, Kang JS, Yi HG, Cha YN, Mansuy D y Boucher JL (2001) Cytochromes P-450 and flavin monooxygenases targets and sources of nitric oxide. *Drug Metab Dispos* **29**, 1366-1376.
- (63) Majano PL, Garcia-Monzon C, Lopez-Cabrera M, Lara-Pezzi E, Fernandez-Ruiz E, Garcia-Iglesias C, Borque MJ y Moreno-Otero R (1998) Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis. Evidence for a virus-induced gene upregulation. *J Clin Invest* **101**, 1343-1352.
- (64) Hollinger MA y Sheikholislam B (1991) Effects of dietary alteration on trimethylaminuria as measured by mass spectrometry. *J Int Med Res* **19**, 63-66.
- (65) Zeisel SH. (1992) Choline: an important nutrient in brain development, liver function and carcinogenesis. *J Am Coll Nutr* **11**, 473-481.

Metabolismo y alteraciones en la regulación del calcio

ANTONIO L. DOADRIO VILLAREJO

INTRODUCCIÓN

El Calcio en los medios biológicos, se encuentra como catión divalente Ca^{2+} , con características neutras, por lo que es soluble en el plasma humano a $\text{pH}=7,4$ y puede estar como tal catión, sin precipitar. No obstante, no está libre, sino hidratado, con un gran número de moléculas de agua, estimadas entre 10 y 12, lo que es importante en cuanto a su actuación como segundo mensajero de los seres vivos, ya que debido a su mayor coordinación, es más específico que el Mg^{2+} en su unión a las proteínas dianas que modulan las señales biológicas a nivel intracelular.

Es importante considerar, a qué aniones se une el Ca^{2+} en el medio biológico, ya que el calcio forma sales insolubles o solubles, dependiendo de aquellos. Así, el cloruro es soluble, especialmente a pH ácido, y así, el calcio es soluble en el estómago, pero los fosfatos son poco solubles, sobre todo el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ que se forma a pH alcalino, por lo que precipita en el intestino y no se absorbe. Los fosfatos, resultan por tanto antagónicos del calcio y se eliminan por heces; solo el fosfato diácido CaH_2PO_4 es soluble y se elimina por orina.

El Calcio tiene una buena biomovilización, a partir de sus fuentes naturales, y llega al ser humano por los alimentos en cantidad suficiente; pero su escasa absorción, hace que se puedan producir problemas carenciales, sobre todo en estados fisiológicos de gran demanda de calcio, como el embarazo o la lactancia.

El Calcio no es un gran formador de complejos biológicos, pero si que se une con gran especificidad a proteínas intracelulares que modulan su señal como segundo mensajero. Su unión preferente es a átomos donadores de oxígeno, comportándose en este sentido como ácido duro.

METABOLISMO DEL CALCIO. REGULACIÓN EXTRACELULAR.

En la figura 1 se muestra un esquema del metabolismo del calcio en el ser humano.

La absorción del calcio, que proviene de los alimentos, se realiza a nivel intestinal. La absorción es escasa, y es necesaria una proteína específica de absorción de calcio, que se fabrica «in situ», en la membrana intestinal.

La absorción de calcio por vía oral es aproximadamente del 30%. Los mecanismos de transporte activo que operan en la porción superior del intestino delgado, varían según el tipo de anión que acompaña al calcio y es dependiente del pH. Así, el carbonato de calcio se transforma en cloruro de calcio en el estómago y se puede unir a fosfatos en el duodeno y el yeyuno, formando fosfatos insolubles que se eliminan por las heces.

Esta problemática se puede utilizar en la terapéutica del calcio, ya que si administramos vía oral carbonato de calcio, se aumenta la absorción pasiva del calcio y se reduce la del fósforo, combinándose con este último. Este efecto es

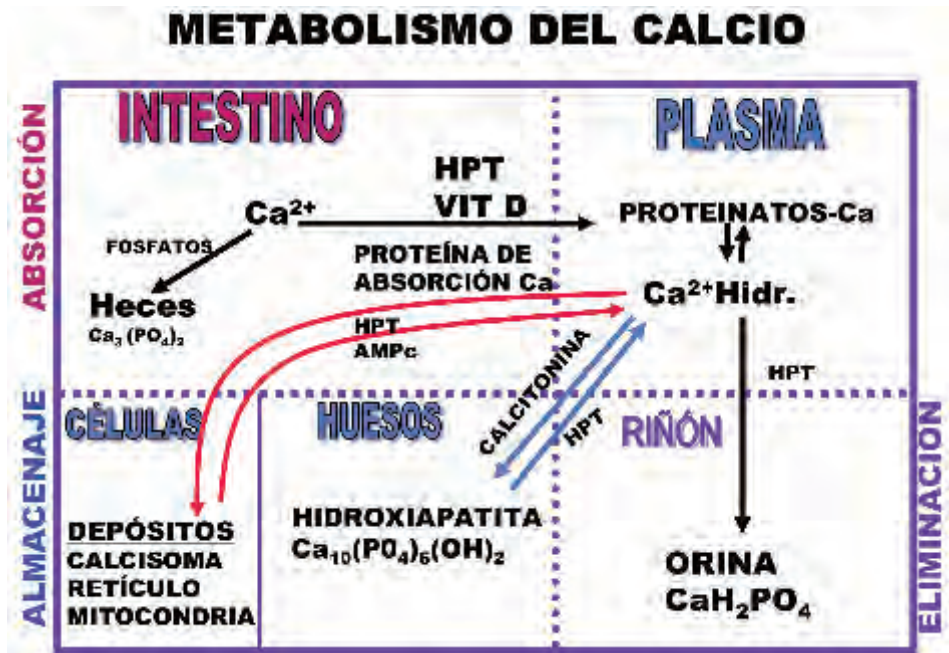


FIGURA 1. *Metabolismo del calcio en el ser humano.*

adecuado en pacientes con insuficiencia renal ya que las sales de Al^{3+} y Mg^{2+} , pueden ser tóxicas¹.

El calcio se absorbe en el intestino en forma de Ca^{2+} soluble, siendo captado en la mucosa por la proteína transportadora de calcio, para continuar su salida por el polo seroso del epitelio intestinal. La absorción de calcio está regulada por la vitamina D y la hormona paratiroidea. La vitamina D, en forma de 1,25 dihidroxicolecalciferol, es necesaria para el transporte activo de calcio en el intestino.

La absorción de calcio disminuye con la edad y con la depleción estrogénica en la menopausia y , aumenta del 10 al 30% cuando se toma con los alimentos.

Una vez absorbido el calcio, se puede unir en el plasma a proteínas plasmáticas. Esta porción de calcio está en equilibrio con el Ca^{2+} hidratado. De esta manera se establecen dos fracciones plasmáticas de calcio, una difusible, constituida por $\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_x$ y citratos de calcio y , otra no difusible de proteínas de calcio.

Desde el plasma, el calcio difusible, es distribuido a sus sitios de almacenamiento, como son los huesos, en forma de hidroxiapatito (hidroxiapatita, según la terminología aceptada en la química), que a su vez realiza una función estructural, ya que es el componente del esqueleto humano; o las células en depósitos de calcio dentro del retículo, de la mitocondria o del calcisoma.

La eliminación de calcio es a nivel renal en forma de CaH_2PO_4 soluble. La cantidad excretada por esta vía es de un 20%, pero varía con el grado de absorción de calcio y si hay una pérdida excesiva de hueso o insuficiencia renal². Por tanto, la mayor cantidad de calcio es eliminada vía fecal, en forma de calcio no absorbido.

CONTROL DEL METABOLISMO DEL CALCIO EN EL SER HUMANO

El control del calcio en el ser humano está regulado por la hormona paratiroidea (HPT), la Vitamina D, en forma de 1,25 dihidroxicolecalciferol, el AMP cíclico y la calcitonina, con las funciones que se muestran en la Tabla I.

La calcitonina, es una hormona liberada por la glándula tiroides muy específica, encargada de la importante tarea de almacenar calcio en los huesos. Su principal función es inhibir la resorción ósea (depósito y eliminación de calcio y fósforo en el hueso) mediante la reducción de la actividad de los osteoclastos, que son las células que se encuentran en el hueso y tienen como objetivo la absorción y remodelación del hueso. Hay dos tipos de calcitonina, la humana y la del salmón, siendo más eficaz esta última en la terapia. Un exceso de calcitonina puede causar una hipocalcemia.

TABLA I. *Funciones específicas de los reguladores metabólicos del calcio*

REGULADOR	FUNCION
HPT	MOVILIZACION CALCIO HUESOS SINTESIS 1,25(OH) ₂ COLECALCIFEROL ELIMINACIÓN RENAL CALCIO
1,25 (OH) ₂ COLECALCIFEROL	ABSORCION INTESTINAL CALCIO REABSORCION TUBULAR CALCIO MOVILIZACION CALCIO HUESOS
AMPc	MOVILIZACION INTRACELULAR Ca REABSORCION TUBULAR Ca MOVILIZACION Ca HUESOS
CALCITONINA	ALMACENAJE CALCIO HUESOS

El AMP cíclico, como segundo mensajero del ser humano, interviene en la regulación del calcio a nivel intracelular, principalmente en los procesos de movilización del calcio, así como en la reabsorción tubular .

La misión principal del 1,25 di hidroxí colescalciferol, es la de intervenir en la absorción de calcio, favoreciendo la síntesis del factor de absorción de calcio a nivel intestinal, aunque también está implicado en los procesos de movilización y reabsorción renal junto al AMPc.

La hormona paratiroidea (HPT), tiene una misión contraria a la calcitonina, y se emplea fundamentalmente para movilizar el calcio de los huesos y aumentar, de esta forma la concentración plasmática de calcio. Además, interviene en la síntesis del 1,25 di hidroxí colescalciferol y en menor medida, en la eliminación de calcio a nivel renal.

Estos mecanismos de control se movilizan en caso de una hipocalcemia, tal como se muestra en la figura 2.

Cuando el nivel sérico de calcio es menor de 5 meq/L, se produce una liberación de la HPT de la glándula paratiroides, que provoca tres procesos:

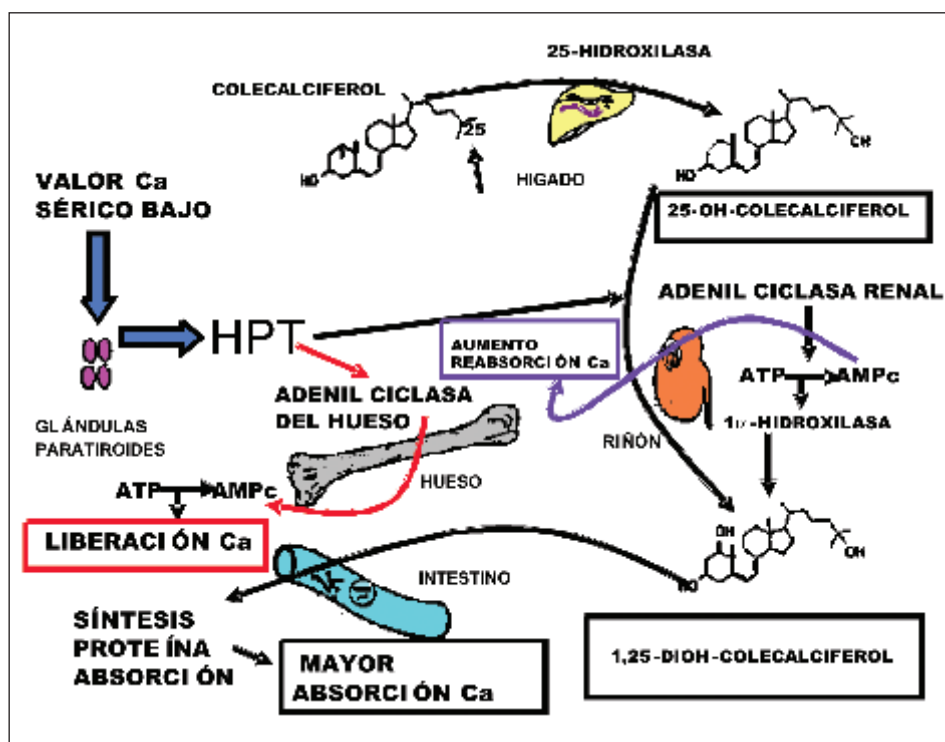


FIGURA 2. Control del calcio con valores séricos bajos.

- Liberación de calcio del hueso. Este proceso es el más rápido y el de primera elección. Supone la activación de una adenil ciclasa del hueso, que fabrica AMPc, a partir de ATP, y que da la señal biológica, a nivel de 2.º mensajero para la liberación de calcio del hidroxapatito.
- Aumento de la reabsorción renal de calcio, también a través del AMPc.
- Aumento en la absorción intestinal del calcio. Es el proceso más complejo, pues es necesario la síntesis previa del 1,25 (OH)₂ colecalciferol, a partir de la vitamina D, que se realiza en dos pasos. En el primero, la vitamina D es hidroxilada en la posición 25, en el hígado, dando lugar al 25 hidroxicolecalciferol y en la segunda etapa, se hidroxila en posición 1, en el riñón, dando lugar al 1,25 dihidroxicolecalciferol, que es la sustancia activa. Estos procesos los efectúa una hidroxilasa, el citocromo P450.

FALLOS EN EL CONTROL DEL CALCIO. HIPOCALCEMIAS E HIPERCALCEMIAS

Como hemos ido viendo en el desarrollo de los párrafos anteriores, el metabolismo del calcio está muy unido al del fosfato, a la glándula paratiroides y a la vitamina D. Por tanto causas de déficit de calcio o hipocalcemias son: falta de vitamina D en la dieta, hipoparatiroidismo, o hiperfosfatemia. También hay que tener en cuenta el antagonismo del calcio con los fosfatos, ya que dietas ricas en este anión, impiden la absorción del calcio.

Además, hay estados fisiológicos, donde las necesidades de calcio son superiores: en el embarazo, la lactancia y en las etapas de crecimiento acelerado.

Los efectos de una hipocalcemia, son bien conocidos, se produce una tetania y trastornos estructurales, que en los adultos conduce a la osteoporosis y en la población infantil al raquitismo.

Tan importante como el déficit de calcio, es su exceso, que conduce a la hipercalcemia. Las causas de este problema, están también relacionadas con la glándula paratiroides, en este caso debido a un hiperparatiroidismo, o al exceso de vitamina D, que provoca una mayor absorción de calcio. También, se produce hipercalcemia, cuando hay una función renal defectuosa, que lleva a una escasa eliminación del calcio y en tumores con metástasis ósea.

Los efectos que provoca la hipercalcemia, son: fatiga, anorexia, vómitos, náuseas, debilidad muscular, trastornos cardiacos, y sobre todo la osteopetrosis, en contraposición con la osteoporosis. La osteopetrosis, produce un hueso muy compacto y duro, que se puede romper por un golpe seco.

Otra enfermedad metabólica del calcio, es la tubulopatía con pérdida de calcio y de magnesio. Es una enfermedad renal hereditaria muy poco frecuente, aunque es probable que se haya infradiagnosticado por falta de conocimiento. La tubulopatía aparece por un defecto en el gen PCLN-1³. Este gen codifica la proteína paracelina-1, que se encuentra involucrada en el transporte de una forma especial de reabsorción del calcio y del magnesio por el túbulo, a través de las uniones intracelulares.

La enfermedad del hueso de Paget es una enfermedad ósea crónica que produce alargamiento y deformidad en los huesos. El hueso puede volverse denso pero frágil como consecuencia de la deformación y el desgaste excesivos. Esta enfermedad afecta a ambos sexos, es muy poco frecuente en personas menores de 40 años y la padece hasta un 3 por ciento de la población de Estados Unidos, y es común en Europa, Australia y Nueva Zelanda.



FIGURA 3. *Efectos de la enfermedad de Paget en cuello y clavícula. Fuente: Garry Swann. Royal Infirmary, Doncaster, UK. <http://www.imi.org.uk>.*

Generalmente, se manifiesta en una o dos áreas del esqueleto, pero se puede propagar, sobre todo a la clavícula, pelvis, fémur, tibia, vértebras, o el húmero. Si afecta al cráneo, se puede presentar un incremento del tamaño de la cabeza, y lesionar nervios craneales. Puede ser asintomática, pero sus síntomas más acusados son: dolores articulares y óseos, que pueden ser severos, dolor de cabeza y cuello, piernas arqueadas, curvatura de las vértebras, disminución de estatura, ceguera y pérdida de audición; estas últimas por afección de los nervios cerebrales.

En la figura 3, se muestra los efectos de esta enfermedad en un paciente.

Otro problema, es la calcificación craneal, por acumulación anómala de calcio en el cerebro, en lugar de ocupar sus sitios habituales de almacenaje. Estos depósitos de calcio pueden causar problemas en el órgano e interferir con las funciones cerebrales.

REGULACIÓN DEL CALCIO INTRACELULAR. EL SISTEMA DE CANALES Y BOMBAS DE CALCIO

El Ca^{2+} es un ión con mayor concentración en el medio extracelular que en el intracelular. Por tanto, la entrada a las células se efectúa a favor de un gra-

diente de concentración, mediante los canales de calcio, mientras que la salida a plasma, se realiza en contra de un empinado gradiente de concentración, por lo que es necesario un complejo sistema de bombas, que expulsen al calcio, para recuperar la concentración citosólica. Estas subidas y bajadas en la concentración de calcio a nivel del citosol, son aprovechadas para emitir señales biológicas, actuando así el calcio como un segundo mensajero de los seres vivos, dentro de las células, y junto al IP_3 y al AMPc, producir una serie de reacciones biológicas, que van desde la contracción muscular a la cascada de quinasas que liberan hormonas, como la vasopresina.

Los canales de calcio pueden ser excitables o de goteo. Los canales excitables, a su vez se dividen en: Potencial dependiente o VOC y Receptor dependiente o ROC. Los canales VOC, pueden ser de tres tipos: T, L y N.

Puesto, que la mitocondria y el retículo, son sitios de almacenaje intracelular de calcio, la salida de calcio de éstos al citosol, se realiza a favor de gradiente y por canales de calcio, mientras que la entrada se efectúa en contra de gradiente y mediante un sistema de bombas e intercambiadores de calcio. Estos procesos, se observan en la figura 4.

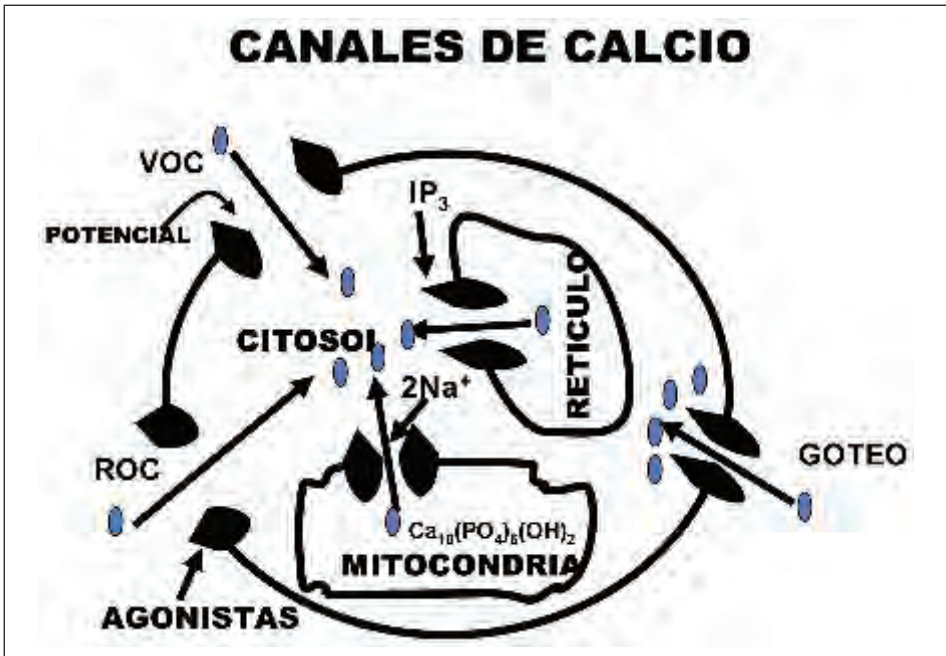


FIGURA 4. Sistema celular de canales de calcio.

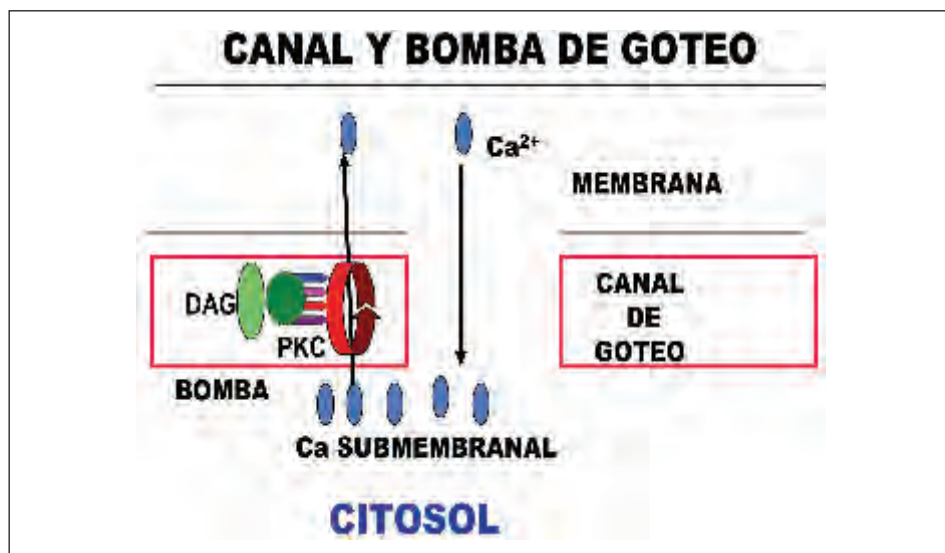


FIGURA 5. Canales de goteo a nivel submembranal y su bomba asociada.

La entrada de calcio a la célula, puede tener lugar por canales VOC, regulados por potencial o ROC, regulado por agonistas del calcio. La salida de calcio de la mitocondria tiene lugar mediante un canal de calcio especial, ya que actúa como intercambiador, y por cada Ca^{2+} que sale, se introducen 2Na^+ , siendo eléctricamente neutro. Por su parte, la salida de Ca^{2+} del retículo, para intervenir en el proceso de la contracción muscular, es debida a un canal regulado por el IP_3 .

La entrada de calcio al citosol, a través de los canales VOC o ROC, suponen un aumento drástico en la concentración de calcio intracelular, de hasta 10 veces mayor, lo que hace que se emita una señal biológica, que regula numerosas funciones biológicas, entre ellas la contracción muscular. Este tipo de señales, actúan como mecanismos on-off, es decir que cuando aumenta la concentración intracelular de calcio se produce el efecto, por ejemplo la contracción muscular, y cuando se retorna a la concentración intracelular normal de calcio, cesa el efecto y por tanto se produce la relajación muscular.

Sin embargo, no todas las señales biológicas del calcio actúan de esa manera. Hay otro mecanismo, regulado por los llamados canales de goteo, que suponen un mantenimiento en la señal intracelular del calcio, aún cuando la concentración citosólica de calcio es la normal.

Un canal de goteo, se muestra en la figura 5. Estos canales de goteo, llevan una bomba asociada y están en un nivel submembranal. El calcio penetra

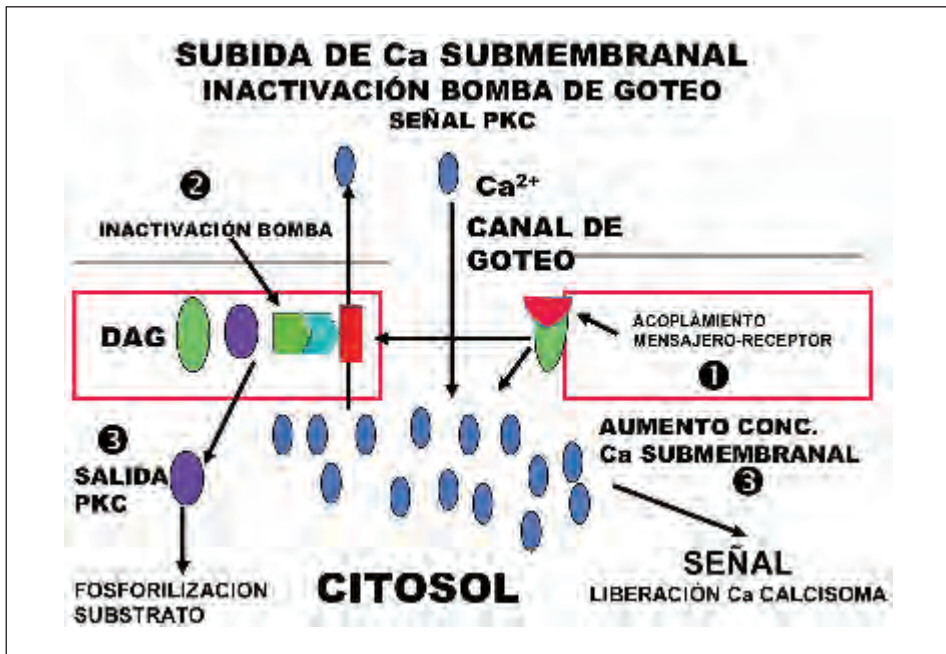


FIGURA 6. *Inactivación de la bomba de goteo.*

de una forma continua a este nivel, mediante el canal de goteo. La bomba de goteo asociada, expulsa al calcio al medio extracelular, también de una manera continua. Esta bomba está regulada por el diacilglicerol DAG y la proteínaquinasa PKC. De esta manera, no hay señal de calcio, pero cuando se inactiva la bomba de goteo, debido a que la PKC abandona su posición en la bomba y viaja al medio intracelular para fosforilar el sustrato, la concentración de calcio submembranal aumenta, ya que no es expulsado, y se mantiene así, la señal del calcio, a pesar de que la concentración citosólica del calcio sea la normal.

Estos procesos se pueden apreciar en la figura 6. En primer lugar, se produce un acoplamiento mensajero-receptor, en el canal de goteo, lo que provoca la salida de PKC de la bomba y su inactivación. La inmediata consecuencia es un aumento en la concentración de calcio submembranal, lo que provoca la salida de calcio del calcisoma y posteriormente, junto a la fosforilización del sustrato por el PKC y la ruta del AMPc, la liberación de hormonas, mediante la cascada de quinasas provocada por estos segundos mensajeros.

Los canales de calcio en el retículo, están regulados por el IP3, tal como se muestra en la figura 7.

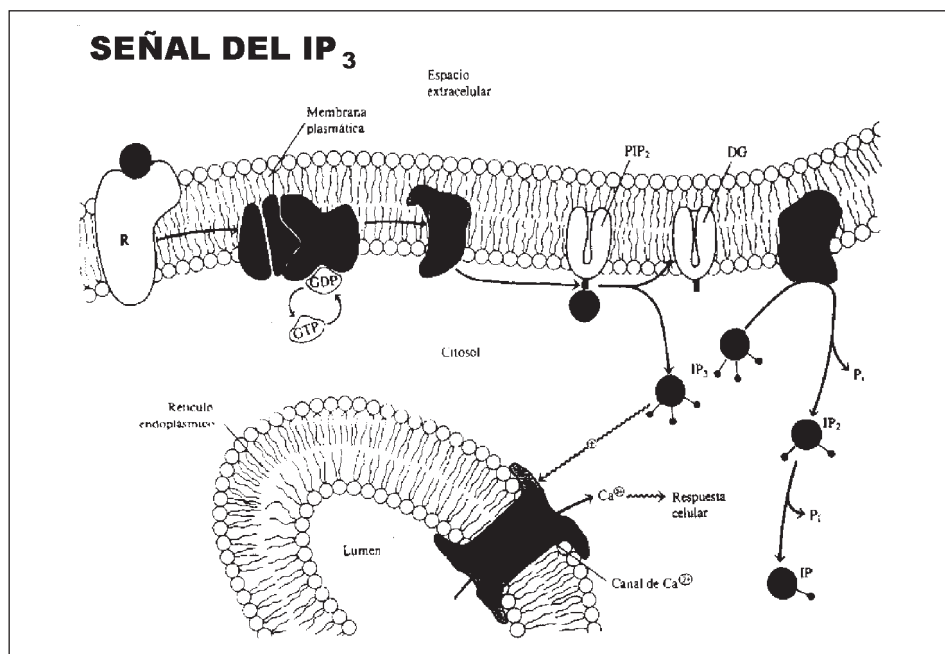


FIGURA 7. Regulación de los canales de calcio del retículo endoplásmico por el IP₃.

El IP₃ es fabricado a nivel de la membrana citosólica, a partir de las señales de los primeros mensajeros, que viajan por la membrana y que llegan a proteínas G, transductoras de la señal y a un amplificador de la señal, como es la fosfolipasa C, que es capaz de dividir a un fosfolípido de membrana, el 4,5 difosfo fosfatidil inositol, en dos compuestos, el DAG o diacilglicerol y el IP₃ o trifosfo inositol. El IP₃ así formado, se acopla a un receptor del canal de calcio del retículo y provoca la liberación del calcio, esencial para que se produzca la contracción muscular. Además, a su vez, el IP₃ es desfosforilado por enzimas de membrana, en IP₂ y posteriormente en IP.

Una vez aumentada la concentración de calcio intracelular y producida la señal del calcio, es preciso retornar a los niveles normales para que cese la misma. Esto se consigue mediante un complejo sistema de bombas e intercambiadores de calcio que actúan a nivel intracelular y que se muestran en la figura 8.

El principal sistema que opera a nivel intracelular, es una bomba ATP dependiente, que intercambia 1Ca²⁺ por 2H⁺ y que por tanto es eléctricamente neutra. Además existe un intercambiador Ca²⁺-Na⁺, que no es eléctricamente neu-

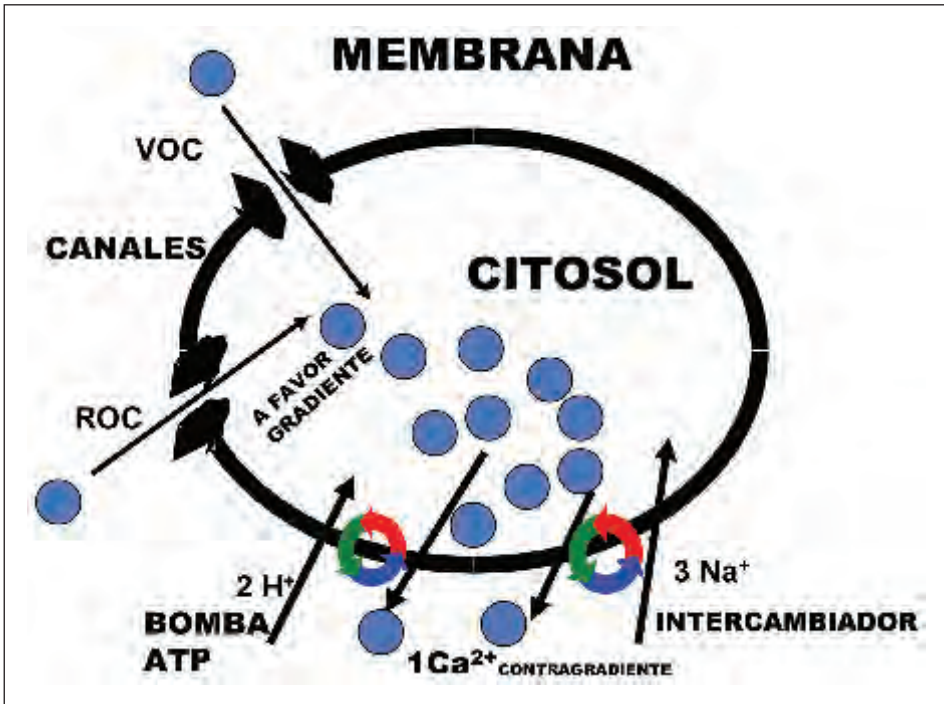


FIGURA 8. Sistema de bombas e inter cambiadores de calcio intracelular es.

tro, ya que por cada Ca^{2+} que sale, se introducen 3Na^{+} , y por tanto hay un gradiente electroquímico favorable, obteniendo así la energía necesaria para un proceso contra gradiente.

Por otra parte, se produce también una entrada de calcio, contra gradiente en el retículo, una vez que el calcio utilizado en la contracción muscular, debe regresar a sus depósitos en el retículo, lo que se produce al cesar la señal citosólica de calcio. Para este proceso, es necesaria una bomba de calcio ATP dependiente, que intercambia 1 o 2 H^{+} , tal como se muestra en la figura 9.

Por último, en la mitocondria, es necesario también un mecanismo contra gradiente, que pueda almacenar, con el fin de liberar calcio para aumentar su concentración citosólica en caso de necesidad. La problemática peculiar del almacenaje de calcio en la mitocondria, es que se efectúa en forma de hidroxiaapatito $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y por tanto, es necesario una introducción simultánea de Ca-Fosfato, (en forma de dihidrógeno fosfato H_2PO_4^-), por lo que sólo se compensa 1 carga positiva, tal como se muestra en la figura 10.

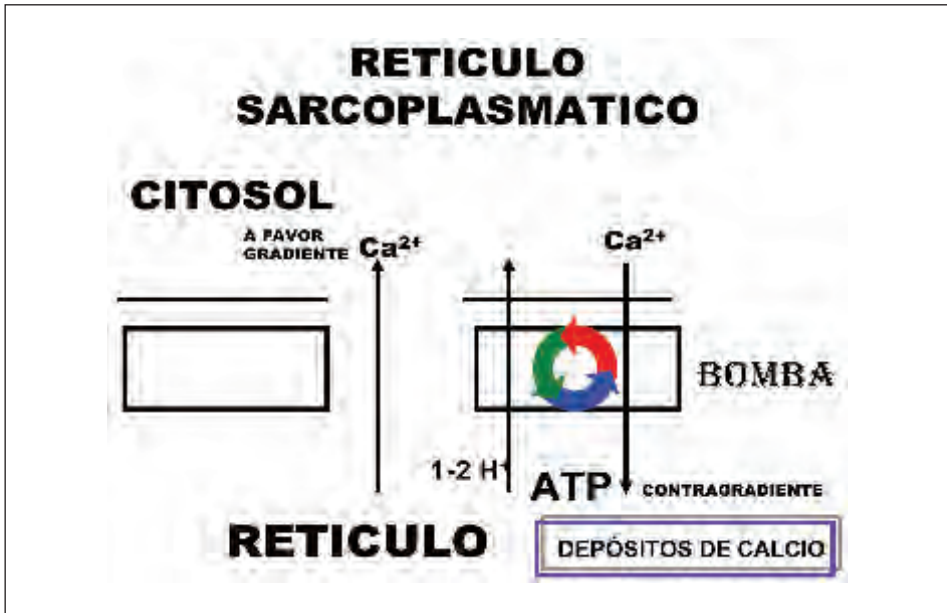


FIGURA 9. Bomba de calcio en el r éticulo.

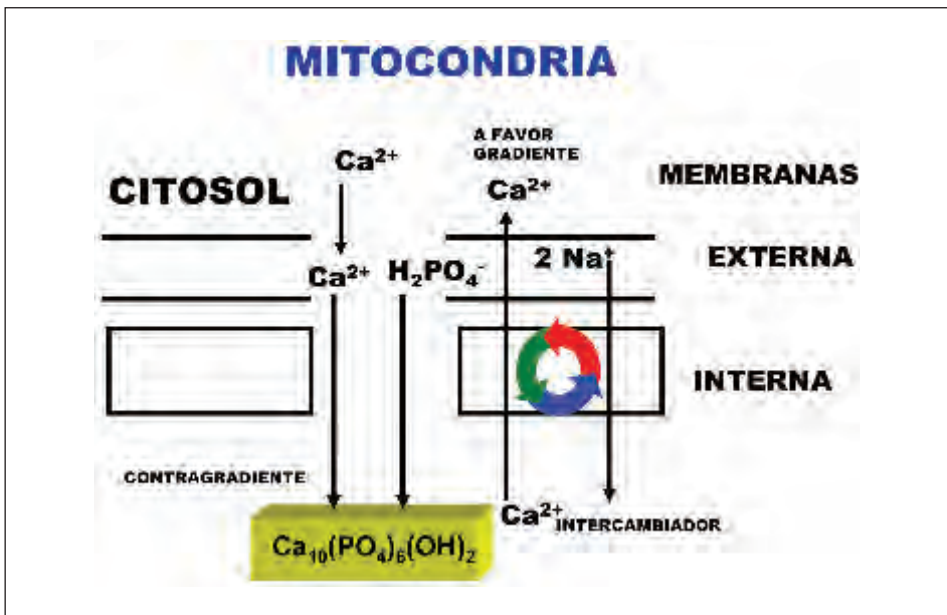


FIGURA 10. Sistema de intercambio de calcio mitocondrial.

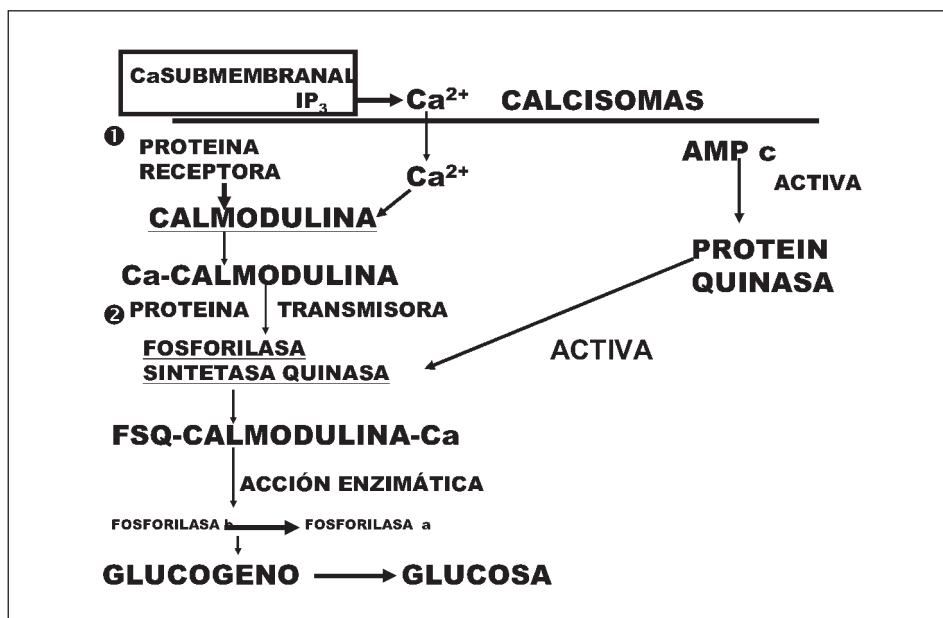


FIGURA 11. Ruta de las señales de calcio y AMPc para la formación de glucosa.

Entonces, ¿de dónde sale la energía necesaria para este proceso? La respuesta más acertada quizás sea que lo hace a través de otros procesos que van acumulando energía en forma de gradiente electroquímico intermembranal.

Las bombas pueden ser activadas de distintas maneras, a través del IP₃, de fosforilización de quinasas activadas por AMPc, por escisión proteolítica ATPasa o por la calmodulina.

La calmodulina es una proteína específica de calcio que modula la señal del calcio y que se utiliza en procesos de liberación de hormonas y en otros, como en el paso de glucógeno a glucosa, tal como se muestra en el esquema de la figura 11, además de la regulación de la bomba ATPasa de calcio citosólico.

La estructura en 3D de la calmodulina de rata proteína quinasa dependiente⁴, se muestra en la figura 12. La proteína tiene dos subunidades muy definidas, denominadas TR₁C y TR₂C, tal como se muestra en la figura 13. Estas subunidades pueden ser separadas mediante la acción de la tripsina. La unidad TR₁C es menos energética (-14,5 kJ/mol) que la TR₂C (-16,7 kJ/mol). El mecanismo de acción también se aprecia en la figura 13. La calmodulina, sufre un cambio conformacional al introducirse el calcio, para adaptarse a la quinasa correspondiente y formar un complejo activo calmodulina-Ca-quinasa.

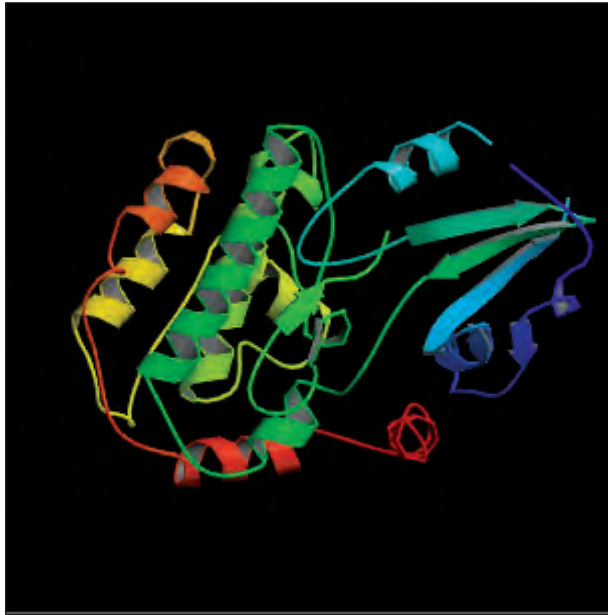


FIGURA 12. Estructura en 3D de la Calmodulina pr oteín quinasa dependiente de rata. Tomada de RCSB Pr otein Data Bank. 2004.

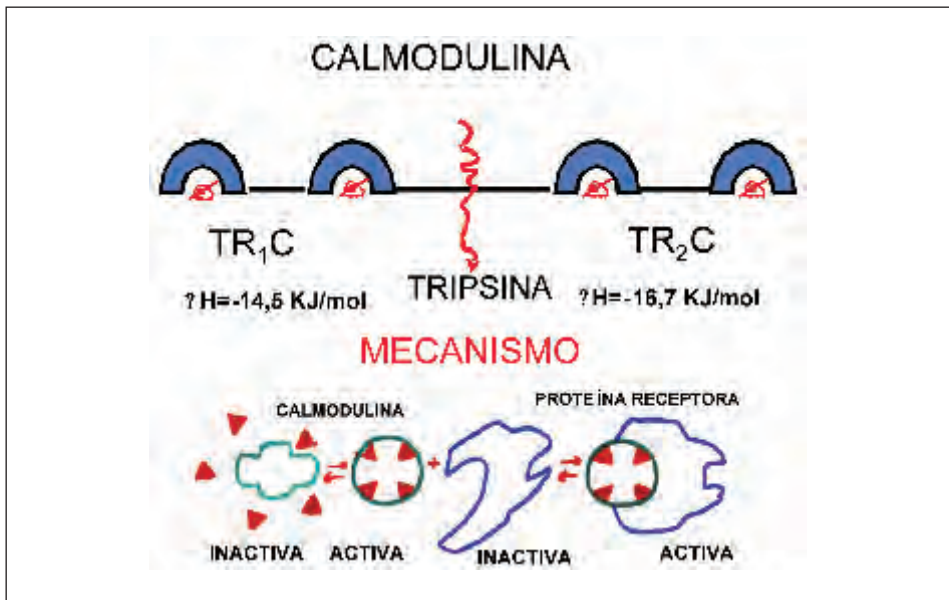


FIGURA 13. Calmodulina: Subunidades y mecanismo de acción.

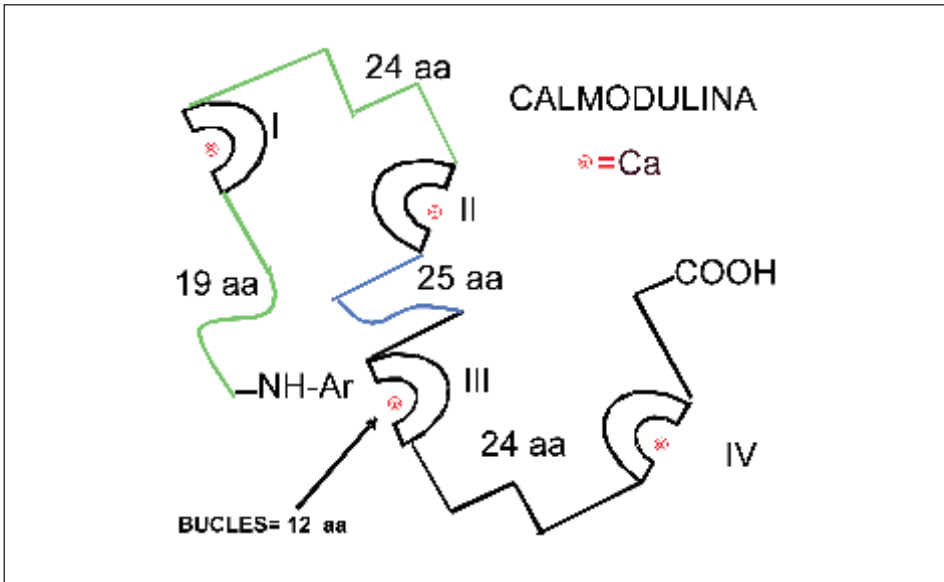


FIGURA 14. Cadena de aminoácidos de la calmodulina.

La calmodulina tiene cuatro sitios activos para el calcio, situados en bucles que contienen 12 aminoácidos; las asas de unión poseen 24 aminoácidos en las uniones entre los sitios activos I y II y III y IV, 25 aminoácidos puente entre las dos subunidades y un grupo $-COOH$ y otro $-NH$ de arginina terminales, tal como se muestra en la figura 14.

El fallo del sistema de bombas e intercambiadores de calcio, y/o de los canales de calcio, pueden causar graves alteraciones en el metabolismo del calcio, alterar su señal intracelular, provocar enfermedades e incluso la muerte neuronal⁵.

FALLOS EN LA REGULACIÓN INTRACELULAR DEL CALCIO

La isquemia cerebral y las enfermedades neurodegenerativas, tienen en común, la muerte neuronal⁶ con intervención directa o indirecta del Ca^{2+} ^{7,8}.

Un aumento anómalo en la concentración de calcio intracelular puede conducir a la activación de rutas moleculares, como las de proteincinasas, fosfolipasas A2, óxido nítrico sintetasa y proteasas⁹, con formación de radicales libres, que ocasionan daños en la mitocondria^{10,11} (Figuras 15 y 16).

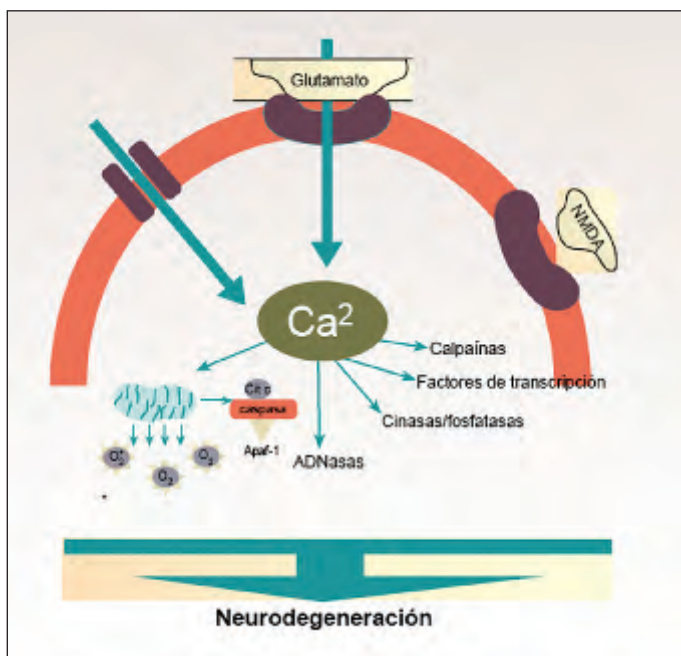


FIGURA 15. Esquema de la intervención del calcio en los procesos neurodegenerativos. Fuente: Jordan (2003) *Offarm.* 22, 102-112.

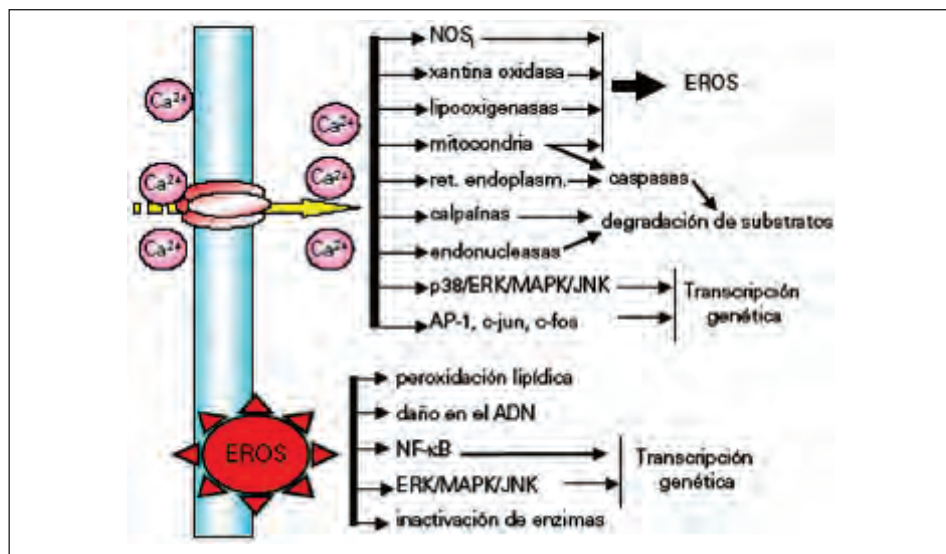


FIGURA 16. Rutas apoptóticas activadas por el calcio y especies reactivas de oxígeno (EROS) en procesos neurodegenerativos. Fuente: Segura et al. (2003) *Rev. Neurol.* 36, 1047-1057.

En el citoplasma de las neuronas, existen proteínas que se unen al Ca^{2+} , como la calbindina o la parvalbúmina que actúan como amortiguadores de calcio. Por ello, en patologías, como la enfermedad de Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica, los grupos neuronales que carecen o contiene cantidades muy pequeñas de estas proteínas resultan más sensibles. Estudios realizados con la utilización de vectores adenovirales, con el fin de sobreexpresar la calbindina D28K en cultivos primarios de neuronas de rata, han conseguido proteger a estos cultivos celulares frente a estímulos, como la presencia de péptido amiloide 25-35¹² o la adición de estaurosporina¹³, un fármaco utilizado como modelo inductor de apoptosis.

Muchos casos de la enfermedad de Alzheimer, sobre todo los de aparición precoz (30-50 años), se asocian a mutaciones en dos proteínas integrantes de la membrana del retículo endoplásmico, las presenilinas. Estas mutaciones, parecen producir cambios apoptóticos asociados a alteraciones en la homeostasis de Ca^{2+} en el retículo. Además, la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas que aparecen a edades más avanzadas se deben a procesos oxidativos que alteran progresivamente el funcionamiento de las mitocondrias y producen una acumulación de Ca^{2+} en su interior, con activación de deshidrogenasas mitocondriales, que puede inducir también apoptosis en las células afectadas¹⁴.

También el calcio, tiene una importante conexión con la enfermedad neuropática de Gaucher, en especial con las de tipo 2 y 3, estando en la actualidad investigándose este tema.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 49 ED. México. 2003. Información referida al Osteomin D.
- (2) Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 49 ED. México. 2003. Información referida al Caltrate.
- (3) Simon, D. B., Lu, Y., Choate, K. A., Velazquez, H., Al Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., McCredie, D., Milford, D., Sanjad, S. y Lifton, R.P. (1999) Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption. *Science* **285**, 103-106.
- (4) Goldberg, J., Nairn, A. C. y Kuriyan, J. (1996) Structural basis for the autoinhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *Cell* **84**, 875-877.
- (5) Yu, S. P., Canzoniero, L. M., Choi, D.W. (2001) Ion homeostasis and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 405-411.

- (6) Orrenius, S., Nicotera, P. (1994) The calcium ion and cell death. *J Neural Transm Suppl* **43**, 1-11.
- (7) Zipfel, G. J., Lee, J. M., Choi, D.W. (1999) Reducing calcium overload in the ischemic brain. *N Engl J Med* **341**, 1543-1544.
- (8) Zipfel, G. J., Babcock, D.J., Lee, J.M., Choi, D. W. (2000) Neuronal apoptosis after CNS injury: the roles of glutamate and calcium. *J Neurotrauma* **17**, 857-869.
- (9) Annunziato, L., Amoroso, S., Pannaccione, A., Cataldi, M., Pignataro, G., D'Alessio, A. (2003) Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions. *Toxicol Lett* **139**, 125133.
- (10) Starkov, A. A., Polster, B. M., Fiskum, G. (2002) Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. *J Neurochem* **83**, 220-228.
- (11) Bindokas, V. P., Jordan, J., Lee, C. C., Millar, R. J. (1996) Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* **16**, 1324-1336.
- (12) Prehn, J. H., Bindokas, V. P., Jordan, J., Galindo, M. F., Ghadge, G. D., Roos, R.P. (1996) Protective effect of transforming growth factor-beta 1 on beta-amyloid neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* 319-328.
- (13) Prehn, J. H., Jordan, J., Ghadge, G. D., Preis, E., Galindo, M. F., Roos, R. P. (1997) Ca²⁺ and reactive oxygen species in staurosporine-induced neuronal apoptosis. *J Neurochem* **68**, 1679-1685.
- (14) Álvarez Martín, J. Universidad de Valladolid y Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC. Instituto de Biología y Genética Molecular, IBGM. <http://www.ibgm.med.uva.es/>.

Osteoporosis

MANUEL DÍAZ CURIEL, MARÍA JESÚS MORO ÁLVAREZ
Y JOSÉ ESPINOZA PINEDA

INTRODUCCIÓN

La osteoporosis es un desorden óseo caracterizado por disminución de la resistencia ósea que conlleva un aumento del riesgo de fractura (1). A su vez, dicha resistencia ósea depende tanto de la masa ósea como de la calidad del hueso (geometría, microarquitectura, etc).

La osteoporosis, denominada la plaga silenciosa de nuestra época, se está convirtiendo en uno de los mayores problemas de la Salud Pública, debido entre otros factores al constante incremento de la expectativa de vida en nuestros países industrializados. Se ha estimado que en el periodo comprendido entre 1980 y el año 2000 la población mayor de 60 años se incrementó en un 57% y que las personas mayores de 80 años aumentaron en un 68% en dicho periodo.

La verdadera importancia de la osteoporosis radica en su estrecha relación con la producción de fracturas y sus complicaciones. Aproximadamente un 70% de todas las fracturas que ocurren en personas por encima de los 45 años están producidas por la osteoporosis. En 1985 hubo 247.000 fracturas de cadera en los Estados Unidos. En España se calcula un número aproximado de 33.300 fracturas de cadera por año, con una proporción mujer hombre de 2.2/1, alcanzando una mortalidad al año entre el 12 y el 20% y con un coste estimado para nuestro país de 100 millones de euros/año, solo en la fase aguda del diagnóstico y tratamiento de las mismas (2).

La comprobación de que la osteoporosis es un cuadro significativamente más frecuente entre la población femenina, sobre todo en el grupo postmenopáusico, sugiere una relación causa-efecto entre la osteopatía y la disminución de hormonas sexuales femeninas, relación ya descrita por Albright

(3) cuando hizo la presentación clínica del cuadro, definiendo ya que la osteoporosis era más frecuente en las mujeres que habían sufrido ooforectomía.

El hecho de la existencia de la osteoporosis tras la deprivación hormonal en la mujer ha sido objetivado de manera clara tras la introducción de métodos precisos para la cuantificación de la masa ósea, tanto a nivel del esqueleto axial (hueso trabecular) como apendicular (hueso cortical). Estas técnicas (4), y especialmente la Absorciometría Radiológica de Doble Haz (DXA o DEXA) han evidenciado a la densidad mineral ósea (DMO) como principal factor responsable de la fortaleza del hueso y de su resistencia a la fractura (5). La DMO disminuye en la población normal, tanto en hombres como en mujeres, a partir de los 35-40 años, siendo esta disminución mayor y más acelerada en las mujeres tras la menopausia (6, 7).

CLASIFICACIÓN DE LA OSTEOPOROSIS

En función de su extensión la osteoporosis (OSP) puede clasificarse en formas localizadas y formas generalizadas. Etiológicamente sin embargo, se distinguen dos formas de OSP: la forma primaria o idiopática y las formas secundarias.

Osteoporosis Primarias (Tabla 1)

TABLA 1. *Clasificación de la Osteoporosis*

PRIMARIAS: Idiopáticas
Tipo I o postmenopáusicas
Tipo II o senil
SECUNDARIAS

Como OSP primarias contemplamos fundamentalmente, *la osteoporosis juvenil* (muy infrecuente) y sobre todo *la osteoporosis tipo I o postmenopáusica*, relacionada preferentemente con el déficit de estrógenos y *la osteoporosis tipo II o senil*, donde el envejecimiento y las consecuencias derivadas del mismo influyen en su patogenia.

*Osteoporosis Secundarias (Tabla 2)*TABLA 2. *Principales causas de Osteoporosis secundarias*

— Hipertiroidismo
— Hiperparatiroidismo
— Hipogonadismo
— Estados de malabsorción intestinal
— Hepatopatías crónicas
— Neoplasias malignas (mieloma)
— Artritis reumatoide
— Toma de fármacos: corticoides, antiepilépticos, tiroxina, heparina, agonistas LHRH, etc
— Inmovilización prolongada

Son de menor incidencia que las primarias, pero deben ser buscadas y descartadas las causas que las determinan, sobre todo en los casos de osteoporosis masculina. En todas ellas va a existir un mecanismo patogénico de desequilibrio entre la formación y reabsorción ósea, cuya normalización solo será posible cuando se corrija la situación causal.

FISIOPATOLOGÍA DE LA OSTEOPOROSIS POSTMENOPÁUSICA

La menopausia es junto con el envejecimiento uno de los factores principales en el desarrollo de la osteoporosis y contribuye por ello a una mayor incidencia de fractura en las mujeres ancianas. Las mujeres que han sufrido una ooforectomía bilateral tienen menor masa ósea en épocas tardías de su vida que la correspondiente a un grupo control de la misma edad. La menopausia quirúrgica acelera la pérdida de masa ósea tanto en el hueso cortical (esqueleto apendicular) como en el hueso trabecular (esqueleto axial) Utilizando técnicas de medición de masa ósea, como la DXA, se ha calculado que el exceso de pérdida del contenido mineral debido a la menopausia es del 10-15% en el hueso cortical (radio) y del 15-20% en el hueso trabecular (columna y cuello de fémur), condicionado por ello un mayor índice de fractura a estos niveles (8, 9).

Los principales factores implicados en la pérdida de masa ósea tras la depleción estrogénica están resumidos en la Tabla 3.

TABLA 3. *Mecanismos relacionados con la disminución de la masa ósea tras la menopausia*

1. Acción de los estrógenos en el hueso.
2. Alteraciones de la parathormona.
3. Alteraciones de la Vitamina D
4. Papel de la Calcitonina.
5. Incremento de la excreción urinaria de calcio.
6. Disminución de la ingesta de calcio.
7. Otras alteraciones hormonales.

Estrógenos y Hueso

La evidencia existente sugiere que el principal factor fisiopatológico responsable de la pérdida de masa ósea tras la menopausia es el aumento de la reabsorción ósea, quizá por una mayor sensibilidad a las hormonas y factores que favorecen este fenómeno reabsortivo. Son varios los mecanismos que relacionan los estrógenos con el hueso, explicando por ello la disminución de la masa ósea relacionada con la deprivación estrogénica (Tabla 4) (Figura 1).

TABLA 4. *Acción de los estrógenos en el hueso*

1. Incremento de IL-1, TNFalfa, e IL-6 después de la menopausia.
2. Interacción de estrógenos y citoquinas inflamatorias a nivel molecular .
3. Efecto de estrógenos en RANKL y Osteoprotegerina (OPG).
4. Efecto de los estrógenos con otros mediadores celulares relacionados con la inflamación (TGF-beta, PG, M-CSF y GM-CSF).
5. Implicaciones en la pérdida ósea postmenopáusica.

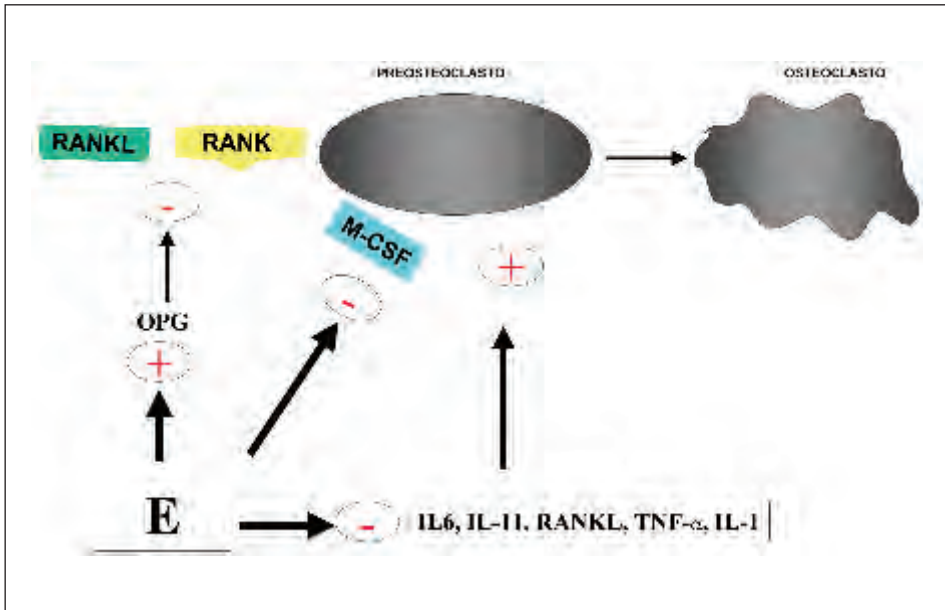


FIGURA 1. Acción de los estrógenos sobre la osteoclastogénesis. La fecha (+) indica estimulación y la (-) indica inhibición. Como se observa en la figura, el estrógeno (E) estimula a la OPG, encargada de bloquear la activación del RANK a través del RANKL. Asimismo el E inhibe la expresión del M-CSF, necesario para el desarrollo de las células preosteoclasticas. También el E inhibe la expresión y/o liberación de las citoquinas IL-1, IL-6 y TNF-alfa.

1. Incremento de IL-1, TNF alfa, e IL-6 después de la menopausia

En diversos estudios experimentales, se ha detectado aumento de la expresión y secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-1, IL-6 y TNF alfa tanto en monocitos circulantes, como en macrófagos de la médula ósea y en osteoblastos en estados de deficiencia estrogénica (10). En mujeres con menopausia tanto quirúrgica como natural, se ha observado un aumento de la concentración del receptor soluble de la IL-6 (11), lo que podría ser secundario a un aumento de la concentración de IL-6. La administración de estrógenos inhibe la expresión o liberación de IL-1beta y TNF alfa e IL-6 en células sanguíneas, células parecidas a los osteoblastos y en los monocitos y macrófagos. Los niveles de IL-6 y de TNF son más bajos en mujeres postmenopáusicas tratadas con terapia hormonal sustitutiva (THS) que en las mujeres no tratadas (12,13) aunque no todos los estudios son coincidentes en estos resultados (14).

2. Interacción de estrógenos y citoquinas inflamatorias a nivel molecular

En contraste con el efecto predominante genómico de los estrógenos en los tejidos reproductivos, la mayoría de las acciones de los estrógenos en la actividad de las citoquinas en los tejidos no reproductivos como el hueso, parecen estar mediados por mecanismos no genómicos, entre los que se incluyen efectos antagónicos en los receptores de estrógenos activados por los factores de transcripción proinflamatorios, modulación de la actividad del óxido nítrico, efectos antioxidantes directos y efectos secundarios debidos a la acción de los estrógenos en el sistema inmune. Los estrógenos activan los receptores intracelulares de los estrógenos, que son capaces de inhibir la expresión de los genes de IL-6 y TNF-alfa a través de mecanismos dependientes del factor nuclear (NF-kappa-beta) y del factor de activación 1 (AF-1) (10, 15).

3. Efecto de estrógenos en RANKL y Osteoprotegerina (OPG)

RANKL es un miembro reciente de la superfamilia de los TNF. Se expresa en una gran variedad de células, incluyendo osteoblastos, células endoteliales y linfocitos y ha demostrado su función como inductora de la proliferación de los osteoclastos. La actividad biológica del RANKL es neutralizada por su unión con la osteoprotegerina (OPG), otro miembro de la superfamilia de los receptores TNF (16). Los estrógenos, de forma dosis dependiente, aumentan los niveles del mRNA de la OPG en las células osteoblásticas humanas, y se ha demostrado niveles mas altos de OPG en mujeres postmenopáusicas con THS. Además los estrógenos pueden bloquear la acción estimulante del RANKL de las IL-1, IL-6 y TNF-alfa (10, 17,18).

4. Efecto de los estrógenos con otros mediadores celulares relacionados con la inflamación (TGF-beta, PG, M-CSF y GM-CSF)

Los estrógenos estimulan la expresión y/o producción de TGF beta a nivel del osteoclasto, osteoblasto, fibroblasto y células musculares lisas de la pared vascular y sabemos que el TGF beta antagoniza los efectos proinflamatorios de las citoquinas. Este efecto estimulante del TGF beta por los estrógenos es independiente de los receptores estrogénicos y puede ser inhibido por el raloxifeno (10, 19).

También se ha evidenciado que la deficiencia de estrógenos incrementa los niveles de prostaglandina E2 así como la expresión de las principales citoquinas que directamente estimulan la proliferación precoz de los osteoclastos como

el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el factor estimulante de colonias de los granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (10, 20).

5. Implicaciones en la pérdida ósea postmenopáusica

Se ha demostrado que las células de la médula ósea de estirpe monocitos/macrófagos son la mayor fuente del incremento de secreción en el tejido óseo de TNF α e IL-1 en el periodo postmenopáusico. Conocemos que estas citoquinas proinflamatorias son los estimulantes más potentes de la reabsorción ósea. De hecho, el nivel sérico de IL-6 es el mejor predictor individual de la pérdida ósea postmenopausica, que explica hasta el 34% de la variación total de la DMO en los primeros años tras la menopausia (21).

También conocemos la potente acción estimuladora de los estrógenos sobre la producción de OPG y de la supresión de M-CSF, y se entiende que la falta de estrógenos conduzca a un incremento de la diferenciación de los precursores de los osteoclastos hacia osteoclastos maduros.

Estos hallazgos explican que el déficit estrogénico originado por la menopausia, ya sea natural o en mayor cuantía la quirúrgica, conlleva un incremento en la frecuencia de activación en la superficie ósea, y un aumento de la reabsorción ósea mediada por los osteoclastos (15). La formación ósea se incrementa en paralelo pero no en la misma intensidad, lo que conduce a una pérdida de la masa ósea.

Alteraciones de la parathormona

El déficit estrogénico hace al hueso más sensible a la acción de las sustancias y hormonas reabsortivas, entre ellas la parathormona, incrementándose por ello la reabsorción ósea. El aumento en el calcio urinario y el cociente HP/Cr en orina que ocurre en la menopausia, relacionan la pérdida de hueso en este periodo con un incremento de la reabsorción ósea, hecho que se confirma con análisis histomorfométricos en la biopsia ósea.

El aumento de la reabsorción ósea conlleva un incremento plasmático de calcio, lo cual produce consecuentemente una disminución de la secreción y/o síntesis de parathormona, hecho que provocaría de manera secundaria una disminución de la síntesis renal de 1,25 (OH) $_2$ vitamina D. Conocemos que la PTH es uno de los principales agentes que estimula la acción del enzima 1-hidrox-

lasa renal. Por tanto la menopausia origina una disminución de los niveles de PTH pero hace al hueso más sensible a la acción de la misma.

Alteraciones de la vitamina D

Se conoce que la administración farmacológica de estrógenos incrementa tanto los niveles séricos de proteínas transportadoras de vitamina D como del 1,25(OH)₂ vitamina D libre, pero no está del todo aclarado que ocurre con esta vitamina en la menopausia. Varios autores han encontrado niveles disminuidos del mismo en este periodo, hecho que podría explicarse por una menor estimulación de la PTH al estar descendidos los niveles plasmáticos de esta hormona en la menopausia (22). La consecuencia fisiopatológica de este hecho estribaría en una reducción de la absorción intestinal de calcio en estas mujeres, lo que provocaría un balance negativo del mismo y un incremento de la reabsorción ósea.

Otros trabajos sin embargo han podido demostrar que los niveles plasmáticos de estrógenos pueden estimular de manera fisiológica, aunque con menor intensidad que la PTH y que la hipofosfatemia, la acción de la 1-hidroxilasa renal, incrementando la síntesis de metabolito activo de la vitamina D.

Papel de la Calcitonina

Existe controversia sobre el papel de la calcitonina en el desarrollo de la osteopenia fisiológica de la menopausia. Conocemos que los niveles plasmáticos de calcitonina disminuyen con la edad, que los hombres tienen valores basales de calcitonina más altos que las mujeres y que la administración de estrógenos puede incrementar los niveles de calcitonina sérica, a pesar de no haberse encontrado receptores para los estrógenos en las células C del tiroides.

Son varios los autores que han encontrado disminución de la reserva secretora de calcitonina en el déficit estrogénico, aunque sin embargo otros autores, midiendo la fracción biológica de la calcitonina, no han hallado alteración de la secreción de la misma en los casos de hipoestrogenemia, lo cual, acompañado por el hecho de que la DMO tanto a nivel axial como apendicular sean normal en los sujetos con déficit crónico de calcitonina (operado de tiroides) y de que los sujetos con carcinoma medular tiroideo con hipercalcitonemia crónica, tengan una DMO normal, plantea cual es la función fisiológica de la calcitonina en la preservación de la integridad ósea así como la función en el desarrollo de la osteopenia de la menopausia (23).

Incremento de la excreción urinaria de calcio

La excreción urinaria de calcio, condicionado por un aumento de la reabsorción ósea está aumentada en la menopausia; diversos autores han sugerido que este incremento en la excreción urinaria de calcio, podría contribuir al desarrollo de la osteopenia y que no fuera exclusivamente consecuencia de la misma.

El incremento de calcio urinario en la menopausia, representa una pérdida adicional diaria de unos 20-40 miligramos de calcio, que es suficiente para explicar la tasa de la pérdida ósea postmenopáusica. Recordemos que un 1% de la pérdida del esqueleto al año corresponde a 10 gramos de calcio anual o 30 miligramos al día. Este incremento del calcio urinario es consecuencia del aumento de la reabsorción ósea, pero sin embargo, si no existiera esta pérdida renal del calcio, el incremento del calcio plasmático frenaría la PTH y con ello la reabsorción ósea.

Disminución de la ingesta de calcio

La deficiencia del calcio dietético puede contribuir a la osteopenia postmenopáusica. Debido al aumento de la pérdida urinaria que se origina en la menopausia, sería necesario un aumento de la ingesta del calcio para reparar así el balance negativo. Se ha recomendado por ello que en esta etapa de la vida la ingesta de calcio debería situarse alrededor de los 1500 mg al día.

Un estudio sobre las cantidades de calcio recibidas en la dieta en una población postmenopáusica de 49 a 66 años ha encontrado que un 12.8% tiene una ingesta diaria entre 0 y 399 mg/día; un 43.6% una ingesta de calcio alrededor de 400-699 mg/día, un 23.8% ingiere entre 700 y 899 mg/día. Solo un 19.8% tiene una ingesta de calcio superior a los 900 mg/día. Es indudable pues que este déficit dietético de calcio puede contribuir a un aumento del paso del mismo desde el hueso hacia el espacio extracelular .

Otras alteraciones hormonales

Las principales hormonas segregadas por el ovario son el estradiol, la estrona y la androstendiona. Pero debido a que este último compuesto es producido también por la cápsula suprarrenal en la misma proporción y sabiendo que cerca del 3% del mismo es convertido en estrona, la caída de estradiol plasmático en la menopausia es proporcionalmente mayor que la caída de estrona y

androstendiona. Después de la menopausia, la androstendiona adrenal constituye la única fuente de estrona, desde la cual se produce una pequeña cantidad de estradiol. Una pequeña cantidad de este último compuesto se deriva también de la conversión periférica de la testosterona, la cual procede parcialmente de la androstendiona adrenal y parcialmente del ovario postmenopáusico. La conversión periférica de esta sustancia se realiza como sabemos en el tejido graso subcutáneo, lo cual explica que las mujeres extremadamente delgadas no puedan realizar dicha conversión y tengan mayor riesgo de osteoporosis (24).

Se sabe que la menopausia no es el fin de los cambios hormonales relacionados con la edad en las mujeres. A la edad de 55-60 años ocurre una caída de los niveles de andrógenos adrenales en plasma tanto en hombres como en mujeres, que puede ser debido a una disminución del aclaramiento del cortisol con la edad, lo que provocaría consecuentemente una disminución de la secreción de hormona adrenocorticotropa (ACTH). La caída de la androstendiona conduce a una posterior disminución de estrona plasmática pudiendo así agravarse la deficiencia estrogénica, aumentando con ello la reabsorción ósea y los fenómenos anteriormente comentados. A ello se le añadiría una disminución en la formación ósea andrógeno dependiente. Esta adenopausia puede contribuir por tanto a una mayor disminución de masa ósea en este periodo (24).

FACTORES DE RIESGO DE LA OSTEOPOROSIS PRIMARIA

La osteoporosis es una enfermedad multifactorial. Los factores asociados con un incremento del riesgo de fractura osteoporótica pueden ser clasificados como modificables o no modificables. Están representados en las tablas 5 y 6.

TABLA 5. *Factores de riesgo no modificables*

-
- *Fracturas previas.*
 - *Historia de fractura en familiar es de primer grado.*
 - Raza blanca.
 - Edad avanzada.
 - Sexo femenino.
 - Demencia.
 - Mala salud/fragilidad.
-

TABLA 6. *Factores de riesgo potencialmente modificables*

-
- *Hábito de fumar*
 - *Bajo peso*
 - Deficiencia estrogénica:
 - Menopausia precoz (antes de los 45 años) u ooforectomía bilateral
 - Amenorrea prolongada(más de un año) premenopáusica
 - Baja ingesta de calcio durante tiempo prolongado
 - Alcoholismo
 - Alteración de la visión
 - Caídas frecuentes
 - Actividad física inadecuada
 - Mala salud/fragilidad

Los cuatro factores en cursiva (historia personal o familiar de fractura, hábito de fumar y bajo peso) han demostrado ser , en estudios prospectivos amplios, factores determinantes del riesgo de fractura de cadera independientes de la masa ósea.

CLÍNICA DE LA OSTEOPOROSIS

La clínica de la osteoporosis es inespecífica. Las manifestaciones aparecen, en general, cuando se producen fracturas.

Fracturas vertebrales

Las pacientes con fracturas vertebrales acuden a la consulta por dolor , difuso o generalizado, acompañado a veces de cansancio muscular proximal. Otros rasgos, aunque tardíos, son la pérdida de estatura, limitación de la movilidad, deformidad en cifosis de la columna vertebral y la debilidad y atrofia muscular .

El dolor vertebral obedece a tres causas: *a)* fractura o colapso vertebral, *b)* contractura muscular y *c)* dolor mecánico.



FIGURA 2. *Fractura de cadera.*

- a) Fractura o colapso vertebral. Dolor intenso, de instauración brusca, con importante limitación funcional. Sobreviene tras un traumatismo o por esfuerzos mínimos (agacharse, coger peso). Se alivia en parte con el reposo. Puede durar varios meses.
- b) Contractura muscular. El espasmo muscular alrededor del foco de fractura produce un dolor más difuso, que puede irradiarse en forma metamérica y se exagera con los movimientos, la tos, etc. Las deformidades, debilidad y atrofia muscular son también causa de dolor crónico que acompaña a las formas evolucionadas.
- c) Dolor mecánico. La disminución de la altura de la columna tras los colapsos y aplastamientos vertebrales puede hacer que los arcos costales lleguen a contactar con las crestas ilíacas, produciendo un dolor de características mecánicas que cede con el reposo y se exagera con los movimientos, sobre todo al caminar en marcha.

Fracturas extravertebrales

Las restantes localizaciones típicas de fracturas osteoporóticas, guardan relación con la exposición de determinadas zonas a caídas o esfuerzos. Las principales son la fractura intertrocantérea o intracapsular de fémur proximal (Figura 2), la

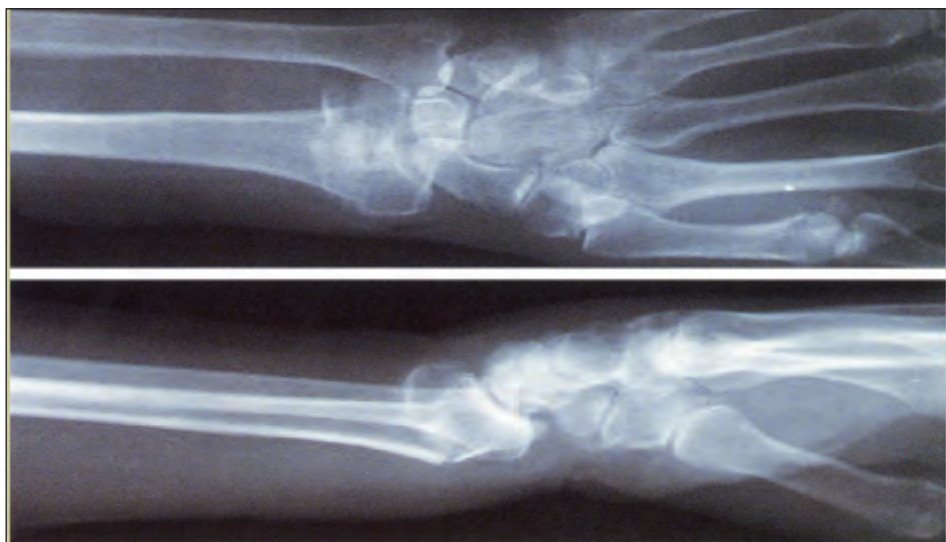


FIGURA 3. *Fractura 1/3 distal del Radio (Fractura de Colles).*

distal de radio (fractura de Colles) (Figura 3), la subcapital de humero y las fracturas costales. Un traumatismo no muy intenso o una caída suele ser la causa.

DIAGNÓSTICO DE LA OSTEOPOROSIS

El diagnóstico de esta enfermedad, que la mayoría de ellas veces es asintomática, reside en los siguientes cuatro pilares: diagnóstico clínico, bioquímico, radiológico y densitométrico

- *Diagnóstico Clínico*

En la historia clínica debe recogerse la cronología, localización, tipo e intensidad del dolor si lo hubiera, los antecedentes familiares de osteoporosis o fracturas, los hábitos (alimentación y específicamente la ingesta de calcio, consumo de tabaco y alcohol, actividad física, etc) síntomas generales, pérdida de talla, etc.

La exploración, además de comprobar la talla, actitud, movimientos y deformidades de la columna, deben incluirse maniobras capaces de revelar dolor a la presión (vertebral o costal), existencia de pliegues cutáneos anormales, etc.

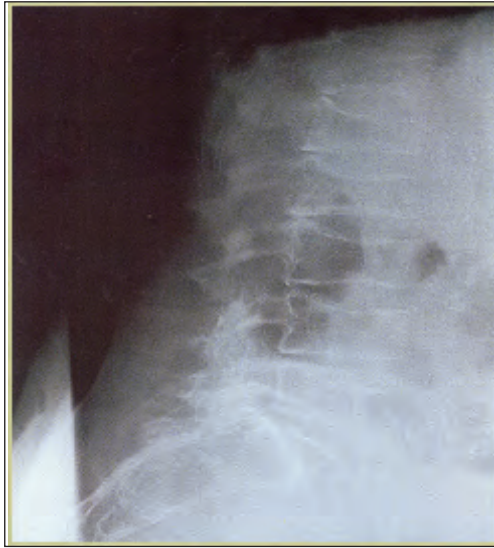


FIGURA 4.

- *Diagnóstico bioquímico: valor de los marcadores de remodelado óseo*

Por un lado los estudios bioquímicos pueden orientar a descartar una posible naturaleza secundaria de la osteoporosis (anemia, velocidad de sedimentación elevada, afectación hepática, hormonas tiroideas, etc)

Más específicamente, los marcadores del remodelado óseo, productos de la actividad continua de los osteoblastos (marcadores de formación) y de los osteoclastos (marcadores de resorción), no son útiles para realizar el diagnóstico de osteoporosis y no deben, por tanto, utilizarse para ello. Se utilizan en la práctica clínica exclusivamente para en algunos casos monitorizar en los primeros meses la respuesta al tratamiento.

- *Diagnóstico radiológico*

La radiografía es útil cuando aparece la fractura (Figuras 2 y 3), pero no tiene gran valor para diagnosticar precozmente la osteoporosis, ya que, además de los problemas técnicos, se estima necesario la pérdida de más del 30% del tejido óseo para que sea evidente la osteopenia.

El diagnóstico de fractura o deformidad vertebral viene dado por los cambios en alguna o en todas las alturas del cuerpo vertebral, (Figura 4). La mayor

incidencia de fracturas vertebrales se produce entre sexta vértebra dorsal (D-6) y la primera lumbar (L-1), siendo la más afectada la octava dorsal (D-8).

- *Diagnóstico densitométrico*

La determinación de la densidad mineral ósea (DMO) mediante densitometría, es el mejor método para cuantificar la masa ósea y establecer el diagnóstico de osteoporosis.

Hoy en día la densitometría radiológica de doble energía (DXA o DEXA), es la técnica más usada y permite medir la DMO en la columna, cadera y brazo, los sitios más comunes donde ocurren las fracturas osteoporóticas. Tiene una alta fiabilidad y representan las técnicas de mayor precisión con la ventaja de exponer al paciente a muy escasa radiación.

Interpretación de la densitometría

La determinación del DMO en cualquier parte del esqueleto con una tecnología apropiada tiene valor predictivo del riesgo de fractura. Sin embargo es la determinación del DMO en la cadera el mejor predictor de fractura de cadera y también buen predictor de fracturas en otros sitios.

Debido a que los valores absolutos varían entre los diferentes densitómetros, la DMO se expresa de dos maneras:

1. En relación con la DMO del grupo de misma edad y sexo (Z-score).
2. En relación con la DMO de los adultos jóvenes de su mismo sexo (T-score).

La diferencia entre el valor del paciente y el valor normal es expresado como el número de desviaciones estandar por encima o por debajo del valor medio.

- *Criterios diagnósticos de osteoporosis por densitometría*

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido las siguientes definiciones basadas en la determinación del DMO en mujeres blancas:

- **Normal:** Si la DMO está por encima de -1 T-score.
- **Osteopenia:** Si la DMO está situada entre -1 T-score y -2.5 T-score.

- **Osteoporosis:** Si la DMO está situada por debajo de -2.5 T-score
- **Osteoporosis establecida:** Aquellas osteoporóticas que además tengan alguna fractura

PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO

Cuando nos planteamos la prevención de la osteoporosis y de sus complicaciones clínicas, las fracturas, nos tenemos que plantear el problema en tres vertientes.

- **Prevención primaria:** Encaminada a actuar sobre los factores que afectan el normal desarrollo de la masa ósea, estimulando el desarrollo del pico de masa ósea.
 - **Prevención secundaria:** Dirigida a modificar los factores que aceleran la pérdida de masa ósea.
 - **Prevención terciaria:** Orientada a evitar las fracturas en las personas que ya tienen una importante disminución de la masa ósea o fracturas previas.
-
- *Prevención Primaria y secundaria*

Las estrategias para la prevención de la osteoporosis pueden tener como sujetos a la población (*estrategias para la población*) o a sujetos con riesgo de padecer osteoporosis (*estrategias para sujetos de riesgo*) o basarse en la *búsqueda activa de casos*. Dichas estrategias se resumen y sus grados de recomendación se resumen en la tabla 7.

Entre las estrategias o recomendaciones para reducir la osteoporosis en la *población* se encuentran: el aumento de la actividad física en todas las edades, la reducción de la prevalencia de fumadores, y el aumento de la ingestión de calcio. Pero hay poca evidencia (positiva o negativa) del efecto sobre el riesgo de la fractura de estas intervenciones dirigidas al cambio de los hábitos colectivos (1, 25-27).

Medidas generales

Existen unas medidas generales que son aplicables a toda la población desde la infancia, especialmente en personas con antecedentes familiares de osteoporosis y en personas portadores de enfermedades que puedan disminuir la masa ósea.

OSTEOPOROSIS

TABLA 7. *Intervenciones preventivas con el grado de recomendación*

Intervención DMO		Fracturas Vertebrales	Fractura de cadera
Ejercicio	A	B o C	B o C
Suplementos de calcio con o sin vitamina D)	A	B o C	B o C
Calcio en la dieta	B o C	B o C	B o C
Retirada de fumar	B o C	B o C	B o C
Reducción del consumo alcohol	D	D	B o C
Estrógenos	A	B o C	B o C
Tibolona	A	-	-
Raloxifeno	A	A	-
Etidronato	A	-	-
Risedronato	A	-	-
Alendronato	A	-	-
Protectores de cadera	-	-	A

DMO: Densidad Mineral Ósea

- 1. Dieta adecuada en calcio**, sobre todo durante el crecimiento, embarazo, lactancia y otras situaciones con aumento de las necesidades de calcio. Para ello se recomiendan 800 mgrs. de calcio durante la edad de 1 a 10 años, 1200 mgrs. desde los 11 a los 18 años y de 800 a 1000 en la edad adulta. Durante el embarazo y la lactancia debería incrementarse a 1200-1500 mgrs/día; las mujeres postmenopáusicas y personas mayores de 60 años deben tomar unos 1200 mgrs al día.

La principal fuente de calcio son los productos lácteos, existiendo aproximadamente 130 mgrs de calcio por 100 grs de leche, unos 150 mgrs de calcio por 100 grs de yoghurt y cantidad variable entre 275 y 1200 mgrs en los quesos, independientemente de la existencia de grasa en los mismos.

- 2. Nutrición adecuada y equilibrada**, evitando dietas hiperproteicas (más de 1,5 grs de proteína/kg de peso), que por su alto contenido en fosfa-

tos y por otros mecanismos, disminuyen la masa ósea. Asimismo hay que evitar dietas vegetarianas, con alto contenido en fitatos y oxalatos y los excesos de sal.

3. **Ejercicio físico habitual**: El ejercicio físico a todas las edades y sobre todo en la adolescencia, es uno de los pocos factores capaces de estimular al osteoblasto y con ello aumentar la masa ósea. Cualquier tipo de actividad física es buena, siempre que no conlleve, en las mujeres, la aparición de baches amenorreicos, recomendándose, como ejemplo, el andar al menos una hora al día.
4. **Suficiente exposición solar**, como método de adquisición de niveles aceptables de vitamina D.

Actuaciones tendentes a corregir factores de riesgo adquiridos

Es muy importante insistir en evitar hábitos tóxicos, como el tabaquismo y el exceso de alcohol, ya que ambos son capaces de reducir la masa ósea. Asimismo la toma de ciertos fármacos como esteroides, anticonvulsivos, etc y ciertas enfermedades endocrinometabólicas, hepáticas o reumáticas, pueden comprometer la obtención de un buen pico de masa ósea, por lo que requerirían medidas específicas tendentes a su prevención y a la posibilidad de su corrección.

Las estrategias destinadas a los *sujetos con riesgo* de padecer osteoporosis se basan en el hecho de que la masa del hueso se puede modular por la ingestión de calcio y/o por los cambios en otros hábitos de vida en edades anteriores a la de alcanzar la madurez esquelética. No hay, sin embargo, evidencia de que prestar atención a los factores de riesgo asociados al desarrollo de la masa ósea tenga ningún efecto sostenido sobre el «pico de masa ósea» ni sobre el subsiguiente riesgo de la fractura. Tampoco existen estudios que muestren adecuadamente que las intervenciones educativas sobre los factores de riesgo de desarrollo de osteoporosis y fracturas en las mujeres posmenopáusicas condicionen cambios estables en sus hábitos de vida. **(Grado de Recomendación A1).**

- *Prevención terciaria*

El riesgo de la fractura de cadera parece disminuir por el uso de los protectores de la cadera en ancianos con alto riesgo de padecer dicha fractura **(Grado de Recomendación A1)** (28).

No existe evidencia de la reducción del riesgo de caídas en los ancianos cuando se actúa sobre un factor de riesgo de conducta específico. Sin embargo parece que se disminuye el riesgo cuando se actúa con programas que toman en consideración varios factores de riesgo específicos para prevenir las caídas (**Grado de Recomendación A1**).

En cuanto a la prevención con fármacos específicos, con excepción del calcio, que tiene una actividad más débil que otros tratamientos, los estudios para evaluar eficacia comparativa de las diferentes opciones son insuficientes. Se desconoce el fármaco de elección, el momento de comenzar el tratamiento y la duración óptima del tratamiento, por lo que no se hace ninguna recomendación sobre el uso jerárquico de diferentes opciones terapéuticas. La elección depende más de los riesgos y de los costes que de la eficacia probada.

FÁRMACOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA OSTEOPOROSIS

El perfil ideal de un fármaco para el tratamiento de la osteoporosis debería satisfacer los siguientes puntos:

- a) Reducción en el número de nuevas fracturas
- b) Ruta de administración fácil y conveniente
- c) Bien tolerado en el momento de la administración y después de su uso por largo tiempo
- d) Perfil óptimo en términos de seguridad ósea
- e) Mejoría y mantenimiento de la calidad y fortaleza del hueso
- f) Mejoría de la calidad de vida
- g) Aumento de la densidad mineral ósea
- h) Efecto rápido y persistente en el tiempo

Son varios los fármacos utilizados en el tratamiento de la osteoporosis. A continuación analizamos los diversos fármacos y en nivel de evidencia de cada uno de ellos sobre todo en cuanto al análisis de su efectividad antifractura.

CALCIO MÁS VITAMINA D

En todas las pacientes con osteoporosis se debe asegurar un aporte de calcio suficiente, siendo recomendable que dicho aporte se realice a través

de la dieta. En cuanto a la ingesta óptima de calcio según la conferencia consenso NIH (29) se aconseja de 1000 mg/día para mujeres postmenopáusicas que siguen THS y para hombres de 25-65 años, y de 1500 mg/día para mujeres postmenopáusicas que no siguen THS así como para todos los hombres y mujeres mayores de 65 años. De este modo, los suplementos de calcio deben mantenerse siempre y cuando con el aporte dietético no se alcancen las necesidades recomendadas, y deberán ser tomados durante las comidas.

El efecto del calcio en el tratamiento de la osteoporosis parece ser debido a una disminución en el turnover. Pequeños incrementos en el calcio sérico producen una disminución en la producción de hormona paratiroidea (PTH) y en la activación del turnover óseo.

Los suplementos diarios de **calcio** de 1 g o más disminuyen la pérdida ósea en las mujeres con osteoporosis (**Nivel de evidencia 1a**). Los estudios sobre DMO en mujeres postmenopáusicas tratadas con suplementos de calcio sugieren que estos pueden producir un aumento de entre un 1% a 3% de la DMO, dependiendo de la cantidad de ingesta total de calcio, el lugar donde se determine la DMO y del número de años de menopausia.

Los suplementos farmacológicos de calcio disminuyen el riesgo de fracturas vertebrales (30) en un 40 % (**Nivel de evidencia 1b**), pero su efecto es menor sobre las fracturas de cadera (22 %) (**Nivel de evidencia 2b**). Sólo el estudio de Chapuy et al analiza independientemente las fracturas de cadera en una población de mujeres ancianas, encontrando una disminución significativa de las mismas (31, 32).

La vitamina D juega un papel muy importante en la absorción del calcio a través del intestino y se ha demostrado que el envejecimiento produce una disminución casi lineal en los niveles séricos de vitamina D, lo que conlleva a un déficit de la misma en un importante número de sujetos ancianos, déficit que debe ser corregido para evitar mayor pérdida de masa ósea. Los derivados activos de la vitamina D (Calcitriol y Alfacalcidol) han demostrado ser capaces de disminuir la pérdida ósea en mujeres con osteoporosis, pero los efectos difieren según los diferentes estudios (**Nivel de evidencia 1b**).

Con respecto a su papel como agente antifracturario existen discrepancias sobre los resultados de la administración terapéutica de vitamina D. En pacientes mayores de 65 años la ingesta de 500 mg de calcio y 7000 UI de vitamina D al día se asocia a una reducción de un 60 % de todas las fracturas durante 3 años (**Nivel de evidencia 1b**).

En un estudio realizado en ancianos asilados la administración de 800 UI de Vitamina D redujo en un 43% la incidencia de fracturas de cadera y otras fracturas no vertebrales (33). Tilyard et al (34) encuentran que, tras 3 años de tratamiento con 0.25 mcgr/día de calcitriol y calcio, existe una disminución significativa de las fracturas vertebrales sólo en el subgrupo de mujeres osteoporóticas con 5 o menos fracturas vertebrales, aunque sí resultó significativa para todas las mujeres la disminución en las fracturas periféricas **(Nivel de evidencia 1b)**.

La administración parenteral de la **vitamina D** (vitamina D 2 ó D 3) con o sin suplementos de calcio disminuye el riesgo de fractura de cadera y de otras fracturas en los ancianos frágiles **(Nivel de evidencia 1b)**. No se ha demostrado el efecto sobre la fractura de la cadera **(Nivel de evidencia 4)**.

El uso de la vitamina D con calcio en mujeres ancianas con osteoporosis ahorra recursos y es recomendable que se ofrezca ese tratamiento a dichas mujeres **(Nivel de evidencia 1b)**, **(Grado de Recomendación A)**.

Ninguno de los derivados de la vitamina D han sido aprobados por la FDA como fármacos para el tratamiento de la osteoporosis.

TERAPIA HORMONAL SUSTITUTIVA: (THS)

Durante años se ha considerado que la terapéutica de primera elección para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis en la mujer postmenopáusica, con sintomatología climatérica asociada, es la terapia estrogénica. La THS con o sin progestágenos, previene la pérdida del hueso en mujeres con osteoporosis **(Nivel de evidencia 1b)** (35-37).

El efecto del THS es dosis-dependiente. La mayor parte de los autores (35, 38-43) admiten que pequeñas dosis de estrógenos (equivalentes a 1 mgrs. de valerianato de estradiol, 0.3 mgrs de estrógenos conjugados equinos o 25 µgrms de estradiol transdérmico) son suficientes para asegurar una adecuada protección de la masa ósea **(Nivel de evidencia 2b)**. La mayor parte de los estudios realizados para establecer la dosis mínima eficaz de estrógenos son observacionales, con escaso número de pacientes y de corta duración por lo que en este momento no se pueden establecer recomendaciones definitivas.

Según estos datos, cualquier terapia, desde el punto de vista de la prevención, debería de mantenerse, al menos teóricamente, hasta que hayan transcurrido 10 años desde el inicio de la menopausia en las mujeres que la desarro-

llan de forma cronológica y hasta los 55 o los 60 años en las que la instauración es precoz. De esta manera, conseguiremos que la pérdida masiva de masa ósea se retrase unos 10 años, tiempo que podría ser suficiente para evitar que la mujer desarrolle una osteoporosis. Algunos estudios no han observado diferencias en la masa ósea de las mujeres que utilizando la THS durante 20 años iniciaron el tratamiento en una etapa muy próxima a la menopausia, ni en aquellas que comenzaron después de haber cumplido los 60 años (44) **(Nivel de evidencia 4)**.

En cuanto a la prevención de fracturas, hasta hace pocos años no se habían diseñado estudios específicamente dirigidos a conocer el poder antifracturario de la THS, si bien la información disponible por ejemplo en el meta-análisis de Torgerson et al., apuntaba aunque no demostraba, su utilidad en la prevención de las fracturas óseas (45).

El WHI (*Women Health Initiative*) es un ensayo clínico que ha reclutado más de 16.500 mujeres posmenopáusicas inicialmente sanas y con una edad media de 63 años, cuyo objetivo primario era analizar la influencia de la THS sobre la prevención primaria de enfermedad cardiovascular y sobre el riesgo de cáncer de mama. Como objetivo secundario del estudio analizó también su influencia en el riesgo de fracturas tanto vertebrales como de cadera. El resultado ha sido la demostración de que la THS es capaz de reducir el riesgo de fracturas en general. En particular redujo el riesgo relativo (RR) de fractura de cadera en un 34% (RR=0,66; IC95%: 0,45-0,98) y el de fractura vertebral en un 43% (RR=0,57; IC95%: 0,45-0,98) (46) **(Nivel de evidencia 1a)**.

Otro ensayo clínico, el HERS (*Heart and Estr ogen Progestin Replacement Study*) incluyó 2763 mujeres, con enfermedad coronaria establecida, cuyo objetivo primario consistió en evaluar la eficacia de la THS en la prevención secundaria del infarto agudo de miocardio (IAM). Este estudio no demostró beneficio, pero tampoco un aumento del riesgo en la enfermedad coronaria (47). Por el contrario en el estudio WHI se demostró que la THS aumentaba significativamente el número de IAM, en forma de 7 casos más de cardiopatía isquémica por cada 100.000 mujeres/año tratadas, y también el riesgo de padecer un ictus e 8 casos más por cada 10.000 mujeres/año tratadas. En base a estos resultados se ha generado una gran controversia en el entorno científico que obliga a un reanálisis de los riesgos y beneficios de la THS desde una perspectiva global. Una vez confirmado el poder antifracturario de la THS se consolidan como las dos grandes indicaciones de la THS el tratamiento de la clínica climatérica y la prevención y tratamiento de la osteoporosis.

CALCITONINA (TC)

La TC es una hormona polipeptídica que actúa sobre el hueso inhibiendo reversiblemente la función del osteoclasto. Además, la TC tiene propiedades analgésicas. El alivio del dolor ocurre cuando se administra TC durante 3 meses a los pacientes con dolor agudo tras una fractura por aplastamiento **(Nivel de evidencia 1b)** (48). En la actualidad se dispone de TC salmón y derivada semisintética de la TC de anguila, tanto por vía intranasal, la más utilizada, como vía parenteral (subcutánea o intramuscular).

La administración subcutánea induce hasta un 20% de efectos secundarios transitorios como náuseas o rubefacción, siendo mucho mejor su aceptabilidad y tolerancia por vía intranasal, lo que facilita el cumplimiento terapéutico. No está asociada con efectos adversos significativos cuando se utiliza TC nasal, excepto la aparición de rinitis. Siendo la mayoría de ellas (97%) leves o moderados. La TC, tanto nasal como subcutánea, está aprobada por la FDA desde 1984 para el tratamiento de la osteoporosis.

La TC actúa sobre el hueso disminuyendo el turnover óseo y disminuyendo la pérdida de masa ósea sobre todo en hueso trabecular. En general la TC, a dosis de 200 UI/día produce un aumento discreto de la densidad mineral ósea (DMO) del 1-1.5%. Los efectos se han documentado mejor en la columna vertebral y en el antebrazo que en la cadera, aunque se han demostrado efectos en todos estos sitios **(Nivel de evidencia 1b)** (49-52). El efecto positivo se mantiene durante al menos 5 años si se persiste con el tratamiento (53).

En relación a la prevención de fracturas, destacan los estudios realizados por Overgaard y col. (54) y Rico y cols (55), que con escaso número de pacientes, demuestran una reducción del número de nuevas fracturas vertebrales en las pacientes tratadas con TC.

El estudio PROOF (*Preventive Recurrente of Osteoporotic Fracture*) es un estudio amplio, multicéntrico, aleatorizado y doble ciego controlado con placebo y seguimiento durante 5 años; su objetivo fue determinar la eficacia y seguridad a largo plazo de la TC de salmón intranasal en la prevención de fracturas vertebrales en pacientes con osteoporosis postmenopáusicas. Como objetivos secundarios, se obtuvieron datos de DMO y de fracturas no vertebrales (56). Incluyó un total de 1.255 mujeres, con al menos una fractura vertebral (entre una y cinco fracturas) dorsal ó lumbar; y osteoporosis densitométrica. Las pacientes recibieron 1.000 mg de calcio más 400 UI de vit. D. Se aleatorizaron 4 grupos: 100 UI (n= 316), 200 UI (n= 316) ó 400 UI (n= 312) diarias de TC de salmón

ó placebo (n= 311) por vía intranasal. El 59% de las participantes abandonaron el estudio prematuramente, siendo similar los porcentajes de abandono en los distintos grupos.

En el grupo de tratadas con 200 UI de TC de salmón intranasal se apreció una reducción del 33% del RR de aparición de nuevas fracturas vertebrales en comparación con el grupo placebo (RR= 0.67, IC95%: 0.47 - 0.97) (**Nivel de evidencia 1b**). Se redujo en un 35% el número de mujeres con nuevas fracturas vertebrales múltiples (2 ó más) en el grupo de mujeres tratadas con 200 UI de TC en comparación con el grupo placebo. No hubo diferencias en el número de fracturas de cadera en ambos grupos.

La valoración conjunta de estos 3 ensayos previamente mencionados se hace en el meta-análisis de Cranney et al. (57), esta valoración demuestra con un total de 1481 casos estudiados, la falta de efectividad de la TC de salmón en la prevención de fracturas de cadera y otras fracturas no vertebrales (RR=0,52, IC 95%: 0,22-1,23).

RALOXIFENO (RLX)

El RLX es un derivado benzotiofeno no esteroideo y pertenece a la segunda generación de los moduladores selectivos de receptores estrogénicos (SERM), con acción agonista estrogénica en determinados tejidos (hueso e hígado) y antagonista estrogénica en tejidos reproductores (mama y útero). A través de la unión con el receptor estrogénico, y especialmente por medio del elemento de respuesta al raloxifeno (RRE), activa la producción del TGF-B, una proteína que se comporta como factor de crecimiento y cuya función es disminuir la actividad y el número de osteoclastos, por lo cual disminuye la resorción ósea, preservando la masa ósea.

El RLX tiene a nivel óseo un efecto similar a los estrógenos, produciendo una disminución del remodelado óseo, una disminución de la pérdida de masa ósea postmenopáusica tanto a nivel de columna lumbar como cuello femoral y cuerpo total, tiene efectos también positivos sobre la incidencia de fracturas vertebrales. En general produce un aumento de la masa ósea del 2-2.5% en relación al grupo tratado con calcio (**Nivel de evidencia 1b**) (58).

En relación a su eficacia antifracturaria el estudio MORE (*Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation*) (59), analizó a 7705 mujeres, dividiéndolas en tres grupos: calcio, RLX 60 mgrs y RLX 120 mgrs. Es un estudio aleatorizado, doble ciego, con unas pérdidas del 11% a tres años y el análisis a tres años de-

mostró la reducción de la incidencia de fracturas vertebrales en un 52% en las mujeres con diagnóstico de osteoporosis sin fracturas vertebrales previas (RR=0.5; IC95%: 0.4-0.8) y en un 38% en las mujeres con osteoporosis establecida (RR=0.7; IC95%: 0.6-0.9) (**Nivel de evidencia 1b**) (59-61). Además, en ambos grupos de pacientes se observó una reducción significativa en la aparición de fracturas vertebrales múltiples (dos o más) entre el 50 y el 80%. Es destacable que el efecto sobre la disminución de fracturas vertebrales clínicas con RLX es significativo al 1.º año de tratamiento, con una reducción del RR del 61% (62). Los resultados a los 4 años muestran un mantenimiento de los datos conseguidos a 3 años. En conjunto, el RR de nuevas fracturas vertebrales es de RR=0.64; IC95%:0.53-0.76. En mujeres sin fractura vertebral previa el riesgo de nueva fractura es de RR=0.51:IC95%:0.35-0.73 y en aquellas con fractura vertebral previa el riesgo es de RR=0.66 (0.55-0.81). No hay datos sobre las fracturas no vertebrales.

En cuanto a efectos adversos, el RLX aumenta el riesgo de trombosis venosa profunda y tromboembolismo en un grado similar al observado con el tratamiento estrogénico (**Nivel de evidencia 1b**). Se ha observado un incremento de los sofocos (6%) en relación al grupo placebo.

RLX ha sido aprobado por la FDA para la prevención y tratamiento de la osteoporosis

BISFOSFONATOS (BP)

Los BP son análogos del pirofosfato de gran afinidad por los cationes formando sales insolubles, lo que determina una fuerte unión a la hidroxiapatita ósea. Son fármacos con potente acción frenadora de la resorción ósea, efecto que consiguen por tres mecanismos diferentes: disminuyen el número de unidades de remodelado, inhiben el reclutamiento de los osteoclastos, bloquean sus funciones, inducen la apoptosis de los mismos y se incorporan a la superficie del hueso impidiendo su resorción. Los BP comercializados en España para el tratamiento de la osteoporosis son: etidronato (ET), alendronato (ALN) y risedronato (RIS).

Etidronato: Diversos estudios con ET en regímenes cíclicos han demostrado que este fármaco previene la pérdida ósea en la columna vertebral lumbar en las mujeres con osteoporosis (**Nivel de evidencia 1a**) (63,64) y disminuye el riesgo de fractura vertebral existiendo datos de hasta 7 años de seguimiento (**Nivel de evidencia 1b**) (65). Se ha publicado un meta-análisis de todos los ensa-

yos clínicos con ET en el que se demuestra una reducción del riesgo de fractura vertebral del 37% en mujeres con DMO inferior a -2DE sin reducción de otro tipo de fractura (66).

El efecto sobre las fracturas de cadera de este fármaco se ha estimado solo mediante estudios observacionales, que han mostrado una disminución del riesgo de fractura de cadera del 69% (**Nivel de evidencia 3**) (67).

Para el ET la pauta recomendada es en forma cíclica, 400 mgrs/día vía oral durante dos semanas, seguida de un período de 13 semanas, asociando calcio a distintas horas del fármaco, para no interferir con su absorción. Se recomienda asociar vitamina D.

Se ha observado la aparición de osteomalacia con la utilización de ET, debido a la proximidad entre la dosis terapéutica y la tóxica del fármaco, aunque en un estudio reciente tras 7 años de tratamiento en forma cíclica no se observó dicha complicación (68).

Alendronato: Es un aminobisfosfonato que se administra también por vía oral. Ha demostrado en una amplia población que aumenta la masa ósea a nivel de columna lumbar y también en el cuello de fémur (**Nivel de evidencia 1b**) (69,70).

En relación al efecto antifracturario, ALN reduce el riesgo de fracturas vertebrales y de cadera (**nivel de evidencia 1a**) (71). El estudio FIT (*Fracture Intervention Trial*) (72), fue realizado en mujeres de 55-80 años con fractura vertebral previa, seguidas durante 3 años. Este estudio incluyó 4432 mujeres postmenopáusicas, con osteoporosis y un grupo de ellas con aplastamientos vertebrales, demostró que el ALN reduce, en un amplio porcentaje tanto las fracturas vertebrales (50%) como las del cuello de fémur (51%) y en otros niveles (**Nivel de evidencia 1a**). El estudio tuvo una pérdida del 3.5% y el riesgo relativo de fractura vertebral a los tres años fue de RR=0.56; IC95%:0.39-0.80.

El efecto protector del ALN se mantiene 7 años después de iniciado el tratamiento (73).

Los BP deben tomarse con el estómago vacío, y seguir estrictamente las normas de administración para evitar lesiones esofágicas potencialmente importantes por lo que se recomienda tomarlos ambos por la mañana, con un vaso de agua no mineral y esperar al menos 30 minutos en posición erigida antes de ingerir cualquier alimento. La dosis recomendada de ALN, es de 10 mg/día por vía oral, y en la actualidad la administración semanal ha demostrado tener una

eficacia análoga a la dosis diaria sobre la DMO (**Nivel de evidencia 1a**) y puede mejorar la aceptabilidad y adherencia al tratamiento (74).

Risedronato: Es un aminobisfosfonato que se administra por vía oral. Tiene efecto positivo sobre la DMO lumbar y femoral.(75). (**Nivel de evidencia 1b**)

El estudio VERT (*Vertebral Efficacy Risedronate Therapy*) (76,77), realizado en mujeres posmenopáusicas de más de 85 años, con dos o más fracturas vertebrales, DMO inferior a -2 DE y un seguimiento de 3 años. En la rama americana del estudio incluyó 1628 mujeres con osteoporosis postmenopáusica y aplastamiento vertebral (76) con una pérdida del 42% de las pacientes, y en la rama europea del estudio se incluyeron 1226 mujeres (77) con una pérdida del 44%, ha demostrado que RIS disminuye el riesgo de fractura vertebral y no vertebral (**Nivel de evidencia 1b**), siendo el RR de fractura vertebral a los 3 años de $RR=0.64; IC95\%:0.42-0.80$ para la rama americana del estudio y de $RR=0.5; IC95\%:0.36-0.73$ para la rama europea del estudio.

El estudio HIP (78), con un seguimiento de 3 años, es el único ensayo realizado aleatorizado controlado diseñado «ad hoc» teniendo como criterio de valoración final la disminución de fracturas de cadera en mujeres mayores de 70 años. En este estudio RIS también ha demostrado reducción de riesgo de fractura de fémur del 60% en las mujeres con fractura vertebral previa (**Nivel de evidencia 1b**). Sin embargo no hubo diferencias significativas en las mujeres sin fractura previa o en mujeres de 80 años con factores de riesgo.

La dosis recomendada de RIS es de 5 mgrs/día, y , al igual que en el caso de ALN, en la actualidad disponemos de la presentación semanal y los resultados de los estudios demuestran una ganancia de DMO equiparable para las dos formas de administración (79).

En cuanto a los efectos adversos de los BP , son fundamentalmente gastrointestinales (dolor abdominal, dispepsia, estreñimiento y diarrea), aunque dichos efectos no eran mayores que los del grupo placebo tanto en el estudio FIT con ALN como el estudio VERT con RIS (**nivel de evidencia 2b**). Se han descrito varios casos de esofagitis asociado al uso de ALN, debiendo interrumpirse inmediatamente el tratamiento. Estudios endoscópicos demuestran una baja toxicidad sobre la mucosa digestiva (**Nivel de evidencia 2b**).

Raramente causan reacciones de hipersensibilidad (eritema o exantema) o hipocalcemia sintomática. Saber también que los BP están contraindicados en presencia de insuficiencia renal grave.

TERIPARATIDA (TRP)

La TRP o PTH 1-34 recombinante humana, obtenida de una cepa de *Escherichia coli* modificada por biotecnología y con una secuencia idéntica a los 34 aminoácidos de la región N-terminal de la PTH humana, ha sido aprobada recientemente para el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusicas. Hay datos suficientes para poder afirmar que la TRP administrada vía subcutánea en dosis de 20 µg/día aumenta la DMO y reduce el riesgo de fracturas de manera importante e inequívoca. Este efecto anabólico se debe a que, administrada de esta forma pulsátil, estimula la generación y proliferación de las células osteoprogenitoras de la médula ósea, induce la transformación de las células quiescentes que yacen sobre la superficie ósea y prolonga la vida de estos últimos al inhibir su apoptosis. Es decir, aumenta la formación ósea.

En el estudio de Neer y cols. (80) que incluía 1637 mujeres osteoporóticas con una o más fracturas vertebrales se ha demostrado que la inyección de TRP reduce de una manera clara las fracturas vertebrales y no vertebrales en un 65-69% y 53-54% respectivamente. Esto se asocia con un incremento significativo de la DMO en columna lumbar (9.7-13.7%) y fémur total (2.6-3.6%). El efecto sobre la DMO se mantiene incluso después de retirar el medicamento, permaneciendo la DMO estable a 4 años, y la reducción del riesgo de fractura se mantiene igualmente al menos hasta 18 meses (81). (**grado de evidencia 1A**)

En otro estudio realizado en mujeres postmenopáusicas con fracturas vertebrales severas, la TRP reduce en un 80% el riesgo de nuevas fracturas vertebrales y en un 95% las fracturas vertebrales moderadas y severas, comparadas con placebo (82).

La limitación de la duración del tratamiento con TRP a 2 años en USA y 18 meses en Europa se debe a la aparición de osteosarcomas en ratas tratadas a dosis muy altas (150-200 veces mayores que las utilizadas en humanos) y durante el equivalente a más del 50% de la esperanza de vida de estas ratas. La FDA considera que estos estudios en ratas no son comparables a los realizados en humanos, ni en la dosis o duración de la administración de TRP ni en cuanto a la biología ósea, permitiendo su uso en la osteoporosis postmenopáusicas.

En relación a la seguridad y efectos secundarios, los ensayos con TRP se han asociado a pocos efectos secundarios en humanos, siendo los más frecuentes: náuseas, cefalea, calambres en MMII, muy ocasionalmente hipotensión y palpitaciones, hiperuricemia y aumento transitorio del calcio sérico y del calcio en orina (80-82).

RANELATO DE ESTRONCIO (RS)

El RS es un fármaco que actúa como desacoplador de la remodelación ósea, llamado por ello de acción dual sobre el hueso, lo que quiere decir que aumenta la formación ósea y disminuye la resorción ósea.

Sobre la DMO el RS ha demostrado prevenir la pérdida de DMO en mujeres postmenopáusicas en tratamiento con 1 gr/día durante 2 años produciendo incrementos de la DMO en columna lumbar del 5.53% y en cadera, en cuello femoral del 2,4% y fémur total del 3,2% (83).

En cuanto al efecto antifracturario, se han realizado dos grandes estudios en la prevención de fractura osteoporóticas. El Estudio SOTI (*Spinal Osteoporosis Therapeutical Intervention*) (84) y el estudio TROPOS (*Treatment of Peripheral Osteoporosis*) (85) administrando 2 gramos diarios de RS vía oral. En ellos, tras 3 años de tratamiento en pacientes osteoporóticas postmenopáusicas, se ha demostrado una disminución del riesgo de fractura vertebral que se sitúa en el 31% y el 49%, según se trate de pacientes sin fractura anterior de más de 80 años o con fractura anterior en el primer año de tratamiento.

Las recomendaciones referentes a las intervenciones para la prevención de la osteoporosis y de las fracturas, que se basan en una revisión sistemática de la literatura, se resumen en la tabla 8.

TABLA 8. *Fármacos recomendados para el tratamiento de la Osteoporosis*

Intervención DMO		Fracturas Vertebrales	Fractura de cadera
Calcio con o sin vitamina D)	A	A	B o C
Estrógenos	A	A	A*
Alendronato	A	A	A
Risedronato	A	A	A
Raloxifeno	A	A	-
Etidronato	A	A	B o C
Calcitonina	A	A	B o C
Flúor	A	A†	-

TABLA 8. *Fármacos recomendados para el tratamiento de la Osteoporosis* (continuación)

Intervención DMO		Fracturas Vertebrales	Fractura de cadera
Esteroides anabólicos	A	–	B o C
Calcitriol	A	A†	D
Tibolona	A	–	–
Ipriflavona	B o C	–	–
Teriparatide	A	A	–
Ranelato de estroncio	A	A	A**

† Datos inconsistentes.

*: Evidencia en fracturas no vertebrales que incluye cadera

** En personas de alto riesgo

BIBLIOGRAFIA

- (1) NIH Consensus Statement: Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy. March 27-29, 2000. http://consensus.nih.gov/cons/111/111_statement.htm. Accessed April 20, 2004.
- (2) Díez A., Puig J., Martínez M.T., Díez J.L., Aubia J., Vivancos J.: Epidemiology of fracture of the proximal femur associated with osteoporosis in Barcelona, Spain. *Calcif. Tissue Int.* 1989, **44**: 382-386.
- (3) Albright, F., Reifenstein EC Jr.: Metabolic bone disease: Osteoporosis. In: «The parathyroid glands and metabolic bone disease». Eds. F. Albright y E.C. Reifenstein; pag 145-204. Williams and Wilkins, Baltimore, 1948.
- (4) Miller PD, Zapalowski C, Kulak CAM, Bilezikian JP: Bone densitometry: the best way to detect osteoporosis and to monitor therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, **84**: 1867-71.
- (5) Schwartz AV, Kerlsey JL, Maggi S, Tuttleman M, Ho SC, Jonsson PV et al: International variation in the incidence of hip fracture: cross-national project on osteoporosis for the WHO program for research on aging. *Osteoporosis Int* 1999, **9**: 242-253.
- (6) Richelson LS, Wahner HW, Melton LJ III, Riggs BL. Relative contributions of aging and estrogen deficiency to postmenopausal bone loss. *N Engl J Med* 1984 ; **311**: 1273-75.

OSTEOPOROSIS

- (7) Hansen MA, Overgaard K, Riis BJ, Christiansen C. Role of peak bone mass and bone loss in postmenopausal osteoporosis: 12 year study. *BMJ* 1991; **303**: 961-64.
- (8) Díaz Curiel M., Carrasco JL, Honorato J, Perez Cano R, Rapado A, Ruiz Martínez I: Study of bone mineral density in lumbar spine and femoral neck in a Spanish population. *Osteoporosis Int* 1997 **7**: 59-64.
- (9) Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators: Risk and benefits of estrogen plus progestin in Healthy Postmenopausal Women. *JAMA*, 2002, **288**: 321-333.
- (10) Pfeilschifter J, Köditz R, Pfohl M, Schatz H: Changes in Proinflammatory Cytokine Activity after Menopause. *Endocrine Reviews* 2002, **23**: 90-119.
- (11) Girasole G, Giuliani N, Modena AB, Passeri G, Pedrazzoni M. Oestrogens prevent the increase of human serum soluble interleukin-6 receptor induced by ovariectomy in vivo and decrease its release in human osteoblast cells in vitro *Clin Endocrinol* 1999, **51**: 801-807.
- (12) Rogers A, Eastell R: The effect of 17 beta-estradiol on cytokines in cultures of peripheral blood mononuclear cells. *Bone* 2001, **29**: 30-34.
- (13) Bernard-Poenaru O, Roux C, Blanque R, Gardner C, de Vernejoul MC, Cohen-Solal ME Bone-resorbing cytokines from peripheral blood mononuclear cells after hormone replacement therapy: a longitudinal study *Osteoporosis Int* 2001 **12**: 769-776.
- (14) Rikkaard D, Russell RGG, Gowen M Oestradiol inhibits the release of tumour necrosis factor but not interleukin 6 from adult human osteoblast in vitro *Osteoporosis Int* 1992 **2**: 94-102.
- (15) Manolagas SC, Jilka RL: Mechanisms of disease: Bone marrow stroma, cytokines and bone remodeling: emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis *N Engl J Med* 1995, **332**: 305-311.
- (16) Khosla S: Minireview of the OPG/RANKL/RANK system *Endocrinology*, 2001, **142**: 5050-5.
- (17) Gruber CJ: Production and actions of estrogen. *N Engl J Med* 2002, **346**: 340-52.
- (18) Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999, **140**: 4367-4370.
- (19) Djurovic S, Os I, Hofstad AE, Abdelnoor M, Westheim A, Berg K: Increased plasma concentrations of TGF beta 1 after hormone replacement therapy *J Intern Med* 2000, **247**: 279-285.
- (20) Jilka RL: Cytokines, bone remodeling and estrogen deficiency: a 1998 update *Bone* 1998 **23**: 75-81.

- (21) Scheidt-Nave CE, Bismar H, Leidig-Bruckner G, Woitge H, Seibel MJ, Ziegler R, Pfeilschifter J: Serum interleukin 6 is a major predictor of bone loss in women specific in the first decade past menopause *J Clin Endocrinol Metab* 2001 **86**: 2032-2042.
- (22) Eastell R.,Heath H.,Kuner R.,Riggs B.L.: Factores hormonales, PTH, vitamina D. y calcitonina. En Osteoporosis. Etiologia, diagnostico y tratamiento. Eds. B.L.Riggs, LJ Melton. Raven Press. Ltd. Copyrigh Harofarma. 1989, 405-421.
- (23) Tieggs R.D. Body J.J., Wahner H.W., Barta J., Riggs B.L.: Calcitonin secretion in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 1985 , **312**: 1097-1100.
- (24) Crilly R.G., Francis R.M., Nordin B.E.C.: Steroid hormones, ageing and bone. Clinics in endocrinology and metabolism. 1982, **10**, Vol. I, 1 15-139.
- (25) Cannata J, Diaz Curiel M, Castrillo JM, Diez Perez A: Guía Práctica de manejo de la Osteoporosis. Ministerio de Sanidad y Consumo, INSALUD, 1992.
- (26) Compston JE, Papapoulos SE, Blanchard F: Report on Osteoporosis in The European Community: Current Status and Recommendations for the Future. *Osteoporos Int* 1998 , **8**: 531-534.
- (27) Physician´s Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. National Osteoporosis Foundation, Washington, 1998.
- (28) Kannus P, Parkkari J, Niemi S et als: Prevention of hip fracture in elderly people with use of a hip protector *N Engl J Med* 2000 **343**: 1506-13.
- (29) NIH Consensus Conference. Optimal calcium intake. NIH Cosensus Development Panel on Optimal Calcium Intake. *JAMA* 1994, **272**: 1942-1948.
- (30) Reid IR, Ames RW, Evans MC, Gamble GD, Sharpe SJ. Long term effects of calcium supplementation on bone loss and fractures in posmenopausal women: A randomized controlled trial. *Am J Med* 1995 , **98**: 331-335.
- (31) Chapuy MC, Arlot ME, Delmas PD, Meunier PJ. Ef fect of calcium and cholecalciferol treatment for three years on hip fractures in elderly women. *BMJ* 1994, **308**: 1081-1082.
- (32) Cumming R G, Nevitt M C. Calcium for prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 1997 , **12**: 1321-1329.
- (33) Gillespie WJ, Avenell A, Henry DA, O'Connell DL, Robertson J. Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures associated with involuntional and post-menopausal osteoporosis (Cochrane Review). In: The Cochrane Library, Issue 1, 2001. Oxford: Update Software.
- (34) Tilyard MW, Spears GFS, Thomson J, Dovey S. Treatment of postmenopausal osteoporosis with calcitriol or calcium. *N Engl J Med* 1992 , **326**: 357-362.

- (35) Barret-Connor E. Hormone replacement therapy . *BMJ* 1998; **317**: 457-461.
- (36) The writing Group for the PEPI study . Effects of hormone therapy on Bone mineral density. Results from the Postmenopausal estrogen/progestin interventions (PEPI) trial. *JAMA* 1996; **276**: 1389-1396.
- (37) Weiss SR, Ellman H, Dolker M, for the transdermal estradiol for preventing postmenopausal bone loss. A randomized controlled trial of four doses of transdermal estradiol for preventing postmenopausal bone loss Transdermal Estradiol Investigator group. *Obstet Gynecol* 1999 , **94**: 330-6
- (38) Conclusiones de la Conferencia de Consenso. Criterios de administración de la THS. A.E.E.M. Sitges (Barcelona) 1994.
- (39) Christiansen, C.; Christiansen, M.S. & cols. Pathophysiological mechanisms of estrogen effect on bone metabolism: Dose-reponse relationships in early postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol.*; 1982 , **55**: 1124-1130.
- (40) Ettinger, B.; Genant, H.K. & cols. Postmenopausal bone loss is prevented by treatment with low dosage estrogen with calcium. *Ann.Intern. Med.*; 1987 , **106**: 40-45.
- (41) Lindsay, R.; Hart, D.M. & cols. The minimum effective dose of estrogen for prevention of postmenopausal bone loss. *Obstet. Gynecol.*; 1984 , **63**: 759-763.
- (42) Lufkin EG, Wahner HW, O'Fallon WM, Hodgson SF, Kotowicz MA, Lane AW et al Treatment of postmenopausal osteoporosis with transdermal estrogen. *Ann Intern Med* 1992 ; **117**: 1-9.
- (43) Recker RR; Davies KM; Dowd RM; Heaney RP . The effect of low-dose continuous estrogen and progesterone therapy with calcium and vitamin D on bone in elderly women. A randomized, controlled trial. *Annals of Internal Medicine* 1999; **130**: 897-904.
- (44) Schneider DL, Barrett-Connor EL, Morton DJ. Timing of postmenopausal estrogen for optimal bone mineral density . The Rancho Bernardo study . *JAMA* 1997; **277**: 543-547.
- (45) Torgerson DJ, Bell-Syer SEM: Hormone Replacement Therapy and prevention of non-vertebral fractures A meta-analysis of randomized trials. *JAMA*, 2001 , **285**: 2891-2897.
- (46) Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the women's health initiative randomised controlled trial. *JAMA* 2002; **288**: 321-333.
- (47) Grady D, Herrington D, Bittner V. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: heart and estrogen /progestin replacement study follow-up (HERS II). *JAMA* 2002; **288**: 49-57.

- (48) Yoshimura M. Analgesic mechanism of calcitonin. *J Bone Miner Metab*, 2000 ; **18**: 230-233.
- (49) Thamsborg-G; Jensen-JE; Kollerup-G; Hauge-EM; Melsen-F; Sorensen-OH. Effect of nasal salmon calcitonin on bone remodeling and bone mass in postmenopausal osteoporosis. *Bone*. 1996; **18**: 207-12.
- (50) Reginster JY, Deroisy R, Lecart MP et al. A double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial of intermittent nasal salmon calcitonin for prevention of postmenopausal lumbar spine bone loss. *Am J Med*, 1995 ; **98**: 452-458.
- (51) Overgaard K. Effect of intranasal salmon calcitonin therapy on bone mass and bone turnover in early postmenopausal women: a dose-response study. *Calcif Tissue Int*, 1994 ; **55**: 82-86.
- (52) Reginster JY, Denis D, Deroisy R, et al. Long-term (3 years) prevention of trabecular postmenopausal bone loss with low-dose intermittent nasal salmon calcitonin. *J Bone Miner Res*, 1994 ; **9**: 69-73.
- (53) Reginster JY, Meurmans L, Deroisy R, et al. A 5-year controlled randomized study of prevention of postmenopausal trabecular bone loss with nasal salmon calcitonin and calcium. *Eur J Clin Invest*. 1994 ; **24**:565-569.
- (54) Overgaard K, Hansen MA, Jensen SB, Christiansen C. Effect of salmon calcitonin given intranasally on bone mass and fracture rates in established osteoporosis: a dose-response study. *BMJ*. 1992; **305**:556-561.
- (55) Rico H, Revilla M et al. Total and regional bone mineral content and fracture rate in postmenopausal osteoporosis treated with salmon calcitonin: a prospective study. *Calcif Tissue Int*, 1995 ; **56**: 181-185).
- (56) Chesnut III CH, Silverman S, Adriano K, Genant H, and PROOF Study Group. A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis: the Prevent of Osteoporotic Fracture Study . *Am J Med*, 2000; **109**: 267-276.
- (57) Cranney A, Tugwell P, Zytaruk N, et al. Meta-analysis of calcitonin for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Endocrine reviews* 2002 ; **23**: 540-551.
- (58) Delmas P, Bjarnason N, Mitlak B et al: Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1997 **337**: 1641-7.
- (59) Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, et al., for the Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene. Results from a 3-year randomized clinical trial. *JAMA*. 1999 Aug 18; **282**: 637-45.

OSTEOPOROSIS

- (60) Meunier PJ; Vignot E; Garnero P; Confavreux E; Paris E; Liu-Leage S; Sarkar S; Liu T; Wong M; Draper MW . Treatment of postmenopausal women with osteoporosis or low bone density with raloxifene. Raloxifene Study Group. *Osteoporos Int*: 1999; **10**: 330-6.
- (61) Lufkin EG; Whitaker MD; Nickelsen T; Argueta R; Caplan RH; Knickerbocker RK; Riggs BL- Treatment of established postmenopausal osteoporosis with raloxifene: a randomized trial. *J Bone Miner Res* 1998 ; **13**: 1747-54.
- (62) Eastell R, Adachi J, Harper K et al: The effect of Raloxifene on incident vertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: 4-T ear results from the MORE trial *J Bone Miner Res* 2000 **vol 15** (supl 1): S229.
- (63) Herd RJ; Balena R; Blake GM; Ryan PJ; Fogelman I. The prevention of early postmenopausal bone loss by cyclical etidronate therapy: a 2-year , double-blind, placebo- controlled study. *Am J Med* 1997 ; 103:92-9.
- (64) Meunier PJ; Confavreux E; Tupinon I; Hardouin C; Delmas PD; Balena R Prevention of early postmenopausal bone loss with cyclical etidronate therapy (a double-blind, placebo-controlled study and 1-year follow-up). *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 2784-91.
- (65) Miller, P. D. Watts N. B. Licata A. A. Harris S. T. Genant H. K. Wasnich R. D. Ross P. D. Jackson R. D. Hoseney M. S. Schoenfeld S. L. Valent D. J. and Chesnut C. H. Cyclical etidronate in the treatment of postmenopausal osteoporosis: efficacy and safety after seven years of treatment. *Am J Medicine* 1997 ; **103**: 468-476.
- (66) Cranney A, Guyatt G, Griffith L, et al. A meta-analysis of etidronate for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 2001 ; **12**: 140-151.
- (67) Van Staa TP, Abenhaim L, Cooper C. Use of cyclical etidronate and prevention of non-vertebral fractures. *Br J Rheumatol* 1998 ; **37**: 87-94.
- (68) Storm T, Steioniche T, Thamsborg G et als: Changes in bone histomorphometry after long-term treatment with intermittent cyclic etidronate for postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1993 **8**: 199-208.
- (69) Hosking D, Clair DE, Chilvers DSc et als: Prevention of bone loss with alendronate in postmenopausal women under 60 years of age. *N Engl J Med* 1998 , **338**: 485-492.
- (70) McClung M, Clemmesen B, Daifotis A, Gilchrist NL, Eisman J, Weinstein RS, Fuleihan GEH, Reda C, Yates AJ, Ravn P. Alendronate prevents postmenopausal bone loss in women without osteoporosis. A double-blind, randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1998 : **128**: 253-261.
- (71) Siris E: Alendronate in the treatment of Osteoporosis: A review of the clinical trials. *J Women's Health & Gender-Based Medicine* 2000 **9**: 599-606.

- (72) Black DM, Cumming SR, Karpf DB et als: Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. *Lancet* 1996 **348**: 1535-1541.
- (73) Tonino RP, Meunier PJ, Emkey R, Rodriguez-Portales JA et als: Skeletal benefits of alendronate: 7-Year treatment of postmenopausal osteoporotic women. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 **85**: 3109-3115.
- (74) Schnitzer T, Bone HG, Crepaldi G, et al. Therapeutic equivalence of alendronate 70 mg once-weekly and alendronate 10 mg daily in the treatment of osteoporosis. *Aging* 2000; **12**: 1-12.
- (75) Mortensen L; Charles P; Bekker PJ; Digennaro J; Johnston CC Jr Risedronate increases bone mass in an early postmenopausal population: two years of treatment plus one year of follow-up. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 ; **83**: 396-402.
- (76) Harris ST; Watts NB; Genant HK; McKeever CD; Hangartner T; Keller M; Chesnut CH 3rd; Brown J; Eriksen EF; Hoseney MS; Axelrod DW; Miller PD Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. Vertebral Efficacy With Risedronate Therapy (VERT) Study Group. *JAMA* 1999, **282**: 1344-52.
- (77) Reginster J; Minne HW; Sorensen OH; Hooper M; Roux C; Brandi ML; Lund B; Ethgen D; Pack S; Roumagnac I; Eastell R Randomized trial of the effects of risedronate on vertebral fractures in women with established postmenopausal osteoporosis. Vertebral Efficacy with Risedronate Therapy (VERT) Study Group. *Osteoporos Int* 2000; **11**: 83-91.
- (78) McClung MR, Geusens P, Miller PD, Zippel H et als: Effect of Risedronate on the risk of hip fracture in elderly women. *N Engl J Med* 2001 **344**: 333-40.
- (79) Brown JP, Kendler DL, McLung MR, et al. The efficacy and tolerability of risedronate once week for treatment of posmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 2002; **2**: 103-111.
- (80) Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gerich A, Reginster YP et al: Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001 , **344**: 1434-1441.
- (81) Lyndsay R, Scheele WH, Neer R, Pohl G, Adami S, Mantalen C, et al: Sustained vertebral fracture risk reduction after withdrawal for teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis. *Arch Intern Med* 2004 , **18**: 2024-30.
- (82) Capuzzo KA, Delafuente JC: Teriparatide for severe osteoporosis. *Ann Pharmacother*. 2004, **38**: 294-302.

OSTEOPOROSIS

- (83) Reginster JY, Deroisy R, Dougados M, Jupsin I, Colette J, Roux C. Prevention of early postmenopausal bone loss by strontium ranelate: the randomized two-year , double-masked, dose-ranging, placebo-controlled PREVOS trial. *Osteoporos Int* 2002; **13**: 925-931.
- (84) Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, et als: The effects of Strontium Ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis *N Engl J Med* 2004 , **350**: 459-468.
- (85) Reginster JY, Seeman E, De Vernejoul MC et al. Strontium Ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in post-menopausal women with osteoporosis: TROPOS study. *J Clin End Metab* Feb 2005 ; doi: 10. **1210/jc**. 2004-1774.

Osteomalacia y Raquitismo

MARÍA JESÚS MORO ÁLVAREZ, MANUEL DÍAZ CURIEL
Y JOSÉ ESPINOZA PINEDA

INTRODUCCIÓN

Actualmente con el término de osteomalacia y/o raquitismo se designa un grupo de enfermedades con similar patogenia, radiología e histología caracterizada por un trastorno generalizado de la mineralización de la matriz osteoide, tanto en hueso cortical como trabecular maduro, consecuencia de un defecto en el depósito de calcio y fósforo. Este trastorno conduce al acúmulo de osteoide no mineralizado y disminuye la resistencia ósea. Las manifestaciones clínicas fundamentales incluyen dolor y deformidad músculo-esquelética, debilidad muscular e hipocalcemia asintomática. Si este trastorno se da en la infancia, mientras el esqueleto se encuentra en fase de crecimiento, se denomina raquitismo, y se caracteriza por afectación de las placas epifisarias y crecimiento óseo anómalo.

ETIOLOGÍA

Para el proceso de mineralización del osteoide se necesitan dos condiciones básicas: por un lado que haya calcio y fósforo a nivel óseo en concentraciones suficientes así como unos niveles normales de metabolitos de la vitamina D; por otro, que no existan inhibidores de la mineralización.

La causa más frecuente de osteomalacia es un déficit de vitamina D. Este puede deberse a múltiples causas pero sobre todo a déficit nutricional, la falta de exposición a la luz solar, el envejecimiento y a enfermedades como: malabsorción intestinal, Síndrome de Fanconi, hepatopatías y síndrome nefrótico. Existe además, un tipo de osteomalacia, conocida como osteomalacia oncogénica, que ocurre en determinados tumores de origen mesenquimal, localizados preferentemente en cara y cuello.

También puede aparecer osteomalacia a consecuencia de efectos tóxicos sobre la función del osteoblasto por la ingesta exagerada de antiácidos que contienen aluminio, o por otros fármacos como: anticonvulsivantes (fenobarbital y fenitoina), colestiramina, rifampicina, isoniazida, óxidos férricos, cadmio y ocasionalmente bifosfonatos. Por otro lado, existen casos de osteomalacia asociados a una alteración metabólica de la vitamina D con resistencia a la acción de la misma, que están asociados a una alteración genética. El gen involucrado en este trastorno es el denominado PHEX, se hereda bien como un rasgo ligado al cromosoma X, o como un rasgo genético autosómico dominante (1-4).

En resumen, y desde un punto de vista práctico, los procesos causantes de osteomalacia y raquitismo se pueden dividir en tres grupos: a) los que cursan con alteraciones de la vitamina D, b) las hipofosfatemias de otro origen, hereditarias o adquiridas, y c) los que suponen un acúmulo de inhibidores de la mineralización (tabla I) (1-4).

TABLA I. *Causas de Osteomalacia y Raquitismo*

Alteraciones de la vitamina D

Deficiencia de vitamina D

Insuficiencia renal

Deficiencia de 1 α hidroxilasa (raquitismo vitamina D dependiente tipo I)

Anomalías de los receptores (raquitismo vitamina D dependiente tipo II)

Hipofosfatemias no relacionadas con la vitamina D

Osteomalacia oncogénica

Tubulopatías adquiridas (síndrome de Fanconi, etc)

Raquitismos hipofosfáticos hereditarios

Ingesta excesiva de antiácidos

Inhibidores de la mineralización

Hipofosfatasa

Acidosis crónica

Intoxicación aluminica

Flúor

Etidronato

Otras

Ingesta de calcio deficiente (niños)

Osteomalacia axial

Fibrogénesis imperfecta

A continuación comentaremos más detenidamente algunas de estas patologías.

Deficiencia de síntesis y/o aporte de vitamina D (Raquitismos u Osteomalacias nutricionales)

Como ya hemos mencionado si el déficit de vitamina D se da en la infancia, mientras el esqueleto se encuentra en fase de crecimiento, la enfermedad se denomina raquitismo, y se caracteriza por afectación de las placas epifisarias y crecimiento óseo anómalo. Sin embargo, cuando este déficit afecta a adultos originando afectación metabólica ósea la enfermedad se denomina osteomalacia.

Los llamados raquitismos nutricionales son raros en países industrializados, pero son todavía un problema de salud pública en muchos países tales como Nigeria, Etiopía, Yemen y Bangladesh. Un déficit de vitamina D aparece especialmente entre niños que son alimentados exclusivamente con lactancia materna y dietas basadas en cereales con limitada variedad. Estudios en niños asiáticos y africanos sugieren también que dietas con bajo contenido en calcio provocan un aumento del catabolismo de la vitamina D y el desarrollo de un déficit de vitamina D y raquitismo. Por tanto, déficit de calcio y/o de vitamina D en la dieta representan ambos por sí solos o en combinación determinantes para la patogénesis de los raquitismos nutricionales (5-12).

En un estudio reciente en USA, se revisaron los casos de raquitismo en niños y jóvenes menores de 18 años entre los años 1986 y 2003. Se identificaron 166 casos. Aproximadamente el 83% eran de raza negra y 96% eran lactantes (6). La Academia Americana de Pediatría recientemente ha recomendado un mínimo de 200 UI/de vitamina D para los niños comenzando el 2.º mes de vida.

La osteomalacia es todavía una importante enfermedad metabólica ósea con un aumento de su prevalencia en ciertas regiones del mundo así como en ancianos de las grandes ciudades. La enfermedad se presenta con una amplia variedad de manifestaciones clínicas, bioquímicas y radiográficas mimetizando muchas veces otras enfermedades músculo-esqueléticas, incluida la osteoporosis. En el adulto ya que una gran parte de la vitamina D procede de la síntesis epidérmica y solo el 5-10% de la dieta, la principal causa de una síntesis deficiente es la falta de exposición solar. A pesar de que España es un país soleado, no es infrecuente su desarrollo en personas ancianas, ya que a partir de los 60 años se produce un déficit en su producción que debe compensarse con aporte exógeno. Un aporte inadecuado es un factor importante en adultos en los que

además de una escasa exposición solar, se asocia una dieta inadecuada: anorexia, dietas vegetarianas estrictas o sin pescado azul (1-4).

Malabsorción

En nuestro medio y en la edad adulta, más frecuente que la depleción intrínseca, es la depleción secundaria a una malabsorción tanto de calcio como de vitamina D por enfermedades intestinales. En general cualquier entidad que disminuya la superficie de absorción puede causar un déficit de vitamina D: enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca, anastomosis yeyuno-ileales, etc. En este apartado también hay que incluir el tratamiento con corticoides, que altera la absorción del calcio, quizás bloqueando las proteínas transportadoras de este, y también actuando sobre los osteoblastos (1,2).

Defectos de la hidroxilación hepática (osteodistrofia hepática)

Se ha comprobado que en las hepatopatías crónicas, la 25-hidroxilación de la vitamina D se conserva hasta fases avanzadas, siempre que exista un mínimo aporte del precursor. Las patologías que van a tener una repercusión precoz son las que afectan a las vías biliares, ya que conducen a esteatorrea y malabsorción intestinal, siendo la cirrosis biliar primaria una de las más frecuentes (1-4). Muchas veces en el tratamiento sintomático se administra colestiramina, que quela los ácidos biliares en el intestino y puede contribuir a una mayor malabsorción.

Los anticonvulsivantes, particularmente fenobarbital y fenitoína, producen una activación enzimática hepática que puede limitar la 25-hidroxilación formando otros metabolitos inactivos. También se ha descrito alteración de la hidroxilación con tuberculostáticos (rifampicina). La administración crónica de corticoides puede disminuir los niveles de 25-(OH)D.

Todas estas patologías van a caracterizarse por una bioquímica común: bajos niveles de 25(OH)D, hipocalcemia leve o normocalcemia, fosforemia normal o descendida discretamente y PTH elevada.

Osteodistrofia renal (defecto de hidroxilación renal en la insuficiencia renal)

En las alteraciones óseas secundarias a enfermedades renales intervienen múltiples factores, y aunque la patogénesis no está totalmente aclarada, los dos

factores fundamentales son el hiperparatiroidismo secundario y el defecto de la 1- alfa-hidroxilasa.

El aumento de la síntesis de PTH en la insuficiencia renal es debido a la retención de fosfatos, que se inicia con un filtrado glomerular menor de 60-80 ml/m. La hiperfosfatemia inhibe la síntesis de 1,25(OH)₂D, disminuye la absorción intestinal de calcio con la consiguiente hipocalcemia, que estimula la producción de calcitriol a través de la PTH, ya que inicialmente la 1-hidroxilación no está afectada. En cambio en las fases avanzadas de la insuficiencia renal, con filtrados glomerulares menores de 25-30 ml/min se afecta directamente la hidroxilación, y a pesar de valores elevados de PTH, los niveles de calcitriol serán comparativamente bajos (1-4).

En pacientes sometidos a diálisis la acumulación de aluminio, que puede complicar a veces la insuficiencia renal avanzada, impide también el proceso de mineralización normal.

Raquitismos hereditarios

Estos a su vez los podemos clasificar como los llamados raquitismos «dependientes» de la vitamina D que se deben a alteraciones de la vitamina D o sus receptores, y los llamados raquitismos «resistentes» que son debidos a pérdidas renales de fosfato que producen hipofosfatemia (13-19).

Raquitismo dependiente de la vitamina D tipo I (R VDD-I)

Se debe a la ausencia congénita de 1-alfa-hidroxilasa. Se transmite con herencia autonómica recesiva. Se trata de una enfermedad que debuta en la infancia, suele manifestarse en los dos primeros años de vida, y diagnosticada precozmente tiene muy buena respuesta a la administración de dosis fisiológicas de calcitriol diarias (de 0,25 a 1 microgr/día) (15,17).

Raquitismo dependiente de la vitamina D tipo II (R VDD-II)

Es una alteración genética del receptor de la vitamina D que determina una respuesta insuficiente de los receptores que son los receptores necesarios para la acción del calcitriol. Se transmite en forma autonómica recesiva. Las manifestaciones suelen aparecer en los dos primeros años de vida, aunque se han descrito

casos esporádicos leves de aparición más tardía. Además de las manifestaciones típicas del raquitismo, dos tercios de los pacientes presentan alopecia. El tratamiento requiere de dosis muy elevadas (suprafisiológicas) de calcitriol y calcio (15).

Raquitismo resistente a la vitamina D hipofosfatémico ligado al cromosoma X

Es el más común de los raquitismos resistentes a la vitamina D, la prevalencia está en torno a 5/100.000. La enfermedad se transmite con carácter dominante ligada al cromosoma X. Se debe a una mutación en el gen PHEX (phosphatase regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome). Este gen situado en el cromosoma X, codifica la síntesis de un metaloproteasa cuyo substrato fisiológico no está bien identificado. El gen se expresa en hueso y en otros tejidos pero no en el riñón. Primeramente, la deficiencia de PHEX provoca una alteración directa en la mineralización del hueso. Además, parece que PHEX sería el responsable en condiciones normales de degradar un factor estimulador de fosfatúria, de modo que ante la ausencia de PHEX aumentarían los niveles de dicho factor produciendo un aumento de la fosfatúria e hipofosfatemia. Por último otro mecanismo patogénico sería una inhibición de la síntesis de calcitriol provocada por este mismo factor fosfatúrico. Dicho factor fosfatúrico todavía no ha sido identificado, aunque varios estudios recientes apuntan a que pueda tratarse del FGF-23 (factor de crecimiento fibroblástico 23) (13,14,16,18,19).

En general las manifestaciones aparecen en los dos primeros años de vida, pero la expresividad clínica es variable y hay casos menos graves que se manifiestan como osteomalacia en la edad adulta.

En estos pacientes, tratados con fosfatos, se observa frecuentemente hiperparatiroidismo, aunque los niveles de fósforo sérico no alcancen el rango normal. El mecanismo patogénico es desconocido. Una disminución en las concentraciones de calcio iónico después del aporte de los suplementos de fósforo pueden contribuir al desarrollo de este hiperparatiroidismo. Sin embargo, también se han observado hiperparatiroidismo secundario y terciario en estos pacientes cuando nunca habían recibido el tratamiento con fosfatos. Esto apunta a que se deba a una regulación anómala de la producción y/o degradación de la propia hormona paratiroidea (PTH). Recientemente se ha publicado un caso de expresión del gen PHEX en glándulas paratiroideas hipertrofiadas de un paciente con Raquitismo resistente a la vitamina D hipofosfatémico ligado al cromosoma X (XLH). No está claro si el gen mutante PHEX puede inducir hiperparatiroidismo por una anómala regulación de las peptidasas (20).

Raquitismo resistente a la vitamina D hipofosfatémico autosómico

Parece deberse a mutaciones en el gen que codifica el FGF-23 situado en el cromosoma 12, provocando un FGF-23 que es más resistente a la degradación por las proteasas. La enfermedad se transmite con carácter autosómico dominante, pero la penetrancia es incompleta y la expresión clínica variable de modo que algunos casos se manifiestan en la infancia y otros en la edad adulta (16,18).

Raquitismo resistente a la vitamina D hipofosfatémico con hiper calciuria

Es una patología muy infrecuente, solo se han descrito unas pocas familias. No se conoce su trastorno genético, pero parece estar relacionado con defectos en las proteínas implicadas en la reabsorción tubular renal del fósforo. A diferencia de otros raquitismos hipofosfatémicos, cursa con un aumento en la calciuria y de los niveles séricos de calcitriol. Su expresividad clínica también es muy variable.

Osteomalacia hipofosfatémica por insuficiente aporte de fosfatos

La hipofosfatemia puede estar causada por un déficit importante en la ingesta o por un defecto de su absorción intestinal: dieta con exceso en fibras, administración prolongada de laxantes o de antiácidos con hidróxido de aluminio. Quizás la causa más importante de déficit de aporte sea la nutrición parenteral prolongada, ya que con frecuencia incluye bajas cantidades de fósforo.

Síndrome de Fanconi o acidosis tubular renal

En este síndrome existe un defecto de reabsorción tubular global en el que a la pérdida de fosfato se suma la de otros elementos como aminoácidos, glucosa, bicarbonato y ácido úrico con poliuria, hipopotasemia e hiponatremia.

Hay formas hereditarias secundarias a defectos congénitos del metabolismo como la cistinuria o la intolerancia a la fructosa, pero también existen formas adquiridas secundarias a enfermedades como mieloma, amiloidosis, síndrome de Sjögren o intoxicaciones por metales pesados o tetraciclinas en mal estado.

Osteomalacia Oncogénica

Es un trastorno poco frecuente, asociado generalmente a tumores poco agresivos, de origen mesenquimal, muy vascularizados. Pueden asentar a cualquier nivel, 45% se localizan en extremidades inferiores, 27% en cabeza y cuello y 17% en extremidades superiores. Las características clínicas y bioquímicas son similares a las de los raquitismos hipofosfatémicos hereditarios (21-24).

La fosfaturia e hipofosfatemia de estos pacientes no esta mediada por la PTH ni por el factor relacionado con la PTH (PTHrp), pues sus concentraciones y la calcemia en estos pacientes son normales. Se supone entonces, que el trastorno se debe a la producción excesiva de FGF-23 u otros factores promotores de fosfaturia por las células tumorales (25-27).

El tratamiento consiste en la extirpación del tumor . Cuando no es posible, por su localización o porque no se detecta deben administrarse suplementos de fosfato (1-3 gr/d).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El hueso osteomalácico tiene menor resistencia y está predispuesto a las fracturas que a veces pueden ser la primera manifestación de la enfermedad. Pueden desarrollarse fracturas con traumatismos mínimos, sobre todo costales, aplastamientos vertebrales y deformidades progresivas (incremento de la cifosis dorsal y curvatura de las extremidades). Además estos pacientes pueden tener dolores óseos aún sin fracturas evidentes, por ejemplo a nivel de las caderas, lo que produce una marcha antiálgica balanceante o «marcha de pato», a lo que contribuye también la debilidad muscular proximal por miopatía (1-4, 28-30).

En la exploración, la palpación ósea es dolorosa, hay hipotonía muscular y los reflejos osteotendinosos están preservados. Cuando existe hipocalcemia, pueden aparecer manifestaciones tetánicas. A veces pueden aparecer sinovitis o cuadros similares a la distrofia simpática refleja. La hipofosfatemia puede asociarse también a calcificaciones ligamentosas y sacroileítis, que pueden simular una espondilitis anquilosante.

Los síntomas osteomalácicos, a veces acompañados de adelgazamiento, pueden ser la primera manifestación de un síndrome de malabsorción.

En los niños con raquitismo se dan además deformidades óseas (genu valgo o varo, deformidades craneales y costales, etc), alteraciones dentarias y retraso del crecimiento.

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de sospecha de osteomalacia se establece a partir de las manifestaciones clínico-radiológicas y bioquímicas (determinación de calcio y fósforo séricos, fosfatasa alcalina, niveles de 25(OH)D, 1,25(OH)2D y de PTH) (3). Será muy importante la historia clínica, interrogando sobre la edad de inicio y duración de la sintomatología, historia familiar de problemas similares, una posible enfermedad gastrointestinal, hepática o renal asociada, y también es importante preguntar sobre las condiciones medioambientales.

En la osteomalacia por deficiencia de vitamina D, que es la causa más frecuente de osteomalacia, suelen existir niveles séricos de calcio bajos o normales-bajos, hipocalciuria, hipofosfatemia y aumento de la fosfatasa alcalina y la PTH. Los niveles de 25(OH)D, que son los que mejor reflejan el estado de vitamina D, están también bajos, pero los de 1,25(OH)2D son variables y carecen de valor diagnóstico en esta situación. Sin embargo, los parámetros más sensibles para el diagnóstico son la fosfatasa alcalina y la PTH Intacta, pues están elevados en más del 90% de los pacientes (3). En la tabla II se resumen las características bioquímicas de los distintos tipos de osteomalacia.

TABLA II. *Características bioquímicas de los diversos tipos de Osteomalacia/Raquitismo*

	Calcio	Fósforo	25(OH)D	1,25(OH)2D	PTH	F. Alcalina
Deficiencia de Vitamina D	↓/N	↓/N	↓↓	V	↑	↑
Tóxicos (Fluor, aluminio)	N	N	N	N/↓	V	V
VDDR-I	↓	↓	N	↓↓	↑	↑
VDDR-II	↓	↓	N	↑↑	↑	↑
Raquitismo hipofosfatémico	N	↓↓	N	↓/N	N/↑	↑/N
Osteomalacia oncogénica	N	↓↓	N	↓	↑	↑
Hipofosfatasa	N	N	N	N	N	↓

El hallazgo radiológico más típico son las «pseudofracturas» o líneas de Looser: son bandas hipodensas localizadas en la cortical de los huesos largos y dispuestas perpendicularmente a la superficie que corresponden a fracturas de stress. Asientan en costillas, clavículas, borde interno del fémur, codo, radio, metacarpianos, borde externo de la escápula y ramas púbcas y presentan hipercaptación gammagráfica. Con el tratamiento adecuado las líneas desaparecen dando lugar a una zona de esclerosis con una ligera reacción perióstica. Otros signos radiológicos de osteomalacia son más inespecíficos como por ejemplo, el ensanchamiento de la sínfisis púbcica y de las articulaciones sacroilíacas, la osteopenia o la pérdida de altura de los cuerpos vertebrales (1-4,28-30). En los niños con raquitismo son típicas las alteraciones de las metafisis, que están ensanchadas y son irregulares (10-12).

En la gammagrafía aparecen focos hipercaptadores múltiples, que no deben confundirse con metástasis.

El diagnóstico definitivo de certeza de osteomalacia se obtiene con la realización de una biopsia ósea previa administración de tetraciclinas que se fijan en los lugares que están siendo mineralizados. Con ello, se observa un aumento de la superficie osteoide, que llega a recubrir la mayor parte de las trabéculas. Además, el grosor y volumen total del osteoide también están aumentados, siendo este superior al 10%. También se observa un retraso en el tiempo de mineralización (superior a 100 días).

No obstante, y como resumen diremos que, en ausencia de biopsia ósea, se puede establecer el diagnóstico de presunción de osteomalacia por déficit de vitamina D ante un cuadro clínico de: 1) hipocalcemia, hipofosfatemia, aumento de la fosfatasa alcalina o pseudofracturas 2) aumento de PTH o disminución de 25(OH)D; 3) ausencia de insuficiencia renal y 4) resolución tras tratamiento con vitamina D.

PREVENCIÓN

Las dosis dietéticas recomendadas de vitamina D en los adultos son en torno a 400-800 UI diarias dependiendo de si existe o no una adecuada exposición solar. A partir de los 60 años es necesario incrementar los periodos de exposición solar, ya que el metabolismo epidérmico de la vitamina D desciende. En caso de ancianos en tratamiento crónico con corticoides es recomendable el uso de preparados de vitamina 25(OH)D; también puede valorarse su administración en pacientes epilépticos y patologías gastrointestinales.

TRATAMIENTO

En caso de osteomalacia por deficiencia de vitamina D se deben administrar cantidades mucho mayores de las recomendadas como requerimientos básicos, aproximadamente de 30.000-100.000 UI semanales, en una o varias dosis, durante varios meses. Si existe malabsorción, es necesario administrar dosis mayores, de unas 200.000 UI semanales (1-4).

Además, se debe asegurar una ingesta de calcio adecuada, de 1-2 g/día.

La respuesta individual es difícilmente predecible, por lo que se deben controlar periódicamente los niveles de calcio sérico y urinario, fosfato y fosfatasa alcalina, con el fin de comprobar la mejoría progresiva de las alteraciones previas y evitar la aparición de hipercalcemia o hipercalcinuria.

Una vez corregido el trastorno, que suele precisar de unos 6 meses, se debe mantener la administración de vitamina D a dosis fisiológicas.

Entre los preparados disponibles de vitamina D disponemos de:

- 25(OH)D colecalciferol o calcifediol (Hidroferol®) disponible en gotas (1 gota = 240 UI) y en ampollas de 16.000 UI o 100.000 UI tienen una vida media circulante de 2 o 3 semanas y son útiles pues no pueden acumularse. Su acción no solo se realiza a través de su transformación a 1,25 (OH)2D en el riñón sino que es eficaz por una acción directa en el receptor de la vitamina D.
- 1,25 (OH)2D o calcitriol (Rocaltrol®) preparado en forma de cápsulas de 0,25 y 0,50 µg. Solo se utilizan en la osteomalacia secundaria a trastornos renales y resistencia de los receptores. La dosis dependerá de la enfermedad basal. Su monitorización debe ser cuidadosa por el riesgo de hipercalcemia.

Las osteomalacias por hipofosfatemia se tratan con suplementos de fosfato y calcitriol. Puede administrarse por vía intravenosa en forma de fosfato potásico y fosfato sódico en los casos secundarios a nutrición parenteral. En el resto, el tratamiento es oral, con dosis de 2-3 mg/d, monitorizando sus niveles séricos (14-19).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Francis RM, Selby PL. *Osteomalacia. Balliere's Clin Endocrinol Metab* 1997; **11**: 145-163.

- (2) Parfitt AM. Osteomalacia and related disorders. En: Avioli LW, Krane SM, eds. *Metabolic Bone disease*, 2.^a ed. Academic Press.
- (3) Riancho JA, Napal J, Olmos JM, et al. Osteopatía de hipovitaminosis D avanzada: espectro clínico y bioquímico. *Rev Esp Enf Metab Oseas* 2000 ; **9**: 104-108.
- (4) Llorente Melero MJ. Osteomalacia. En Calvo Catalá J, Herrera Ballester A. *Patología metabólica ósea*, J. Aguilar S.L. Valencia 1997.
- (5) Pettifor JM. Nutritional rickets: deficiency of vitamin D, calcium, or both? *Am J Clin Nutr.* 2004; **80** (6 Suppl): 1725S-9S.
- (6) Weisberg P, Scanlon KS, Li R, Cogswell ME. Nutritional rickets among children in the United States: review of cases reported between 1986 and 2003. *Am J Clin Nutr.* 2004; **80** (6 Suppl): 1697S-705S.
- (7) Abrams SA. Nutritional rickets: an old disease returns. *Nutr Rev.* 2002; **60**: 111-5.
- (8) Chesney RW. Vitamin D deficiency and rickets. *Rev Endocr Metab Disord.* 2001; **2**: 145-51.
- (9) Singh J, Moghal N, Pearce SH, Cheetham T. The investigation of hypocalcaemia and rickets. *Arch Dis Child.* 2003 ; **88**: 403-7.
- (10) Wharton B, Bishop N. *Rickets. Lancet.* 2003 ; **362**: 1389-400.
- (11) Mughal Z. Rickets in childhood. *Semin Musculoskelet Radiol.* 2002 ; **6**: 183-90.
- (12) Pettifor JM. Rickets. *Calcif Tissue Int.* 2002 ; **70**: 398-9.
- (13) Riancho JA. Resistencia a la vitamina D. En: Rapado A, Díaz Curiel M, eds. *Hipovitaminosis D en España*. FHOEMO. Madrid 2000.
- (14) Jan de Beur SM, Levine MA. Molecular pathogenesis of hypophosphatemic rickets. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 ; **87**: 2467-2473.
- (15) Kato S, Yoshizawa T, Kitanaka S, Murayama A, Takeyama K. Molecular genetics of vitamin D- dependent hereditary rickets. *Horm Res.* 2002 ; **57**: 73-8.
- (16) DiMeglio LA, Econs MJ. Hypophosphatemic rickets. *Rev Endocr Metab Disord.* 2001; **2**: 165-73.
- (17) Kitanaka S, Takeyama K, Murayama A, Kato S. The molecular basis of vitamin D-dependent rickets type I. *Endocr J.* 2001 ; **48**: 427-32.
- (18) Saggese G, Baroncelli GI. Hypophosphataemic rickets. *Horm Res.* 2000; 53 Suppl 3: 57-60.
- (19) Rowe PS. The molecular background to hypophosphataemic rickets. *Arch Dis Child.* 2000; **83**: 192-4.

OSTEOMALACIA Y RAQUITISMO

- (20) Schmitt CP, Mehls O. The enigma of hyperparathyroidism in hypophosphatemic rickets. *Pediatr Nephrol.* 2004; **19**: 473-7.
- (21) Carpenter. Oncogenic osteomalacia. A complex dance of factors. *N Engl J Med* 2003; **348**: 1705-1707.
- (22) Edmister KA, Sundaram M. Oncogenic osteomalacia. *Semin Musculoskelet Radiol.* 2002; **6**: 191-6.
- (23) Drezner MK. Tumor-induced osteomalacia. *Rev Endocr Metab Disor d.* 2001; **2**: 175-86.
- (24) Kumar R. Tumor-induced osteomalacia and the regulation of phosphate homeostasis. *Bone.* 2000; **27**: 333-8.
- (25) Kumar R. New insights into phosphate homeostasis: fibroblast growth factor 23 and frizzled-related protein-4 are phosphaturic factors derived from tumors associated with osteomalacia. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2002; **11**: 547-53.
- (26) Fukumoto S, Yamashita T. Fibroblast growth factor -23 is the phosphaturic factor in tumor -induced osteomalacia and may be phosphatonin *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2002; **11**: 385-9.
- (27) Fukumoto S, Yamashita T. Fibroblast growth factor (FGF)-23 and hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *Endocr J.* 2001; **48**: 603-10.
- (28) Reginato AJ, Falasca GF, Pappu R, et al. Musculoskeletal manifestations of osteomalacia: report of 26 cases and literature disease, 2.^a ed. Academic press.
- (29) Reginato AJ, Coquia JA. Musculoskeletal manifestations of osteomalacia and rickets. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2003; **17**: 1063-80.
- (30) Berry JL, Davies M, Mee AP. Vitamin D metabolism, rickets, and osteomalacia. *Semin Musculoskelet Radiol.* 2002; **6**: 173-82.

Hemocromatosis

JOSÉ MARÍA FERNÁNDEZ RAÑADA, JUAN JOSÉ GIL FERNÁNDEZ
Y CARLOS BLAS LÓPEZ

RESUMEN

La hemocromatosis hereditaria (HH) clásica es una enfermedad genética autosómica recesiva (AR) con una elevada prevalencia en individuos de origen caucásico. El fenotipo de sobrecarga de hierro se desarrolla a partir de la 3.^a-4.^a décadas de la vida. La tríada clínica de hiperpigmentación cutánea, cirrosis hepática y diabetes se produce en fases avanzadas cuando se ha establecido daño orgánico debido al depósito tisular de hierro. El diagnóstico precoz se basa en la elevación del índice de saturación de la transferrina (IST) en ayunas. En pacientes con elevación persistente del IST (>45%) y de la ferritina sérica se deben descartar otras causas de sobrecarga de hierro (hepatopatías virales, alcoholismo, hemopatías...). En la actualidad, el estudio del gen HFE permite identificar la causa del fenotipo HH en un 60-90% de los pacientes y evita la realización de otros estudios genéticos ó de biopsias hepáticas. La mayoría de enfermos con HH clásica ó ligada al HFE, presentan la mutación C282Y en homocigosis y en menor medida doble heterocigosis C282Y/ H63D. Estas mutaciones originan una proteína HFE defectuosa que altera los mecanismos de regulación de la absorción intestinal del hierro, produciéndose una hiperabsorción del mismo. Existen otros subtipos de HH en la clasificación de los trastornos primarios de sobrecarga de hierro de la OMIM (On line Mendelian Inheritance in Man). En pacientes con fenotipo HH no ligado al HFE, se debe considerar de forma individualizada la realización de estudios genéticos de 2.^a línea: receptor-2 de transferrina, (TFR-2), hemojuvelina (HJV), hepcidina (HAMP) ó ferroportina. En caso de fenotipo HH no explicable genéticamente en pacientes de >40 años, con ferritinas >1,000 µg/l, elevación de GOT y hepatomegalia se debe realizar biopsia hepática diagnóstica y para descartar fibrosis hepática. El diagnóstico genético poblacional, aunque controvertido, sería deseable para

diagnosticar pacientes asintomáticos e iniciar un tratamiento precoz antes de producirse daño orgánico y así reducir la morbimortalidad de esta enfermedad.

INTRODUCCIÓN

Bajo el término de hemocromatosis se incluyen un conjunto de enfermedades y situaciones patológicas caracterizadas por la existencia de sobrecarga corporal de hierro. Es habitual que al hablar de hemocromatosis nos estemos refiriendo a la hemocromatosis genética en su forma clásica ó hemocromatosis hereditaria (HH). Sin embargo, en la actualidad, el epígrafe de HH no incluye una única enfermedad: se han descrito 5 diferentes subtipos de HH estando implicados diferentes genes en cada uno de ellos, como más adelante se describirá con detalle.

Las descripciones clásicas de la HH se remontan a finales del siglo XIX cuando varios autores describieron un cuadro clínico común a diferentes pacientes que se caracterizaba por la tríada de cirrosis- diabetes mellitus e hiperpigmentación cutánea¹⁻⁴. Desde estas primeras descripciones hasta la actualidad ha pasado un largo intervalo de tiempo que nos ha llevado a un conocimiento mucho más profundo de las bases genéticas y moleculares implicadas en este proceso⁵⁻⁷.

El carácter hereditario de la HH era conocido desde principios del siglo XX⁴. En los años 1970-1980, se reconoció el carácter autosómico recesivo (AR) de la enfermedad y su asociación con una región del brazo corto del cromosoma 6, en concreto con un haplotipo del HLA de clase I, HLA-A3^{8,9}. Un hito reciente en la historia de la HH fue el descubrimiento en 1996 del gen HFE¹⁰ ó «gen de la hemocromatosis».

A pesar de todos los avances ocurridos muy recientemente en el conocimiento de las bases genéticas y mecanismos moleculares implicados en la homeostasia del hierro, son aún muchas las dudas existentes. La correcta homeostasia del hierro en humanos depende de una estrecha coordinación entre diferentes genes y proteínas, de muchos de los cuales aún se desconocen su función y mecanismos íntimos de acción.

CLASIFICACION DE LOS SÍNDROMES DE SOBRECARGA FERRICA

Una primera división dentro de estos síndromes caracterizados por un acúmulo excesivo de hierro en el organismo viene de diferenciar entre causas congénitas ó hereditarias y causas adquiridas. En los síndromes de hemocromatosis genética ó hereditaria la sobrecarga tisular de hierro en el organismo viene deter-

minada por trastornos genéticos ó moleculares que alteran la normal homeostasia del hierro, fundamentalmente debido a un incremento en la absorción intestinal del mismo (tal y como ocurre en la HH ligada al HFE). Por el contrario, en los síndromes de sobrecarga férrica adquiridos, ésta es secundaria a un aporte extrínseco excesivo de hierro (por vía enteral ó parenteral), enfermedad hepática (hepatopatías víricas ó secundarias a ingesta etílica) ó mala utilización medular del hierro (anemias sideroblásticas). En la tabla 1 puede verse una lista de circunstancias tanto hereditarias como adquiridas que pueden producir sobrecarga corporal de hierro. En la tabla 2 se resumen de forma comparativa las principales características de los 5 subtipos genéticos de HH reconocidos en la OMIM (base de datos sobre las enfermedades con herencia mendeliana en humanos). Como puede verse en esta tabla 2, los subtipos 1, 2-A, 2-B y 3 comparten muchas características en común (patrón hereditario, características fenotípicas, tipo de depósito orgánico del hierro, pronóstico y respuesta al tratamiento). Por el contrario el tipo 4 tiene sus propias características diferenciales, siendo su herencia autosómica dominante (AD) y con acúmulo de hierro en células del sistema reticuloendotelial.

TABLA 1. *Causas de sobrecarga de hierro*

CAUSAS HEREDITARIAS

Hemocromatosis hereditaria clásica, tipo 1 (ó ligada al gen HFE)
 Hemocromatosis neonatal
 Hemocromatosis juvenil
 Hemocromatosis africana
 Talasemia mayor
 Anemias diseritropoyéticas congénitas
 Anemia sideroblástica congénita
 Algunas anemias hemolíticas hereditarias (Déficit de PK, Déficit de G6PDH)
 Atransferrinemia congénita
 Aceruloplasminemia congénita
 Porfiria hepatocutánea tarda
 Síndrome de catarata congénita e hiperferritinemia

CAUSAS ADQUIRIDAS

Sobrecarga oral de hierro (aporte oral de hierro medicinal, exceso dietético de hierro)
 Sobrecarga parenteral de hierro (politransfusión de hematíes)
 Hepatopatías crónicas (Hepatitis C, hepatopatía alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica)
 Shunt porto-cava
 Anemia refractaria sideroblástica
 Anemias hemolíticas crónicas adquiridas
 Síndrome dismetabólico con sobrecarga de hierro

PK: piruvato kinasa; G6PDH: glucosa-6-fostato-deshidrogenasa

TABLA 2. Resumen de los trastornos primarios de sobrecarga de hierro clasificados como Hemocromatosis Hereditaria, según la OMIM

Entidad	Hemocromatosis Hereditaria ligada al HFE *	Hemocromatosis Hereditaria Juvenil		Hemocromatosis Hereditaria Ligada al TFR-2	Sobrecarga de hierro Ligada a la Ferroportina **
Clasificación de OMIM	Tipo 1	Tipo 2, subtipo A	Tipo 2, subtipo B	Tipo 3	Tipo 4
Gen implicado	HFE	HJV	HAMP	TFR-2	SLC40A1
Localización cromosómica	6p21.3	10q21	19q13.1	7q22	2q32
Proteína implicada	HFE	Hemojuvelina	Hepcidina	Receptor-2 Transferrina	Ferroportina
Patrón de herencia	AR	AR	AR	AR	AD
Edad de desarrollo de daño orgánico	4. ^a -5. ^a década (30-50 años)	2. ^a -3. ^a década (10-30 años)	2. ^a -3. ^a década (10-30 años)	4. ^a -5. ^a década (30-50 años)	4. ^a -5. ^a década (30-50 años)
Elevación del IST	1. ^o : anomalía detectable	1. ^o : anomalía detectable	1. ^o : anomalía detectable	1. ^o : anomalía detectable	En las fases avanzadas
Órganos que acumulan hierro	Hígado, corazón, glándulas endocrinas	Hígado, corazón, glándulas endocrinas	Hígado, corazón, glándulas endocrinas	Hígado, corazón, glándulas endocrinas	Hígado y bazo
Localización celular del depósito de hierro	Células Parenquimatosas	Células Parenquimatosas	Células Parenquimatosas	Células Parenquimatosas	Células del SRE
Potencial de daño orgánico	Variable	Elevado	Elevado	Variable	Bajo
Respuesta a las flebotomías \$	Excelente	Excelente	Excelente	Excelente	Pobre

OMIM: siglas en inglés de Online Mendelian Inheritance in Man; *: también denominada como hemocromatosis hereditaria (HH) o dismetabolismo del hierro; **: también denominada como hemocromatosis autosómica dominante (AD) o sobrecarga reitculocitocitaria de hierro; AD o enfermedad de la ferroportina; HJV: gen de la hemojuvelina (anteriormente denominado como HFE tipo 2); TFR-2: receptor 2 de la transferrina; AR: autosómico recesivo; AD: autosómico dominante; IST: índice de saturación de la transferrina; SRE: sistema reticuloendotelial; \$: Excelente: el IST y la ferritina disminuyen de forma simultánea y se desarrolla anemia; Elevado: el IST y la ferritina disminuyen de forma simultánea y se desarrolla anemia; Variable: el IST y la ferritina disminuyen de forma simultánea y se desarrolla anemia; Pobre: se produce un rápido descenso del IST con ferritinas persistentemente elevadas y con riesgo elevado de desarrollar anemia con las flebotomías.

ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS

La HH es la enfermedad autosómica recesiva (AR) más frecuente en la raza caucasiana. La prevalencia de los genes mutantes causantes de la enfermedad es muy alta: se estima que el 0,4% de la población europea presenta la mutación C282Y en homocigosis (1 de cada 250 personas) y cerca del 10% en heterocigosis^{10,11}. Estas cifras son similares en las poblaciones de raza blanca de América del Norte, Oceanía y África del Sur^{13,14,15}. Dentro de Europa, se observa una mayor frecuencia de la mutación en el Norte y Oeste, siendo máxima en Irlanda (14%), Escandinavia y Bretaña francesa y disminuyendo hacia el Este y el Sur. En España, la frecuencia del alelo C282Y está en torno al 4%. Se piensa que el haplotipo portador de la mutación surgió hace unos dos mil años en la población celta del norte de Europa y se transmitió con las migraciones posteriores hacia América y Oceanía^{16,17}. Esto explica la escasa presencia de la mutación en población africana, asiática o en aborígenes australianos. La mutación habría protegido a los portadores de la ferropenia producida por las pérdidas de sangre y los déficit nutricionales.

La mutación H63D es más antigua y frecuente que la C282Y (2,5% en homocigosis y hasta un 30% en heterocigosis); se asocia a diversos haplotipos y se encuentra más uniformemente distribuida por toda Europa, América y el subcontinente indio^{17,18}.

ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DEL METABOLISMO FERRICO

No existen mecanismos activos de excreción de hierro, por lo que el punto clave en la homeostasis del mismo es la absorción. Ésta tiene lugar fundamentalmente en los enterocitos del duodeno y yeyuno. El hierro férrico presente en la luz intestinal es transformado en hierro ferroso mediante ferrirreductasas¹⁹ como el citocromo B duodenal (Dcytb) y atraviesa la membrana de los enterocitos mediante transportadores de iones metálicos como el DMT1²⁰ («divalent metal transporter1»), también llamado NRAMP2 («natural resistance-associated macrophage protein 2»). En la membrana basolateral del enterocito existe otro mecanismo similar formado por una ferroxidasa, la hephasteína²¹ (que es una proteína con gran homología con la ceruloplasmina), y un transportador de iones, la ferroportina 1²²⁻²⁴, encargado de enviar los iones férricos a la circulación portal, donde se unen a la transferrina.

Las células que necesitan el hierro para su metabolismo presentan en su superficie receptores para la transferrina (TFR1), que se unen al complejo trans-

ferrina-hierro en presencia de un pH de 7,4 y forman un endosoma que se introduce en el interior de la célula. Este endosoma tiene en su interior un pH más ácido (alrededor de 6), que hace que el hierro se libere del complejo transferrina/receptor de transferrina y se una a la apoferritina para formar la molécula de ferritina. El endosoma, ya sin hierro, vuelve a la superficie de la célula donde, con un pH neutro, se libera la transferrina al torrente circulatorio.

Los mecanismos reguladores de este complejo proceso, que permiten al organismo aumentar la absorción de hierro en las situaciones en que se necesite, o bien disminuirlas cuando los depósitos de hierro del organismo estén repletos, no se conocen todavía con precisión, pero se van encontrando de forma progresiva más genes y proteínas implicadas.

Así, se sabe que si una célula tiene exceso de hierro en su interior, disminuye el número de receptores de transferrina en superficie y aumentan las moléculas de ferritina. La ferroportina 1, el DMT1, los receptores de transferrina y la ferritina tienen en sus mRNAs unas regiones llamadas IRE («iron responsive elements»), que mediante su unión a unas proteínas reguladoras (IRP o «iron regulatory proteins») ²⁵ permiten una regulación de su expresión a nivel post-transcripcional, de forma que una célula deficiente en hierro pueda aumentar las concentraciones de DMT1 y de receptores de transferrina y disminuir las de ferroportina 1 y ferritina, y viceversa.

El descubrimiento de la proteína HFE, y el hecho de que ésta no tenga sitios de unión para el hierro, han hecho que se haya ido estudiando su papel como proteína reguladora. Se piensa que HFE participa en la función que tienen las células de la cripta intestinal como «sensores de hierro», ya que la mutación C282Y impide que se forme el complejo HFE/ β 2-microglobulina/TRF1. Se ha visto que cultivos celulares con sobreexpresión de HFE y β 2-microglobulina muestran un aumento de la captación de hierro mediado por TRF1, por lo que una proteína HFE mutada daría lugar a una célula de la cripta con ferropenia, con bajos niveles de expresión de ferritina y elevadas de TRF1 ²⁶. Una vez en la vellosidad, esta célula deficiente tendría activada la cascada de señales para absorber hierro de forma persistente e independientemente de las necesidades de la eritropoyesis. Este modelo fisiopatológico se denomina «modelo de programación de la cripta» ⁵.

En el año 2000 se aisló un cDNA que codifica para el péptido antimicrobiano hepcidina (HAMP). Este péptido se une a la ferroportina 1 e induce su degradación, lo que provoca la acumulación intracelular de hierro. La interleuquina 6 produce elevación de los niveles de hepcidina en la inflamación ²⁷. La hepcidina

es un regulador muy importante: cuando los niveles de hierro en plasma aumentan, la síntesis de hepcidina también lo hace para conseguir que el hierro permanezca en los macrófagos y en los enterocitos. Es probable que HFE también intervenga en esta regulación mediada por hepcidina. Aunque no se conoce su función exacta, se cree que la hemojuvelina debe de ser un modulador de la hepcidina, ya que los pacientes con hemocromatosis juvenil y mutaciones en el gen HJV tienen niveles bajos de hepcidina a pesar de los niveles elevados de hierro en plasma.

ASPECTOS MOLECULARES

HFE: El gen HFE - inicialmente denominado HLA-H- fue clonado en el año 1996¹⁰. Se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3), a unas cuatro megabases en dirección telomérica de HLA-A. El gen HFE ocupa unas doce kilobases, contiene siete exones y codifica una proteína (HFE) constituida por 343 aminoácidos que está estructuralmente relacionada con las proteínas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que se encargan de la presentación de antígenos al receptor de células T. La proteína está formada por una pequeña cola citoplasmática, una porción transmembrana y una porción extracelular con tres dominios (α_1 , α_2 y α_3). En el dominio α_1 se encuentra el sitio de unión al TFR1, y en el α_3 el de unión a la β_2 -microglobulina, ver la figura 1. La proteína HFE está presente en la mayoría de las células humanas²⁸ y en el intestino delgado (donde se absorbe el hierro de la dieta), se encuentra en los enterocitos duodenales de las criptas y no a nivel apical, presentando una localización tanto perinuclear como en la membrana basolateral de las células. La proteína HFE juega un papel fundamental en la regulación de la absorción del hierro. El hecho de que HFE no se encuentre en las células maduras de las vellosidades, sino en sus precursores de las criptas, hizo pensar a los investigadores que esta proteína determina la capacidad absorbente de las células de las vellosidades. La presencia de una mutación en el gen HFE conduciría a una célula de la cripta deficiente en hierro.

Las dos principales mutaciones del gen HFE son la C282Y (845 G→A) y la H63D (187C→G). El estudio de estas 2 mutaciones permite identificar entre un 60-90% de los pacientes con HH genética, encontrándose fundamentalmente un estado de homocigosis para la mutación C282Y^{10,29,30}. En la mutación C282Y, se produce una sustitución aminoacídica en la posición 282 de cisteína por tirosina, lo cual impide la unión de Beta-2-microglobulina a la proteína HFE. En la mutación H63D, se produce una sustitución en el aminoácido 63 de histidina por aspartato, lo cual altera el dominio de unión a péptidos de la proteína HFE.

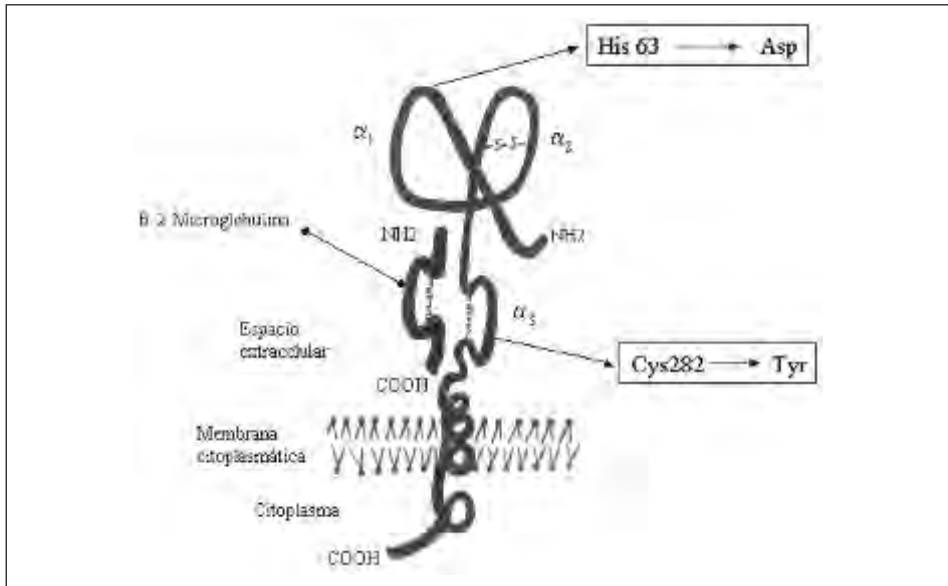


FIGURA 1. Representación esquemática de la proteína HFE. Se muestran los sitios donde se producen la mutación C282Y (cambio de cisteína por tir osina en posición 282) y la mutación H63D (cambio de histidina por aspartato en posición 63). Se muestra el sitio de unión a la Beta-2-microglobulina para formar el complejo HFE/Beta-2-micr o/TFRI.

Se han descrito otras mutaciones en el gen HFE, mucho menos frecuentes que las ya mencionadas: la más destacable parece ser la S65C; consiste en una sustitución A→T en el nucleótido 193 que produce un cambio de cisteína en lugar de serina en el codón 65 y se ha implicado en formas leves de hemocromatosis ³¹.

HJV: El gen de la hemojuvelina ha sido recientemente clonado en 1q21 ³², tiene unas 4 kilobases y codifica para una proteína de 426 aminoácidos, aunque se han descrito varias isoformas. La proteína se expresa fundamentalmente en el hígado, corazón y músculo esquelético, de forma similar a la hepcidina. Se piensa que su función es moduladora de la expresión de la hepcidina, ya que en los pacientes con hemocromatosis juvenil que presentan mutaciones en HJV, se encuentran niveles bajos de hepcidina pese a la sobrecarga férrica. Hasta el momento se han descrito seis mutaciones del gen en diversas familias, siendo la más frecuente la Gly320Val, que está presente en dos tercios de los casos.

HAMP: El péptido antimicrobiano hepcidina (HAMP) pertenece a una familia de péptidos que tienen la capacidad de romper las membranas de diversos patógenos celulares, por lo que tienen efecto antimicrobiano. El gen HAMP se en-

cuentra en 19q13, está formado por 3 exones ³³⁻³⁵ y codifica para un péptido de 84 aminoácidos. El péptido activo tiene 25 aminoácidos ³⁴ y se expresa de forma predominante en el hígado, aunque también, en menor medida, en corazón, cerebro y pulmón. La hepcidina es un regulador clave en el metabolismo férrico, ya que su expresión aumenta con la sobrecarga férrica, produciendo una unión a la ferroportina que disminuye la salida de hierro de las células ²⁷. Hasta ahora se han descrito seis mutaciones en el gen HAMP ³⁶⁻³⁸, que producen un cuadro de hemocromatosis juvenil indistinguible del producido por el gen HJV. Algunas aparecen en heterocigosis, combinadas con mutaciones en el gen HFE.

TFR2: El receptor de transferrina 2 (TFR2), a diferencia del TFR1, no está regulado negativamente por la sobrecarga celular de hierro, por lo que se encuentran niveles elevados del mismo en la hemocromatosis clásica ³⁹. El gen del TFR2 se encuentra en 7q22 y tiene 18 exones ³⁶. Se han encontrado dos transcritos: el alfa, de 801 aminoácidos, es muy similar en su dominio extracelular al del receptor clásico y se expresa en hígado, bazo, pulmón, músculo, próstata y células mononucleares sanguíneas; el beta es más pequeño, ya que no contiene las secuencias de los tres primeros exones, y se expresa prácticamente en todos los tejidos. Hasta ahora se han encontrado diversas mutaciones en el gen TFR2, casi todas en familias italianas ⁴¹. El hecho de que algunas de estas mutaciones (como la Y250X) produzcan ausencia de la proteína funcional, con un fenotipo de sobrecarga férrica, hace que se piense que la proteína TFR2 esté más relacionada con la regulación de la absorción que con la absorción misma.

FERROPORTINA 1: La ferroportina 1 es una proteína de 571 aminoácidos, presente en la membrana basolateral de los enterocitos y encargada de sacar hierro hacia el torrente circulatorio ²⁴. También se expresa en placenta, hígado, bazo y riñón. Está codificada por el gen SLC11A3 (solute carrier family 11, member 3), que se encuentra en 2q32 ^{42,43}. Las diversas mutaciones descritas de este gen ⁴³⁻⁴⁹ producen la llamada hemocromatosis dominante; además de su patrón de herencia, produce hiperferritinemia sin elevación inicial de la saturación de transferrina, quizá porque, al menos inicialmente, las mutaciones en la ferroportina producen disminución de la absorción del hierro de la dieta e impiden la liberación del hierro de los macrófagos ⁵⁰, así como acumulación del metal en el hígado.

CRIBADO GENÉTICO POBLACIONAL

Existe bastante debate sobre si se debe realizar un cribado genético en la población general ⁵¹. La hemocromatosis cumple con la mayor parte de los criterios propuestos por la OMS ⁵² para realizar el screening: tiene alta prevalen-

cia en determinadas poblaciones; existe un largo período asintomático; hay disponible un test genético fiable y de fácil aplicación; el tratamiento existente es barato y efectivo si se utiliza de forma precoz. Sin embargo, se argumenta en contra del cribado poblacional que la penetrancia de la enfermedad es baja, y que habría que estudiar a gran cantidad de personas para encontrar a una que se beneficiara de un diagnóstico y de un tratamiento precoz. La mayor parte de los expertos están de acuerdo en que un cribado poblacional debería incluir sólo a la mutación C282Y, ya que la H63D tiene menor penetrancia, y que este estudio no debería realizarse antes de los treinta años de edad^{51,53}.

ASPECTOS DIAGNOSTICOS EN LA HEMOCROMATOSIS

Historia clínica y exploración física

El diagnóstico de HH se debería sospechar en todos aquellos pacientes con las típicas características clínicas derivadas de una avanzada sobrecarga tisular de hierro que pueden presentar los siguientes síntomas y/o signos clínicos: fatiga, hiperpigmentación cutánea, hepatomegalia, artralgias y otras manifestaciones de artropatía, pérdida de la libido y otras manifestaciones de hipogonadismo, síntomas de hipotiroidismo, manifestaciones secundarias a la diabetes o a la cirrosis y síntomas debidos a insuficiencia cardíaca secundaria a miocardiopatía. Afortunadamente, en la actualidad, una gran mayoría de los pacientes con hemocromatosis son diagnosticados en fases precoces y asintomáticas antes de haber desarrollado diabetes o cirrosis^{54,55}. Para una descripción más pormenorizada de las manifestaciones clínicas debidas a la hemocromatosis se remite al lector al capítulo sobre esta materia del tratado de hematología «Williams of Hematology»⁵⁵.

Determinaciones bioquímicas indicativas de sobrecarga férrica

La manifestación fenotípica más precoz desde el punto de vista bioquímico en la HH es el incremento del índice de saturación de la transferina (IST). La HH debe ser sospechada en todo paciente con elevación del IST y de la ferritina sérica. El IST que se obtiene del cociente entre la sideremia sérica (Fe) y la capacidad total de fijación de hierro (TIBC) y se expresa en tanto por ciento ($\text{Fe/TIBC} \times 100$). La determinación del IST se debe de realizar en situación de ayuno y a primera hora de la mañana debido a las variaciones diurnas en los valores de sideremia. El punto de corte en relación al IST ha sido objeto de de-

bate, pudiendo considerarse que $IST > 45\%$ son patológicos e identifican al 98% de los pacientes con HH en estado homocigoto ⁵⁶. Hay que tener presente que el IST puede ser normal en etapas precoces (ó subfenotípicas), en mujeres jóvenes con HH homocigota y que también existen causas adquiridas de elevación del IST y de la ferritina (fundamentalmente las hepatopatías alcohólicas y virales). La determinación del IST puede ser empleada en el cribado poblacional de la HH, habiéndose demostrado en diferentes estudios que su uso es ampliamente eficaz y coste-efectivo ⁵⁷⁻⁵⁹. Esta determinación sencilla, barata y no invasiva permite un diagnóstico y tratamiento precoces que influyen de un modo claramente favorable en el pronóstico de esta enfermedad.

Los valores séricos de ferritina son los que mejor se correlacionan con los depósitos tisulares de hierro en el organismo. Se puede utilizar la ferritina sérica en el diagnóstico de la HH, siendo una determinación sensible aunque no específica y poco útil para realizar un diagnóstico precoz debido a que su elevación (ferritina $> 300 \mu\text{g/l}$ en varones y $> 200 \mu\text{g/l}$ en mujeres) ocurre cuando ya existe un elevado acúmulo tisular de hierro en el organismo ⁶⁰. La TIBC suele ser normal salvo en casos con cirrosis hepática en que puede estar disminuída.

Otras determinaciones de laboratorio

Dentro del estudio básico del paciente con sospecha de sobrecarga corporal de hierro, se deberían incluir los siguientes estudios ó determinaciones: hemograma completo con plaquetas y reticulocitos; glucemia basal; pruebas de función hepática que incluyan determinación de transaminasas (la glutámico oxalacético transaminasa- GOT - puede estar elevada en 2/3 de los pacientes), estudio básico de coagulación, hormonas tiroideas (T4 libre y TSH), serologías para virus de hepatitis B (VHB) y C (VHC), alfa-fetoproteína, parámetros básicos de hemólisis (haptoglobina, LDH, bilirrubina fraccionada). Otros estudios de laboratorio complementarios que pueden resultar de utilidad son: la prueba de tolerancia oral a la glucosa, determinación de gonadotropinas de la adenohipófisis y andrógenos.

Otros estudios complementarios

Pueden resultar de utilidad los siguientes estudios: la ecografía abdominal buscando signos de hepatopatía, cirrosis ó hipertensión portal; el electrocardiograma que puede revelar signos de bajo voltaje, extrasistolia, arritmias

de origen auricular ó ventricular ó alteraciones de la repolarización; la radiografía simple de tórax puede mostrar la presencia de cardiomegalia, incremento de las marcas vasculares pulmonares o derrame pleural; el ecocardiograma que puede mostrar signos de miocardiopatía restrictiva ó dilatada; la radiología simple de manos y muñecas y de otras articulaciones puede revelar edema de partes blandas con irregularidad de las superficies articulares, disminución del espacio articular y reducción de la densidad ósea; el estudio del líquido sinovial puede mostrar la presencia de cristales de hidroxapatita y de pirofosfato cálcico ⁵⁵.

Estudios genéticos en la hemocromatosis

Una vez establecida la sospecha clínica y fenotípica el siguiente paso es realizar el estudio genético para el gen HFE. El estudio de las mutaciones C282Y y H63D del gen HFE se realiza de forma rutinaria en prácticamente todos los laboratorios, amplificando mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los fragmentos del gen que contienen la mutación y estudiando el fragmento de diversas formas (por secuenciación automática, con digestión con enzimas de restricción y análisis del patrón electroforético resultante, mediante hibridación con oligonucleótidos específicos de alelo...). Las dos principales mutaciones del gen HFE son la C282Y y la H63D. En la figura 2 puede verse un ejemplo de una electroforesis en gel de poliacrilamida de diversos productos de PCR, tras digestión con enzimas de restricción, para el diagnóstico de estas mutaciones. El estudio de ambas permite identificar entre un 60-90% de los pacientes con HH genética, encontrándose fundamentalmente un estado de homocigosis para la mutación C282Y y en menor medida doble heterocigosis C282Y/H63D ^{10,29,30,61}. Otra mutación del gen HFE es la S65C que también ha sido relacionada con un fenotipo de sobrecarga de hierro ^{31,62}. De hecho, su proximidad a la mutación H63D hace que sea muy fácil estudiarlas en paralelo. Sin embargo, existen pacientes con sobrecarga férrica clínicamente significativa en ausencia de estas mutaciones del gen HFE.

En caso de pacientes con características clínico-bioquímicas muy sugestivas de tener una HH y en los que no se detecten mutaciones del gen HFE, ni otras causas que ocasionen hemosiderosis secundaria debe considerarse individualmente la realización de otros estudios genéticos de 2.^a línea, que incluyen el estudio de los genes de la hemojuvelina (HJV), de la hepcidina (HAMP), del receptor-2 de la transferrina (TFR2) y de la ferroportina ^{5,41}, ver figura 3 y tabla 2.

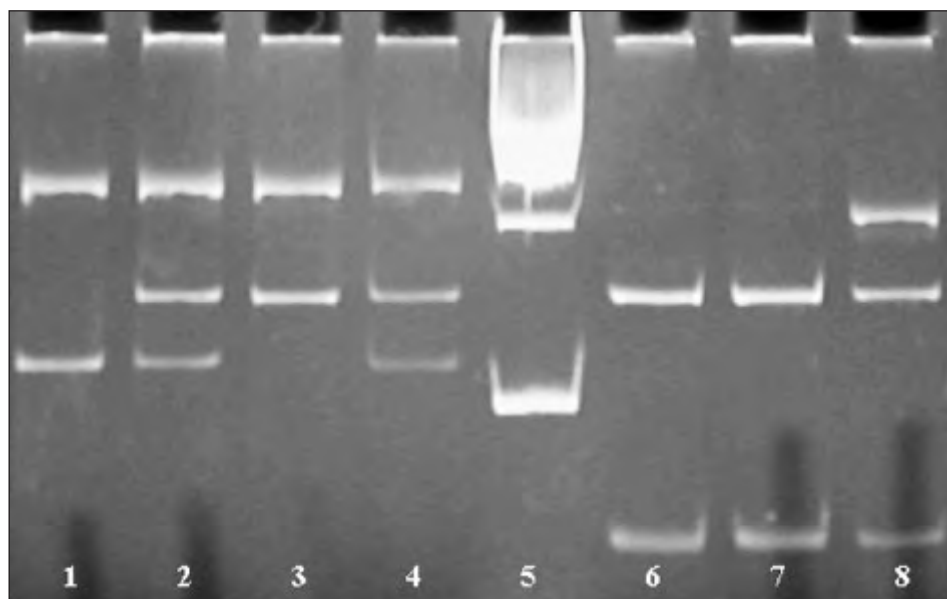


FIGURA 2. Resultados del estudio por PCR del gen HFE.

En algunos pacientes el fenotipo de sobrecarga de hierro ha podido ser explicado por la existencia de mutaciones en estado de heterocigosis para el gen HFE y el gen HAMP (dobles heterocigotos para HFE-HAMP)³⁷ ó del gen HFE y el gen TFR2 (dobles heterocigotos para HFE-TFR2)⁶¹. En algunos estudios recientes realizados en poblaciones orientales la sobrecarga férrica ha sido explicada por mutaciones en el gen TFR2⁶⁵.

En algunos casos la sobrecarga férrica puede ser explicada por mutaciones en el gen de la ferroportina que ocasionan un cuadro genético distintivo, autosómico dominante (AD), con sobrecarga de hierro en el sistema reticuloendotelial (macrófagos del hígado y bazo), elevación precoz de la ferritina sérica con IST normal ó bajo y mala respuesta a las sangrías terapéuticas con posible desarrollo de anemia con las mismas^{43,44}.

Biopsia hepática en los síndromes de sobrecarga de hierro

La indicación y utilidad clínica de la biopsia hepática en la era del diagnóstico genético de la hemocromatosis es objeto de debate. El estudio genético para el gen HFE ha eliminado la necesidad de realizar una biopsia hepática con fines diagnósticos en una proporción muy importante de pacientes⁶. Para algu-

nos autores su realización sólo estaría justificada en pacientes de > 40 años, con ferritinas de > 1000 µg/l, elevación de la GOT y hepatomegalia ^{6,55}.

En la muestra de tejido hepático se puede establecer la concentración hepática de hierro (CHH) y calcular el índice de hierro hepático (IHH) ⁷. La CHH son los micromoles de hierro por gramo (µmol/g) de peso seco, determinados por espectrometría atómica, siendo sus cifras normales entre 3,6 y 28,6 µmol/g y en la HH superior a 71 µmol/g. El acúmulo tisular de hierro puede ser leve (1,5 gramos; CHH > 30 µmol/g) como en la porfiria cutánea tarda, moderado (2-5 gramos; CHH > 100 µmol/g; ferritinas en torno a 500 µg/l) como en hepatopatías crónicas, enfermedades hemolíticas, porfiria cutánea tarda o severa (> 5 gramos; CHH > 200 µmol/g; ferritinas en torno a 750 µg/l). La fibrosis hepática se produce con acúmulos de hierro en el organismo de entre 5-10 gramos y fundamentalmente en asociación con alcoholismo. En la HH el depósito de hierro ocurre en los hepatocitos, mientras que en otras circunstancias de sobrecarga férrica (asociadas a transfusiones, hemólisis, hemodiálisis, aportes dietéticos) el hierro se deposita en las células de Kupffer. El IHH se obtiene del cociente entre la CHH y la edad del paciente [IHH= CHH/ edad (en años)]. Un IHH >1,9 (en ausencia de otras causas de sobrecarga parenteral de hierro) es altamente sugestivo de HH homocigoto, aunque un 10% de HH confirmadas por estudios genéticos tiene un IHH < 1,9 ^{7,66,67}.

La biopsia hepática es la prueba «gold estándar» para conocer si existe fibrosis hepática establecida y su grado, y permite establecer si existe cirrosis hepática asociada a la hemocromatosis e identificar la esteatosis, lesiones histológicas sugestivas de alcoholismo o de hepatopatías virales, etc. ^{7,68}. En caso de existir cirrosis se incrementa en 200 veces el riesgo de desarrollar un hepatocarcinoma siendo necesaria la realización secuencial de ecografías hepáticas y determinaciones de alfa-fetoproteína cada 6 meses.

Guyader y cols establecieron un índice pronóstico para predecir mediante variables clínicas no invasivas la presencia de fibrosis hepática severa en pacientes con HH homocigotos para la mutación C282Y del gen HFE ⁶⁹. Según los resultados de este estudio los pacientes con ferritinas < 1000 µg/l, ausencia de hepatomegalia y normalidad de la GOT no deberían ser sometidos a biopsia hepática debido a la baja probabilidad de fibrosis severa.

En pacientes con hepatitis crónica por VHC, las mutaciones del gen HFE en heterocigosis (tanto la C282Y como la H63D) son un factor de riesgo independiente que incrementa de forma significativa la probabilidad de desarrollar tanto fibrosis (OR 3,1) como cirrosis hepática (OR 3,6) ⁷⁰. De este modo, los pacientes con hepatitis crónica por VHC serían subsidiarios de ser sometidos a un screening genético para las mutaciones del gen HFE.

Otras pruebas de imagen

Dentro de los estudios más recientemente empleados para valorar la sobrecarga corporal de hierro cabe mencionar la resonancia magnética nuclear (RMN), fundamentalmente por su carácter no invasivo. Diferentes publicaciones han analizado el papel de la RMN en la estimación de la cantidad de hierro almacenado a nivel hepático ⁷.

En la figura 3, se expone un algoritmo para el diagnóstico de los enfermos con sobrecarga férrica.

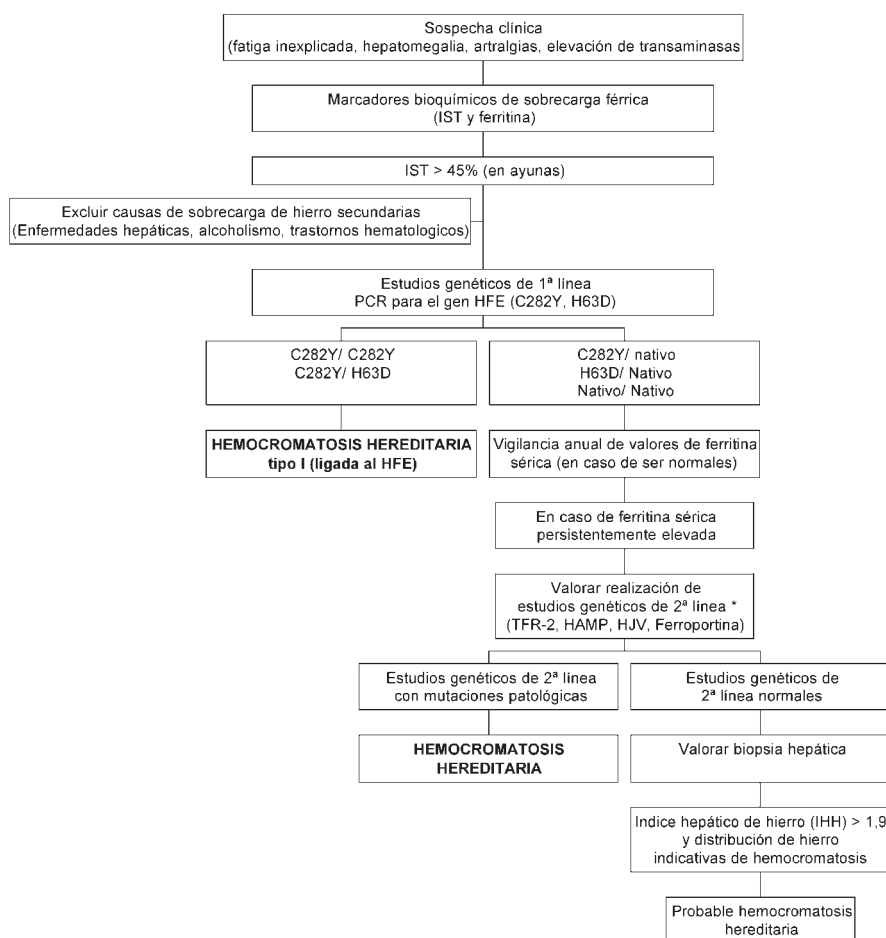


FIGURA 3. Algoritmo diagnóstico de los síndromes de sobrecarga férrica. * TFR-2: receptor 2 de la transferrina; HAMP: siglas de Human Antimicrobial Peptide, Hepsidina; HJV: hemojuvelina.

PRONÓSTICO DE LA HEMOCROMATOSIS

El pronóstico de la HH viene marcado fundamentalmente por el momento en que se realiza el diagnóstico de la enfermedad. Cuando ésta se diagnostica y se trata de forma precoz (existiendo poco depósito corporal de hierro y en ausencia de daño orgánico), el pronóstico es muy bueno. En un estudio alemán realizado sobre 163 pacientes se comunicaron medianas de supervivencia de hasta 20 años (muy similares a los 25 años de supervivencia esperable en sujetos no afectados de las mismas edades y sexos)⁷¹ y los factores que se relacionaron con una peor supervivencia fueron la existencia de cirrosis hepática, diabetes ó un inadecuado tratamiento de depleción del hierro⁷¹. En una actualización más reciente, sobre una cohorte de 251 pacientes con HH seguidos una media de $14,1 \pm 6,8$ años, la supervivencia global del conjunto de pacientes fue inferior a la prevista en comparación con población no afectada; sin embargo la supervivencia de los pacientes sin cirrosis ni diabetes y de los pacientes diagnosticados en el período 1982-1991 fue similar a la supervivencia esperable⁷².

Es importante reseñar que a pesar de un adecuado tratamiento de depleción de hierro, éste tiene poco impacto en la regresión de la fibrosis hepática (estudiada en biopsias seriadas), en la reducción del riesgo de hepatocarcinoma una vez establecida la fibrosis hepática ó en el curso evolutivo de la artritis, la miocardiopatía dilatada, la diabetes ó el hipogonadismo. Hoy en día, según algunos autores, resulta inaceptable la búsqueda de la hemocromatosis cuando ya se ha desarrollado enfermedad clínica⁷³, resultando de gran interés los programas de screening fenotípico y genético sobre la población general asintomática⁷³. El diagnóstico y tratamiento precoces son cruciales para prevenir las consecuencias dañinas de la sobrecarga férrica e iniciar las flebotomías antes de que el exceso corporal de hierro produzca daño en los parénquimas del hígado, corazón, páncreas, glándulas endocrinas ó sobre las articulaciones⁷².

TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO CLÍNICO

El tratamiento de los pacientes con HH y otros síndromes de sobrecarga de hierro está basado en la realización de flebotomías ó sangrías. Es importante iniciar este tratamiento lo antes posible una vez establecido el diagnóstico de HH. Inicialmente se debe proponer un régimen intensivo de flebotomías, con extracción de volúmenes de sangre de entre 400 y 500 mililitros cada 7-10 días. Con cada flebotomía de 500 ml se eliminan 250 mg de hierro elemento. Como

media se suele lograr una adecuada depleción corporal después de la realización de aproximadamente 20 sangrías, lo que supone una acumulación media de 5 gramos de hierro corporal ⁶. En algunos pacientes con enfermedad avanzada, el acúmulo de hierro puede ser tan alto como de hasta 20 gramos y por tanto mayor el número de sangrías que hay que programar .

El objetivo terapéutico es llegar a conseguir unos niveles séricos de ferritina de < 50 µg/l y un IST < 50%. Habitualmente los pacientes suelen tolerar de forma adecuada este régimen intensivo de sangrías sin desarrollar anemia y una vez que la concentración de hemoglobina esté por debajo del rango de referencia y sin haber realizado sangrías durante 3 semanas consecutivas se deben reevaluar los parámetros bioquímicos del metabolismo férrico (ferritina e IST).

Una vez logrado el objetivo terapéutico el paciente debe ser vigilado periódicamente para la realización de sangrías de mantenimiento de forma indefinida a lo largo del resto de su vida (habitualmente con 4-8 sangrías anuales la mayoría de los pacientes están bien controlados y mantienen ferritinas de < 50 µg/l).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Trousseau A, (1865), Glycosurie, diabète sucré. *In: Clinique medicale de l'Hotel-Dieu de Paris. Paris: J.-B. Bailliere, Vol. 2*, 663-98.
- (2) Troisier M, (1871), Diabète sucré, *Bull Soc Anat Paris*, **44**, 231-5.
- (3) Von Recklinghausen H, (1889), Über Hamochromatose, *Tageblatt Versammlung Dtsche Naturforscher Arzte Heidelberg*, **62**, 324-5.
- (4) Sheldon JH, (1935), Haemochromatosis, *London: Oxford University Press*.
- (5) Pietrangelo A, (2004), Hereditary hemochromatosis- A new look at an old disease. *N Engl J Med*, **350**, 2383-297.
- (6) Brandhagen DJ, Fairbanks VF, Batts KP, Thibodeau SN, (1999), Update on hereditary hemochromatosis and the HFE gene. *Mayo Clin Proc*, **74**, 917-921.
- (7) Pérez-Aguilar F, (2002), Hemocromatosis hereditaria: consideraciones fisiopatológicas, clínicas y terapéuticas, *Med Clin*, **118 (3)**, 103-110.
- (8) Simon M, Pawlotsky Y, Bourel M, Fauchet R, Genetet B, (1975), Hémochromatose idiopathique maladie associée à l'antigène tissulaire HL-A3, *Nouv Presse Med*, **4**, 1432-1432.

- (9) Simon M, Le Mignon L, Fauchet R, et al, (1987), A study of 609 HLA haplotypes marking for the hemochromatosis gene: (1) mapping of the gene near the HLA-A locus and characters required to define a heterozygous population and (2) hypothesis concerning the underlying cause of hemochromatosis-HLA association, *Am J Hum Genet*, **41**, 89-105.
- (10) Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al, (1996), A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis, *Nat Genet*, **13**, 399-408.
- (11) Hanson EH, Imperatore G, Burke W, (2001), HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review, *Am J Epidemiol*, **154**, 193-206.
- (12) Bomford A, (2002), Genetics of haemochromatosis, *Lancet*, **360**, 1673-1681.
- (13) Steinberg KK, Cogswell ME, Chang JC, et al, (2001), Prevalence of C282Y and H63D mutations in the hemochromatosis (HFE) gene in the United States, *JAMA*, **285**: 2216-2222.
- (14) Burt MJ, George PM, Upton JD, et al, (1998), The significance of the haemochromatosis gene mutations in the general population: implications for screening, *Gut*, **43**, 830-836.
- (15) Whitfield JB, Cullen LM, Jazwinska EC, et al, (2000), Effects of HFE C282Y and H63D polymorphisms and polygenic background of iron stores in a large community sample of twins, *Am J Hum Genet*, **66**, 1246-1258.
- (16) Lucotte G, (2001), Frequency analysis and allele map in favour of the Celtic origin of the C282Y mutation of hemochromatosis, *Blood Cell Mol Dis*, **27**, 549-556.
- (17) Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJH, (1997), Global prevalence of putative haemochromatosis mutations, *J Med Genet*, **34**, 275-278.[Abstract]
- (18) Rochette J, Pointon JJ, Fisher CA, et al, (1999), Multicentric origin of hemochromatosis gene (HFE) mutations, *Am J Hum Genet*, **64**, 1056-1062.
- (19) Riedel H-D, Remus AJ, Fischer BA, Stremmel W, (1995), Characterization and partial purification of a ferrireductase from human duodenal microvillus membranes, *Biochem J*, **309**, 745-748.
- (20) Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, et al, (1997), Cloning and characterisation of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter, *Nature*, **388**, 482-488.
- (21) Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N et al, (1999), Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in iron transport, is defective in the sla mouse, *Nat Genet*, **21**, 195-199.
- (22) McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW, Simpson RJ, (2000), A

- novel duodenal iron-regulated transporter , IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Molec Cell*, **5**, 299-309
- (23) Abboud S, Haile DJ, (2000), A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism, *J Biol Chem*, **275**, 19906-19912.
- (24) Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard Y, Pratt SJ, Moynihan J et al, (2000), Positional cloning of zebrafish ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron exporter, *Nature (Lond)*, **403**, 776-781.
- (25) Theil EC, Eisenstein RS, (2000), Combinatorial mRNA regulation: iron regulatory proteins and iso-iron-responsive elements (Iso-IREs), *J Biol Chem*, **275**, 40659-62.
- (26) Waheed A, Grubb JH, Zhou XY , et al, (2002), Regulation of transferrin-mediated iron uptake by HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis, *Proc Natl Acad Sci*, **99**, 3117-22.
- (27) Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J, (2004), Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalisation, *Science*, **306**, 2090-2093.
- (28) Parkkila S, Waheed A, Britton RS, et al, (1997), Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract, *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 2534-2539.
- (29) Burke W, Thomson E, Khoury MJ, et al, (1998), Hereditary hemochromatosis: gene discovery and its implications for population based screening, *JAMA*, **280**, 172-178.
- (30) Brandhagen DJ, Fairbanks VF, Baldus WP, Smith CI, Kruckeberg KE, Thibodeau SN, (1998), Prevalence of HFE gene mutations in normal blood donors and in patients with iron overload [abstract], *Gastroenterology*, **114**, A1214
- (31) Mura C, Raguene O, Ferec C, (1999), HFE mutations analysis in 71 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood*, **93**, 2502-2505.
- (32) Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, et al, (2004), Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis, *Nat Genet*, **36**, 77-82.
- (33) Krause A, Neitz S, Magert HJ, et al, (2000), LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS, Lett*, **480**, 147-150.
- (34) Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T, (2001), Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver, *J Biol Chem*, **276**, 7806-7810.
- (35) Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, et al (2001), A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload, *J Biol Chem*, **276**, 7811-7819.

- (36) Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, et al, (2003), Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis, *Nat Genet*, **33**, 21-22.
- (37) Merryweather-Clarke AT, Cadet E, Bomford A, et al, (2003), Digenic inheritance of mutations in HAMP and HFE results in different types of haemochromatosis, *Hum Mol Genet*, **12**, 2241-2247.
- (38) Matthes, T, Aguilar-Martinez P, Pizzi-Bosman L, Darbellay R, Rubbia-Brandt L, Giostra E, Michel M, Ganz T, Beris, P, (2004), Severe hemochromatosis in a Portuguese family associated with a new mutation in the 5-prime-UTR of the HAMP gene, *Blood*, **104**, 2181-2183.
- (39) Fleming RE, Migas MC, Holden CC, et al, (2000), Transferrin receptor 2: continued expression in mouse liver in the face of iron overload and in hereditary hemochromatosis, *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 2214-2219.
- (40) Kawabata H, Yang R, Hiramata T, et al, (1999), Molecular cloning of transferrin receptor 2: a new member of the transferrin receptor-like family, *J Biol Chem*, **274**, 20826-20832.
- (41) Camaschella C, Roetto A, Cali A, et al, (2000), The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22, *Nat Genet*, **25**, 14-15.
- (42) Haile DJ, (2000), Assignment of Slc11a3 to mouse chromosome 1 band 1B and SLC11A3 to human chromosome 2q32 by in situ hybridization, *Cytogenet Cell Genet*, **88**, 328-9.
- (43) Montosi G, Donovan A, Totaro A, Garuti C, Pignatti E, Cassanelli S, Trenor CC, Gasparini P, Andrews NC, Pietrangeli A, (2001), Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene, *J Clin Invest*, **108**, 619-623.
- (44) Njajou OT, Vaessen N, Joosse M, Berghuis B, van Dongen, JWF, Breuning MH, Snijders PJLM, Rutten WPF, Sandkuijl LA, Oostra BA, van Duijn CM, Heutink P, (2001), A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis, *Nature Genet*, **28**, 213-214.
- (45) Wallace DF, Pedersen P, Dixon JL, Stephenson P, Searle JW, Powell L W, Subramaniam VN, (2002), Novel mutation in ferroportin1 is associated with autosomal dominant hemochromatosis, *Blood*, **100**, 692-4.
- (46) Devalia V, Carter K, Walker AP, Perkins SJ, Worwood M, May A, Dooley JS, (2002), Autosomal dominant reticuloendothelial iron overload associated with a 3-base pair deletion in the ferroportin 1 gene (SLC11A3), *Blood*, **100**, 695-697.
- (47) Roetto A, Merryweather-Clarke AT, Daraio F, Livesey K, Pointon JJ, Barbabietola G, Piga A, Mackie PH, Robson KJH, Camaschella C, (2002), A valine deletion of ferroportin 1: a common mutation in hemochromatosis type 4? (Letter), *Blood*, **100**, 733-734.

- (48) Cazzola M, Cremonesi L, Papaioannou M, Soriani N, Kioumi A, Charalambidou A, Paroni R, Romtsou K, Levi S, Ferrari M, Arosio P, Christakis J, (2002), Genetic hyperferritinaemia and reticuloendothelial iron overload associated with a three base pair deletion in the coding region of the ferroportin gene (SLC11A3), *Brit J Haemat*, **119**, 539-546.
- (49) Hetet G, Devaux I, Soufir N, Grandchamp B, Beaumont C, (2003), Molecular analyses of patients with hyperferritinemia and normal serum iron values reveal both L ferritin IRE and 3 new ferroportin (slc11A3) mutations, *Blood*, **102**, 1904-1910.
- (50) Fleming RE, Sly WS, (2001), Ferroportin mutation in autosomal dominant hemochromatosis: loss of function, gain in understanding, *J Clin Invest*, **108**, 521-522.
- (51) McCullen MA, Crawford DH, Hickman PE, (2002), Screening for hemochromatosis. *Clin Chim Acta*, **315**, 169-86.
- (52) Powell L W, Subramaniam VN, Yapp TR, (1999), Haemochromatosis in the new millennium, *J Hepatol*, **32**, (suppl 1), 48-62.
- (53) Adams P, Brissot P, Powell L W, (2000), International Consensus Conference on Haemochromatosis, 2: expert document. *J Hepatol*, **33**, 485-504.
- (54) Bacon BR, Sadiq SA, (1997), Hereditary hemochromatosis: presentation and diagnosis in the 1990s, *Am J Gastroenterol*, **92**, 784-789.
- (55) Fairbanks VF and Brandhagen DJ, (2001), Disorders of iron storage and transport. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ and Seligsohn U editors. *Williams Hematology (Sixth Edition)*, McGraw-Hill, 489- 502.
- (56) McLaren CE, McLachlan GJ, Halliday JW, et al, (1998), Distribution of transferrin saturation in an Australian population: relevance to the early diagnosis of hemochromatosis, *Gastroenterology*, **114**, 543-549.
- (57) Balan V, Baldus W, Fairbanks V, Michels V, Burritt M, Klee G, (1994), Screening for hemochromatosis: a cost-effectiveness study based on 12,258 patients, *Gastroenterology*, **107**, 453-459.
- (58) Phatak PD, Guzman G, Woll JE, Robeson A, Phelps CE, (1994), Costeffectiveness of screening for hereditary hemochromatosis, *Arch Intern Med*, **154**, 769-776.
- (59) Adams PC, Gregor JC, Kertesz AE, Valberg LS, (1995), Screening blood donors for hereditary hemochromatosis: decision analysis model based on a 30-year database, *Gastroenterology*, **109**, 177-188.
- (60) Bacon BR, Powell L W, Adams PC, Kresina TF, Hoofnagle JH, (1999), Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads, *Gastroenterology*, **116**, 193-207.
- (61) Gochee PA, Powell LW, Cullen DJ, Du Sart D, Rossi E, Olynyk JK, (2002), A population-based study of the biochemical and clinical expression of the H63D hemochromatosis mutation, *Gastroenterology*, **122**, 646-651.

- (62) Wallace DF, Walker AP, Pietrangelo A, et al, (2002), Frequency of the S65C mutation of HFE and iron overload in 309 subjects heterozygous for C282Y, *J Hepatol*, **36**, 474-479.
- (63) Pietrangelo A, Montosi G, Totaro A, Garuti C, Conte D, Casanelli S et al, (1999), Hereditary hemochromatosis in adults without pathogenic mutations in the hemochromatosis gene, *N Engl J Med*, **341**, 725-732.
- (64) Hofmann WK, Tong XJ, Ajioka RS, Kushner JP, Koefler HP, (2002), Mutation analysis of transferrin-receptor 2 in patients with atypical hemochromatosis, *Blood*, **100**, 1099-1100.
- (65) Koyama C, Wakusawa S, Hayashi H, Yano M, Yoshioka K, Kozuru M, Takayama Y, Okada T, Mabuchi H, (2005), Two novel mutations, L490R and V561X, of transferrin receptor 2 gene in Japanese patients with hemochromatosis, *Haematologica*, **90**, 302-6.
- (66) Bonkovsky HL, Ponka P, Bacon BR, Drysdale J, Grace ND, Tavill AS, (1996), An update on iron metabolism: summary of the Fifth International conference on Disorders of Iron Metabolism, *Hepatology*, **23**, 718-729.
- (67) Bassett ML, Hallyday JW, Powell LW, (1986), Value of hepatic iron measurements in early hemochromatosis and determination of the critical iron level associated with fibrosis, *Hepatology*, **6**, 24-29.
- (68) Powell LW, Leggett BA, Crawford DH, (1999), Hemochromatosis and other iron storage disorders. *En: Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC, editor es. Schiff's Diseases of the Liver (8ed.). Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers*, 1107-1130.
- (69) Guyader D, Jacquelinet C, Moirand R, et al, (1998), Noninvasive prediction of fibrosis in C282Y homozygous hemochromatosis, *Gastroenterology*, **115**, 929-936.
- (70) Erhardt A, Maschner-Olberg A, Mellenthin C, Kappert G, Adams O, Donner A, Willers R, Niederau C, Haussinger D, (2003), HFE mutations and chronic hepatitis C: H63D and C282Y heterozygosity are independent risk factors for liver fibrosis and cirrhosis, *Hepatology*, **38**, 335-42.
- (71) Niederau C, Fischer R, Sonnenberg A, Stremmel W, Trampisch HJ, Strohmeyer G, (1985), Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis, *N Engl J Med*, **313**, 1256-1262.
- (72) Niederau C, Fischer R, Purschel A, Stremmel W, Haussinger D, Strohmeyer G, (1996), Long-term survival in patients with hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology*, **110**, 1107-19.
- (73) Niederau C, Strohmeyer G, (2002), Strategies for early diagnosis of haemochromatosis, *Eur J Gastroenterol Hepatol*, **14**, 217-21.

Enzimopatías eritrocitarias

AMANDO GARRIDO PERTIERRA

RESUMEN

Los eritrocitos, además de transportar el oxígeno y el dióxido de carbono en la sangre, realizan otras importantes funciones metabólicas. Su metabolismo se reduce a las rutas glucolítica y de las pentosas fosfato, al ciclo del 2,3-bisfosfoglicerato y a unas pocas reacciones de oxidorreducción y de la ruta de rescate de nucleótidos. Las deficiencias en algunas de las enzimas que catalizan las reacciones de dichas rutas originan enzimopatías, porque, al carecer de núcleo y orgánulos celulares, no son capaces de compensar el defecto enzimático sintetizando las enzimas, ni utilizar otras rutas alternativas. Seis enzimopatías de la ruta glucolítica y una en la de los fosfatos de pentosa causan anemias hemolíticas como consecuencia de la desnaturalización oxidativa de la hemoglobina y/o la pérdida de plasticidad de la membrana. Las deficiencias en piruvato quinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, genética y clínicamente polimórficas, aparecen con gran frecuencia en el planeta. Las técnicas de biología molecular y de difracción de rayos X, y los estudios de modelización molecular, están permitiendo la caracterización génica de las mutaciones, la observación de las alteraciones en la conformación de las proteínas y la correlación entre el defecto molecular y la severidad de la anemia hemolítica. Para paliar los efectos de la enfermedad se ha practicado con éxito, al menos en niños, la esplenectomía y el trasplante de médula. Actualmente se pretende utilizar la transferencia de genes con fines terapéuticos, principalmente, con vectores retrovirales, que en animales está produciendo resultados satisfactorios.

Los eritrocitos

Los eritrocitos, hematíes o glóbulos rojos son células sanguíneas, cuyas funciones principales son la de transportar el oxígeno desde los pulmones a los te-

cidos y el dióxido de carbono en sentido inverso. Los eritrocitos normales son discos bicóncavos con un diámetro medio de, aproximadamente, 7-8 micras, un espesor en el centro de 1 micra y en su periferia, el punto más ancho, de 2,5 micras. No obstante, la forma de los eritrocitos puede cambiar cuando atraviesan los capilares debido a que poseen una membrana celular de un tamaño bastante superior al perímetro del material que encierra. A lo largo de su vida, un eritrocito recorre cientos de miles de veces el aparato circulatorio y, debido a que posee una resistencia mecánica excepcional y una gran flexibilidad, atraviesa continuamente circuitos de diámetro inferior a su propio tamaño; estas propiedades vienen condicionadas por varios factores que conciernen a la membrana, entre los que destacan su composición lipídica, su carga electrostática y, en particular, la presencia de una rígida malla de proteínas adosada a la superficie citoplasmática (1, 2).

Los eritrocitos además de transportar O_2 y CO_2 , participan en el equilibrio ácido-base de la sangre, puesto que la hemoglobina es una excelente sustancia reguladora de dicho equilibrio, y realizan otras importantes funciones metabólicas. Como todas células sanguíneas, derivan de las células de la médula ósea llamadas células madre hematopoyéticas multipotenciales (CMHs). La proliferación y reproducción de las diferentes células progenitoras están reguladas por múltiples proteínas, llamadas inductores de la proliferación, que a su vez están controladas por factores externos a la médula ósea. Así, la exposición del organismo a una baja presión parcial de oxígeno durante un periodo largo de tiempo provoca la inducción de la proliferación, la diferenciación y la producción de un mayor número de eritrocitos (1).

El principal factor que estimula la producción de los eritrocitos es la hormona eritropoyetina, una glucoproteína de 34 kDa. El hecho de que todas las células sanguíneas tengan una vida media limitada, exige que su producción transcurra a un ritmo continuo durante toda la vida del individuo con el fin de mantener un nivel constante de las mismas. Ello requiere la existencia de un acervo celular en la médula ósea, común para todas las líneas hematopoyéticas, que está constituido por una población relativamente pequeña de células germinales no diferenciadas, las cuales se depositan en las cavidades óseas durante las primeras etapas de la embriogénesis. Aunque su número es pequeño, estas células poseen una gran capacidad de autorrenovación, permitiendo así satisfacer la demanda de células en el caso de accidente o enfermedad (3).

Las primeras células que se identifican como pertenecientes a la serie de eritrocitos son los proeritroblastos, que se transforman en eritroblastos basófilos porque se tiñen con pigmentos básicos; en este punto la célula ha acumula-

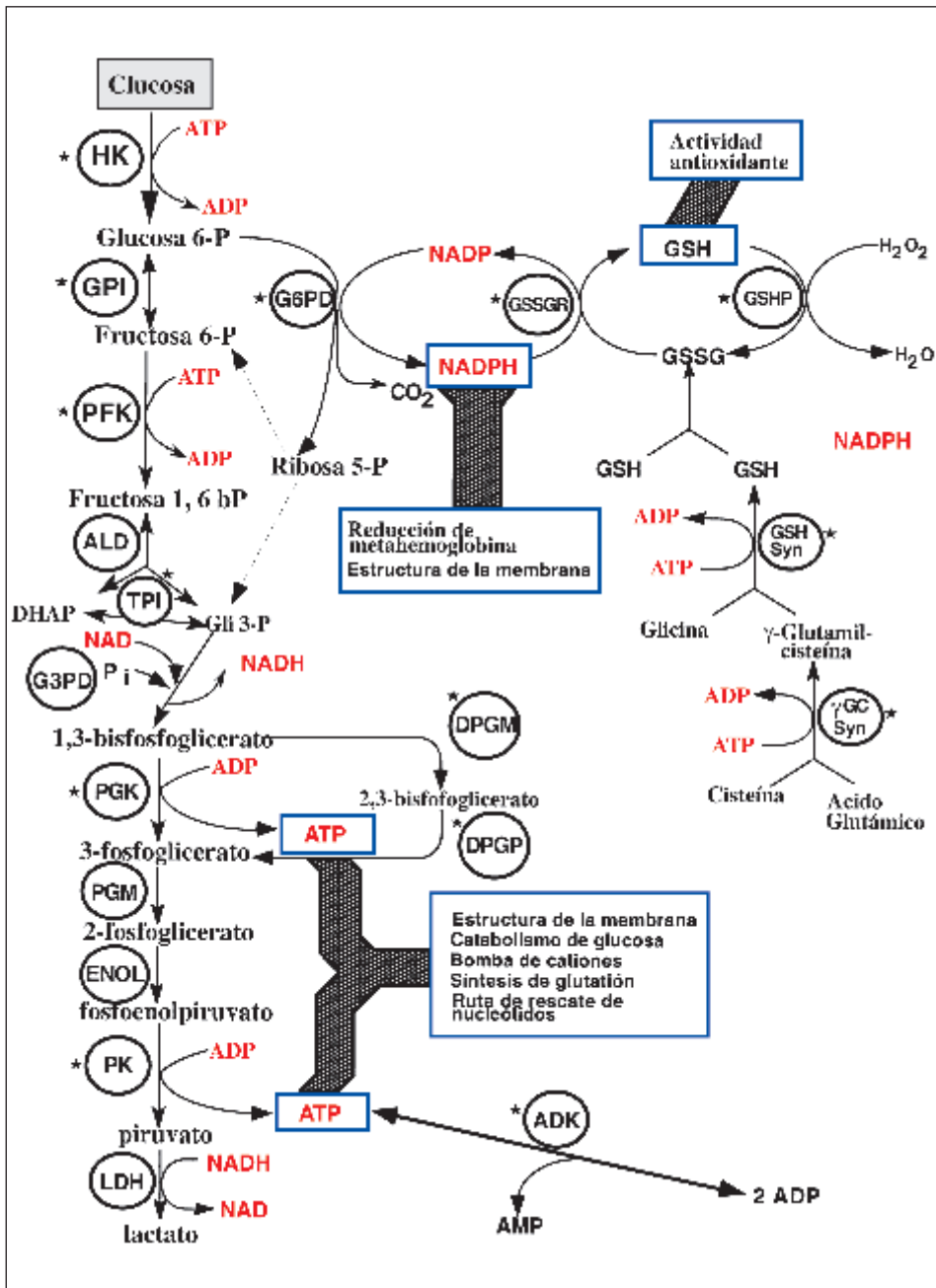
do muy poca hemoglobina. En las generaciones siguientes, las células se llenan de hemoglobina hasta una concentración de, aproximadamente, un 34 % del volumen total, al mismo tiempo que se reabsorbe el retículo endoplásmico. La célula en este estadio se denomina reticulocito porque todavía contiene una pequeña cantidad de material basófilo, constituido por restos del aparato de Golgi, mitocondrias y otros pocos tipos de orgánulos citoplásmicos. Durante esta fase, los reticulocitos pasan de la médula ósea a los capilares sanguíneos por estrangulamiento a través de los poros de la membrana capilar. El resto del material celular desaparece normalmente en 1 ó 2 días, y el reticulocito se convierte en un eritrocito maduro, el cual circula por el sistema sanguíneo, normalmente una media de 120 días, antes de ser destruido. Este proceso se inicia al hacerse muy frágil la membrana del eritrocito y romperse al pasar a través de algún estrechamiento del sistema circulatorio. (4-6).

Las rutas metabólicas

Los eritrocitos maduros no tienen núcleo, mitocondrias, ni retículo endoplásmico, por ello no pueden sintetizar proteínas, glucógeno ni lípidos y son incapaces de llevar a cabo la fosforilación oxidativa. En consecuencia, su metabolismo, muy reducido, queda limitado a la glucólisis, el ciclo de las pentosas fosfato, el ciclo del 2,3-bisfosfoglicerato, algunas reacciones de oxidorreducción para la destoxicación de sustancias oxidantes y otras pocas reacciones de la ruta de rescate de nucleótidos. Estas rutas y reacciones son justamente las precisas para mantener sus necesidades metabólicas durante su vida. Los eritrocitos requieren la energía para llevar a cabo el transporte iónico (Na^+ , K^+ y Cl^- , principalmente), la síntesis del glutatión, la ruta de rescate de nucleótidos y la conservación de la estructura de la membrana.

La glucólisis comienza con la incorporación de monosacáridos a la célula, principalmente glucosa. La presencia de ésta a concentraciones fisiológicas, inhibe la utilización *in vivo* de otros monosacáridos, lo que confirma que sólo se utilizan metabólicamente otros carbohidratos en ausencia de glucosa. La glucosa es fosforilada por ATP a glucosa 6-fosfato iniciándose así la secuencia de reacciones características de la glucólisis hasta la formación de lactato como producto final (véase Figura) (3, 4, 7).

El control de la glucólisis en los eritrocitos se ejerce mediante la acción de distintos metabolitos sobre las enzimas que catalizan reacciones irreversibles, y que cumplen con todas las condiciones para considerarlas reguladoras: hexoquinasa (HK), fosfofructoquinasa (PFK) y piruvato quinasa (PK). El efector más



Rutas metabólicas en los eritrocitos. Las enzimas aparecen en abreviatura y circundadas; aquellas que presentan enzimopatías más frecuentes se han señalado con un asterisco.

importante es el ATP que, al sobrepasar determinados niveles, inhibe, principalmente, la PFK y la PK. Ello conlleva una disminución de la utilización de glucosa por la ruta glucolítica y un aumento de la concentración de los sustratos correspondientes de ambas enzimas, sobre todo la fructosa-6-fosfato (F6P), lo cual es importante a efectos de regulación, puesto que supone, al mismo tiempo, un aumento de la glucosa-6-fosfato (G6P), debido a la reversibilidad de la reacción catalizada por la glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI). Al ser la G6P un inhibidor de la HK, se refuerza la acción inhibitoria de la glucólisis ejercida por el ATP sobre la PFK. Cuando, como consecuencia de la alta concentración de ATP, disminuye la actividad de la PFK, también desciende la concentración del producto de la reacción, la fructosa 1,6-bisfosfato (F1,6BP), con lo que desaparece igualmente el efecto activador de este compuesto sobre la PFK y la PK (8-10). Todo ello contribuye al detenimiento o enlentecimiento más o menos parcial, de la glucólisis. Ahora bien, el efecto inhibitorio global del ATP sobre la glucólisis puede contrarrestarse y, por tanto, el flujo metabólico restaurarse, gracias, fundamentalmente, a la acción desinhibidora de determinados metabolitos como la del AMP, el cual se produce por la hidrólisis del propio ATP cuando su concentración es alta, mediante la intervención de la ATPasa. El descenso de los niveles de ATP hace que desaparezcan los efectos inhibitorios sobre las enzimas, reactivándose el proceso glucolítico (7, 9).

A nivel de la PFK hay otro punto de regulación de la glucólisis, que se ejerce mediante pequeñas variaciones de pH, las cuales se originan durante la oxigenación y desoxigenación de la hemoglobina. La actividad de la enzima responde positivamente al aumento del pH y negativamente a la disminución del mismo. La liberación de oxígeno en los tejidos conduce a un aumento del pH intracelular, lo que equivale a un incremento de la actividad de la PFK y, por tanto, de la glucólisis. Por el contrario, como consecuencia del proceso de oxigenación de la hemoglobina en los pulmones, aumenta la concentración de hidrogeniones y disminuye el flujo glucolítico (10, 11).

En la ruta glucolítica de los eritrocitos existe una desviación a nivel del 1,3-bisfosfoglicerato (1,3BFG) en la que, a partir de esta sustancia, por acción de la bisfosfoglicerato mutasa, se produce 2,3-bisfosfoglicerato (2,3BFG). Es bien conocido el papel esencial que desempeña el 2,3BFG en la regulación de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno en los tejidos. El mecanismo de control se basa en la capacidad que tiene el 2,3BPG para unirse específicamente a la desoxihemoglobina, pero no a la oxihemoglobina, puesto que, como consecuencia de la oxigenación, se produce un estrechamiento en la cavidad central de la estructura proteica (11).

El significado fisiológico del 2,3BPG se encuentra en su papel estabilizador de la estructura cuaternaria de la desoxihemoglobina. La regulación de los niveles de 2,3BPG viene condicionada por la concentración de ADP, cuya disminución conlleva un aumento del 1,3BPG, para mantener el equilibrio con la reacción catalizada por la fosfoglicerato quinasa. El aumento de 1,3BPG favorece la síntesis de 2,3BPG, mientras que, por el contrario, el aumento de ADP hará disminuir los niveles de 1,3BPG y, por tanto, la síntesis de 2,3BPG (11).

La ruta de las pentosas fosfato en los eritrocitos es similar a la de otras células. Comprende una fase oxidativa e irreversible en la que se producen dos moles de NADPH y uno de ribulosa-5-fosfato; en una segunda fase, no oxidativa, se regeneran las hexosas a través de diversas reacciones reversibles. La glucosa degradada por esta ruta, supone un 5-10% del total degradado por la ruta glucolítica. La enzima principal y reguladora de la ruta de las pentosas fosfato es la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). La enzima de eritrocitos humanos, que está constituida por dos cadenas polipeptídicas idénticas, tiene un peso de 118,4 Kd., y utiliza como coenzima preferente NADP ($K_m \approx 5 \mu M$); el NADPH inhibe competitivamente su actividad ($K_i \approx 12 \mu M$). Estos valores reflejan, no sólo una alta especificidad por el nucleótido fosforilado sino también el papel clave que juegan las concentraciones relativas de NADP y NADPH para regular su actividad. En este sentido es de especial significado fisiológico el comportamiento sigmoide que muestra la actividad de la enzima frente a la variación de la concentración de NADP. El ATP actúa como regulador inhibiendo competitivamente la enzima y su concentración intracelular es del orden de su K_i . La función principal del NADPH es evitar el estrés oxidativo (12, 13), reducir la forma disulfuro del glutatión a la forma sulfhidrilo, que a su vez actúa para mantener en estado reducido los residuos de cisteína de la hemoglobina y otras proteínas enzimáticas y de la membrana de los eritrocitos. Y ello es especialmente importante en estas células, porque al carecer de mitocondrias no tienen un modo alternativo de generar NADPH. Esta forma reducida también juega un papel esencial en los mecanismos de detoxificación, ya que reacciona con el peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos evitando con ello daños irreversibles en la célula. En los últimos años se han obtenido numerosos resultados experimentales que sugieren que el coenzima juega un papel importante en la estabilidad de la enzima. Nosotros hemos demostrado, mediante ensayos *in vitro* que tanto en el plegamiento espontáneo de las cadenas de la enzima como en el acoplamiento de los monómeros es imprescindible la presencia de NADP (14).

Las anemias hemolíticas

Las alteraciones que afectan a los eritrocitos pueden ser clasificadas en dos grandes grupos, teniendo en cuenta sus manifestaciones clínicas más características. Las anemias, que vienen definidas por una reducción del número de eritrocitos, de la concentración de hemoglobina o del valor del hematocrito, y las policitemias, definidas por una elevación en el número de eritrocitos (15). Existen anemias por pérdida de sangre, por disfunción de la médula ósea, por esferocitosis o eliptocitosis hereditarias, por deficiencia vitamínica de B₁₂, de ácido fólico y/o de hierro y por enfermedades endocrinas, gastrointestinales o hepáticas.

Las anemias hemolíticas se originan por diferentes alteraciones de los eritrocitos, muchas de las cuales son hereditarias. Las células que presentan gran fragilidad se rompen al pasar por los capilares, especialmente, en el bazo. En ocasiones el número de eritrocitos formados es normal, o incluso mayor de lo normal, pero su vida es tan corta que se produce una anemia grave (16, 17). Se han descrito diferentes clases de anemias hemolíticas, siendo unas de las más frecuentes las *enzimopatías eritrocitarias*, que son debidas a una deficiencia en algunas de las enzimas del metabolismo intermediario del eritrocito. Estas deficiencias son consecuencia de una mutación que afecta al genoma de las células germinales en el momento de su producción. Se suelen subdividir en grupos de acuerdo con la vía metabólica donde se localiza la enzima defectiva y, en general, se caracterizan por ausencia de esferocitosis, y presión osmótica y hemoglobina normales. Sus defectos enzimáticos pueden aparecer bajo formas homocigóticas o heterocigóticas, acompañados de hemólisis celular y cuyo mecanismo desencadenante depende de la lesión molecular.

La sintomatología similar que presentan estas alteraciones ha hecho difícil conocer los diferentes tipos de anemia y la causa que los originan y, por ello, se han requerido numerosas observaciones experimentales y clínicas. En 1950 Crosby y col. (18) definieron estas enfermedades como anemias hemolíticas no esferocíticas de carácter hereditario. Tres años más tarde se clasificaron en dos tipos, I y II, basados en que a las de tipo II la adición de glucosa no corregía la mayor velocidad de autohemólisis. En 1956 Carson y col. (19) publicaron en la revista *Science* un artículo en el que describían el primer caso clínico de anemia hemolítica como consecuencia de una deficiencia en la actividad G6PD. De Gruchy y col., (20) y Robinson y col., (21) describieron que los pacientes de tipo II, con anemia hemolítica no esferocítica, tenían altas concentraciones de 2,3BPG en los eritrocitos. En ese mismo año, Valentine y col. (22) determinaron la actividad de las enzimas glucolíticas en pacientes de tipo II descubriendo que tenían una deficiencia en piruvato quinasa. En España, la primera defi-

Deficiencias enzimáticas en los eritrocitos desencadenantes de anemias hemolíticas

<i>Deficiencia enzimática</i>	<i>Posición en el cromosoma</i>	<i>Cuadro clínico</i>
Hexoquinasa	10 p11-2	CNSHA*
Hexofosfato isomerasa	19 cen-q12	CNSHA
Fosfofructoquinasa	21 q22-3	CNSHA y/o almacenamiento de glucógeno en el músculo
Aldolasa	16 q22-24	CNSHA y almacenamiento de glucógeno en el músculo
Triosa fosfato isomerasa	12 p13	CNSHA y enfermedades neuromusculares
Fosfoglicerato quinasa	Xq13	CNSHA, retraso mental, mioglobulinuria, alteraciones en el comportamiento
2,3-bisfosfoglicerato mutasa	7 q22-34	CNSHA
Piruvato quinasa	1q21	CNSHA
Enolasa	1 pter-p36.13	CNSHA
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	Xq28	CNSHA, AHA**, favismo, anemias hemolíticas inducidas por infección o fármacos
Glutation reductasa	8 q21.1	Favismo, anemia hemolítica sensible a los fármacos
Glutación peroxidasa	3 q11-12	CNSHA
γ -Glutamil cisteina sintetasa	6p12	CNSHA, AHA, degeneración espino-cerebral, anemias hemolíticas inducidas por infección o fármacos
Glutación sintetasa	20q11.2	CNSHA, AHA, defectos neurológicos, anemias hemolíticas inducidas por infección o fármacos
Adenosina desaminasa	20 q13	CNSHA
Adenilato quinasa	9 q34	CNSHA

* CNSHA, Anemia hemolítica no esferocítica;

** AHA, Anemia hemolítica aguda.

ciencia en la actividad G6PD fue descrita por Rico Irlés en 1962 (23) y la primera en piruvato quinasa por Kahn y col., en 1977 (24).

Han sido descritas deficiencias enzimáticas hereditarias en todas las rutas metabólicas de los eritrocitos y las que aparecen con mayor frecuencia, se muestran

en la Tabla. Sus frecuencias difieren marcadamente con respecto a la enzima afectada y a la distribución geográfica. Así, por ejemplo, existen más de 400 millones de personas afectadas con deficiencias en G6PD en nuestro planeta (25) y , también, varios millones con deficiencias en PK. La primera se ha encontrado con mayor frecuencia en los países del área ecuatorial en relación con la malaria, que actúa como selección fenotípica, mientras que la segunda se encuentra extendida por todo el planeta, aunque aparece en mayor proporción, relativamente, entre la población del área mediterránea, del sudeste asiático, los judíos kurdos y los negros africanos y americanos (27-29). La relación entre el grado de deficiencia enzimática y la extensión de la disfunción metabólica en los eritrocitos depende de varios factores entre los que se encuentran la importancia metabólica de la enzima afectada, su velocidad de expresión, la estabilidad de la enzima mutada frente a la degradación proteolítica y las anormalidades funcionales.

Mutaciones y función proteica

En 1956, Ingram (30) propuso que el fenotipo de la anemia falciforme (*sickle cell anemia*) podía ser debido a la sustitución de un aminoácido (ácido glutámico) por otro (valina) en la β -hemoglobina. A partir de esta extraordinaria hipótesis en genética humana, los estudios estructurales de las enzimas mutadas fueron proporcionando información para entender la anemia y la frecuencia observada en diversas poblaciones. Actualmente los avances en la Biología molecular han añadido nuevas dimensiones para analizar la disfunción proteica.

Mientras los desórdenes genéticos proporcionan la oportunidad de observar los efectos fenotípicos de los cambios que aparecen en el DNA, los genes mutados *in vitro* son de gran valor , especialmente cuando las mutaciones se diseñan para observar los cambios en la estructura proteica tridimensional. Avances en la tecnología de la información y otras metodologías basadas en la computación, se han centrado en esta área no sólo por la provisión de datos para estudios comparativos, sino también para diseñar y realizar predicciones estructura-función.

Por conveniencia, las mutaciones se clasifican con respecto a sus efectos sobre las proteínas, pero esta clasificación es, inevitablemente, algo arbitraria. Las mutaciones asociadas con enfermedades genéticas en los eritrocitos pueden deberse a un cambio del codón que origina la sustitución de un aminoácido, a deleciones, a inserciones que conducen a la terminación prematura de la cadena, a una pequeña duplicación intrínseca o a la inestabilidad del mRNA. También, aunque con menor frecuencia, pueden encontrarse mutaciones en los promotores o

en el proceso de corte y unión del mRNA (*splicing*). Estas categorías no se pueden diferenciar respecto a la función proteica, puesto que la producción de proteína anormal puede también estar asociada a la pérdida completa de la función debida a la inestabilidad de la proteína que le impide alcanzar correctamente su lugar de acción, o también a una mutación en una región crítica, como por ejemplo el centro activo de la enzima. Además, en muchos casos aparecen situaciones complejas debidas a las interacciones de unas proteínas con otras y con compuestos celulares tales como ligandos, sustratos y otras moléculas (31, 32).

Muchas mutaciones sin sentido, así como pequeñas deleciones e inserciones, alteran el plegamiento y las afinidades entre las subunidades. En ocasiones el plegamiento de las proteínas en la célula está facilitado por la interacción con carabinas, que protegen a las cadenas nacientes de las proteínas de las posibles interacciones con otras moléculas del retículo endoplásmico. Las mutaciones que rompen las interacciones con las carabinas, a menudo conducen a la inestabilidad proteica y/o a la pérdida de la actividad funcional (6, 33).

Un estudio en el que se demuestra cómo las mutaciones conducen a un plegamiento defectuoso con pérdida de la estabilidad, es el descrito por nosotros sobre la G6PD de eritrocitos humanos (34). La variante A⁺, que muestra deficiencia enzimática, difiere de la variante B o forma normal en dos aminoácidos. La doble sustitución aminoacídica se traduce en un plegamiento defectuoso debido a la pérdida de interacción entre las estructuras secundarias de las regiones donde se localizan las mutaciones. El centro activo de la enzima no se modifica pero los cambios que se originan entre los residuos aminoacídicos en el dominio del coenzima y la alteración parcial de la estructura terciaria son suficientes para producir un notable descenso de la estabilidad de la proteína en el eritrocito.

En ocasiones los efectos principales no se corresponden con ninguno de los descritos anteriormente sino con una acumulación excesiva de la proteína anormal. En esas condiciones, una actividad del 10-20% suele ser suficiente para permitir su funcionamiento en circunstancias normales. Esto significa que los heterocigotos, con un alelo normal, se encuentran afectados en pocas ocasiones, ya que la forma de expresarse la enfermedad es recesiva, pero, puesto que el gen se encuentra en el cromosoma X, no así los hemocigotos. Las mutaciones en las proteínas estructurales demuestran fácilmente el carácter hereditario de una enfermedad; también cuando la síntesis de la cadena proteica es menor del 50% de la normal, se puede esperar que sea insuficiente para desarrollar una función normal (35, 36).

Las mutaciones en los genes que codifican proteínas con una estructura multimérica o aquellas implicadas en un complejo multiproteico, frecuentemente tienen

otros efectos además de la simple pérdida de función. En algunos casos un fenotipo grave surge de un alelo mutado que codifica una proteína en un heterocigoto individual. Los portadores heterocigóticos de tales mutaciones están más o menos afectados dependiendo de la intensidad del efecto en la subunidad mutada. Una mutación en la estructura de un dominio afectará las propiedades enlazantes y tendrá una repercusión directa en el proceso de represión-activación del DNA (37).

Se ha podido deducir que algunas proteínas de los eritrocitos funcionan como moléculas heteroméricas (espectrina y hemoglobina), las cuales se forman por unión de los productos de algunos genes que funcionan como una unidad y son particularmente vulnerables a cambios en sus estructuras. A menudo, las mutaciones en genes diferentes que codifican los polipéptidos componentes originan el mismo o similar fenotipo clínico. Las mutaciones en los genes SPT A o SPTB que codifican las subunidades de espectrina, se traducen en una elipocitosis hereditaria autosómica dominante.

Aunque es posible determinar, con una certeza casi completa, la secuencia de aminoácidos de una proteína a partir de la secuencia nucleotídica de un gen, no se puede conocer bien la relación entre la secuencia de aminoácidos y la conformación tridimensional nativa de una proteína. Se han obtenido las secuencias aminoacídicas completas de diferentes enzimas de varias especies, desde mamíferos a microorganismos. Así, por ejemplo, se conocen las secuencias de piruvato quinasa de la especie humana, el gato, conejo, gallo, rata, ratón, sapo, mosca, levaduras, *Lactobacillus* y *Escherichia coli*. Las comparaciones de los fragmentos génicos y de las estructuras primarias de las proteínas, el acopio de bases de datos sobre la conformación de éstas y los estudios de modelización molecular ayudan a predecir el proceso de plegamiento y a comprender el efecto producido por las mutaciones sobre la estructura de las enzimas (38). Sin embargo, los pronósticos exactos de las estructuras terciaria y cuaternaria son, en la mayoría de los casos, meras conjeturas hasta que las proteínas no hayan sido objeto de estudios cristalográficos (39). La información estructural obtenida mediante difracción de rayos X de enzimas cristalizadas junto con la obtenida mediante mutagénesis dirigida, permite acercarse al entendimiento de las relaciones estructura y función y, en muchos casos, a interpretar las posibles interacciones entre la proteína y el resto de los componentes celulares.

Enzimopatías de las rutas metabólicas

Las enzimopatías en los eritrocitos provocan alteraciones, casi exclusivamente, en las funciones de estas células, porque al carecer de la maquinaria de

síntesis de proteínas y poseer un metabolismo muy sencillo, no son capaces de compensar el defecto enzimático produciendo la enzima mutada, ni de utilizar otras rutas alternativas.

Enzimas de la ruta glucolítica. La deficiencia en *hexoquinasa* (HK), la primera enzima de la ruta glucolítica, asociada a una anemia hemolítica hereditaria fue descubierta por Valentine y col. en 1967 (40). Han sido descritos diecisiete casos, no relacionados familiarmente, en el área mediterránea, en la península escandinava y en el próximo Oriente (41, 42, 43). En los eritrocitos se expresan dos hexoquinasas, la HK-I y la HK-R que han sido separadas mediante HPLC. La HK-I es una enzima reguladora muy sensible a la inhibición por G6P (44). Los síntomas de anemia pueden ser particularmente graves en algunas personas con deficiencia en la HK, debido a que conduce a bajos niveles de 2,3BPG y consecuentemente a un aumento de la afinidad por el oxígeno de la hemoglobina.

Desde la descripción de la primera deficiencia en *fosfoglucoisomerasa* (GPI) en 1968 (45) se han encontrado algo más de medio centenar de casos distribuidos en varios países (46-48). Esta deficiencia, que es la segunda en frecuencia de la ruta de Embden-Meyerhof, además de en eritrocitos ha sido encontrada en leucocitos, plaquetas, hígado y músculo. Las manifestaciones clínicas no se limitan exclusivamente a una anemia hemolítica sino que en algunos casos se acompaña de retardo mental e hipotonía muscular (49), los cuales se agravan por estrés oxidativo (50). Todos los productos de los genes mutados, se caracterizan por una afinidad normal por el sustrato, pero presentan una notable inestabilidad y una baja actividad enzimática (51).

En 1965 Tarui y col. (52) describieron una grave deficiencia en *fosfofructoquinasa* (PFK) de músculo que se traducía en una miopatía; este desorden fue denominado tipo VII de la enfermedad por almacenamiento de glucógeno. Las deficiencias de esta enzima son, generalmente, parciales y se encuentran asociadas con síndromes clínicos heterogéneos, sugiriendo una alta complejidad a nivel molecular. Los eritrocitos contienen cinco isoenzimas compuestas por las subunidades M y L, siendo la M la más crítica en regular el flujo metabólico.

La deficiencia en la *aldolasa* (ALD) ha sido descrita en muy pocos pacientes (53, 54) los cuales sufren una anemia moderada que se agrava por el aumento de la concentración de F1,6BP en los eritrocitos y con infecciones en el tracto respiratorio. Se han descrito tres isoenzimas codificadas por distintos genes, siendo la isoenzima A la única presente en los eritrocitos (55). El residuo de ácido aspártico situado en la posición 128 tiene un papel primordial en la estruc-

tura espacial y en la función catalítica de la enzima (56). La deficiencia en *triosa fosfato isomerasa* (TPI), que fue descrita por primera vez en 1965 (57), origina un conjunto de manifestaciones clínicas, desde anemia hemolítica y anomalías neuromusculares a complicaciones cardíacas que, en niños, conducen inevitablemente a la muerte. La enzima mutada de eritrocitos muestra poca actividad y estabilidad y provoca la acumulación de dihidroxiacetona fosfato (58).

La fosfoglicerato quinasa (PGK) es la única enzima de la ruta glucolítica codificada por un gen localizado en el cromosoma X (48, 59). Las manifestaciones clínicas más usuales de una enzimopatía de esta clase son anemia hemolítica, alteraciones neurológicas y retardo mental. Se conoce la estructura primaria de la enzima de eritrocitos humanos que consta de 417 aminoácidos (60). Sobre la base de la secuencia aminoacídica y los estudios de modelización de la enzima homóloga de caballo, se han llegado a correlacionar los cambios estructurales con las disfunciones de las variantes conocidas. Así, la sustitución de arginina por prolina en la variante Uppsala induce a un desplazamiento del centro de unión del ATP.

La deficiencia en *piruvato quinasa* (PK) es el defecto más frecuente en la ruta de Embden-Meyerhof y junto con la deficiencia en G6PD constituyen la mayoría de los casos de anemia hemolítica crónica debido a enzimopatías eritrocitarias. Una característica de estos pacientes es que sus eritrocitos tienen bajos niveles de ADP y altos de 2,3BPG en comparación con los normales. Las propiedades bioquímicas de los productos de las mutaciones son inestabilidad térmica, actividad enzimática baja y descenso de la afinidad por el PEP.

Los pacientes que sufren una enzimopatía PK se caracterizan por tener una baja actividad catalítica, junto con la pérdida de sus propiedades alostéricas y un aumento de la afinidad por el PEP. En raras ocasiones se han descrito cambios en la afinidad por el ADP. Las variantes genéticas de la PK pueden ser identificadas por su sensibilidad a la degradación proteolítica y su diferente movilidad electroforética. Únicamente un 10% de mutantes defectivos en PK son relativamente estables, con una actividad normal o ligeramente disminuida y manteniendo las propiedades alostéricas.

En la especie humana se han descrito dos genes codificantes de PK-M y de PK-LR, localizados en cromosomas diferentes y que, en el proceso de transcripción, codifican cuatro isoenzimas específicas con actividad piruvato quinasa, denominados M₁, M₂, L y R, las cuales se expresan de forma diferente en cada tipo de tejido u órgano (61, 62). Todas las formas consisten en tetrámeros con subunidades de unos 50-60 kDa y muestran algunas propiedades molecula-

res y fisico-químicas similares pero difieren en sus propiedades electroforéticas, cinéticas, reguladoras e inmunológicas.

La PK-R se encuentra bajo control del mismo *locus* genético que la PK-L pero es un producto del proceso de traducción con un mRNA diferente al de la forma L, que está modificado en el extremo 5' y con promotores específicos. Esta iso-enzima es dependiente de K^+ y Mg^{2+} y exhibe propiedades alostéricas que reflejan su estructura polimérica. Además, es muy sensible a la modulación alostérica por la F1,6BP y cantidades micromoleculares de este intermediario aumentan significativamente la afinidad de la enzima por el sustrato, PEP, convirtiendo la cinética sigmoide en hiperbólica. Las propiedades cinéticas de esta enzima pueden explicarse fácilmente según el modelo concertado de enzimas alostericas de Monod y col. (63). Así, la enzima se puede encontrar en un equilibrio transicional entre dos conformaciones, relajada (R) y tensada (T). La forma T no tiene afinidad por K^+ y muy poca por el PEP (y su cinética es sigmoide), mientras la forma R tiene alta afinidad por K^+ y por PEP. A partir de los datos cinéticos se ha llegado a la conclusión de que la unión K^+ es esencial para la posterior unión del PEP. Los efectores positivos F1,6BP, F2,6BP y 6-fosfogluconato disminuyen la cooperatividad de PK-R hacia PEP porque el equilibrio $R \rightleftharpoons T$ se desplaza hacia el estado R, mientras los efectores negativos, ATP y alanina, operan en sentido opuesto.

Enzimas de la ruta de las pentosas fosfato. En la 2.^a Guerra Mundial, a los soldados de los destacamentos que acampaban en zonas de malaria se les administraba primaquina para prevenir la enfermedad. Se observó que algunos de ellos presentaban una cierta hipersensibilidad al medicamento debido a un defecto intrínseco que, posteriormente, fue reconocido como una deficiencia en *G6PD* (53). Esta deficiencia comprende un amplio conjunto de desordenes debido a la mutación del gen que codifica la enzima. El gen comprende 13 exones y 12 intrones, tiene una longitud de 1545 pb, y se encuentra localizado en la región q 28 del cromosoma X. A nivel de proteína han sido caracterizadas más de 400 variantes, 86 de las cuales han sido clasificadas como polimórficas, que difieren en su actividad, estabilidad, pHs óptimos, movilidad electroforética, Km para el sustrato y el coenzima y susceptibilidad a la acción de inhibidores (64). La enzima normal tiene un peso de 118,4 Kd y está constituida por dos cadenas polipeptídicas idénticas de 515 aminoácidos. Cada unidad está compuesta por dos dominios formados, a su vez, por dos o más tramos de las cadenas polipeptídicas dobladas, uno donde se fija el coenzima NADP y otro donde lo hace el sustrato G6P.

Los pacientes con deficiencia G6PD se encuentran concentrados en las regiones más cálidas del planeta. Es un hecho probado que la elevada frecuencia de esta deficiencia en esas zonas es debida a la presión selectiva que ejerce la

malaria, enfermedad provocada por el parásito *Plasmodium falciparum* (13). En los eritrocitos deficientes, el bajo nivel de glutatión reducido debilita extraordinariamente la estructura de la membrana facilitando su fagocitosis temprana, que impide la maduración de los parásitos al estadio o fase en que son activos (65). Por ello, la deficiencia en G6PD, es un mecanismo de protección contra la malaria, lo que justifica la alta frecuencia, hasta el 26 % de la población, en aquellas regiones del mundo con malaria endémica.

Algunos pacientes con deficiencia en G6PD sufren hemólisis aguda después de la inhalación de polen de *Vicia faba* o de la ingestión de habas. El favismo es una manifestación causada por la divicina, un oxidante que se encuentra en dicha planta; los síntomas que aparecen inmediatamente consisten en dolores de cabeza, vértigo, náuseas y fiebre seguidas de ictericia y anemia. Muchos medicamentos, entre los que se encuentran algunas sulfamidas, e infecciones víricas y bacterianas pueden causar anemia hemolítica aguda en personas con deficiencia G6PD. Se han descrito algunas deficiencias en la segunda enzima de la ruta, la *6-fosfogluconato deshidrogenasa* (6PGD), pero sus manifestaciones clínicas no revisten importancia (64).

La función principal de la ruta de las pentosas fosfato es, como se ha indicado, el mantener el glutatión en su estado reducido. El glutatión se sintetiza a partir de los aminoácidos cisteína y ácido glutámico mediante dos reacciones consecutivas, catalizadas por la *γ-glutamil cisteína sintetasa* (γ GC Syn) y la *glutatión sintetasa* (GSH Syn), con requerimiento de dos moléculas de ATP (Figura). Han sido descritas enzimopatías en ambas enzimas que se traducen en anemia hemolítica moderada la cual puede exacerbarse por las mismas sustancias que aceleran la hemólisis en personas deficientes en G6PD. Los pacientes con deficiencia en la γ GC Syn suelen presentar, además de hemólisis, un defecto neurológico (66). Las deficiencias en GSH Syn suelen originar dos síndromes: uno, caracterizado, únicamente, por hemólisis, y otro, además, con oxoprolinuria y acidosis metabólica.

Diagnostico y caracterización molecular de la enfermedad

Los procedimientos para descubrir las variantes deficientes en eritrocitos han sido normalizados por el *International Committee for Standardization in Haematology* (ICSH)(54). Sin embargo, la interpretación de los valores de las propiedades bioquímicas de las enzimas mutadas se puede ver enmascarada o confundida por la inestabilidad parcial de las enzimas, por la alta frecuencia relativa de los heterocigotos, que originan enzimas con diferentes propiedades, o por el diferente metabolismo energético que existe entre los pacientes debido a la edad,

a una enfermedad añadida o a un tratamiento terapéutico basado en medicamentos. Además, los pacientes con anemia hemolítica, requieren con frecuencia transfusiones de sangre lo que impide la caracterización bioquímica de los mutantes porque aportan eritrocitos y leucocitos que contienen el producto del gen normal.

Actualmente estos problemas han podido ser superados utilizando métodos de análisis molecular. Mediante la clonación del cDNA correspondiente al gen que codifica la enzima defectiva, se puede estudiar directamente las mutaciones y obtener información acerca de los defectos moleculares. El método es relativamente sencillo y consiste en extraer el DNA de células nucleadas de la sangre (leucocitos), amplificar los genes de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), insertar y unir los productos de PCR a un vector, y secuenciar directamente en un secuenciador automático (67).

Utilizando una metodología similar a la indicada, se han caracterizado más de 300 mutantes defectivos en las rutas metabólicas de los eritrocitos, y constantemente se describen nuevas enzimopatías. Nosotros, hace poco más de un año (38), caracterizamos en la población española tres mutaciones en piruvato quinasa, que no habían sido descritas previamente, G694A, A1150G y G1154A, y que causan el cambio de glicina por serina, treonina por alanina y arginina por lisina, respectivamente, en la estructura de la enzimas.

Terapia habitual y génica

Se puede afirmar que no existe un tratamiento definitivo en las enzimopatías eritrocitarias. La terapia que más se ha utilizado en niños para paliar los efectos de una deficiencia, cuando los valores de hemoglobina son muy bajos, son las transfusiones de sangre. Después de la niñez muchos pacientes se adaptan a un nivel compensado de hemólisis que no suelen requerir transfusión, a menos que existan otras complicaciones como un estado infeccioso, embarazo u otras condiciones adicionales (42, 68).

En casos graves de adultos se suele practicar la esplenectomía que en ocasiones permite mejorar el proceso, aunque no se puede predecir el grado de eficacia para un caso particular (16, 17). También en niños, y en adolescentes se suele recurrir a la esplenectomía. Esta terapia debe aplicarse con cautela ya que no es posible conocer con seguridad la respuesta, y el enfermo, una vez desprovisto del bazo, se encuentra ante un mayor riesgo de infecciones y de accidentes trombóticos. En estas personas suele aumentar la concentración de hemoglobina de 1 a 3 g/dL, lo que hace innecesario las transfusiones y el paciente suele crecer y desarrollarse normalmente (69).

Se han realizado varios estudios con sustancias que modifican las actividades enzimáticas, administrándolas por vía oral o parental, como son: AMP, magnesio, manosa, galactosa, fructosa, adenina, inosina y guanosina. También se han utilizado factores estimulantes hematopoyéticos y esteroides. Los resultados obtenidos mediante estos procedimientos no han resultado satisfactorios (70, 71).

Aubourg y col. (72) y Hoogerbrugge y col. (73) señalaron que el posible mecanismo por el que el trasplante de médula ósea podía aliviar los síntomas en células hematopoyéticas, debería incluir la transferencia de la enzima desde células de la médula ósea normales a células deficientes, bien por contacto célula-célula o por liberación de la enzima en el plasma. Posteriormente se demostró que el trasplante de médula ósea es eficaz, al menos, en niños. Tanphaichitr y col. (74) consiguieron eliminar los efectos de una enzimopatía PK en un niño de cinco años utilizando dicho procedimiento. El donante fue su hermana con idéntico antígeno HLA y actividad piruvato quinasa normal. Cuatro años después de la operación el niño tiene un nivel normal de hemoglobina y de actividad PK con ausencia de hemolisis.

Respecto a la transferencia de genes con fines terapéuticos en humanos, es evidente que el procedimiento debe realizarse con un mínimo riesgo y para ello tiene que ser convenientemente probado en modelos animales. Cuando solamente las células sanguíneas, sufren la principal manifestación de un defecto genético, como son estos casos, hay fundadas esperanzas de que la transferencia de genes a células progenitoras hematopoyéticas sea efectiva. Un hecho a tener en cuenta es que tanto la médula ósea como otros tejidos hematopoyéticos son de fácil acceso, existiendo un notable desarrollo tecnológico para la purificación, la manipulación y el cultivo *in vitro* de progenitores hematopoyéticos. Como se ha indicado anteriormente la supervivencia de los diferentes tipos de células sanguíneas depende de una población muy escasa en número de CMHs. Esta población celular es la única del sistema hematopoyético que reúne simultáneamente propiedades de automantenimiento, multipotencia y de repoblación. Sin embargo, el número de CMHs es, aproximadamente, 1 por cada 100.000 células de médula ósea (75) y , además, en condiciones estacionarias, tan sólo una pequeña minoría de CMHs se encuentra en ciclo activo de proliferación, lo que limita aún más sus posibilidades de transducción.

En la transducción de células madre hematopoyéticas el antígeno CD34 constituye un marcador de superficie que se expresa en los CMHs. Basándose en la expresión de este marcador celular, se ha desarrollado una tecnología que permite enriquecer los CMHs de una manera relativamente sencilla, mediante sistemas de selección inmunomagnética o de biotina-avidina. Con ello, a partir

de una población altamente compleja es posible seleccionar una pequeña población que contiene los progenitores responsables de la repoblación hematopoyética del injerto. A pesar de estas ventajas, la transducción estable y eficaz de las CMHs sigue siendo una de las etapas limitantes en la terapia génica de la hematopoyesis humana.

En el caso de la deficiencia de PK han podido obtenerse modelos animales mediante transgenicidad. Utilizando recombinación homóloga con células de tamaño embrionario, ha sido posible producir ratones con una mutación puntual en el lugar deseado y, por tanto, en principio los modelos de ratas con deficiencias enzimáticas resultarían fáciles de obtener sustituyendo los aminoácidos conservados que están alterados. Los modelos de ratones son muy útiles para evaluar los efectos del gen alterado y así ha sido demostrado experimentalmente en el PK-LR (76). Estos autores obtuvieron una línea celular mediante transfección retroviral del cDNA de la PK-L humana. La línea celular fue utilizada para transducir células NIH/3T3 de ratón y líneas celulares leucémicas. El mRNA de la PK humana fue detectado en las células transducidas. Posteriormente se intentaron transducir células de médula ósea de rata, enriquecidas con células progenitoras, a ratones letalmente irradiados. El mRNA correspondiente al gen recombinante humano se detectó en la sangre periférica de los ratones pero a niveles extremadamente bajos (sólo detectables por PCR). Este estudio, aunque demuestra la viabilidad del procedimiento, deja entrever que queda mucho trabajo por realizar antes de intentar una terapia molecular en la especie humana con suficiente garantía de éxito.

En el modelo experimental con vectores retrovirales, el más utilizado, es el virus de la leucemia murina de Maloney (MMVL). El genoma de MMVL contiene tres genes *gag*, *pol* y *env*, que codifican tres proteínas necesarias para la replicación viral y el empaquetamiento, y dos genes reguladores, *tat* y *rev*, esenciales para la expresión del genoma. Los genes que codifican las tres proteínas pueden ser liberados y en su lugar insertados genes heterólogos y secuencias reguladoras (77). Se han desarrollado estrategias que se basan en la utilización de promotores de retrovirus, como el *Spleen Focus Forming Virus* y el virus mieloproliferativo del sarcoma de ratón que presentan mayor actividad transcripcional que el MMVL en líneas celulares embrionarias (78). Para la construcción de estos vectores se ha utilizado la región *leader* del *Murine Embryonic Stem Cell Virus*, con objeto de eliminar el silenciamiento transcripcional que se produce por la unión de un represor en la región de «primer binding site» del MMVL.

Células del estroma derivadas de la médula ósea de ratón Bal/c fueron transducidas con un retrovirus defectivo a la replicación que contenía el gen *LacZ*.

Este gen fue detectado, después del trasplante, por PCR en varios órganos, obteniendo una frecuencia del 3 y el 5% en células de bazo y médula ósea. La facilidad de cultivo, de transducción de los genes y la especificidad para células de órganos hematopoyéticos señalan que las células del estroma pueden ser un vehículo ideal para la transferencia de genes (79).

Evidentemente, como en todas las técnicas de transferencia de genes, existe todavía un largo camino por recorrer hasta desarrollar un procedimiento seguro y una metodología eficaz y sencilla que permita obtener unos resultados totalmente satisfactorios.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Harrison PR. (1984) Molecular Analysis of Erythropoiesis. *Experimental Cell Research*. **155**, 321-344.
- (2) Hollan S (1996) Membrane fluidity of blood cells. *Haematologia* (Budap.) **27**, 109-127.
- (3) Brewer GJ.(1984) *Red Cell Metabolism and Function*, 3th ed., Plenum Press, New York.
- (4) Brewer GJ (1980) Inherited erythrocyte metabolic y membrane disorders. *Med. Clin. North. Am.* **64**, 579-596.
- (5) Guyton AC y Hall JE (1996) Tratado de Fisiología Médica. 9.^a ed. Interamericana-McGraw Hill. Madrid.
- (6) McMullin MF (1999) The molecular basis of disorders of red cell enzymes. *J. Clin. Pathol.* **52**, 241-244.
- (7) Beutler E. (1986) Red Cell Metbolism. In: *Methods in Hematology*, vol. 16, Churchill Livingstone. Edimbur g.
- (8) McGilvery RW y Murray TW (1974) Calculated equilibria of phosphocreatine and adenosine phosphates during utilization of high energy phosphate by muscle. *J. Biol. Chem.* **249**, 5845-5850.
- (9) Luque J, Pinilla M, Escrivá F y Giménez A. (1991) Bioquímica de las células sanguíneas: serie eritrocitaria. En: *Bioquímica*. Vol. II. 2.^a Ed. Herrera E. Interamericana McGraw-Hill.
- (10) Yoshikawa H y Rapoport SM (1974) *Cellular and Molecular Biology of Erythrocytes*. Medical and Technical Publications Co., London.
- (11) Perutz M F (1990) Mechanisms regulating the reactions of human hemoglobin with oxygen and carbon monoxide. *Ann. Rev. Physiol.* **52**, 1-25.

- (12) Pandolfi PP, Sonati F, Rivi R, Mason P, Grosveld F y Luzzatto L. (1995) Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *EMBO J.* **14**, 5209-5215.
- (13) Filosa S, Fico A, Paglialunga F, Balestrieri M, Crooke A, Verde P, Abrescia P, Bautista JM y Martini G. (2003) Failure to increase glucose consumption through the pentose-phosphate pathway results in the death of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene deleted mouse embryonic stem cells subjected to oxidative stress. *Biochem J.* **370**, 935-943.
- (14) Gómez-Gallego F, Garrido-Pertierra A, Mason PJ y Bautista JM (1996) Unproductive folding of the human G6PD-deficient variant A. *FASEB J.* **10**, 153-158.
- (15) Hardisty RM. y Weatherall DJ (1982) *Blood and its disorders*, 2nd ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- (16) Gilsanz F. (1996) Anemia: manifestaciones clínicas y clasificación. En: *Medicine. 7.ª Serie*. IDEPSA. Madrid. pp. 1 169-1171.
- (17) Gilsanz F. (1996) Anemia: manifestaciones clínicas y clasificación. En: *Medicine. 7.ª Serie*. IDEPSA. Madrid. pp. 1213-1216.
- (18) Crosby W. H. (1950) Hereditary nonspherocytic hemolytic anemia. *Blood* **5**, 233-253.
- (19) Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE y Alving AS. (1956) Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* **124**, 484-485.
- (20) DeGruchy GC, Santamaria JC, Parson JC y Crawford H. (1960) Nonspherocytic congenital hemolytic anaemia. *Blood* **16**, 1371-1397.
- (21) Robinson MA, Loder PB y DeGruchy GC. (1961) Red-cell metabolism in nonspherocytic congenital haemolytic anaemia. *Brit. J. Haematol.* **7**, 327-339.
- (22) Valentine WN, Tanaka KR y Miwa S. (1961) A specific erythrocyte glycolytic enzyme defect (pyruvate kinase) in three subjects with congenital nonspherocytic hemolytic anemia. *Transactions of the Association of American Physicians* **74**, 100-110.
- (23) Rico Irlés J. (1962) Enzymes in haematology. *Rev. Clin. Esp.* **84**, 217-212.
- (24) Kahn A, Vives-Corrons JL, Marie J, Galand C y Bolvin C. (1977) A Spanish family with erythrocyte pyruvate kinase deficiency: contribution of various immunologic methods in the study of the mutant enzyme. *Clin. Chim. Acta* **75**, 71-78.
- (25) Jacobash G y Rapoport SM. (1996) Hemolytic Anemias Due to Erythrocyte. *Enzyme Deficiencies* **17**, 143-170.
- (26) Ruwende C, Khoo SC, Snow R W, Yates SN, Kwiatkowski D, Gupta S, Warn P, Allsopp CE, Gilbert SC y Peschu N. (1995) Natural selection of hemi- and hete-

- rozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature* **376**, 246-249.
- (27) Beutler, E. (1990) The genetic of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Sem. Hemat.* **27**, 137-164.
- (28) De Medicis E, Ross P, Friedman R, Hume H, Marceau D, Milot M, Lyonais J y De Braekeleer M. (1992) Hereditary nonspherocytic hemolytic anemia due to pyruvate kinase deficiency: a prevalence study in Quebec (Canada) *Hum. Hered.* **42**, 179-183.
- (29) Luzzatto L. y Mehta A. (1995) Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: *The metabolic and Molecular Basis of inherited Disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS y Valle D.(eds). New York. MacGraw-Hill. pp. 3367-3898.
- (30) Ingram VM.(1956) A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle cell anaemia haemoglobin. *Nature* **178**, 792-794.
- (31) Leblond PF, Coulombe L y Lyonais J. (1978) Erythrocyte populations in pyruvate kinase deficiency anaemia following splenectomy. II. Cell deformability. *Br. J. Haematol.* **39**, 63-70.
- (32) Dacie J. (1985) The Haemolytic Anemias. In: *The Hereditary Haemolytic Anemias*. Grune y Stratton (eds), Vol.1, 419. New York.
- (33) Thomas PJ, Qu BH y Pedersen PL.(1995) Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends. Biol. Sci.* **20**, 456-459.
- (34) Gómez-Gallego F, Garrido-Pertierra A, y Bautista JM (2000) Structural defects underlying protein dysfunction in human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **16**, 1061-1067.
- (35) Baronciani L, Bianchi P y Zanella A. (1996) Hematologically important mutations: red cell pyruvate kinase. *Blood Cells Mol Dis.* **22**, 85-89.
- (36) Baronciani L, Bianchi P y Zanella A. (1996) Hematologically important mutations: red cell pyruvate kinase. *Blood Cells Mol Dis.* **22**, 259-264.
- (37) Treacy MN, He X y Rosenfeld MG (1991) 1-Pou: a POU domain protein that inhibits neuron specific gene activation. *Nature* **350**, 577-584.
- (38) Bautista JM y Garrido-Pertierra A. (2003) Deficiencias en piruvato quinasa y anemias hemolíticas. *Anal. Real Acad. Nac.Farm.* **69**, 111-143.
- (39) Branden C. y Tooze J. (1991) Introduction to Protein Structure. Garland Pub.Inc. New York.
- (40) Valentini WN, Oski F A, Paglia DE, Baughan MA, Schneider AS y Naiman N. (1967) Hereditary haemolytic anaemia with hexokinase deficiency: role of hexokinase in erythrocyte agglutination. *N. Engl. J. Med.* **275**, 1-11.

- (41) Paglia DE, Shende A, Lanzkowsky P y Valentine WN. (1981) Hexokinase «New Hyde Park»: a low activity erythrocyte isoenzyme in a Chinese Kindred. *Am. J. Hematol.* **10**, 107-117.
- (42) Valentine W. N., Tanaka K. R. y Paglia D. E. (1985) Hemolytic anemias and erythrocyte enzymopathies. *Ann. Intern. Med.* **103**, 245-257.
- (43) Kanno H (2000) Hexokinase: gen structure and mutations. *Baillieres Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* **13**, 83-88.
- (44) Murakami K, Kanno H, Tancabelli J y Fujii H (2002) Gene expresión and biological significance of hexokinase in erythroide cells. *Acta Haematol.* **108**, 204-209.
- (45) Baughan MA, Valentine WN, Paglia DE, Ways PO Simon ER y DeMars QB (1968) Hereditary hemolytic anemia associated with glucosephosphate isomerase (GPI) deficiency-a new enzyme defect of human erythrocytes. *Blood* **32**, 236-249.
- (46) Paglia DE y Valentini WN. (1974) Hereditary glucophosphate isomerase deficiency: a review. *Am. J. Clin. Pathol.* **62**, 740-751.
- (47) Miwa S. (1983) Hereditary disorders of red cell enzymes in the Embden-Meyerhof pathway. *Am. J. Hematol.* **10**, 57-80.
- (48) Valentine WN, Tanaka KR y Paglia DE. (1989) Pyruvate kinase and other enzyme deficiency disorders of the erythrocyte. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. Scriber CR, Beaudet AL y Sly WS (eds) 6th ed. New York.
- (49) Zanella A, Izzo C y Rebullá P. (1980) The first stable variant of erythrocyte glucose-fosphate isomerase associated with severe haemolytic anemia. *Am. J. Hematol.* **275**, 9-11.
- (50) Dhaliwal G, Cornet P A y Tierney LM Jr (2004) Hemolytic anemia. *Am. Fam. Physician* **69**, 2599-2606
- (51) Kugler W y Lakomek M. (2000) Glucose-6-phosphate isomerase deficiency. *Baillieres Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* **13**, 89-101.
- (52) Tarui S, Okuno G, Ikuno Y, Tanaka T, Suda M y Nishikawa M. (1965) Phosphofructokinase deficiency in skeletal muscle: a new type of glycogenosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **19**, 517-523..
- (53) Beutler E (1978) *Hemolytic Anemia in Disorders of Red Cell Metabolism*. Plenum Medical Book Co. New York.
- (54) Miwa, S. (1980). Pyruvate kinase variants characterized by the methods recommended by the International Committee for Standardization in Haematology. *Hemoglobin* **4**, 627-633.
- (55) Yao DC, Tolan DR, Murria MF, Harris DJ, Darras BT, Geva A y Neufeld EJ (2004) Hemolytic anemia and severe rhabdomyolysis caused by compound heterozygous

- mutations of the gene for erythrocyte/muscle isozyme of aldolase, ALDOA (Arg303X/Cys338Tyr) *Blood* **103**, 2401-2403.
- (56) Kishi H, Muka T, Hirono A, Fujii H, Miwa S y Hori K (1987) Human aldolase A deficiency associated with a hemolytic anemia: thermolabile aldolase due to a single base mutation. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* **84**, 8623-8627.
- (57) Schneider AS, Valentine WN, Hattoti M y Heins HL Jr. (1965) Hereditary haemolytic anemia with triosephosphate isomerase deficiency. *N. Engl. J. Med.* **272**, 229-235.
- (58) Skala H, Dreyfua JC, Vives-Corrans JL, Matsumoto F y Beutler E. (1977) Triose phosphate isomerase deficiency. *Biochem. Med.* **18**, 226-234.
- (59) Chen SH, Malcom LA, Yoshida A y Giblett ER (1971) Phosphoglycerate kinase: an X-linked polymorphism in man. *Am. J. Hum. Genet.* **23**, 87-91.
- (60) Huang IY, Rubinfien E. y Yoshida A. (1980) Complete amino acid sequence of human phosphoglycerate kinase: I Isolation and amino acid sequence of tryptic peptides. *J. Biol. Chem.* **255**, 6408-6411.
- (61) Noguchi T, Yamada K, Inoue H, Matsuda T y Tanaka T. (1987) The L-type and R-type isozymes of rat pyruvate-kinase are produced from a single gene by use of different promoters. *J. Biol. Chem.* **223**, 14366-14371.
- (62) Consler TG, Woodard SH y Lee JC. (1989) Effects of Primary Sequence Differences on the Global Structure and Function of an Enzyme: A Study of Pyruvate Kinase Isozymes. *Biochemistry* **28**, 8756-8764.
- (63) Monod J, Changeux JP y Jacob J. (1963) Allosteric proteins and cellular control systems *J. Mol. Biol.* **6**, 306-329.
- (64) Bautista JM y Luzzatto L (1997) Glucose 6-phosphate dehydrogenase. In: *Protein Dysfunction in Human Genetic Disease*. Swallow D.M. y Edwards Y.H. (eds) BIOS Scientific Publisher Ltd. Oxford. UK. pp. 33-56.
- (65) Cappadoro M, Giribaldi G, O'Brien E, Turrini F, Mannu F, Ulliers D, Simula G, Luzzatto L y Arese P. (1998) *Blood* **92**, 2527-2534.
- (66) Konrad PN, Richards FII, Valentine WN y Paglia DE. (1972) γ -Glutamyl cysteine synthetase deficiency: a cause of hereditary hemolytic anemia. *N. Engl. J. Med.* **286**, 557-561.
- (67) Garrido-Pertierra A. (2002) Genética molecular de la deficiencia eritrocitaria humana en piruvato quinasa. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.
- (68) Gilsanz F, Vega MA, Gómez-Castillo E, Ruiz-Balda JA y Omeñaca F. (1993) Fetal anaemia due to pyruvate kinase deficiency. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal* **69**, 523-527.

- (69) Tanaka KR y Paglia DE. (1971) Pyruvate kinase deficiency . *Semin. Hematol.* **8**, 367-369.
- (70) Tanaka KR.(1985) Disorders associated with enzymopathies of the Embden-Meyerhof pathway, pp. 249-252. In: Valentine W. N., moderator. Hemolytic anemias and erythrocyte enzymopathies. *Ann. Intern. Med.* **103**, 245-257.
- (71) Tanaka KR. (1985) Hemolytic anemia due to abnormalities of enzyme of anaerobic glycolysis and nucleotide metabolism. In: *Current therapy in Hematology-Oncology*. Brain MC y Carbone PP (eds). Philadelphia. USA.
- (72) Aurbourg P, Blanche S y Janbaque I (1990) Reversal of early neurologic and neuroradiological manifestations of X-linked adrenoleukodystrophy by bone-marrow transplantation. *N. Eng. J. Med.* 1860-1866.
- (73) Hoogerbrugge PM, Brouwer OF , Bordigini P, Ringden O, Kapaun P , Ortega JJ, Suillet G y Frappaz D. (1995) Allogeneic bone-marrow transplantation for lysosomal storage diseases. *Lancet* **345**, 1398-1402.
- (73) Tanphaichitr VS, Suvatte V, Issaragrisil S, Mahasandana C, Veerakul G, Chongkolwatana, V, Waiyawuth, W y Ideguchi H. (2000). Successful bone marrow transplantation in a child with red blood cell pyruvate kinase deficiency. *Bone Marrow Transplant* **26**, 689-690.
- (75) Harrison DE, Zsebo KM y AstleCM. (1994) Splenic primitive hematopoietic stem cell (PHSC) activity is enhanced by steel factor because of PHSC proliferation. *Blood* **83**, 3146-3151.
- (76) Tani K, Yoshikubo T, Ikekuchi K, Takahashi K, Tsuchiya T, Shimane M, Ogura H, Tojo A y Ozawa K. (1994) Retrovirus-mediated gene transfer of human pyruvate kinase (PK) cDNA into murine hematopoietic cells implications for gene-therapy of human PK deficiency . *Blood* **83**, 2305-2310.
- (77) Robbins PD y Ghivizzani SC. (1998) Viral Vectors for Gene therapy. *Pharmacol. Therm* **80**, 35-47.
- (78) Baum C, Richters A, y Osteryag W. (1999) Retroviral vector -mediated gene expression in hematopoietic cells. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **1**, 605-612.
- (79) Ding L, Lu S, Batchu R y Munshi N. (1999) Bone marrow stromal cells as a vehicle for gene transfer . *Gene Ther.* **6**, 1611-1616.

Patología del metabolismo oxidativo del propionato

CELIA PÉREZ CERDÁ, PILAR RODRÍGUEZ POMBO,
BEGOÑA MERINERO, LOURDES RUIZ DESVIA T, BELEN PÉREZ
Y MAGDALENA UGARTE

RESUMEN

Las acidemias orgánicas más frecuentes en humanos afectan al metabolismo oxidativo del ácido propiónico, son las acidemias propiónica y metilmalónica. Distintos defectos genéticos que afectan a la síntesis o función de una de las dos principales enzimas de la vía oxidativa del propionato (propionilCoA carboxilasa, PCC y metilmalonilCoA mutasa, MCM) o de sus coenzimas (biotina y vit. B12), causan trastornos metabólicos con importantes implicaciones fisiopatológicas, que dan lugar a diferentes entidades clínicas de diversa gravedad. Mutaciones en cualquiera de los dos genes (PCCA y PCCB) que codifican el enzima mitocondrial dependiente de biotina PCC dan lugar a la acidemia propiónica, enfermedad metabólica grave que se hereda de forma autosómica recesiva. Por otro lado, se han descrito diferentes defectos moleculares asociados a acidemia metilmalónica con diversa gravedad clínica. La mayoría de los casos con acidemia metilmalónica aislada afectan a la actividad mitocondrial MCM o a la síntesis intramitocondrial de su cofactor adenosilcobalamina, estando tres genes afectados (MUT, MMAA y MMAB) responsables de los grupos de complementación genética mut, cblA y cblB respectivamente. El diagnóstico bioquímico/genético de estas enfermedades es posible gracias a las técnicas analíticas actuales. El conocimiento del espectro mutacional de los genes implicados así como los estudios de expresión de los alelos mutantes está proporcionando información muy valiosa sobre la compleja correlación genotipo-fenotipo en este grupo de enfermedades. En los pacientes con acidemia metilmalónica con homocistinuria (formas cblC, cblD y cblF), el diagnóstico es sólo bioquímico ya que no se conocen actualmente los genes afectados.

INTRODUCCIÓN

El origen del propionato en mamíferos superiores se localiza en el catabolismo de proteínas y lípidos. La degradación de los aminoácidos ramificados isoleucina y valina, así como la de metionina y treonina y la β -oxidación de ácidos grasos de cadena impar y de la cadena lateral del colesterol, constituyen las fuentes principales de ácido propiónico en humanos. La producción bacteriana en intestino puede ser también importante en determinadas circunstancias. Se ha demostrado mediante estudios con isótopos estables en pacientes con acidemias propiónica y metilmalónica, que aproximadamente un 50% del propionato formado es debido al catabolismo protéico, un 25% es debido al de los ácidos grasos de cadena impar mientras que el restante 25% es causado por la actividad bacteriana intestinal (1).

Tres reacciones enzimáticas sucesivas son responsables de la conversión del propionilCoA a succinilCoA (Figura. 1), metabolito éste último que se incorpora al ciclo de Krebs, cumpliendo así una función gluconeogénica al sintetizarse piruvato vía oxalacetato. La primera reacción implica la carboxilación biotina-dependiente del propionilCoA a D-metilmalonilCoA por acción del enzima propionilCoA carboxilasa (PCC; EC 6.4.1.3). Esta forma estereoisómera del metilmalonilCoA no es sustrato de la actividad mutasa, y por tanto debe ser

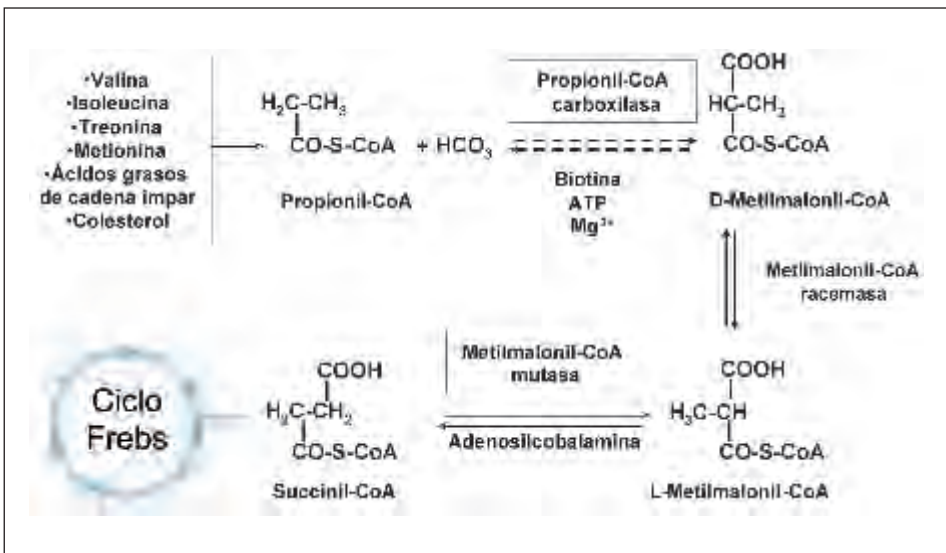


FIGURA 1. Precursores del ácido propiónico. Vía degradativa del ácido propiónico y ácido metilmalónico. Enzimas y coenzimas implicadas.

racemizada a L-metilmalonilCoA por el enzima metilmalonilCoA racemasa (EC 5.1.99.1); finalmente, el enzima metilmalonilCoA mutasa (MCM; EC 5.4.99.2), que utiliza como cofactor AdoCbl (vitamina B12), isomeriza el L-metilmalonilCoA a succinilCoA (2).

Distintos defectos genéticos que afectan a la síntesis o función de una de las dos principales enzimas de esta vía (PCC y MCM) o de sus coenzimas (biotina y vit. B12), causan un trastorno del metabolismo de propionato con importantes implicaciones fisiopatológicas, que dan lugar a diferentes entidades clínicas de diversa gravedad.

ACIDEMIA PROPIÓNICA

La acidemia propiónica (AP; MIM 606054), es una de las acidemias orgánicas del catabolismo de aminoácidos ramificados más frecuentes en humanos. Está causada por la deficiencia genética del enzima mitocondrial biotina-dependiente PCC (Figura 2).

La enzima, que cataliza la carboxilación ATP-dependiente del propionilCoA en L-metilmalonilCoA, es un heteropolímero compuesto por dos tipos de subunidades, α y β , con una configuración de $\alpha_6\beta_6$. La subunidad α presenta los sitios de unión a ATP y biotina, así como el dominio de biotinilación. Se postula

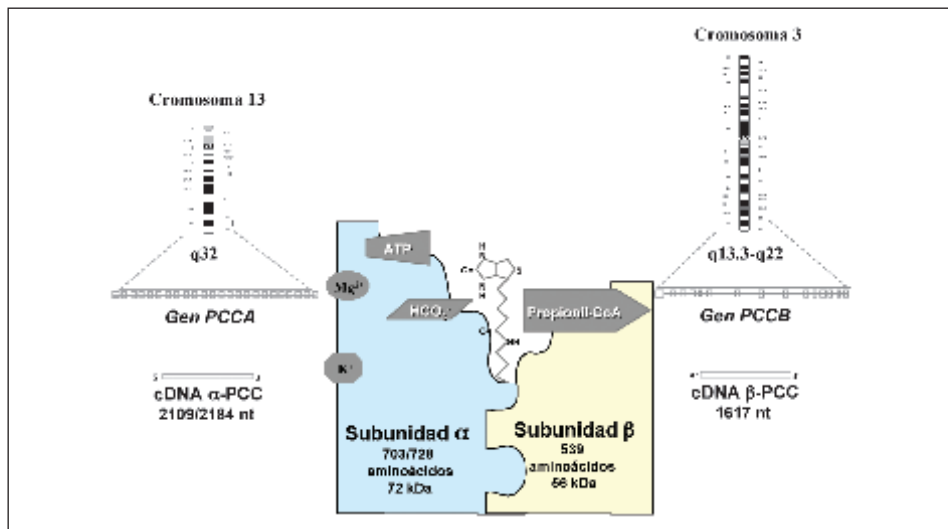


FIGURA 2. Modelo propuesto para el prótomo propionilCoA carboxilasa de mamífero, compuesto por las dos subunidades no idénticas α y β , el sitio del cofactor biotina en la subunidad α y los diferentes sitios para los sustratos y efector es.

que sobre la subunidad β se encuentran los sitios de unión de la carboxibiotina y el propionilCoA.

Fenotipo clínico

La mayoría de los pacientes con AP manifiestan la enfermedad en las primeras semanas de vida, lo que se denomina AP de presentación temprana (3). Tienen signos clínicos de enfermedad tipo «intoxicación», con cetoacidosis metabólica e hiperamonemia. Generalmente, tras un breve periodo inicial libre de síntomas en un recién nacido a término de un embarazo y parto normal, los pacientes desarrollan problemas de alimentación con vómitos, somnolencia que puede derivar en letargia y coma, hipotonía y movimientos anómalos como mioclonías y convulsiones. Los casos menos graves pueden debutar durante la infancia, presentación tardía (4). En este caso, los síntomas clínicos suele ser más sutiles y generalmente asociados a infecciones con problemas gastrointestinales. Por otra parte, la AP también puede presentarse como una enfermedad fundamentalmente neurológica sin episodios agudos de cetoacidosis ni hiperamonemia. También se ha descrito algún caso asintomático (5).

Fenotipo bioquímico

La AP se caracteriza porque los pacientes acumulan grandes concentraciones de ácido propiónico en sangre y orina. Este exceso de propionilCoA se desvía por rutas alternativas hacia la formación de numerosos metabolitos, fundamentalmente ácidos orgánicos, que se encuentran también elevados en fluidos fisiológicos; éstos son: ácido 3-OH-propiónico, metilcitrato y propionilglicina; en episodios de cetosis se encuentran 3-OH-butilato, 3-OH-isovalerato, 3-OH-n valerato, 3-ceto-n valerato, y otros intermediarios del catabolismo de la isoleucina como ácido tíglico, tiglil glicina y 2-metil-3-OH butirato. Además, la acumulación de propionil CoA intracelular da lugar a la inhibición del enzima N-acetilglutamato sintetasa y del sistema de transporte mitocondrial de la glicina (6), que explicaría la hiperamonemia y la hiperglicinemia que presentan estos pacientes. Debido a la acción del enzima carnitina-N-acilasa, los pacientes también acumulan propionilcarnitina y sufren una deficiencia secundaria de carnitina en plasma (7). Por otra parte, el propionilCoA puede actuar como cebador en lugar del acetilCoA en la síntesis de ácidos grasos, dando lugar a un aumento relativo de los ácidos grasos de cadena impar (OLCFA) (8).

Pruebas diagnósticas

El diagnóstico de AP está generalmente basado en la detección y cuantificación por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-MS) de los metabolitos marcadores urinarios 3-OH-propionato, metilcitrato y propionilglicina. Los pacientes pueden presentar también con frecuencia hiperamonemia, hiper glicinemia e hipocarnitinemia. Desde hace varios años, la cuantificación de propionilcarnitina en sangre impregnada en papel de recién nacidos por espectrometría de masas en tandem (MS-MS) permite la identificación pre-sintomática de pacientes con AP (9). La confirmación del diagnóstico se lleva a cabo por la determinación de la actividad propionil-CoA carboxilasa en linfocitos (10) y/o fibroblastos de piel cultivados, que presenta una importante disminución (1-5%) y por el análisis de mutaciones en los genes PCCA o PCCB. El diagnóstico prenatal es así mismo posible mediante la cuantificación de metabolitos en líquido amniótico, determinación de la actividad PCC (11) y/o estudios moleculares en amniocitos o biopsia corial (12, 13).

El diagnóstico diferencial debe hacerse de una sepsis, trauma de parto, obstrucción gastrointestinal, dificultades cardiorrespiratorias y de otras condiciones que cursen con cetocidosis y/o hiperamonemia, como deshidratación grave, diabetes mellitus, síndrome de Reye, glucogenosis, enfermedades del ciclo de la urea y otras acidemias orgánicas, especialmente del déficit múltiple de carboxilasas.

Tratamiento

El objetivo del tratamiento dietético de la acidemia propiónica es reducir la producción de propionato y facilitar la eliminación de metabolitos tóxicos. Fundamentalmente está basado en la restricción de proteínas de alto valor biológico y suplemento con una mezcla especial de proteínas exenta de los aminoácidos propionicogénicos (Treo, Met, Val e Ileu). Se debe administrar carnitina para facilitar la eliminación por orina del ácido propiónico, en forma de propionilcarnitina, y prevenir la deficiencia secundaria de carnitina. Es también muy aconsejable la suplementación de biotina, cofactor del enzima, de metronidazol, antibiótico para reducir la producción anaerobia de propionato de las bacterias intestinales, e isoleucina, cuya carencia provoca el síndrome de piel escaldada, de fatales consecuencias. Debe evitarse el ayuno, para prevenir el catabolismo proteico y la lipólisis.

Recientemente, se ha desarrollado un modelo de AP en ratón con deficiencia en propionilCoA carboxilasa generado mediante disrupción del gen PCCA. En este modelo se describe la suplementación hepática de la PCC mediante expresión de un transgen como tratamiento potencial para esta enfermedad (14).

La acidemia propiónica es una enfermedad grave con un porcentaje alto de mortalidad (40%) (15) y alta incidencia de retraso mental y complicaciones neurológicas entre los supervivientes. A largo plazo, las secuelas más importantes son las neurológicas: retraso mental y desórdenes del movimiento, como distonía y coreoatetosis; alteraciones de los ganglios basales, hemiplegia aguda, cuadriparesia espástica, demencia y hemorragias cerebrales. Otras secuelas importantes pueden ser: retraso en el crecimiento, pancitopenia, inmunodeficiencia, infecciones de repetición, pancreatitis, problemas dermatológicos, retraso en el desarrollo puberal, osteoporosis y cardiomiopatía. Hasta la fecha, sólo se ha descrito un embarazo en una mujer con AP con una buena evolución del mismo (16).

Bases moleculares

La AP es una enfermedad con herencia autosómica recesiva y una incidencia estimada de 1 afectado por cada 100.000 recién nacidos vivos, aunque ésta puede variar según la población analizada. Los primeros estudios de complementación genética mediante fusión celular somática mostraron que los pacientes con AP podían ser clasificados en dos grupos de complementación: pccA y pccBC. Pacientes pertenecientes al grupo de complementación pccA tienen un defecto primario en el gen PCCA que codifica para la subunidad α . El grupo de complementación pccBC corresponde a pacientes con defectos en el gen PCCB que codifica para la subunidad β . Los cDNAs de ambas subunidades han sido clonados y los genes correspondientes se han mapeado en los cromosomas 13q32 y 3q13.3-q22, respectivamente (Figura 2). El gen PCCA contiene 24 exones y ha sido redefinido recientemente desde la versión original en que fue descrito. La localización de un nuevo codón de iniciación 75 nucleótidos por delante del previamente identificado ha supuesto la inclusión de 25 nuevos aminoácidos que, aún encontrándose ausentes en el péptido maduro, ha implicado una renumeración de las posiciones nucleotídicas y de aminoácidos (17). El gen PCCB tiene 15 exones cuyas secuencias están depositadas en el GenBank con números de acceso AJ006499-AJ006487 (18). En la actualidad, el análisis de las variantes alélicas responsables de AP se realiza rutinariamente, si bien como paso previo es preciso la identificación del gen afectado. La complementación

genética es el método de elección y se realiza bien ensayando el restablecimiento de la ruta de incorporación del propionato tras fusión celular somática de fibroblastos del paciente con líneas de fibroblastos con defectos conocidos, o bien mediante transfección de células del paciente con los cDNAs correspondientes a los genes PCCA y PCCB humanos y posterior determinación de la actividad propionil-CoA carboxilasa (19).

Hasta el momento, se han descrito un total de 90 variantes alélicas, 44 en el gen PCCA y 55 en el gen PCCB (Figura 3), incluidos 4 polimorfismos, tres en PCCA y uno en PCCB. (20, 21, 22, 23, 24, 25, 26). En ambos genes, las mutaciones más frecuentes son las que implican un cambio de aminoácido, seguidas por las que suponen pequeñas inserciones-delecciones y mutaciones de procesamiento de mRNA. El espectro mutacional en ambos genes es específico de población. Así, en pacientes caucásicos no se han descrito variantes alélicas prevalentes para el gen PCCA, pero sí en pacientes orientales, donde hay tres mutaciones c.922_923insT, c.1644_1646C>G y p.R399Q que dan cuenta del 50% de los alelos mutantes. En el gen PCCB, se ha descrito un número limitado de mutaciones que, aunque diferentes según el origen étnico, aparecen en un número elevado de pacientes. En la población caucásica la mutación más frecuente es 1218del14ins12 seguida por c.1170insT y E168K, especialmente relevantes en España y Latinoamérica. Entre la población oriental destacan las mutaciones R410W, T428I y A153P. Mutaciones descritas en ambas poblaciones son: R77W en PCCA y R165W, R410W y R512C en PCCB, cuya presencia podría reflejar un mecanismo de recurrencia ya que todas afectan a un dinucleótido CpG.

Análisis estructural y funcional de las variantes alélicas

Para confirmar la patogenicidad de las mutaciones identificadas y analizar sus consecuencias funcionales se han utilizado diferentes aproximaciones experimentales; transcripción y traducción de mutaciones en sistemas libres de células (27), análisis de interacciones heteroméricas (α/β) (28) y homoméricas (β/β) (29) en sistemas de doble híbrido, y expresión de mutaciones tanto en sistemas procarióticos, (30, 31) como en fibroblastos humanos deficientes (32, 33). En algunos casos se han analizado los efectos de los cambios utilizando las estructuras cristalinas de proteínas bacterianas homólogas, subunidad biotina carboxilasa de *E. coli* como modelo del dominio biotina carboxilasa de PCCA (Figura 4) (34), y 12S transcarboxilasa de *P. shermanii* para modelar la subunidad β de la PCC humana (35).

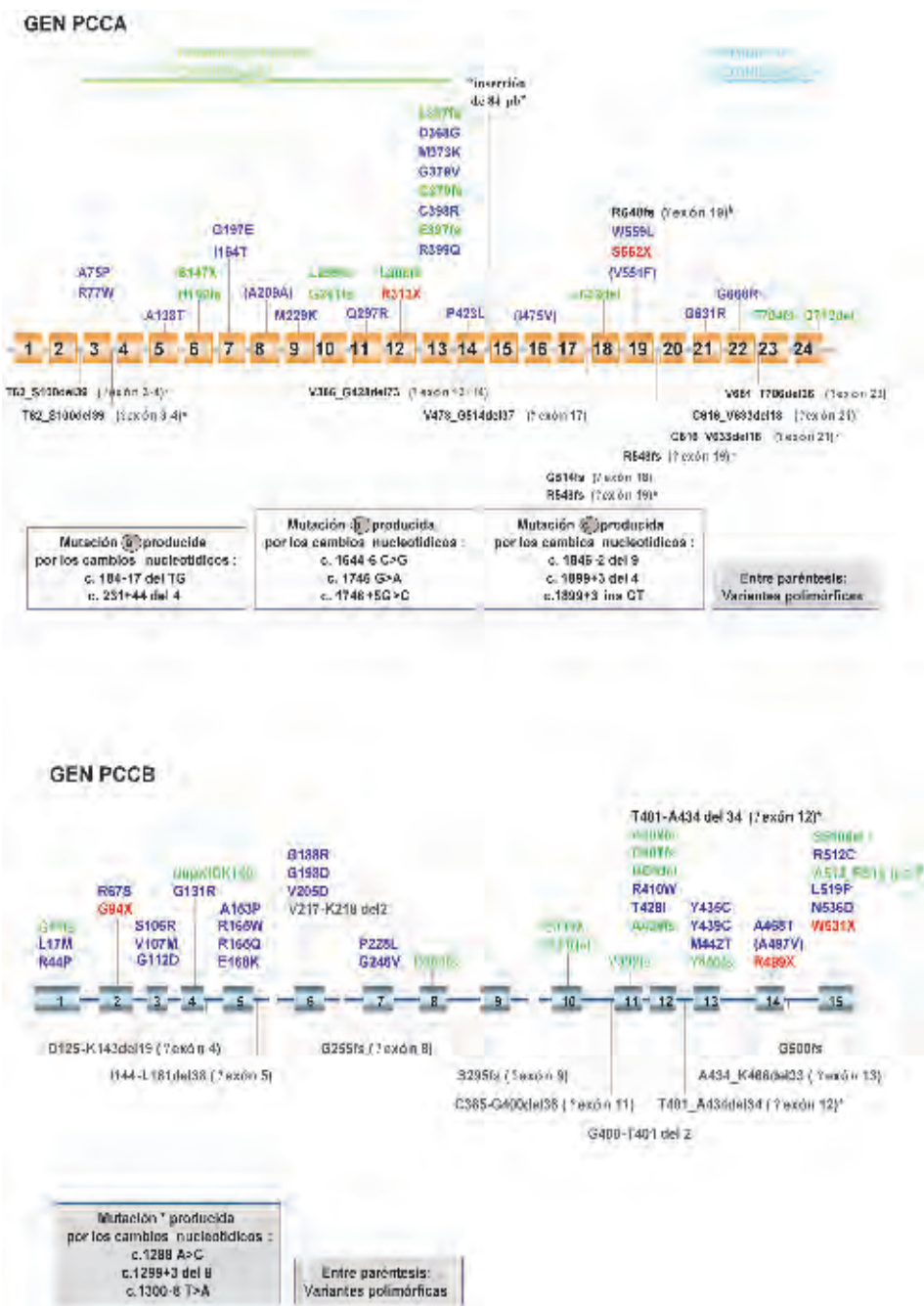


FIGURA 3. Distribución de mutaciones en los genes PCCA y PCCB

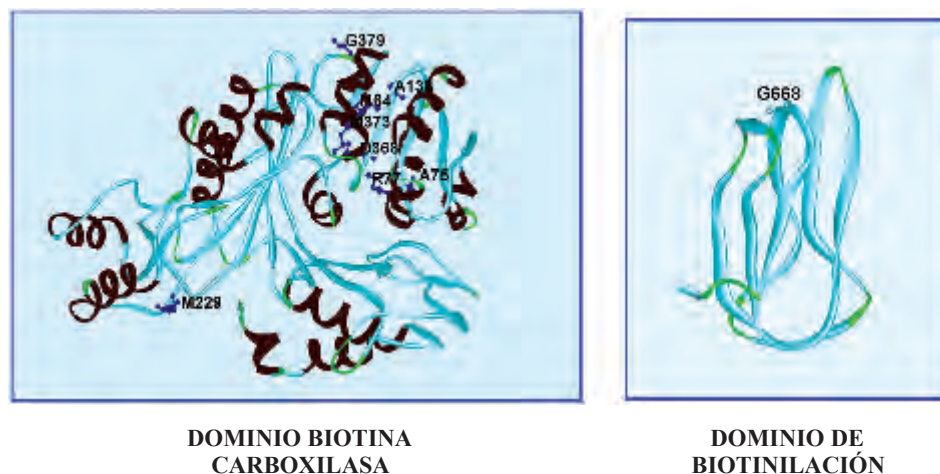


FIGURA 4. Localización estructural de mutaciones PCCA. Modelado molecular del dominio biotina carboxilasa y dominio de biotinylación de la PCCA utilizando como modelo tridimensional las subunidades biotina carboxilasa y BCCP de la Acetil-CoA carboxilasa de *E.coli*.

En el gen PCCA se han analizado un total de 11 mutaciones, 10 de cambio de aminoácido y una deleción en fase de lectura, todas corresponden a posiciones conservadas en proteínas homólogas. Su expresión en sistema de fibroblastos deficientes indica actividades residuales comprendidas entre el 1-27% del valor control expresado en condiciones idénticas. Todas, excepto M229K y R399Q, que probablemente afectan a la unión del ATP, presentan una disminución en la estabilidad y subsiguiente aumento en la tasa de degradación (32). En el gen PCCB se han analizado un total de 24 variantes alélicas (19 de cambio de aminoácido, una deleción de un aminoácido, una inserción y tres truncamientos carboxilo-terminales). Los análisis de expresión han confirmado la patogenicidad de los cambios. La expresión en células eucarióticas indica que excepto para tres de los mutantes estudiados G246V, R410W y N536D, que retienen actividad parcial, el resto son mutaciones deletéreas (33, 36). Basándose en la similitud estructural existente entre la subunidad PCC β y la 12S TC, las mutaciones estudiadas se han localizado en la estructura cristalina de 12S (35). Un número elevado de las mismas además de afectar a la estabilidad de la proteína resultante podrían alterar la conformación del sitio activo (26, 36). Las mutaciones R512C, L519P y G112D, que producen las proteínas menos estables, podrían afectar al ensamblaje final del oligómero alterando no sólo la interacción entre subunidades PCC β sino también la interacción con PCC α .

Correlación genotipo-fenotipo

Tras explorar ampliamente la posible correlación entre el genotipo de los pacientes AP investigados y su expresión fenotípica (37, 38), los estudios de expresión de alelos PCCA y PCCB mutantes han permitido establecer algunas correlaciones. En pacientes homocigotos o hemicigotos funcionales, los resultados obtenidos apuntan a que ciertas mutaciones de cambio de aminoácido que retienen actividad parcial, como A138T, I164T en PCCA y N536D en PCCB, se asocian a fenotipos menos graves. Mutaciones categorizadas como funcionalmente nulas (p.e. mutaciones que provocan una parada prematura, cambios en la fase de lectura, procesamiento de mRNA, etc.) y aquellas que, aún siendo de cambio de aminoácido, carecen de actividad detectable en sistemas de expresión, se asocian, casi siempre, a los fenotipos más graves de la enfermedad. La inconsistencia de que pacientes con AP que portando mutaciones de procesamiento de mRNA presenten fenotipos menos graves de la enfermedad, se ha analizado utilizando minigenes y estudios de PCR a tiempo real. En tres de los casos investigados, c.1899+3del4 y c.204-2A>G de PCCA y c.1091-11del6 de PCCB, se ha detectado algo de mRNA procesado correctamente en las células de los pacientes que podría ser suficiente para aliviar el fenotipo clínico de los mismos (39). Por último, en un intento de clarificar la correlación genotipo-fenotipo en pacientes heterocigotos, se ha ensayado la expresión simultánea de dos mutaciones diferentes en fibroblastos deficientes. Estos estudios, que intentan reproducir la situación en pacientes heterocigotos, parecen indicar que al menos para determinadas combinaciones de mutaciones, como R410W y G246V o W531X y V205D, la interacción entre subunidades mutantes aumenta la estabilidad del oligómero resultante mejorando el fenotipo bioquímico (36).

ACIDEMIA METILMALÓNICA

La acidemia metilmalónica se caracteriza por el acúmulo de ácido metilmalónico en fluidos fisiológicos, y está causado por la incapacidad de convertir L-metilmalonilCoA en succinilCoA en la vía del propionato. Esta reacción está catalizada por la enzima mitocondrial metilmalonilCoA mutasa (MCM; EC 5.4.99.2) que utiliza 5'-desoxiadensilcobalamina (AdoCbl) como cofactor. La acidemia metilmalónica puede ser el resultado de un defecto en la apomutasa, o bien en el procesamiento intracelular de cobalamina (Cbl) que conduce a la síntesis de AdoCbl. Se han caracterizado dife-

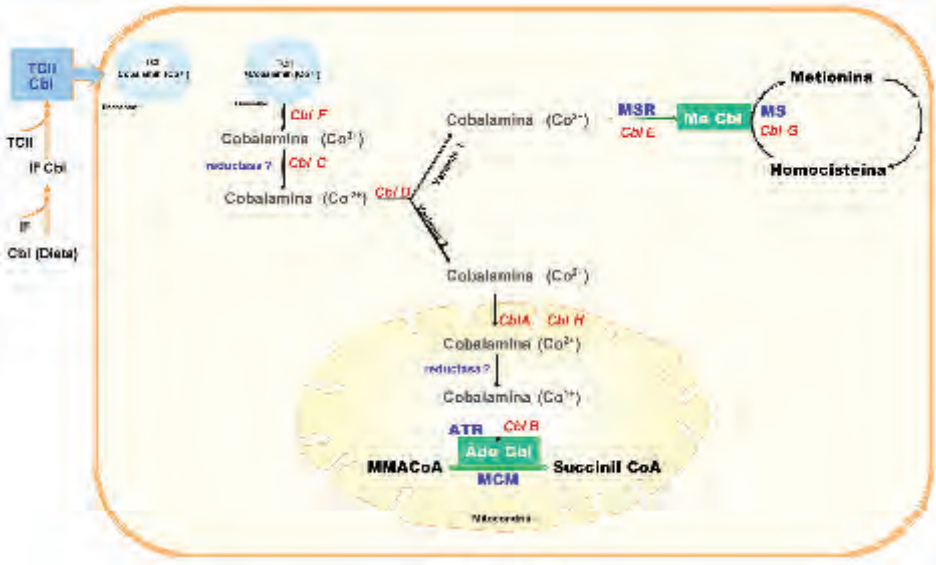


FIGURA 5. *Metabolismo celular de cobalaminas. MCM: metilmalonilCoA mutasa; ATR: ATP: cobalamina (Co¹⁺) adenosiltransferasa. MS: metionina sintasa; MSR: metionina sintasa reductasa. Ado Cbl: adenosilcobalamina; Me Cbl: metilcobalamina.*

rentes formas bioquímicas mediante estudios de complementación celular somática (40): forma mut (MIM 251000), en la que la MCM se encuentra afectada con dos expresiones fenotípicas mut⁰ y mut⁻; y cuatro grupos en los que se encuentra alterada la síntesis de AdoCbl: *cbIA* (MIM 251 100), *cbIB* (MIM 251 110), *cbIH* (MIM 606169) y *cbID*-variante 2, descrito recientemente (41). Todas estas formas se presentan con acidemia metilmalónica aislada (Figura 5).

Existen otros grupos de complementación genética: *cbIC* (MIM 277400), *cbID* (MIM 277410) y *cbIF* (MIM 277380), en los que se encuentra afectada tanto la síntesis intracelular de AdoCbl como la de metilcobalamina (MeCbl), cofactor de la remetilación citosólica de homocisteína a metionina, catalizada por la N-metiltetrahidrofolato:homocisteína metiltransferasa (EC 2.1.1.13) (2, 42). En el grupo *cbIF* el defecto se encuentra localizado en el transporte de la cobalamina a través de la membrana lisosomal. En todos estos casos los pacientes presentan acidemia metilmalónica combinada con homocistinuria (Figura 5). Todos estos defectos se heredan con carácter autosómico recesivo.

Defectos en metilmaloniCoA mutasa y en la síntesis de AdoCbl

Fenotipo clínico

La mayoría de los pacientes con acidemia metilmalónica aislada (grupos mut⁰, mut⁻, cblA, cblB) presentan vómitos recurrentes, retraso del crecimiento, hipotonía y retraso psicomotor. La presentación de los síntomas clínicos puede variar desde el período neonatal (43) hasta la infancia, incluso más tardíamente en la adolescencia (44). Los hallazgos analíticos más frecuentes son acidosis metabólica, cetonemia/uria, hiperamonemia, leuco- y trombocitopenia. El curso clínico dependerá de la naturaleza del defecto y de la respuesta clínica a la administración de dosis farmacológicas de vitamina B₁₂. Los pacientes con la forma mut⁰ presentan el peor pronóstico, mientras que los de la forma cblA que generalmente responden a la administración de vitamina B₁₂ presentan el curso clínico más favorable. La evolución clínica en las formas mut⁻ o cblB es variable, y depende de la edad al diagnóstico y del control del tratamiento. Las complicaciones a largo plazo descritas son retraso en el crecimiento y en el desarrollo; problemas renales crónicos debido a la gran excreción de ácido metilmalónico; alteraciones neurológicas progresivas, pancreatitis, cardiomiopatía hipertrófica, osteoporosis; y alteraciones neuroradiológicas como leucoencefalopatía y alteraciones bilaterales de ganglios basales. Se han reportado algunos embarazos de MMA materna (formas mut⁻; cblA), que han sido controlados estrictamente durante el embarazo con un resultado favorable. No se conoce teratogenicidad del ácido metilmalónico.

Pruebas diagnósticas

El diagnóstico está basado en la identificación de grandes cantidades de los ácidos metilmalónico (MMA), 3-hidroxiisovalérico y metilcítrico en orina por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), y glicina en fluidos fisiológicos por cromatografía de intercambio iónico. Otros hallazgos diagnósticos son hipocarnitinemia y aumento de propionilcarnitina (C3) y metilmaloni-carnitina (C4DC) en plasma, secundarios al acúmulo intramitocondrial de propionilCoA y metilmaloniCo. Es posible el diagnóstico presintomático de la enfermedad en muestras de sangre impregnadas en papel de filtro de los recién nacidos por espectrometría de masas₅ en tandem (MS-MS), utilizando C3 y C4DC como metabolitos característicos (45). El diagnóstico diferencial en pacientes con un curso clínico benigno debe realizarse con un defecto en metilmalónico semialdehído deshidrogenasa (46). La localización del defecto enzimático puede realizarse midiendo la actividad MCM en fibroblastos en los casos

ciencia en mutasa, y mediante estudios de incorporación de [1- ^{14}C] propionato a material precipitable por ácido tricloroacético en fibroblastos crecidos en medio basal y en medio suplementado con hidroxicoBALAMINA en las otras formas. Los estudios de complementación celular con líneas celulares «tester» permitirán la clasificación definitiva. Es posible el análisis de mutaciones de las formas mutantes mut⁰/mut⁻, cblA y cblB.

Se puede realizar el diagnóstico prenatal en familias de alto riesgo de las formas mut, cblA y cblB, midiendo ácido metilmalónico por dilución isotópica en líquido amniótico; determinando la actividad MCM y realizando análisis de mutaciones del gen afectado en vellosidad corial y/o amniocitos cultivados.

Tratamiento

El tratamiento es dietético y farmacológico, y consiste en restricción proteica suplementada con fórmula especial exenta de valina, isoleucina, treonina, metionina; suplemento de carnitina; metronidazol, para reducir la producción bacteriana intestinal del propionato, precursor de MMA, y la administración oral de hidroxicoBALAMINA. La monitorización del estado metabólico y del tratamiento se realiza mediante determinaciones de amonio plasmático, aminoácidos, MMA en orina, ácidos grasos de cadena impar (47), y recientemente también mediante acilcarnitinas en plasma. En las formas más graves de la enfermedad es común que los pacientes presenten anorexia, y en las formas leves el seguimiento de la dieta hipoproteica es menor. Otras estrategias terapéuticas utilizadas son el trasplante renal que normaliza la excreción de MMA; el trasplante conjunto de hígado-riñón; y recientemente también sólo él de hígado pero con escaso éxito debido a la alta mortalidad y a la disfunción progresiva tanto renal como neurológica.

Se ha descrito la corrección de la incorporación de [1- ^{14}C] propionato en fibroblastos deficientes en mutasa mediante transferencia genética mediada por DNA (48) y mediante virus (49). Recientemente se ha descrito por primera vez un modelo de ratón «knout-out» para MMA, que reproduce las principales características fenotípicas de MMA mut⁰, y que podría ayudar a entender la fisiopatología de esta enfermedad y la posibilidad de desarrollar una terapia más eficaz que la actual (50).

Bases moleculares

La MCM humana es un homodímero de 718 aminoácidos miembro de una pequeña familia de enzimas que utiliza AdoCbl como cofactor. En humanos la

MCM está codificada por un único gen (MUT) de 35Kb, y 13 exones que generan un transcrito de 2.7Kb (51, 52). La comparación entre diversas proteínas dependientes de B₁₂ tanto de organismos eucariotas y como procariotas han permitido diferenciar tres dominios funcionales que incluyen, el dominio C-terminal de la proteína (residuos 578-750) o dominio de unión de la AdoCbl, un dominio que contiene el sitio de unión del sustrato metilmalonilCoA y un dominio N-terminal menos conservado implicado en la dimerización de la proteína. Además existe una fuerte homología con la subunidad α de la MCM de *Propionibacterium shermanii* que está cristalizada y ha servido como modelo tridimensional en los estudios funcionales y estructurales realizados (53).

Mediante secuenciación del cDNA y del gen MUT se han identificado cerca de 100 mutaciones diferentes causantes de enfermedad, de las que un 55% son mutaciones de cambio de aminoácido o «missense», un 16% son mutaciones de parada de traducción prematura, un 19% son pequeñas deleciones e inserciones y un 10% son mutaciones que afectan al correcto procesamiento del mRNA. Además se han descrito en todas las poblaciones cuatro polimorfismos dialélicos muy frecuentes (K212K, A499T, H532R y V671I). La mayoría de las mutaciones identificadas son mutaciones identificadas en un sólo alelo (mutaciones privadas), aunque las mutaciones E117X y N219Y son relativamente frecuentes en la población japonesa y caucásica respectivamente (54). El espectro mutacional de la población española es similar al descrito anteriormente y se muestra en la Figura 6 (55).

La mayoría de las mutaciones identificadas en el gen MUT son cambios identificados en pacientes mut⁰, siendo las mutaciones mut⁻ cambios aminoacídicos generalmente localizados en el dominio C-terminal de unión al cofactor. Estas mutaciones han sido expresadas en algunos casos y presentan una afinidad aparente por AdoCbl 100-1000 veces aumentada con respecto al normal y resultan en un aumento justificado de la actividad residual in vitro en respuesta a la administración de B₁₂ (56). Hasta la fecha, no existen pacientes que respondan *in vivo* al cofactor con las dosis actualmente administradas de vitamina. Las mutaciones mut⁰ generalmente afectan a la estabilidad de los transcritos de MCM y suelen ser mutaciones que afectan a la fase de lectura de la proteína (57).

Recientemente se han identificado el cDNA y la estructura de los genes responsables de los grupos de complementación cblA y cblB (58, 59). El gen MMAA consta de 7 exones que codifican para una proteína de 418 aminoácidos. En la actualidad no se sabe con exactitud la función de esta proteína mitocondrial aunque existen dos hipótesis basadas ambas en la homología de secuencia de la MMAA con proteínas procariotas. Por una parte se piensa

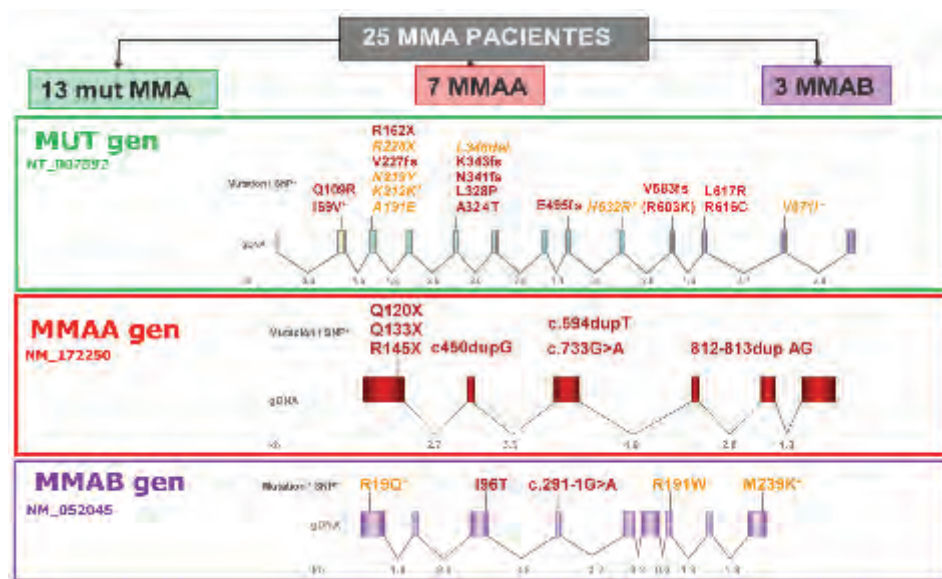


FIGURA 6. Mutaciones identificadas en 25 pacientes con acidemia metilmalónica en los genes MUT, MAA y MMAB.

que es un transportador mitocondrial de la vitamina y otra hipótesis es que podría ser una proteína implicada en la reactivación o protección frente a la inactivación de la MCM (58, 60). Se han descrito 28 mutaciones diferentes en el gen MAA (58, 61), siendo cerca del 80% mutaciones que afectan a la fase de lectura de la proteína y por tanto generan proteínas truncadas. Aun así la mayoría de los pacientes responden bioquímicamente a la administración de B₁₂. El cambio R145X es la mutación más frecuente y se encuentra en el 38% de los alelos mutantes estudiados procedentes de diferentes grupos poblacionales. En nuestra población se ha descrito un espectro mutacional similar (Figura 6).

El gen responsable de la MMAB codifica para una proteína de 250 aminoácidos, la ATP:cob(I)alamina adenosiltransferasa (59). Se han descrito mutaciones todas ellas localizadas en residuos altamente conservados de la proteína. Utilizando la proteína homóloga recientemente cristalizada de *Thermoplasma acidophilum* se ha podido ver que la mayoría de las mutaciones afecta a residuos implicados directamente en el centro activo de la proteína (62).

Hasta el momento no se ha identificado el gen responsable del grupo de complementación cblH.

Deficiencia combinada de metilmalonilCoA mutasa y de metionina sintasa

Fenotipo clínico

Estos pacientes presentan acidemia metilmalónica con homocistinuria (grupos cblF, cblC, cblD). Los síntomas clínicos más comunes en el período neonatal son anemia megaloblástica y retraso del crecimiento (63). En las formas de presentación tardía son frecuentes los síntomas neurológicos y psiquiátricos. Los pacientes de las formas cblC o cblF, aunque responden bioquímicamente a la administración intramuscular de hidroxicoalamina, suelen desarrollar retraso en el desarrollo. A largo plazo son frecuentes el síndrome hemolítico urémico y la retinopatía pigmentaria progresiva en los pacientes de aparición temprana.

Pruebas diagnósticas

Los metabolitos marcadores son hiperhomocisteinemia e hipometioninemia junto con los encontrados en las acidemias metilmalónicas aisladas. Los estudios de incorporación de [1-¹⁴C] propionato y de 5-[¹⁴C] metiltetrahidrofolato a material precipitable por ácido tricloroacético en fibroblastos crecidos en medio basal y en medio suplementado con hidroxicoalamina se utilizan para confirmar la alteración en la vía del propionato y en la vía de biosíntesis de metionina. Dado que actualmente no se conocen los genes responsables de estos grupos no es posible realizar estudio de mutaciones*. El diagnóstico prenatal se realiza mediante la determinación de los metabolitos marcadores en líquido amniótico: ácido metilmalónico y homocisteína (64).

Se ha descrito leve aciduria metilmalónica con homocistinuria en niños con lactancia materna de madres vegetarianas estrictas o de madres con anemia perniciosa causada por deficiencia de vitamina B12 (65) y en la deficiencia en transcobalamina II (MIM 275350) con niveles normales de vitamina B12 en plasma. (66)

* Durante la preparación de este manuscrito se ha publicado la identificación del gen responsable de la forma cbl C por el grupo de Rosenblatt en *Nature Genetics* **38** (1), 93-100 (2006).

Tratamiento

Es similar a los pacientes con acidemia metilmalónica aislada pero administrando además hidroxicobalamina intramuscular y betafina.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Thompson GN, Walter JH, Bresson JL, Ford GC, Lyonnet SL, Chalmers RA, Saudubray JM, Leonard JV, Halliday D (1990) Sources of propionate in inborn errors of propionate metabolism. *Metabolism* **39**:1133-1137.
- (2) Fenton WA, Gravel RA, Rosenberg LE (2001) Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly W, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, pp 2165-2190.
- (3) DelValle JA, Merinero B, Jimenez A, Garcia MJ, Ugarte M, Omenaca F, Neustadt G, Quero J (1982) Dietary treatment and biochemical studies on a neonatal case of propionyl-CoA carboxylase deficiency. *J Inherit Metab Dis* **5**:121-124.
- (4) Merinero B, DelValle JA, Jimenez A, Garcia MJ, Ugarte M, Solaguren R, Lopez O, Condado I (1981) Late onset type of propionic acidemia: case report and biochemical studies. *J Inherit Metab Dis* **4**:71-72.
- (5) Wolf B, Paulsen EP, Hsia YE (1979) Asymptomatic propionyl CoA carboxylase deficiency in a 13-year-old girl. *J Pediatr* **95**:563-565.
- (6) Ugarte M, Lopez-Lahoya J, Garcia ML, Benavides J, Valdivieso F (1980) Possible explanation for hyperglycinaemia in propionic acidemia and methylmalonic acidemia: propionate and methylmalonate inhibit liver and brain mitochondrial glycine transport. *J Inherit Metab Dis* **2**:93-99.
- (7) Chalmers RA, Roe CR, Stacey TE, Hoppel CL (1984) Urinary excretion of l-carnitine and acylcarnitines by patients with disorders of organic acid metabolism: evidence for secondary insufficiency of l-carnitine. *Pediatr Res* **18**:1325-1328.
- (8) Wendel U, Baumgartner R, van der Meer SB, Spaapen LJ (1991) Accumulation of odd-numbered long-chain fatty acids in fetuses and neonates with inherited disorders of propionate metabolism. *Pediatr Res* **29**:403-405.
- (9) Naylor EW, Chace DH (1999) Automated tandem mass spectrometry for mass newborn screening for disorders in fatty acid, organic acid, and amino acid metabolism. *J Child Neurol* **14 Suppl 1**:S4-8.
- (10) Del Valle JA, Merinero B, Garcia MJ, Ugarte M, Omenaca F, Neustadt G (1980) Leukocyte propionyl-CoA carboxylase deficiency in a patient with ketotic hyperglycinaemia. *J Inherit Metab Dis* **3**:93.

- (11) Perez-Cerda C, Merinero B, Sanz P, Jimenez A, Garcia MJ, Urbon A, Diaz Recasens J, Ramos C, Ayuso C, Ugarte M (1989) Successful first trimester diagnosis in a pregnancy at risk for propionic acidemia. *J Inherit Metab Dis* **12 Suppl 2**:274-276.
- (12) Muro S, Perez-Cerda C, Rodriguez-Pombo P, Perez B, Briones P, Ribes A, Ugarte M (1999) Feasibility of DNA based methods for prenatal diagnosis and carrier detection of propionic acidemia. *J Med Genet* **36**:412-414.
- (13) Perez-Cerda C, Perez B, Merinero B, Desviat LR, Rodriguez-Pombo P, Ugarte M (2004) Prenatal diagnosis of propionic acidemia. *Prenat Diagn* **24**:962-964.
- (14) Miyazaki T, Ohura T, Kobayashi M, Shigematsu Y, Yamaguchi S, Suzuki Y, Hata I, Aoki Y, Yang X, Minjares C, Haruta I, Uto H, Ito Y, Muller U (2001) Fatal propionic acidemia in mice lacking propionyl-CoA carboxylase and its rescue by postnatal, liver-specific supplementation via a transgene. *J Biol Chem* **276**:35995-35999.
- (15) Lucke T, Perez-Cerda C, Baumgartner M, Fowler B, Sander S, Sasse M, Scholl S, Ugarte M, Das AM (2004) Propionic acidemia: Unusual course with late onset and fatal outcome. *Metabolism* **53**:809-810.
- (16) Van Calcar SC, Harding CO, Davidson SR, Barness LA, Wolff JA (1992) Case reports of successful pregnancy in women with maple syrup urine disease and propionic acidemia. *Am J Med Genet* **44**:641-646.
- (17) Campeau E, Desviat LR, Leclerc D, Wu X, Perez B, Ugarte M, Gravel RA (2001) Structure of the PCCA gene and distribution of mutations causing propionic acidemia. *Mol Genet Metab* **74**:238-247.
- (18) Rodriguez-Pombo P, Hoenicka J, Muro S, Perez B, Perez-Cerda C, Richard E, Desviat LR, Ugarte M (1998) Human propionyl-CoA carboxylase beta subunit gene: exon-intron definition and mutation spectrum in Spanish and Latin American propionic acidemia patients. *Am J Hum Genet* **63**:360-369.
- (19) Pérez-Cerdá C, Desviat LR, Perez B, Ugarte M, Rodriguez-Pombo P (2002) Transfection screening for defects in the PCCA and PCCB genes encoding propionyl-CoA carboxylase subunits. *Mol Genet Metab* **75**:276-279.
- (20) Perez-Cerda C, Rodriguez-Pombo P, Ugarte M (1994) Identification of the insertion/deletion mutation in Spanish beta-propionyl-CoA carboxylase-deficient patients. *J Inherit Metab Dis* **17**:661-663.
- (21) Richard E, Desviat LR, Pérez B, Pérez-Cerdá C, Ugarte M (1997) Three novel splice mutations in the PCCA gene causing identical exon skipping in propionic acidemia patients. *Hum Genet* **101**:93-96.
- (22) Hoenicka J, Rodriguez-Pombo P, Perez-Cerda C, Muro S, Richard E, Ugarte M (1998) New frequent mutation in the PCCB gene in Spanish propionic acidemia patients. *Hum Mutat Suppl 1*:S234-236.

- (23) Ugarte M, Perez-Cerda C, Rodriguez-Pombo P, Desviat LR, Perez B, Richard E, Muro S, Campeau E, Ohura T, Gravel RA (1999) Overview of mutations in the PCCA and PCCB genes causing propionic acidemia. *Hum Mutat* **14**:275-282.
- (24) Muro S, Rodriguez-Pombo P, Perez B, Perez-Cerda C, Desviat LR, Sperl W, Skladal D, Sass JO, Ugarte M (1999) Identification of novel mutations in the PCCB gene in European propionic acidemia patients. Mutation in brief no. 253. Online. *Hum Mutat* **14**:89-90.
- (25) Perez B, Desviat LR, Rodriguez-Pombo P, Clavero S, Navarrete R, Perez-Cerda C, Ugarte M (2003) Propionic acidemia: identification of twenty-four novel mutations in Europe and North America. *Mol Genet Metab* **78**:59-67.
- (26) Desviat LR, Perez B, Perez-Cerda C, Rodriguez-Pombo P, Clavero S, Ugarte M (2004) Propionic acidemia: mutation update and functional and structural effects of the variant alleles. *Mol Genet Metab* **83**:28-37.
- (27) Richard E, Desviat LR, Perez B, Perez-Cerda C, Ugarte M (1999) Genetic heterogeneity in propionic acidemia patients with alpha-subunit defects. Identification of five novel mutations, one of them causing instability of the protein. *Biochim Biophys Acta* **1453**:351-358.
- (28) Muro S, Perez B, Desviat LR, Rodriguez-Pombo P, Perez-Cerda C, Clavero S, Ugarte M (2001) Effect of PCCB gene mutations on the heteromeric and homomeric assembly of propionyl-CoA carboxylase. *Mol Genet Metab* **74**:476-483.
- (29) Muro S, Pérez B, Rodríguez-Pombo P, Desviat LR, Pérez-Cerdá C, Ugarte M (2000) Mutations affecting the $\beta - \beta$ homomeric interaction in propionic acidemia: An approach to the determination of the β -propionyl-CoA carboxylase functional domains. *J. Inher. Metab. Dis.* **23**:300-304.
- (30) Chloupkova M, Ravn K, Schwartz M, Kraus JP (2000) Changes in the carboxyl terminus of the beta subunit of human propionyl-CoA carboxylase affect the oligomer assembly and catalysis: expression and characterization of seven patient-derived mutant forms of PCC in Escherichia coli. *Mol Genet Metab* **71**:623-632.
- (31) Chloupkova M, Maclean KN, Alkhateeb A, Kraus JP (2002) Propionic acidemia: analysis of mutant propionyl-CoA carboxylase enzymes expressed in Escherichia coli. *Hum Mutat* **19**:629-640.
- (32) Clavero S, Martinez MA, Perez B, Perez-Cerda C, Ugarte M, Desviat LR (2002) Functional characterization of PCCA mutations causing propionic acidemia. *Biochim Biophys Acta* **1588**:119-125.
- (33) Perez-Cerda C, Clavero S, Perez B, Rodriguez-Pombo P, Desviat LR, Ugarte M (2003) Functional analysis of PCCB mutations causing propionic acidemia based on expression studies in deficient human skin fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* **1638**:43-49.

- (34) Thoden JB, Blanchard CZ, Holden HM, Waldrop GL (2000) Movement of the biotin carboxylase B-domain as a result of ATP binding. *J Biol Chem* **275**:16183-16190.
- (35) Hall PR, Wang YF, Rivera-Hainaj RE, Zheng X, Pustai-Carey M, Carey PR, Yee VC (2003) Transcarboxylase 12S crystal structure: hexamer assembly and substrate binding to a multienzyme core. *Embo J* **22**:2334-2347.
- (36) Rodriguez-Pombo P, Pérez-Cerdá C, Pérez B, Desviat L, Sanchez Pulido L, Ugarte M (2005) Towards a model to explain the intragenic complementation in the heteromultimeric protein propionyl-CoA carboxylase. *Biochim. Biophys. Acta* **1740**, 489-498.
- (37) Pérez-Cerdá C, Merinero B, Martí M, Cabrera J, Peña L, Garcia MJ, Gangoiti J, Sanz P, Rodriguez-Pombo P, Hoenicka J, Richard E, Muro S, Ugarte M (1998) An unusual Late-onset case of propionic acidemia: biochemical investigations, neuroradiological findings and mutational analysis. *Eur J Pediatr* **157**:50-52.
- (38) Perez-Cerda C, Merinero B, Rodriguez-Pombo P, Perez B, Desviat LR, Muro S, Richard E, Garcia MJ, Gangoiti J, Ruiz Sala P, Sanz P, Briones P, Ribes A, Martínez-Pardo M, Campistol J, Perez M, Lama R, Murguía ML, Lema-Garrett T, Verdu A, Ugarte M (2000) Potential relationship between genotype and clinical outcome in propionic acidemia patients. *Eur J Hum Genet* **8**:187-194.
- (39) Clavero S, Perez B, Rincon A, Ugarte M, Desviat LR (2004) Qualitative and quantitative analysis of the effect of splicing mutations in propionic acidemia underlying non-severe phenotypes. *Hum Genet* **115**:239-247.
- (40) Willard HF, Mellman IS, Rosenberg LE (1978) Genetic complementation among inherited deficiencies of methylmalonyl-CoA mutase activity: evidence for a new class of human cobalamin mutant. *Am J Hum Genet* **30**:1-13.
- (41) Suormala T, Baumgartner MR, Coelho D, Zavadakova P, Koich V, Koch HG, Berghauer M, Wraith JE, Burlina A, Sewell A, Herwig J, Fowler B (2004) The cblD defect causes either isolated or combined deficiency of methylcobalamin and adenosylcobalamin synthesis. *J Biol Chem*.
- (42) Rosenblatt DS, Wayne, A.F. 2001 Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism. In Scriver CR, Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D (ed) *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases*. McGraw-Hill, New York, pp 3897-3933.
- (43) Del Valle JA, Merinero, B, Garcia, M.J., Ugarte, M., González, M., Gracia, R., Peralta, A. (1982) Biochemical findings in a patient with neonatal methylmalonic acidemia. *J Inher Metab Dis* **5**:53-54.
- (44) Vázquez López M MBA, Martínez Jiménez A, García Muñoz MJ, Royo Orejas A, Arcas Martínez J, López Martín V, Pascual Castroviejo I (1996) Necrosis bilateral de ganglios basales en la acidemia metilmalónica. *An Esp Pediatr* **44**:273-276.

- (45) Chace DH, DiPerna JC, Kalas TA, Johnson RW, Naylor EW (2001) Rapid diagnosis of methylmalonic and propionic acidemias: quantitative tandem mass spectrometric analysis of propionylcarnitine in filter -paper blood specimens obtained from newborns. *Clin Chem* **47**:2040-2044.
- (46) Roe CR, Struys E, Kok RM, Roe DS, Harris RA, Jakobs C (1998) Methylmalonic semialdehyde dehydrogenase deficiency: psychomotor delay and methylmalonic aciduria without metabolic decompensation. *Mol Genet Metab* **65**:35-43.
- (47) Coker M, de Klerk JB, Poll-The BT, Huijmans JG, Duran M (1996) Plasma total odd-chain fatty acids in the monitoring of disorders of propionate, methylmalonate and biotin metabolism. *J Inherit Metab Dis* **19**:743-751.
- (48) Wilkemeyer MF, Crane AM, Ledley FD (1991) Differential diagnosis of mut and cbl methylmalonic aciduria by DNA-mediated gene transfer in primary fibroblasts. *J Clin Invest* **87**:915-918.
- (49) Sawada T, Ledley FD (1992) Correction of methylmalonyl-CoA mutase deficiency in Mut0 fibroblasts and constitution of gene expression in primary human hepatocytes by retroviral-mediated gene transfer. *Somat Cell Mol Genet* **18**:507-516.
- (50) Peters H, Nefedov M, Sarsero J, Pitt J, Fowler KJ, Gazeas S, Kahler SG, Ioannou PA (2003) A knock-out mouse model for methylmalonic aciduria resulting in neonatal lethality. *J Biol Chem* **278**:52909-52913.
- (51) Ledley FD, Lumetta M, Nguyen PN, Kolhouse JF, Allen RH (1988) Molecular cloning of L-methylmalonyl-CoA mutase: gene transfer and analysis of mut cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:3518-3521.
- (52) Nham SU, Wilkemeyer MF, Ledley FD (1990) Structure of the human methylmalonyl-CoA mutase (MUT) locus. *Genomics* **8**:710-716.
- (53) Thoma NH, Leadlay PF (1996) Homology modeling of human methylmalonyl-CoA mutase: a structural basis for point mutations causing methylmalonic aciduria. *Protein Sci* **5**:1922-1927.
- (54) Acquaviva C, Benoist JF, Pereira S, Callebaut I, Koskas T, Porquet D, Elion J (2005) Molecular basis of methylmalonyl-CoA mutase apoenzyme defect in 40 European patients affected by mut(o) and mut- forms of methylmalonic acidemia: identification of 29 novel mutations in the MUT gene. *Hum Mutat* **25**:167-176.
- (55) Martinez MA, Rincon A, Desviat LR, Merinero B, Ugarte M, Perez B (2005) Genetic analysis of three genes causing isolated methylmalonic acidemia: identification of 21 novel allelic variants. *Mol Genet Metab* **84**:317-325.
- (56) Crane AM, Jansen R, Andrews ER, Ledley FD (1992) Cloning and expression of a mutant methylmalonyl coenzyme A mutase with altered cobalamin affinity that causes mut- methylmalonic aciduria. *J Clin Invest* **89**:385-391.

- (57) Jansen R, Ledley FD (1990) Heterozygous mutations at the mut locus in fibroblasts with mut0 methylmalonic acidemia identified by polymerase-chain-reaction cDNA cloning. *Am J Hum Genet* **47**:808-814.
- (58) Dobson CM, Wai T, Leclerc D, Wilson A, Wu X, Dore C, Hudson T, Rosenblatt DS, Gravel RA (2002) Identification of the gene responsible for the cblA complementation group of vitamin B12-responsive methylmalonic acidemia based on analysis of prokaryotic gene arrangements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:15554-15559.
- (59) Dobson CM, Wai T, Leclerc D, Kadir H, Narang M, Lerner -Ellis JP, Hudson TJ, Rosenblatt DS, Gravel RA (2002) Identification of the gene responsible for the cblB complementation group of vitamin B12-dependent methylmalonic aciduria. *Hum Mol Genet* **11**:3361-3369.
- (60) Korotkova N, Lidstrom ME (2004) MeaB is a component of the methylmalonyl-CoA mutase complex required for protection of the enzyme from inactivation. *J Biol Chem* **279**:13652-13658.
- (61) Lerner-Ellis JP, Dobson CM, Wai T, Watkins D, Tirone JC, Leclerc D, Dore C, Lepage P, Gravel RA, Rosenblatt DS (2004) Mutations in the MMAA gene in patients with the cblA disorder of vitamin B12 metabolism. *Hum Mutat* **24**:509-516.
- (62) Saridakis V, Yakunin A, Xu X, Anandakumar P, Pennycooke M, Gu J, Cheung F, Lew JM, Sanishvili R, Joachimiak A, Arrowsmith CH, Christendat D, Edwards AM (2004) The structural basis for methylmalonic aciduria. The crystal structure of archaeal ATP:cobalamin adenosyltransferase. *J Biol Chem* **279**:23646-23653.
- (63) Urbon Artero A, Aldana Gomez J, Reig Del Moral C, Nieto Conde C, Merinero Cortes B (2002) [Neonatal onset methylmalonic aciduria and homocystinuria: Biochemical and clinical improvement with betaine therapy]. *An Esp Pediatr* **56**:337-341.
- (64) Merinero B, Perez-Cerda C, Garcia MJ, Chadefaux-V ekemans B, Kamoun P, Tonetti C, Zittoun J, Jakobs C, Ugarte M (1998) Reliability of biochemical parameters used in prenatal diagnosis of combined methylmalonic aciduria and homocystinuria. *Prenat Diagn* **18**:947-952.
- (65) Emery ES, Homans AC, Colletti RB (1997) Vitamin B12 deficiency: a cause of abnormal movements in infants. *Pediatrics* **99**:255-256.
- (66) Bibi H, Gelman-Kohan Z, Baumgartner ER, Rosenblatt DS (1999) Transcobalamin II deficiency with methylmalonic aciduria in three sisters. *J Inherit Metab Dis* **22**:765-772.

Fenilcetonuria

BELEN PÉREZ, LOURDES RUIZ DESVIA T, M^a. JOSÉ GARCÍA
Y MAGDALENA UGARTE

RESUMEN

La fenilcetonuria (PKU) es una enfermedad genética humana que se hereda con carácter autosómico recesivo (OMIM 261600), causada por un defecto en el enzima fenilalanina hidroxilasa (PAH) que cataliza la hidroxilación de fenilalanina a tirosina. Defectos en esta proteína provocan hiperfenilalaninemia que, si no se trata durante los primeros días de vida con una dieta restringida en fenilalanina, pueden producir alteraciones neurológicas. Se han descrito más de 460 mutaciones en el gen que codifica para la proteína P AH, siendo el 60% de cambios de aminoácido. Teniendo en cuenta la naturaleza de las mutaciones identificadas en el gen de la P AH mediante el genotipado de los pacientes PKU, la información obtenida de los numerosos estudios funcionales y estructurales de las diferentes variantes alélicas en distintos sistemas de expresión y los datos del fenotipo clínico y bioquímico de los pacientes se ha podido establecer una correcta correlación fenotipo-genotipo. Esta correlación permite, en base al genotipo, predecir el fenotipo clínico y bioquímico, incluso identificar pacientes que no necesitan de tratamiento dietético y en los últimos años además establecer nuevas terapias farmacológicas, como es el tratamiento con el cofactor tetrahidrobiopterina (BH₄). En resumen, esta enfermedad que hace 60 años producía retraso mental, es actualmente diagnosticada bioquímicamente en los primeros días de vida posibilitando un tratamiento eficaz. Ese hecho, junto con el conocimiento de las bases moleculares, el desarrollo de modelos animales y la aplicación de nuevas y prometedoras terapias farmacológicas y enzimáticas han convertido a la fenilcetonuria en una enfermedad paradigmática dentro del conjunto de las enfermedades metabólicas. Y enseña como una investigación biomédica multidisciplinar, aporta conocimientos que benefician a individuos, familias y, en definitiva, a la sociedad.

INTRODUCCIÓN

La fenilcetonuria (PKU: OMIM 261600) es una enfermedad genética humana, que se hereda de forma autosómica recesiva, causada por la deficiencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa (PAH) hepática. La disfunción de esta enzima, limitante en el metabolismo de la fenilalanina, produce hiperfenilalaninemia. Clínicamente se caracteriza por diferentes grados de alteración del desarrollo cognitivo de los pacientes, así como de las funciones resultantes del desequilibrio neuroquímico.

La primera descripción de la enfermedad fue hecha por Asbjörn Fölling en 1934, al estudiar dos niños con retraso mental que excretaban cantidades elevadas de ácido fenilpirúvico en orina, por lo que le dio el nombre de Idiocia Fenilpirúvica o fenilcetonuria (1). En 1935, Penrose confirmó que este desorden se heredaba como un defecto autosómico recesivo (2). Jervis en 1947 postuló que el defecto metabólico de la fenilcetonuria consistía en la imposibilidad de la fenilalanina de oxidarse a tirosina, originando hiperfenilalaninemia (3). En 1953 Jervis demostró la deficiencia de PAH en el hígado de un paciente PKU (4). Más tarde, Bickel inició el tratamiento de sus pacientes usando un hidrolizado especial de proteínas bajo en fenilalanina. La administración de esta dieta no sólo redujo los niveles de fenilalanina en sangre y ácido fenilpirúvico en orina, sino que produjo una mejoría en el desarrollo mental y en el comportamiento de los pacientes tratados(5). Posteriormente, se comprobó que la prevención total del daño neurológico se lograba al iniciar el tratamiento en el período neonatal (6). De acuerdo con estos resultados existía una razón para introducir la búsqueda masiva de PKU en la población general con fines preventivos.

El sistema de hidroxilación de la fenilalanina a tirosina, es una etapa limitante en el catabolismo de este aminoácido, que conduce a la oxidación completa de la fenilalanina a CO_2 y agua. La PAH es una monooxigenasa de función mixta que cataliza la parahidroxilación del aminoácido esencial L-fenilalanina a L-tirosina en presencia de tetrahidrobiopterina (BH_4) como cofactor y oxígeno como cosustrato (Figura 1). La actividad PAH depende de otras dos enzimas para regenerar la tetrahidrobiopterina en su forma reducida, la 4α -carbinolamin-deshidratasa (PCD) y la dihidropteridina reductasa (DHPR). Estas dos enzimas llevan a cabo la regeneración de la BH_4 desde la forma oxidada 4α -carbinolamina (4α -hidroxi-tetrahidrobiopterina), mediante su deshidratación a q- BH_2 y posterior reducción de éste a BH_4 en un proceso dependiente de NAD(P)H. Por otro lado, los niveles de BH_4 hepáticos están regulados a través de la biosíntesis intracelular mediante la actividad acoplada

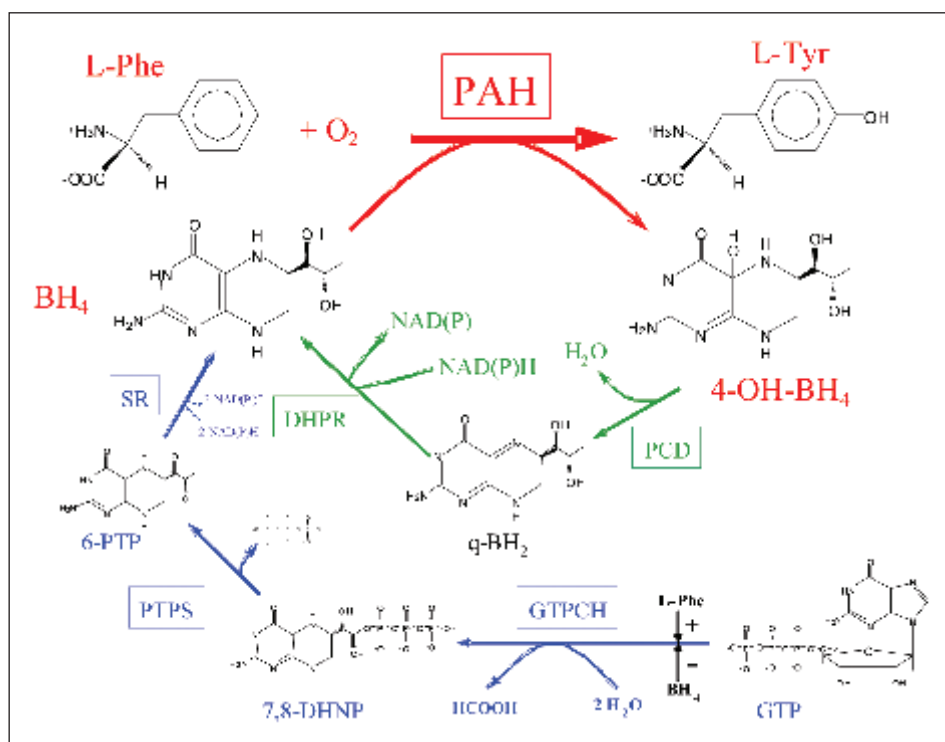


FIGURA 1. Esquema del ciclo catalítico de la fenilalanina hidroxilasa (PAH) en presencia del cofactor natural BH_4 (en rojo), en el que se incluyen las rutas principales de biosíntesis de BH_4 (en azul) y de reducción del cofactor oxidado (en verde). Se indica la regulación ejercida por L-Phe (+) y BH_4 (-) sobre la etapa limitante en la biosíntesis de BH_4 . Las enzimas implicadas en estos procesos se muestran en recuadros. Abreviaturas: BH_4 - (6R)-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina; 4-OH- BH_4 - 4- α -carbinolamin-tetrahidrobiopterina; q- BH_2 - 7,8-dihidrobiopterina quinoinoide; 6-PTP- 6-piruviloil-5,6,7,8-tetrahidropterina; 7,8-DHNP- 7,8-dihidroneopterina-trifosfato; PCPD- 4- α -carbinolamin-tetrahidropterina deshidratasa; DHPR- dihidropteridina reductasa; SR- sepiapterina reductasa; PTPS- 6-piruviloil-5,6,7,8-tetrahidropterina sintasa; GTPCH- GTP ciclohidrolasa I.

de distintas enzimas (Figura 1). La enzima en humanos se expresa preferentemente en hígado, aunque también en riñón, páncreas y cerebro (7).

Aunque la causa más frecuente de la hiperfenilalaninemia son las mutaciones que afectan al locus que codifica para la subunidad de la PAH, han sido descritas también deficiencias en DHPR o en las enzimas implicadas en la biosíntesis y reciclaje del cofactor (8, 9). Las deficiencias en BH_4 son raras y constituyen el 1-3% de los casos de PKU. Los pacientes con esta deficiencia requieren diferente terapia y tienen un pronóstico más grave que las deficiencias

en PAH, por lo tanto, es necesario diferenciar las deficiencias en PAH de los desórdenes en el metabolismo del cofactor BH_4 . Los desórdenes en la biosíntesis de BH_4 son de especial interés, debido a que este cofactor interviene también en las reacciones de hidroxilación de los aminoácidos aromáticos L-triptófano y L-tirosina para producir precursores de los neurotransmisores serotonina y catecolaminas, importantes en el desarrollo cerebral y su funcionamiento.

Los individuos con un defecto en el sistema hidroxilante de la fenilalanina presentan hiperfenilalaninemia con niveles de fenilalanina en sangre superiores a 2 mg/dl (120 μ mol/L), siendo más o menos elevados dependiendo del grado de severidad de la enfermedad. La hiperfenilalaninemia es un término genérico dado a un fenotipo caracterizado por una concentración de fenilalanina plasmática elevada de forma persistente sobre la distribución normal de los valores en plasma. Los valores homeostáticos normales de la fenilalanina en plasma son alrededor de 1 mg/dl (60 μ mol/L). El acumulo de este aminoácido activa metabolismos alternativos, generándose metabolitos derivados de la fenilalanina que en condiciones normales se encuentran en niveles muy bajos. Uno de estos metabolitos es el ácido fenilpirúvico que detectó Fölling y que da el nombre a la enfermedad.

La exposición postnatal prolongada a los metabolitos que se acumulan puede provocar retraso mental. No está claro cual es el mecanismo por el cual la fenilalanina y sus metabolitos producen disfunción cerebral, pero varias evidencias tomadas de estudios *in vitro* e *in vivo* (en ratones), apuntan a las siguientes causas fundamentales: mielinización defectuosa, con hipomielinización y gliosis del sistema nervioso central (10-13), alteración del transporte de los precursores de los neurotransmisores (14) y disminución de la densidad de los receptores de neurotransmisores y, por consiguiente, de la conectividad (15).

DetECCIÓN NEONATAL

La observación de Bickel sobre el efecto que la fenilalanina tenía en los niños fenilcetonúricos y la mejoría que se producía cuando este aminoácido se restringía en la dieta, abrió una puerta en el tratamiento de estos pacientes e hizo crecer el interés por los errores congénitos del metabolismo. Efectivamente, poco después se comprobó que cuanto antes se iniciara el tratamiento mayor era el grado de alivio hasta llegar a la prevención total cuando se iniciaba en el primer mes de vida, antes de la aparición de síntomas neurológicos.

Con este fin, Guthrie y Susi en 1963 desarrollaron un método de detección masiva de la PKU, que permitía la determinación de la concentración de feni-

alanina en muestras de sangre de recién nacidos (16). Desde entonces, más de 40 millones de niños han sido analizados, estableciéndose que la incidencia mundial de esta enfermedad es de uno cada doce mil recién nacidos, pero su distribución en las distintas poblaciones no es uniforme (17). En España la incidencia es 1:10.000, lo que implica que 1 de cada 50 individuos es portador de la enfermedad.

Los programas de detección precoz de esta enfermedad, junto con los de hipotiroidismo congénito, son los más extendidos en los países desarrollados. El primer programa de detección precoz de fenilcetonuria que se organizó en España fue en Granada en 1968. En 1973, se inició en Madrid (CEDEM) un nuevo programa que cubría la zona centro de España (Madrid, Toledo, Ciudad Real, Cuenca, Guadalajara, Segovia y Avila). En la actualidad existen 21 centros de detección precoz repartidos por las distintas autonomías y que cubren toda la población.

Confirmación y Diagnóstico Diferencial

En todos los casos detectados en los programas de detección precoz con valores de fenilalanina en sangre superiores a 2,5 mg/dl (150 μ mol/L), se procede a la confirmación y diagnóstico diferencial de la etiología de la hiperfenilalaninemia (figura 2). Para ello, de acuerdo con el protocolo nacional, se ingresan los niños en el hospital y tras asegurarse de que reciben una ingesta proteica equivalente a 150 mg/Kg./día de fenilalanina, se procede a la toma de muestras (plasma, orina en oscuridad y sangre total) para:

1. Cuantificación de aminoácidos en plasma y orina, por cromatografía de intercambio iónico, para establecer los niveles de fenilalanina y tirosina.
2. Cuantificación de los niveles de fenilcetonas en orina, por cromatografía de gases-espectrometría de masas.
3. Cuantificación de pterinas en orina por HPLC
4. Determinación de la actividad dihidropterina reductasa en eritrocitos.

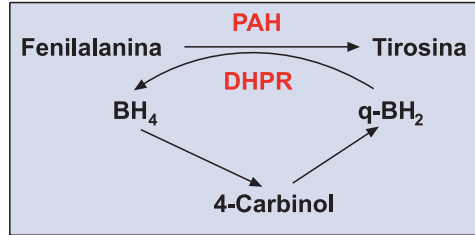
Este estudio permite diferenciar no sólo entre los distintos defectos del metabolismo del cofactor, sino entre éstos y las deficiencias en P^{AH}, puesto que la excreción de pterinas es característica para cada tipo de hiperfenilalaninemia. De este diagnóstico diferencial dependerá el tratamiento a aplicar en cada caso. La excreción de neopterina y biopterina es característica de cada uno de los defectos del cofactor, así como de las deficiencias en P^{AH} y los controles (figura 3).

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE HIPERFENILALANINEMIAS

SCREENING NEONATAL

(prueba del talón)

Sangre impregnada en papel



CONFIRMACION

Después de tres días con una ingesta de 150 mg/kg/día de Fen

Fen plasmática

CCI

Fenilcetonas

CG-EM

Pterinas

HPLC

DHPR

UV

Sobrecarga

CCI

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

FIGURA 2. Diagnóstico diferencial de hiperfenilalaninemias.

DETERMINACION DE PTERINAS EN ORINA POR HPLC

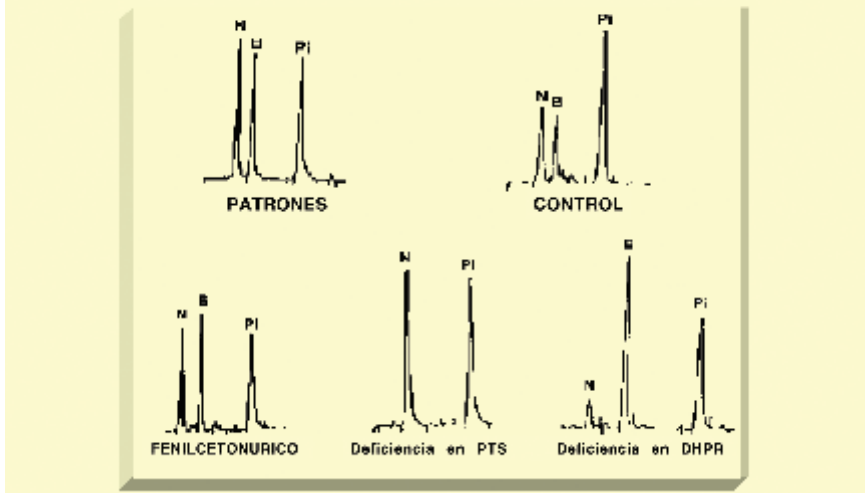


FIGURA 3. Representación de los cromatogramas obtenidos en el análisis de pterinas para controles, fenilcetonuria y deficiencias en el cofactor. N: neopterina, B: biopterina, Pi: patrón interno.

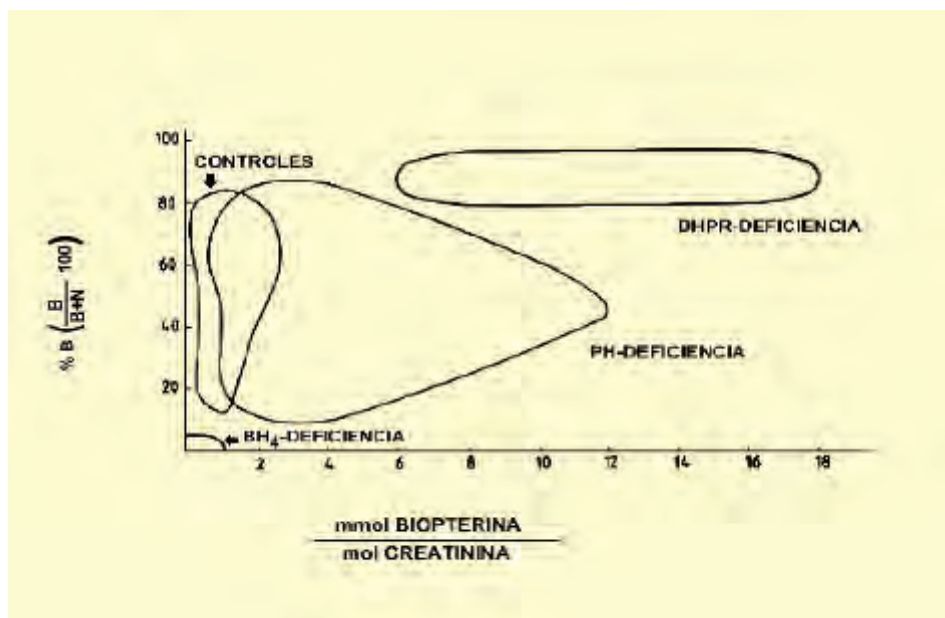


FIGURA 4. Representación del porcentaje de biopterina frente a la excreción de biopterina en mmol/mol de creatinina.

La representación gráfica del porcentaje de biopterina total frente a la concentración de biopterina en mmoles por mol de creatinina permite distinguir con mayor claridad entre los defectos en la síntesis del cofactor y los de su regeneración, así como entre estos y las deficiencias en P AH. (figura 4)

Este estudio diferencial se debe completar con la determinación en eritrocitos de la actividad dihidropterina reductasa (DHPR).

Cuando existe una sospecha de una alteración en el metabolismo de este cofactor, se debe realizar como prueba complementaria una sobrecarga de BH₄. Esta prueba consiste en la administración al paciente de 7,5 mg/Kg. de BH₄, tomando muestras de sangre antes de la sobrecarga, 4 y 8 horas después de la misma.

En la figura 5 se resume el diagnóstico diferencial y las alteraciones bioquímicas que se pueden encontrar según el tipo de deficiencia. Como complemento al estudio diferencial y para confirmar una sospecha de alteración en el metabolismo del cofactor, se debe realizar la determinación de neurotransmisores en líquido cefalorraquídeo.

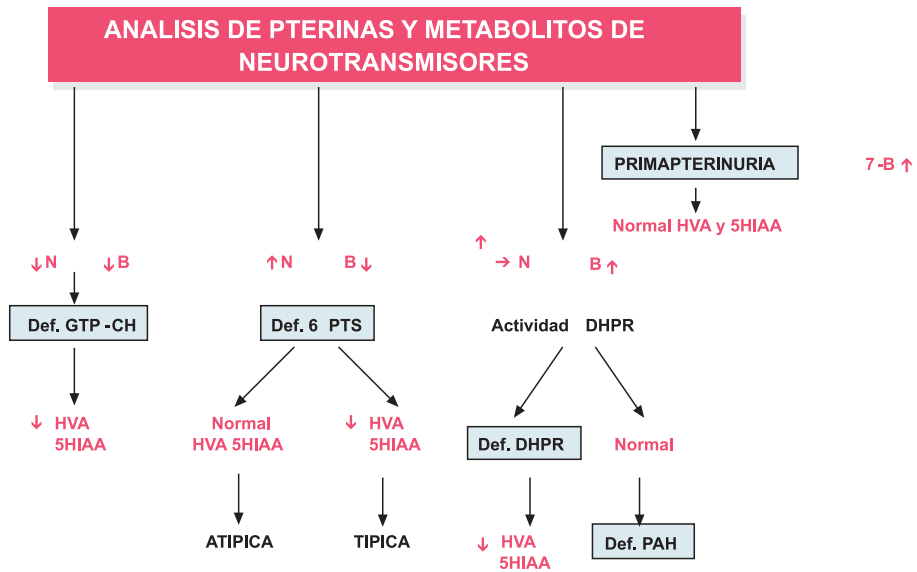


FIGURA 5. Esquema de los metabolitos que presentan las diversas alteraciones en el metabolismo del cofactor y su diferencia con las deficiencias en PAH. N: neopterina, B: bipterina, HVA: ácido homovanílico, 5HIAA: ácido hidr oxindolacético.

Tratamiento y Seguimiento

El tratamiento de la fenilcetonuria, consiste en la administración de una dieta restringida en fenilalanina, para evitar el acúmulo de este aminoácido en los fluidos biológicos y prevenir el daño neurológico que se produce en los pacientes si no reciben tratamiento o lo reciben tarde.

Durante años se pensó que el tratamiento dietético era suficiente hasta los ocho años de vida, edad en la que la mielinización cerebral estaba completa. Pero la publicación de Holtzman y col en 1986 (18) describiendo como sus pacientes que habían abandonado la dieta a esa edad, presentaban pérdida de algunas de sus capacidades cognitivas y la de Smith y col. en 1991 (19), sobre el efecto que una dieta relajada producía en la disminución del cociente de inteligencia en adolescentes fenilcetonúricos, puso de manifiesto la necesidad de mantener la dieta restringida de por vida y controlar los niveles de fenilalanina en sangre periódicamente, para evitar un acúmulo de este aminoácido y sus metabolitos.

En las mujeres con fenilcetonuria hay que prestar una atención especial en el control del tratamiento. Esta definitivamente demostrado que las mujeres con

fenilalanina elevada en sangre ($>360 \mu\text{mol/L}$) durante el embarazo, tienen hijos con retraso mental y malformaciones. Para prevenir este daño fetal, es necesario mantener niveles plasmáticos de fenilalanina $<240 \mu\text{mol/L}$ desde antes de la concepción hasta el final del embarazo.

En el caso de los defectos en el cofactor, al ser la BH_4 imprescindible para la síntesis de dopamina y serotonina, es necesario administrar precursores de neurotransmisores, DOPA y 5-OH-triptófano, para paliar los problemas neurológicos que produce su deficiencia.

Por lo tanto, una vez establecido el diagnóstico diferencial entre las posibles causas de hiperfenilalaninemia, se debe instaurar el tratamiento específico para la deficiencia que presenta el paciente, lo más rápidamente posible y no debería transcurrir más de cuarenta y ocho horas entre el diagnóstico bioquímico y el tratamiento adecuado.

Bases Moleculares de la Fenilcetonuria

El defecto molecular en fenilcetonuria se debe a mutaciones en el gen de la fenilalanina hidroxilasa (PAH). Antes del clonaje del gen ya se conocían las características bioquímicas y enzimáticas del enzima PAH de rata. En 1985 se obtuvo un clon de cDNA de PAH de rata purificado por inmunoprecipitación de polisomas que se utilizó como sonda en la hibridación con una librería de cDNA humano, aislándose así el cDNA de la PAH humana, homólogo al de rata (20).

Este cDNA, que se comprobó que codificaba para la enzima PAH mediante experimentos de expresión, fue utilizado para determinar la posición exacta del locus de la PAH humana en la región q22-q24.1 del cromosoma 12 (21) y para el estudio de la organización estructural de su gen codificante (22). El gen de la PAH humana tiene 13 exones, con intrones de tamaños entre 0,5 kb y 17,8 kb y exones entre 57 pb (exon 9) y 892 pb (exon 13) (23), base de datos genómica (www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000171759). La secuencia genómica que se extiende a lo largo de 171 Kb se reportó recientemente (Konecki, D.S., sin publicar, reportado en www.mcgill.ca/pahdb, base de datos PAH).

La determinación de la estructura genómica del gen PAH posibilitó el análisis mutacional de los pacientes PKU. Actualmente hay descritas 493 variaciones alélicas en el gen PAH, 462 potencialmente causantes de enfermedad y 31 mutaciones silenciosas, sin efecto en la secuencia de aminoácidos de la protei-

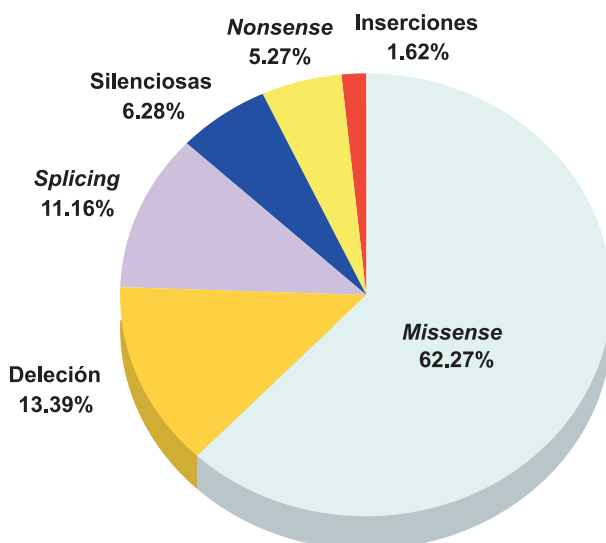


FIGURA 6. Tipos de mutaciones en el gen PAH ($n=493$) descritas en la población mundial y recogidas en la base de datos PAH.

na (polimorfismos). Las variantes patogénicas incluyen mutaciones de cambio de aminoácido (*missense*), que son la mayoría (66,5%), deleciones (14,3%), mutaciones que afectan al procesamiento del mRNA (*splicing*, 12%), mutaciones de parada de traducción (*nonsense*, 5,5%) y pequeñas inserciones (1,7%) (Figura 6). No ha sido detectada ninguna mutación en el promotor basal del gen PAH, aunque sí se han descrito 3 polimorfismos en esta región (24). Todas las variantes alélicas están recogidas en una base de datos pública, mantenida y actualizada por el Prof. C. R. Scriver y colaboradores del McGill Hospital, Montreal, Canada (25)(www.pahdb.mcgill.ca).

Debido al gran número de diferentes mutaciones y a la marcada divergencia en el espectro mutacional entre diferentes poblaciones, actualmente el diagnóstico genético tiende a dirigirse al estudio individualizado de los pacientes mediante técnicas que permitan la localización directa a lo largo del gen de la PAH de las dos mutaciones causantes de la enfermedad antes de proceder a su secuenciación. Aunque existen varios métodos, el que tiene mayor eficiencia de detección, cercana al 100%, y que ha sido aplicado con éxito en la búsqueda de mutaciones causantes de PKU en varias poblaciones incluida la española es la electroforesis en geles con gradiente de desnaturalización (DGGE) (26) (27) (Figura 7).

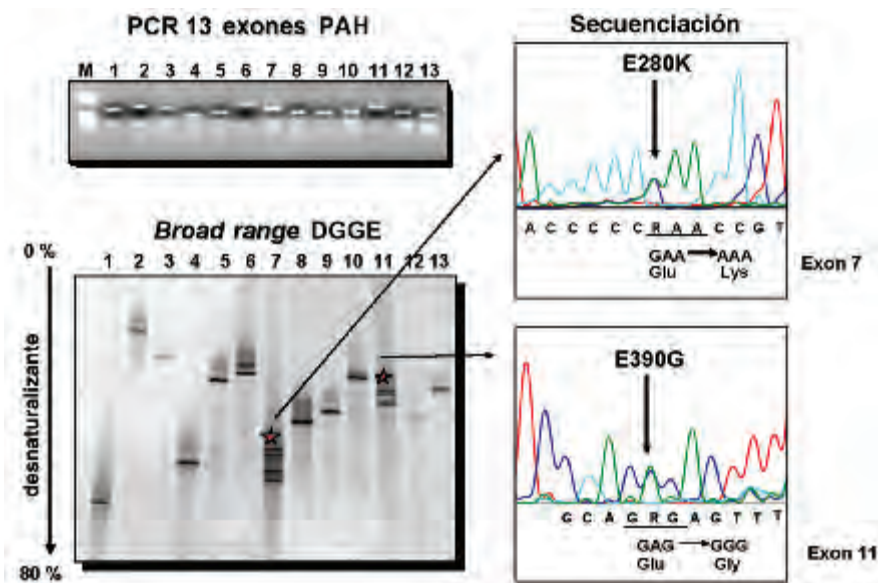


FIGURA 7. Estrategia de identificación de mutaciones en un paciente PKU. Tras la amplificación por PCR de los 13 exones del gen PAH, se someten a una electroforesis en gels con gradiente de agente desnaturalizante (DGGE) y se secuencian aquellos exones donde se localizan las mutaciones, caracterizados por un patrón de varias bandas en el gel DGGE.

La heterogeneidad genética según se desprende de los datos recogidos en la base de datos PAHdb, es muy grande. La mayoría de los pacientes PKU (~75%) son compuestos heterocigotos de dos mutaciones diferentes y no hay ninguna mutación mayoritaria. Globalmente, las mutaciones más frecuentes solamente suponen cada una de ellas menos de un 10% de todos los alelos mutantes. Sin embargo, cuando se analizan distintas poblaciones sí se observan mutaciones predominantes.

La primera población que se analizó fue la del norte de Europa y se describieron dos mutaciones, R408W e IVS12nt1g>a, que suponen un 60% de los alelos PKU en esa región (28, 29). Sin embargo en la población mediterránea la mutación mayoritaria es IVS10nt-1 1g>a (30, 31) y las dos mutaciones prevalentes en el norte de Europa aparecen con frecuencias muy bajas (<1%), lo que confirma la gran diferencia en el espectro mutacional que existe entre ambas poblaciones (32), ya visto para otras enfermedades. En la población latinoamericana se han encontrado mutaciones frecuentes en poblaciones del sur de Europa, en particular de España, como era de esperar dado la relación histórica existente (33-39).

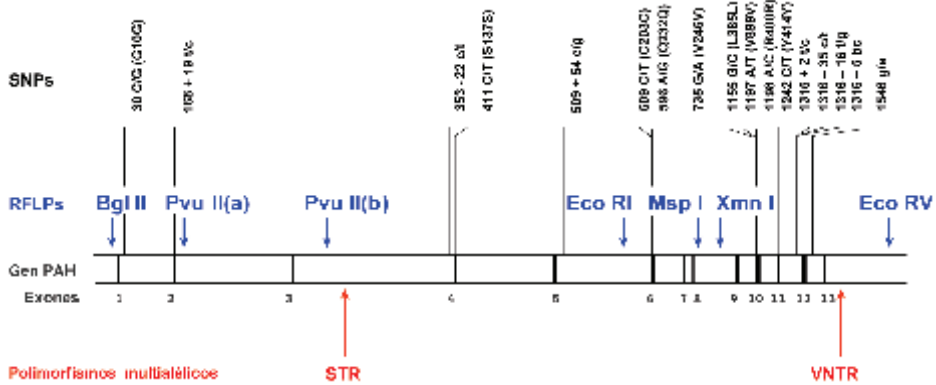


FIGURA 8. Variantes polimórficas caracterizadas en el gen P AH.

Las variantes polimórficas en el gen de la P AH han sido estudiadas en profundidad e incluyen polimorfismos de un solo nucleótido o SNP (*single nucleotide polymorphisms*), polimorfismos dialélicos de tipo RFLP nombrados según la enzima de restricción correspondiente (BglII, PvuIIa, PvuIIb, XmnI, EcoRI, MspI, EcoRV) y polimorfismos multialélicos, que incluyen un minisatélite conteniendo un número variable de repeticiones en tandem de 30 pb (VNTR, *variable number of tandem repeats*) en la región 3' del gen (40), y un microsatélite consistente en segmentos polimórficos cortos de 4pb repetidos en tandem (STR, *short tandem repeat*) en el intrón 3 del gen (41) (Figura 8).

Los alelos RFLPS, STR y VNTR pueden combinarse generando haplotipos, los cuales han sido nombrados con números según su orden de identificación y de los que se conocen al menos 87 (42). Solamente unos pocos haplotipos son prevalentes, la mayoría son poco comunes. Se ha confirmado que la heterogeneidad de haplotipos P AH es mucho mayor en poblaciones caucásicas que en orientales donde predomina el haplotipo 4 (43, 44).

Los haplotipos han resultado ser herramientas poderosas para el análisis genético de la deficiencia de P AH, así como para conocer la epidemiología genética de la enfermedad, para el estudio del origen y evolución de las mutaciones PKU a través del mundo. Mediante el análisis de asociación de mutaciones con haplotipos se ha podido determinar el efecto fundador de muchas mutaciones, las cuales deben su distribución actual a expansiones y efectos migratorios de las diferentes poblaciones.

Como ejemplo, mediante el estudio de haplotipos se ha podido confirmar la hipótesis que la mutación PKU más frecuente en la población mediterránea

(IVS10nt-11g>a) tiene un único efecto fundador en la región este del Mediterráneo (Turquía e Israel). El estudio se realizó en pacientes de Turquía, Israel, Italia y España encontrándose la mutación siempre sobre el haplotipo 6 (basado en los alelos RFLP) asociado a diferentes alelos STR y VNTR, siendo la combinación VNTR7-STR250 la predominante. Este podría ser el gen ancestral, sobre el cual se produjo la mutación y que aparece con un claro gradiente de frecuencia de Este a Oeste del Mediterráneo. La expansión se habría producido hacia Italia y España con la cultura Neolítica y por último hacia países históricamente relacionados como los latinoamericanos en las sucesivas oleadas de migración producidas en los últimos cinco siglos (45).

Otro ejemplo del uso de haplotipos para determinar el origen de mutaciones PKU lo constituye la mutación V388M, la segunda más frecuente en España asociada al haplotipo 1.7 y que se encontró asociada en Latinoamérica a dos haplotipos, 4.3 y 1.7 (36). El origen de la mutación V388M sobre haplotipo 1.7 está en la Península Ibérica lo que en algún caso se pudo también confirmar investigando el origen geográfico de los antecesores de los pacientes latinoamericanos. Sin embargo, la presencia de la misma mutación sobre el haplotipo 4.3 es probablemente debido a un fenómeno de recurrencia, ya que la recombinación genética entre ambos haplotipos para transferir la mutación es altamente improbable y además, la mutación se localiza sobre un dinucleótido CpG altamente susceptible de sufrir mutaciones (46). La presencia de esta mutación sobre el haplotipo 4.3 en Latinoamérica podría deberse a la migración desde Oriente con los primeros pobladores del continente americano a través del estrecho de Bering. Esta hipótesis concuerda con la identificación de un paciente japonés con dicha mutación sobre el haplotipo 4.3 y con las teorías del origen oriental de la población amerindia, sustentadas por datos de frecuencia genética de marcadores de grupos sanguíneos, como los HLA y los datos de polimorfismos del DNA mitocondrial (47).

Estudios funcionales y estructurales. Relación fenotipo genotipo

La posibilidad de predecir la gravedad del fenotipo clínico y bioquímico en los pacientes PKU a partir del genotipo del paciente, es el motor que ha impulsado los estudios funcionales y estructurales de las diferentes variantes alélicas identificadas en los pacientes PKU. Estos estudios son de especial interés en el caso de las mutaciones de cambio de aminoácido ya que en estos casos el efecto de las mismas sobre la proteína P_{4H} es difícil de predecir. Por el contrario, las mutaciones que dan lugar a codones de parada prematuros de la tra-

ducción, deleciones, inserciones o aquellas que alteran el procesamiento del mRNA, produciendo generalmente proteínas truncadas, no requieren en la mayoría de los casos ser expresadas. En cualquier caso, la verificación del efecto que cualquier sustitución produce en la proteína es esencial para predecir la actividad PAH residual de pacientes con un genotipo conocido así como para conocer los mecanismos moleculares responsables de su patogénesis y poder así aplicar nuevas terapias.

De las más de 490 mutaciones descritas hasta el momento, 81 mutaciones han sido expresadas en al menos un sistema de expresión *in vitro* procariota, eucariota o un sistema libre de células. Los resultados de la expresión *in vitro* de las diferentes mutaciones han permitido establecer una base de datos en el consorcio PAH (<http://www.pahdb.mcgill.ca/>) que relaciona los datos de actividad, cantidad de proteína expresada y niveles de mRNA de las distintas mutaciones PKU expresadas. En algunos casos se han realizado ensayos cinéticos y de estabilidad intracelular. Todos estos estudios funcionales se han completado con sofisticados análisis estructurales utilizando diferentes formas truncadas de la PAH cristalizadas (48).

La expresión en bacterias utilizando el sistema pMALc2 ha sido ampliamente utilizada ya que permite la producción de grandes cantidades de proteína, expresada tanto como proteína de fusión como proteína aislada, siendo las propiedades bioquímicas y catalíticas de las proteínas purificadas en este sistema similares a las de la enzima purificada de rata (49). Utilizando este sistema y la coexpresión con las chaperoninas GroES y GroEL se han podido identificar numerosas mutaciones que afectan directamente a la estabilidad de la proteína PAH pudiendo ser modulada su cantidad y por tanto su actividad por el sistema de control celular. Este hecho ha permitido explicar algunas de las inconsistencias fenotipo-genotipo detectadas en fenilcetonuria. Estos estudios en bacterias se han completado con análisis funcionales de las diferentes variantes alélicas en células eucariotas, las más utilizadas las células COS7, siendo probablemente el sistema que mejor refleje la situación que ocurre *in vivo*. Adicionalmente a la expresión en estos dos sistemas, varias mutaciones PKU han sido expresadas en un sistema de transcripción-traducción *in vitro* que permite analizar la biogénesis de las proteínas mediante el seguimiento, a lo largo del tiempo, de una población de proteínas recién sintetizadas.

El uso de estos estudios de expresión ha permitido proponer como un posible mecanismo la inestabilidad de determinadas proteínas mutantes, denominadas mutantes de plegamiento, siendo la causa directa de la disminución de su actividad residual. Este tipo de mutaciones de cambio de aminoácido, localiza-

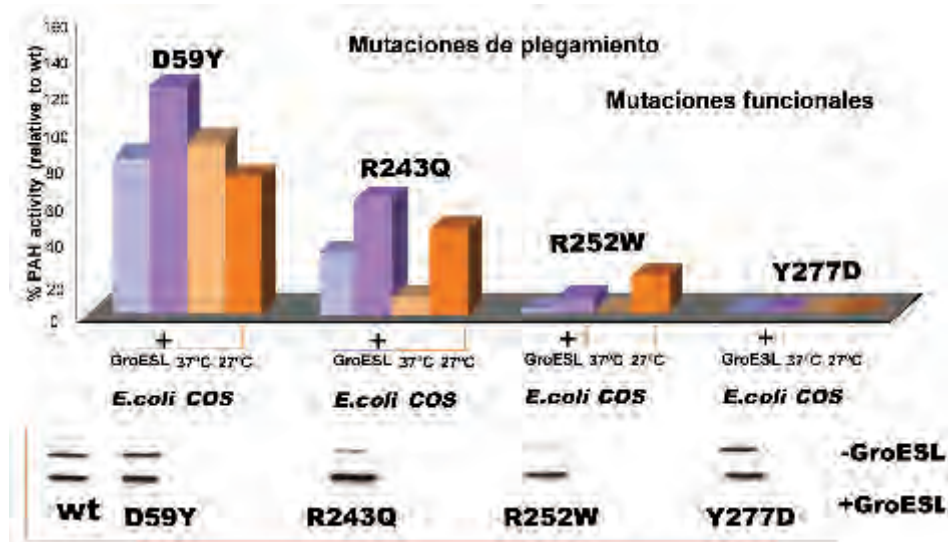


FIGURA 9. En la figura se muestra ejemplos de mutaciones de plegamiento y mutaciones funcionales identificadas mediante los experimentos de expresión realizados en sistemas eucariotas y procariontas. En la parte superior de la figura se muestran los resultados de actividad PAH obtenidos tras la expresión de la proteína normal y las correspondientes proteínas mutantes en *E. coli* con y sin coexpresión con las chaperoninas GroES y GroEL así como en COS7 a dos temperaturas de cultivo celular 37 y 27 °C. En la parte inferior se muestra la cantidad de proteína inmunoreactiva tras la expresión con y sin GroESL.

das en los tres dominios de la proteína PAH y fuera del centro activo, presentaron defectos de oligomerización, niveles disminuidos de proteína inmunorreactiva, vidas medias inferiores a la proteína normal y su actividad pudo ser experimentalmente modulada por chaperoninas y temperaturas de cultivo subfisiológicas. Los mutantes puramente funcionales presentaron actividades residuales nulas, niveles de proteína inmunoreactivas y estado de oligomerización normal (Figura 9) (50, 51).

Uno de los estudios funcionales realizados recientemente ha sido el análisis de 17 variantes alélicas identificadas en pacientes PKU que podrían responder, como se describe en el siguiente apartado de nuevas terapias, al tratamiento con BH₄ (Figura 10). Estos estudios funcionales y estructurales se han desarrollado con el propósito de analizar los mecanismos moleculares responsables de esta respuesta al cofactor BH₄. Aunque todas las mutaciones analizadas presentaron alguna de las propiedades cinéticas alteradas solo cinco de ellas presentaron ligeros defectos en la afinidad (Km) por el cofactor y seis presentaron una estabilización

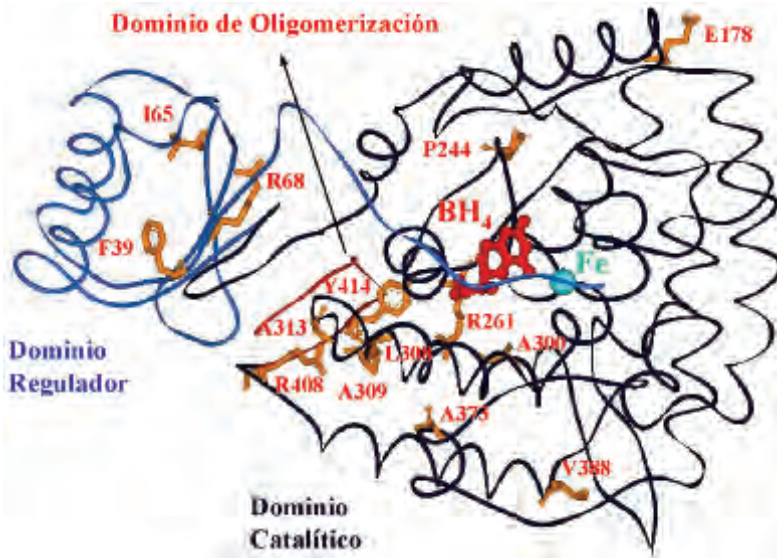


FIGURA 10. Residuos afectados por mutaciones identificadas en pacientes que responden in vivo a la administración del cofactor BH₄ y que han sido analizadas in vitro o con el propósito de conocer las bases moleculares de la respuesta. Las mutaciones identificadas se encuentran localizadas en los tres dominios de la proteína PAH y no solo afectan a los aminoácidos implicados en la unión del BH₄.

conformacional, cuando se expresaron en presencia del cofactor (52) (53). Además se ha podido comprobar que en ratones transgénicos, con una deficiencia completa o parcial de la biosíntesis endógena de BH₄, que la actividad enzimática de la PAH estaba disminuida aunque no se ve afectada la estabilidad o expresión del mRNA de la PAH (54). Todos los estudios funcionales realizados indican que la respuesta a BH₄ es multifactorial, mediada por diferentes mecanismos y cuya contribución podrá ser distinta en cada paciente dependiendo de los heterooligómeros formados por la combinación de las diferentes mutaciones presentes.

Teniendo en cuenta la naturaleza de las mutaciones identificadas en el gen de la PAH así como la información obtenida de los estudios de expresión se han podido clasificar las mutaciones en función del grado de severidad. Estos datos junto con los datos de los fenotipos bioquímicos han permitido establecer una correcta correlación genotipo-fenotipo en fenilcetonuria pudiendo predecirse el fenotipo clínico y bioquímico en base a las variantes alélicas que porta cada individuo y así poder adecuar la terapia de forma más individualizada. Existe una correlación entre la presencia en homocigosis o hemocigosis funcional de mutaciones severas, bien por afectar a la fase de lectura de la PAH (deleciones, in-

serciones, mutaciones de splicing) bien por presentar actividad residual nula *in vitro* (mutaciones funcionales) y las formas más graves de la enfermedad, con los niveles más elevados de fenilalanina en sangre y tolerancias proteicas más bajas. Sin embargo la presencia en homocigosis o hemicigosis funcional de mutaciones con actividad residual parcial *in vitro* (mutaciones estructurales) están asociadas a los fenotipos más leves de la enfermedad. En estos estudios fenotipo-genotipo se han identificado mutaciones marcadoras del fenotipo más benigno de la enfermedad o HP A. El análisis genético de estos pacientes permite distinguir prenatal y neonatalmente los individuos que requieren tratamiento dietético de los que no lo necesitan (55-57).

Nuevas terapias enzimáticas y farmacológicas en pku

En las últimas cuatro décadas los pacientes PKU/HP A han sido tratados con éxito limitando la ingesta de Phe. Este tratamiento sin embargo tiene el inconveniente de tener que mantenerse durante toda la vida del paciente, lo que ha hecho que actualmente se estén investigando tratamientos alternativos que permitan mejorar la calidad de vida de los fenilcetonúricos. Actualmente existen dos nuevos tratamientos muy prometedores, el tratamiento con dosis farmacológicas de cofactor y el reemplazamiento enzimático utilizando bien la enzima de plantas Fenilalanina Amonio Liasa (PAL) o la forma recombinante de la P AH humana.

Desde que en 1999 Kure y col (58) en ensayos clínicos con sobre carga de BH_4 identificaron las llamadas deficiencias en P AH que responden a la administración de BH_4 , el número de pacientes que se pueden beneficiar de este tratamiento ha ido en aumento representando el 60-70% de los pacientes PKU leves o moderados. Los pacientes son detectados en ensayos clínicos que consisten en monitorizar los niveles de Phe en sangre tras la supresión de la dieta y la administración del cofactor. En el caso de los HP A que no están en tratamiento dietético se administra una sobre carga de Phe monitorizando los niveles plasmáticos en días consecutivos con y sin cofactor (59) (60) (61). Aquellos pacientes que presentaron en las pruebas de sobre carga una disminución de su nivel de fenilalanina basal de al menos el 30%, a las 8h tras la administración de BH_4 (Figura 11) se consideran pacientes candidatos a ser tratados a largo plazo con monoterapia con el cofactor o combinada con dieta más relajada, menos restringida en Phe. El análisis genético de los pacientes identificados en las pruebas de sobre carga han revelado que todos estos pacientes son portadores de al menos una mutación con cierta actividad residual en alguno de los sistemas de expresión utilizados. Las posibles mutaciones responsables de la respuesta a BH_4

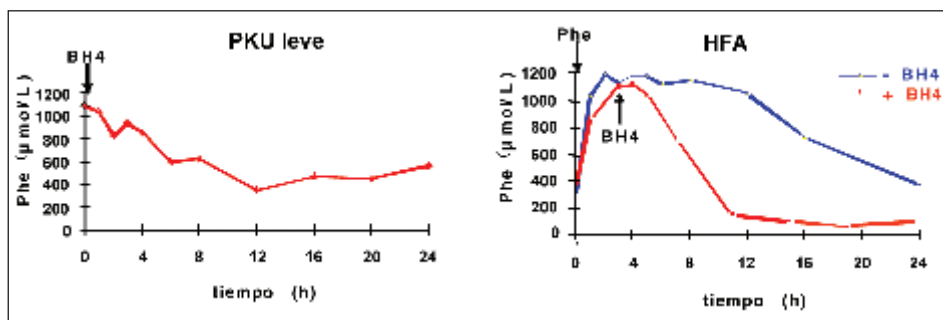


FIGURA 11. Curvas de sobrecargas de BH4 en pacientes leves o moderados o pacientes HP A.

que han sido identificadas en los diferentes ensayos clínicos realizados a nivel mundial están recogidas en la base de datos www.BH4.org.

Otra forma de tratamiento que esta siendo ensayando en ratones transgénicos (pah^{enu}) es el tratamiento oral con un enzima de plantas funcionalmente homóloga a la PAH, la PAL, que es capaz de metabolizar la fenilalanina sin requerimientos de un cofactor lo que facilita su administración. La utilización de esta o de la forma recombinante de la PAH es una terapia prometedoras en especial para las formas más severas de PKU que generalmente no responden a la administración farmacológica de cofactor (62, 63). Finalmente, una forma alternativa que esta en fase de experimentación en los ratones $\text{pah}^{\text{enu}2}$ es la terapia genética de células somáticas. Se están desarrollando vectores virales de transferencia génica que dirijan de forma segura y eficaz a las células hepáticas el gen de la PAH (64).

REFERENCIAS

- (1) Fölling A (1934) Ueber Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillitaet. *Ztschr. Physiol. Chem.* **227**:169-176.
- (2) Penrose LS (1935) Inheritance of phenylpyruvic amentia (Phenylketonuria). *Lancet* **2**:192.
- (3) Jervis GA (1947) Studies on phenylpyruvic oligophrenia: The position of the metabolic error. *J. Biol. Chem.* **169**:651-657.
- (4) Jervis GA (1953) Phenylpyruvic oligophrenia: Deficiency of phenylalanine oxidizing system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **82**:514.

- (5) Bickel H, Gerrad J, Hickmans FM (1953) Influence of Phenylalanine Intake on Phenylketonuria. *Lancet* **2**:313.
- (6) Bickel H (1954) The effects of a Phenylalanine-free and Phenylalanine-poor diet in Phenylpyruvic Oligophrenia. *Exp. Med. Surg.* **12**:114-118.
- (7) Lichter-Konecki U, Hipke CM, Konecki DS (1999) Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues. *Mol. Genet. Metab.* **67**:308-316.
- (8) Kaufman S, Holtzman NA, Milstien S, Butler LJ, Krumholz A (1975) Phenylketonuria due to a deficiency of dihydropteridine reductase. *N. Engl. J. Med.* **293**:785-790.
- (9) Kaufman S, Berlow S, Summer GK, Milstien S, Schulman JD, Orloff S, Spielberg S, Pueschel S (1978) Hyperphenylalaninemia due to a deficiency of bipterin. A variant form of phenylketonuria. *N. Engl. J. Med.* **299**:673-679.
- (10) Valdivieso F, Ugarte M, Maties M, Gimenez C, Mayor F (1977) Free Amino Acids in the Tissues of Rats With Experimentally Induced Phenylketonuria. *Ment. Defic. Res.* **21**:95-102.
- (11) Hommes FA, Eller GA, Taylor EH (1982) Turnover of the Fast Component of Myelin and Myelin Proteins in Experimental Hyperphenylalaninemia. Relevance to Termination of Dietary Treatment. *J. Inher. Metab. Dis.* **5**:21-27.
- (12) Dyer CA, Kendler A, Philibotte T, Gardines P, Cruz J, Levy HL (1996) Evidence for central nervous glial cell plasticity in Phenylketonuria. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**:795-814.
- (13) Reynolds R, Burri R, Herschkowitz N (1993) Retarded development of neurons and oligodendroglia in rat forebrain produced by hyperphenylalaninemia results in permanent deficits in myelin despite long recovery periods. *Exp Neurol* **124**:357-367.
- (14) Aragón MC, Giménez C, Valdivieso F (1982) Inhibition by Phenylalanine of Tyrosine Transport by Synaptosomal Plasma Membrane: Implication in the Pathogenesis of Phenylketonuria. *J. Neurochem.* **39**:1185-1187.
- (15) Hommes FA (1994) Loss of neuro transmitter receptors by hyperphenylalaninemia in the HPH-5 mouse brain. *Acta Paediatr. Suppl.* **407**.
- (16) Guthrie R, Susie A (1963) A Simple Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants. *Pediatrics.* **32**:338-343.
- (17) Scriver CR, Kaufman S (2001) Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS (eds) *The Metabolic and Molecular bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill., pp 1667-1724.
- (18) Holtzman NA, Kronmal RA, van Doorninck W, Azen C, Koch R (1986) Effect of age at loss of dietary control on intellectual performance and behavior of children with phenylketonuria. *N Engl J Med* **314**:593-598.

- (19) Smith I, Beasley MG, Ades AE (1991) Effect on intelligence of relaxing the low phenylalanine diet in phenylketonuria. *Arch Dis Child* **66**:311-316.
- (20) Kwok SC, Ledley FD, DiLella AG, Robson KJ, Woo SL (1985) Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* **24**:556-561.
- (21) Lidsky AS, Law ML, Morse HG, Kao F-T, Rabin M, Ruddle FH, Woo SLC (1985) Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **82**:6221-6225.
- (22) Konecki DS, Wang Y, Trefz FK, Lichter-Konecki U, Woo SLC (1992) Structural Characterization of the 5' Regions of the Human Phenylalanine Hydroxylase Gene. *Biochemistry* **31**:8363-8368.
- (23) DiLella AG, Kwok SCM, Ledley FD, Marvit J, Woo SLC (1986) Molecular Structure and Polymorphic Map of the Human Phenylalanine Hydroxylase Gene. *Biochemistry* **25**:743-749.
- (24) Svensson E, Wang Y, Eisensmith RC, Hagenfeldt L, Woo SLC (1993) Three Polymorphisms but No Disease-Causing Mutations in the Proximal Part of the Promoter of the Phenylalanine Hydroxylase Gene. *Eur. J. Hum. Genet.* **1**:306-313.
- (25) Scriver CR, Hurtubise M, Konecki D, Phommarinh M, Prevost L, Erlandsen H, Stevens R, Waters PJ, Ryan S, McDonald D, Sarkissian C (2003) P AHdb 2003: what a locus-specific knowledgebase can do. *Hum Mutat* **21**:333-344.
- (26) Guldborg P, Güttler F (1994) Broad-range DGGE for single-step mutation scanning of entire gene: application to human phenylalanine hydroxylase gene. *Nucleic Acids Res.* **22**:880-881.
- (27) Pérez B, Desviat LR, Ugarte M (1997) Analysis of the Phenylalanine Hydroxylase gene in the Spanish population: mutation profile and association with intra-genic polymorphic markers. *Am. J. Hum. Genet.* **60**:95-102.
- (28) DiLella AG, Marvit J, Brayton K, Woo SL (1987) An amino-acid substitution involved in phenylketonuria is in linkage disequilibrium with DNA haplotype 2. *Nature* **327**:333-336.
- (29) DiLella AG, Marvit J, Lidsky AS, Güttler F, Woo SL (1986) Tight linkage between a splicing mutation and a specific DNA haplotype in phenylketonuria. *Nature* **322**:799-803.
- (30) Dasovich M, Konecki D, Lichter-Konecki U, Eisensmith RC, Güttler F, Naughton E, Mullins C, Giovannini M, Riva E, Woo SL (1991) Molecular characterization of PKU allele prevalent in southern Europe and Ireland. *Somat Cell Mol Genet* **17**: 303-309.

- (31) Pérez B, Desviat LR, Die M, Ugarte M (1992) Mutation analysis of phenylketonuria in Spain: prevalence of two mediterranean mutations. *Hum Genet* **89**:341-342.
- (32) Eisensmith RC, Okano Y, Dasovich M, Wang T, Guttler F, Lou H, Guldberg P, Lichter-Konecki U, Konecki DS, Svensson E, et al. (1992) Multiple origins for phenylketonuria in Europe. *Am J Hum Genet* **51**:1355-1365.
- (33) Pérez B, Desviat LR, De Lucca M, Cornejo V, Raimann E, Ugarte M (1999) Molecular characterization of phenylalanine hydroxylase deficiency in Chile. *Human Mutation* **243**.
- (34) Pérez B, Desviat LR, De Lucca M, Schmidt B, Loghin-Grosso N, Giuliani R, Feres Pires R, Ugarte M (1996) Mutation Analysis of Phenylketonuria in South Brazil. *Human Mutation* **8**:262-264.
- (35) Pérez B, Desviat LR, Die M, Cornejo V, Chamoles NA, Nicolini H, Ugarte M (1993) Presence of the Mediterranean PKU mutation IVS10 in Latin America. *Hum. Genet.* **2**:1289-1290.
- (36) Desviat LR, Perez B, De Lucca M, Cornejo V, Schmidt B, Ugarte M (1995) Evidence in Latin America of Recurrence of V388M, a Phenylketonuria Mutation with High in vitro residual activity. *Am J Hum Genet* **57**:337-342.
- (37) Desviat LR, Perez B, Ugarte M (1993) Phenylketonuria in Spain: RFLP haplotypes and linked mutations. *Hum Genet* **92**:254-258.
- (38) De Lucca M, B. P, Desviat LR, Ugarte M (1998) Molecular basis of phenylketonuria in Venezuela: presence of two novel null mutations. *Human Mutation* **11**:354-359.
- (39) Desviat LR, B. P, Gutierrez E, Sánchez A, Barrios B, Ugarte M (2001) Molecular basis of phenylketonuria in Cuba. *Human Mutation* **440**.
- (40) Goltsov AA, Eisensmith RC, Konecki DS, Lichter-Konecki U, Woo SLC (1992) Associations between Mutations and a VNTR in the Human Phenylalanine Hydroxylase Gene. *Am. J. Hum. Genet.* **51**:627-636.
- (41) Goltsov AA, Eisensmith RC, Naughton ER, Jin L, Chakraborty R, Woo SL (1993) A single polymorphic STR system in the human phenylalanine hydroxylase gene permits rapid prenatal diagnosis and carrier screening for phenylketonuria. *Hum. Mol. Genet.* **2**:577-581.
- (42) Eisensmith RC, Woo SLC (1992) Updated Listing of Haplotypes at the Human Phenylalanine Hydroxylase (PAH) Locus. *Am. J. Hum. Genet.* **51**:1445-1448.
- (43) Daiger SP, Lidsky AS, Chakraborty R, Koch R, Guttler F, Woo SLC (1986) Polymorphic DNA haplotypes at the phenylalanine hydroxylase locus in prenatal diagnosis of phenylketonuria. *Lancet* **1**:229-232.

- (44) Daiger SP, Reed L, Huang SS, Zeng YT, Wang T, Lo WH, Okano Y, Hase Y, Fukuda Y, Oura T, et al. (1989) Polymorphic DNA haplotypes at the phenylalanine hydroxylase (PAH) locus in Asian families with phenylketonuria (PKU). *Am J Hum Genet* **45**:319-324.
- (45) Calí F, Dianzani I, Desviat LR, B. P , Ugarte M, Ozguc M, Seyrantepe V, Shiloh Y, Giannattasio S, Carducci C, Bosco P , De Leo G, Piazza A, Romano V (1997) The STR252 - IVS10nt546 - VNTR7 phenylalanine hydroxylase minihaplotype in five Mediterranean samples. *Hum Genet* **100**:350-355.
- (46) Cooper DN, Youssoufian H (1988) The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum. Genet.* **78**:151-155.
- (47) Szathmary EJ (1993) mtDNA and the peopling of the Americas. *Am J Hum Genet* **53**:793-799.
- (48) Erlandsen H, Fusetti F , Martinez A, Hough E, Flatmark T, Stevens RC (1997) Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria. *Nat. Struct. Biol.* **4**:995-1000.
- (49) Martínez A, Knappskog PM, Olafsdottir S, Døskeland AP, Eiken H. G., Svebak R. M., Bozzini M, Apold J, Flatmark T (1995) Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. *Biochem. J.* **306**:589-597.
- (50) Gamez A, Perez B, Ugarte M, Desviat LR (2000) Expression analysis of phenylketonuria mutations: effect on folding and stability of the phenylalanine hydroxylase protein. *J Biol Chem* **275**:29737-29742.
- (51) Pey AL, Desviat LR, Gamez A, Ugarte M, Perez B (2003) Phenylketonuria: Genotype-phenotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations in PAH. *Hum Mutat* **21**:370-378.
- (52) Erlandsen H, Pey AL, Gamez A, Perez B, Desviat LR, Aguado C, Koch R, Surendran S, Tyring S, Matalon R, Scriver CR, Ugarte M, Martinez A, Stevens RC (2004) Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:16903-16908.
- (53) Pey AL, Perez B, Desviat LR, Martinez MA, Aguado C, Erlandsen H, Gamez A, Stevens RC, Thorolfsson M, Ugarte M, Martinez A (2004) Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations. *Hum Mutat* **24**:388-399.
- (54) Thony B, Ding Z, Martinez A (2004) Tetrahydrobiopterin protects phenylalanine hydroxylase activity in vivo: implications for tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia. *FEBS Lett* **577**: 507-511.

- (55) Waters PJ (2003) How PAH gene mutations cause hyper-phenylalaninemia and why mechanism matters: insights from in vitro expression. *Hum Mutat* **21**: 357-369.
- (56) Desviat LR, Perez B, Gamez A, Sanchez A, Garcia MJ, Martinez-Pardo M, Marchante C, Boveda D, Baldellou A, Arena J, Sanjurjo P, Fernandez A, Cabello ML, Ugarte M (1999) Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain: molecular survey by regions. *Eur J Hum Genet* **7**:386-392.
- (57) Desviat LR, B. P, Garcia MJ, Martínez-Pardo M, Baldellou A, Arena J, Sanjurjo P, Campistol J, Couce ML, Fernández A, Cardesa J, Ugarte M (1997) Relationship between mutation genotype and biochemical phenotype in a heterogeneous Spanish phenylketonuria population. *Eur. J. Hum. Genet.* **5**: 196-202.
- (58) Kure S, Hou DC, Ohura T, Iwamoto H, Suzuki S, Sugiyama N, Sakamoto O, Fujii K, Matsubara Y, Narisawa K (1999) Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr* **135**: 375-378.
- (59) Desviat LR, Perez B, Belanger-Quintana A, Castro M, Aguado C, Sanchez A, Garcia MJ, Martinez-Pardo M, Ugarte M (2004) Tetrahydrobiopterin responsiveness: results of the BH4 loading test in 31 Spanish PKU patients and correlation with their genotype. *Mol Genet Metab* **83**: 157-162.
- (60) Blau N, Erlandsen H (2004) The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab* **82**: 101-111.
- (61) Muntau AC, Roschinger W, Habich M, Demmelmair H, Hofmann B, Sommerhoff CP, Roscher AA (2002) Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N Engl J Med* **347**: 2122-2132.
- (62) Kim W, Erlandsen H, Surendran S, Stevens RC, Gamez A, Michols-Matalon K, Tyring SK, Matalon R (2004) Trends in enzyme therapy for phenylketonuria. *Mol Ther* **10**:220-224.
- (63) Gamez A, Wang L, Straub M, Patch MG, Stevens RC (2004) Toward PKU enzyme replacement therapy: PEGylation with activity retention for three forms of recombinant phenylalanine hydroxylase. *Mol Ther* **9**:124-129.
- (64) Ding Z, Harding Co, Thony B (2004) State-of-the-art 2003 on PKU gene therapy. *Mol Genet Metab* **81**: 3-8.

Patología molecular de los sistemas de señalización beta-adrenérgicos

ANTONIO S. TUTOR, PETRONILA PENELA
Y FEDERICO MAYOR MENÉNDEZ

Las catecolaminas adrenalina y noradrenalina controlan múltiples procesos biológicos a través de distintos subtipos de receptores de membrana, fundamentalmente alfa y beta-adrenérgicos, pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Así, por ejemplo, los receptores beta estimulan la glucogenolisis y gluconeogénesis en el hígado y músculo esquelético, la lipólisis en el tejido adiposo, la relajación del músculo liso en los bronquios o el ritmo y fuerza de la contracción cardíaca. Por otra parte, los receptores alfa modulan la contracción del músculo liso o la agregación plaquetaria y ambos tipos de receptores participan en múltiples procesos en el sistema nervioso.

Una característica general de los GPCRs es que muestran complejos mecanismos de regulación tanto de su expresión como de su funcionalidad y localización subcelular, modulando su capacidad de respuesta. La regulación de estos receptores es esencial en la integración de señales a nivel celular y en procesos de plasticidad y desensibilización. Así, los GPCRs pueden ser fosforilados y modulados por quinasas activadas por segundos mensajeros (como la quinasa dependiente de AMPc, y la proteína quinasa C), proceso denominado desensibilización heteróloga, que permite que la estimulación de un determinado receptor atenúe la respuesta mediada por otro distinto. Por contraposición, la desensibilización homóloga se define como la atenuación de la respuesta de un receptor a sucesivas estimulaciones de su propio ligando. En este proceso, la ocupación de GPCRs promueve la fosforilación del receptor estimulado por las quinasas de receptores acoplados a proteínas G o GRKs y el posterior reclutamiento al receptor fosforilado de las proteínas desacoplantes β -arrestinas, responsables finales del desacoplamiento del receptor de las proteínas G.

Muchas situaciones patológicas derivan de un funcionamiento alterado (excesivo o disminuido) de estos receptores, y múltiples fármacos actúan modu-

lando sus cascadas de señalización a diferentes niveles. En este trabajo nos centraremos en las funciones y la patología molecular de los sistemas de señalización beta-adrenérgicos, y en especial, en su relación con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

1. RECEPTORES BETA ADRENÉRGICOS EN EL CORAZÓN

En la actualidad se conocen múltiples subtipos de receptores adrenérgicos. En 1966, Ahlquist fue el primero en diferenciar farmacológicamente los receptores alfa y beta adrenérgicos (1). El corazón contiene un bajo número de receptores α -adrenérgicos, siendo la relación entre α y β de aproximadamente 1 a 10 en el miocardio humano.

La señalización de los receptores beta adrenérgicos (β AR) constituye el principal mecanismo por el cual el corazón regula rápidamente la contractilidad en respuesta a la liberación de neurotransmisores (norepinefrina) y hormonas (epinefrina) (2, 3). Los receptores β_1 , β_2 y β_3 son codificados por distintos genes localizados en los cromosomas 10q24-26, 5q31-32 y 8p11-12, respectivamente. Los receptores β_1 y β_2 exhiben una homología del 49%, presentando sus mayores diferencias en el extremo N-terminal y en el 3^{er} bucle citoplasmático, mientras que el β_3 muestra una homología del 50 y 45% con los otros dos receptores, respectivamente. Existen importantes diferencias entre el receptor β_3 AR y el resto de miembros de la familia (4). El gen del β_3 posee intrones, mientras que β_1 y β_2 no. Además, en lo que se refiere a mecanismos de regulación, el β_3 AR no presenta sitios de fosforilación por PKA y GRKs en su extremo carboxilo terminal. La presencia del β_3 AR en el corazón humano se mantiene como materia de debate así como su posible papel funcional en la fisiología del corazón (5). Su expresión, sin embargo, es mayoritaria en los tejidos adiposos blanco y marrón, donde principalmente regula tras su estimulación por noradrenalina lipólisis y termogénesis (6-8). La estimulación de este receptor provoca un aumento en los niveles de AMP cíclico, provocando la activación de la triglicérido lipasa sensible a hormonas, la cual es responsable de la degradación de los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos libres (9). El descenso en la expresión de receptores β_3 -adrenérgicos en el tejido adiposo puede contribuir al desarrollo de obesidad y resistencia a insulina observadas en modelos animales (10, 11), mientras que el tratamiento con agonistas específicos de este subtipo de receptor puede reducir la obesidad genética o inducida por la dieta (11, 12) y tener además efectos anti-diabéticos (13).

La gran similitud estructural y funcional del β_1 AR y β_2 AR es paradigmática con respecto a otras familias de GPCRs en las que dos o más subtipos res-

ponden al mismo ligando y se acoplan a un mismo efector. Sin embargo, estos dos receptores no son redundantes mostrando diferentes afinidades por sus ligandos (14) y distintas capacidades de señalización en el corazón. Así, aunque ambos receptores pueden acoplarse a $G_{\alpha s}$ y estimular las adenilil ciclasas, no inducen la misma producción de AMPc. La generación de este segundo mensajero promovida por el receptor β_1 AR es más potente y sostenida. Diversos mecanismos promueven este hecho diferencial. Por un lado, se ha descrito que el β_2 AR presenta un acoplamiento secuencial a $G_{\alpha s}$ y $G_{\alpha i}$ (15). La capacidad de interacción con $G_{\alpha i}$ será consecuencia de la fosforilación por PKA del receptor. Este cambio de acoplamiento del receptor β_2 limita la producción de AMPc, al potenciarse una vía de inhibición de la adenilato ciclasa, al mismo tiempo que promueve la estimulación de vías de señalización diferentes, como la activación de MAPK y de la vía de supervivencia PI3K/ Akt a través de la liberación de subunidades $G\beta\gamma$ (16).

En marcada contraposición, el receptor β_1 AR sólo se acopla a $G_{\alpha s}$ en miocitos, promoviendo un fuerte aumento de AMPc. Los parámetros de contractilidad y producción de AMPc en miocitos procedentes de ratones deficientes para el β_1 AR o el β_2 AR confirman estas observaciones (17). Esta diferente capacidad de señalización explica asimismo el hecho de que la estimulación del β_2 AR se asocie al inicio de respuestas antiapoptóticas o de supervivencia en miocitos, mientras que la estimulación del β_1 AR no. Por otro lado, la producción de AMPc por el receptor β_1 y β_2 no se distribuye en la célula de igual manera. Los β_2 AR se hallan en el miocito confinados en los microdominios de caveolas de la membrana plasmática (18, 19), mientras que el β_1 AR se distribuye homogéneamente por la membrana. Esto implica que el AMPc producido en respuesta al β_2 AR no estaría disponible para modular determinados efectores.

Asimismo, se ha descrito el reclutamiento de fosfodiesterasas de AMPc al complejo del receptor β_2 AR por las proteínas adaptadoras β -arrestinas (20), así como la activación de la fosfodiesterasa PDE3B por PI3K, la cual se recluta al receptor por su interacción con GRK2 (21). Estos mecanismos, que no han sido confirmados para el β_1 AR, contribuirían a limitar la producción de AMPc.

Finalmente, su distribución en el corazón es muy diferente. El β_1 AR es el subtipo más abundante, llegando a constituir el 75-80% (60 a 70 en el atrio y 70 a 80% en los ventrículos) del total de receptores beta adrenérgicos. Coherentemente con la prevalente expresión del β_1 AR en el corazón, la delección del gen de este receptor genera graves consecuencias fisiopatológicas frente a la aparente inocuidad de la deficiencia del β_2 AR. La mayoría de los ratones β_1 AR^{-/-} muere en fases prenatales, y aquellos que sobreviven son incapaces de pro-

ducir las respuestas cronotrópicas e inotrópicas observadas en el ratón salvaje en respuesta al tratamiento con agonistas beta adrenérgicos como el isoproterenol (17, 22). Estos resultados confirman el papel central de este receptor como mediador de los efectos cronotrópicos e inotrópicos tras la estimulación con catecolaminas (23). Por el contrario, estudios en el ratón deficiente del gen β_2AR han permitido concluir que la estimulación beta adrenérgica de los efectos cronotrópico e inotrópicos no está mediada por este receptor (24), mientras que sí participa en la relajación cardiovascular y en el ritmo metabólico, junto con los restantes subtipos de receptores beta adrenérgicos (25).

2. ASPECTOS MOLECULARES DE LA CONTRACTILIDAD CARDIACA

La actividad cardiaca está controlada por el sistema nervioso autónomo (sistemas nerviosos simpático y parasimpático) y el sistema renina-angiotensina, que actúan mediante la activación de receptores acoplados a proteínas G, tales como los α y β -adrenérgicos, muscarínicos, angiotensina II o endotelina, que desempeñan un papel central en la regulación de la contractilidad cardiaca, la resistencia vascular, en el desarrollo del sistema cardiovascular o en el crecimiento y remodelación de los diversos tipos celulares cardiovasculares (26, 27).

De todos los receptores acoplados a proteínas G, los adrenérgicos y muscarínicos son particularmente importantes en el corazón, debido a su función en la regulación de la contractilidad cardiaca y la homeostasis del sistema cardiovascular. Los receptores adrenérgicos se han estudiado en profundidad y son diana de numerosos fármacos, como pueden ser los α y β bloqueantes que se utilizan en el tratamiento de la hipertensión y enfermedades miocárdicas (28).

El inicio de la sístole se asocia con el aumento de la concentración del ión Ca^{2+} en el citosol. En cada onda de despolarización ingresan pequeñas concentraciones de Ca^{2+} del medio extracelular a través de canales de calcio dependientes de voltaje (canales tipo L), que activan la liberación del Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. Cada canal de calcio del sarcolema controla a un grupo de canales de liberación de calcio del retículo sarcoplásmico (RS) (ver Figura 1). Los canales de liberación de calcio del retículo sarcoplásmico son parte de una compleja estructura proteica llamada receptor de rianodina (29). Los miocitos son células muy especializadas en las que se disponen miles de unidades de contracción o sarcómeros perfectamente ordenados. Cada sarcómero está formado por haces paralelos de filamentos gruesos y finos parcialmente interdigitados.

Los filamentos finos están constituidos por moléculas de actina, troponina y tropomiosina, mientras que los gruesos lo están por miosina (30).

Los iones Ca^{2+} liberados se unen a moléculas de troponina C provocando un cambio conformacional en el complejo troponina-tropomiosina que favorece la interacción actina-miosina. La formación de este nuevo complejo promueve la liberación del ADP y Pi presentes en la cabeza de miosina en condiciones de reposo. Esto conlleva una liberación de energía libre, que se traduce en un cambio conformacional de la cabeza de miosina que genera un arrastre mecánico del filamento de actina hacia el centro del sarcómero y por tanto la contracción. La nueva disposición espacial de la cabeza de miosina permite la entrada de ATP y la disociación de la actina. La energía generada por la hidrólisis rápida del ATP se almacena, parte en la cabeza de miosina que adopta la conformación de reposo inicial, y parte se gasta en la recaptura del Ca^{2+} hacia el retículo sarcoplásmico, mediante la acción de la bomba $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPasa}$ o SERCA.

La estimulación de los receptores β -adrenérgicos modula la actividad de diversas moléculas implicadas en la regulación del Ca^{2+} (31), y por tanto de la contracción, a través de la producción del segundo mensajero AMPc y la activación de la quinasa PKA (Figura 1). Así, PKA fosforila a los canales de Ca^{2+} tipo L aumentando sus cinéticas de apertura (32). También se ha postulado un papel directo de asociación de las subunidades $G_{\alpha s}$ al canal con efectos similares. PKA también puede modificar por fosforilación a la proteína fosfolamban (33), que actúa como un inhibidor de SERCA, causando su disociación de la bomba de Ca^{2+} y aumentando su función. PKA asimismo fosforila y activa a la proteína inhibidora I-1 (34) que bloquea la acción de la proteína fosfatasa 1, garantizando así la estabilización de los productos fosforilados por PKA. Finalmente, el $\beta_1\text{AR}$ modula algunos componentes reguladores del receptor de rianodina como la junctina (35). Asimismo, diferentes moléculas de los miofilamentos son objeto de modulación por PKA, como la troponina I (36), cuya fosforilación reduce la afinidad de la troponina C por calcio. En resumen, el conjunto de estas modulaciones por los receptores beta adrenérgicos tiene como resultado modificar la magnitud y duración de la liberación de calcio (efectos inotrópicos) según las necesidades del organismo.

La actividad α y β adrenérgica afecta también a otros aspectos de la contracción cardiaca. La repolarización del potencial de acción cardiaco es llevada a cabo por diferentes corrientes de potasio. Se distinguen dos componentes en la corriente rectificadora «retrasada» de potasio, componente rápido (I_{kr}) y componente lento (I_{ks}). El componente rápido es único por su capacidad para modificar la velocidad de repolarización del potencial de membrana al final de cada

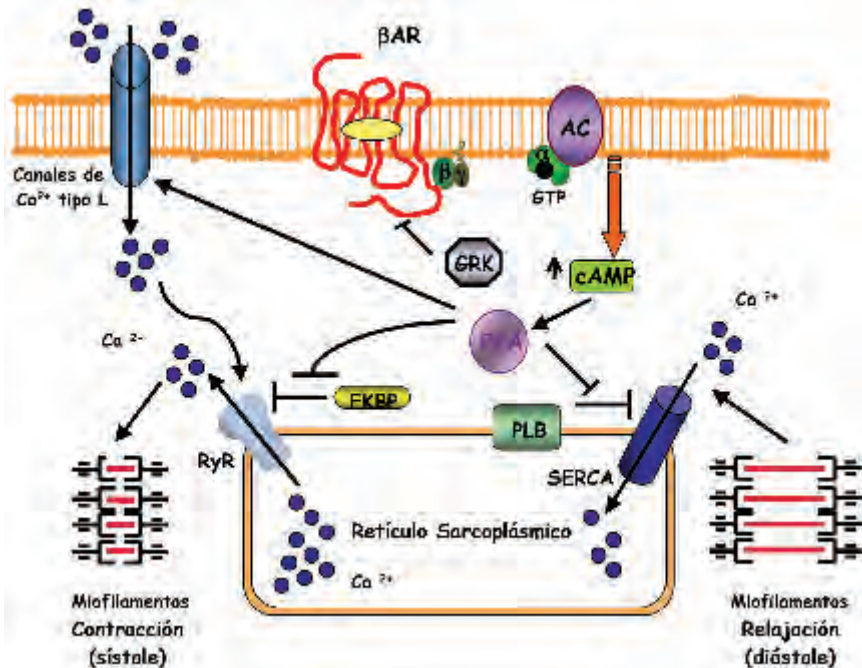


FIGURA 1. **Regulación beta adrenergica del ritmo cardiaco.** La contracción del corazón se desencadena con la entrada de Ca^{2+} en la célula inducida por depolarización de la membrana a través de canales de calcio tipo L dependientes de voltaje. Este aumento inicial del Ca^{2+} intracelular promueve la movilización del Ca^{2+} almacenado en el retículo sarcoplásmico, a través de los receptores de rianodina, lo cual aumenta sustancialmente la concentración de calcio citoplásmico y permite estimular la contracción de los miofilamentos. La estimulación beta-adrenergica produce un aumento de los niveles intracelulares de AMPc, causando la activación de la proteína quinasa A, que potencia la actividad de canales de calcio tipo L. Asimismo, PKA promueve la disociación de la proteína FKBP del complejo de receptores de rianodina y su activación. Por otra parte, PKA también es capaz de fosforilar a la proteína fosfolamban, impidiendo de este modo su asociación a la bomba Ca^{2+} -ATPasa SERCA y la inhibición de ésta. La mayor actividad de SERCA permite la acumulación de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico favoreciendo la relajación del músculo cardíaco.

potencial de acción, y por tanto es crítico en la regulación del latido del corazón. La estimulación adrenergica, además de incrementar los parámetros inotrópicos y cronotrópicos del corazón, aumenta la duración de la repolarización del potencial de acción cardiaco. En este sentido, se ha descrito que la subunidad formadora de poro de estos canales de potasio, conocida como HERG, exhibe una modulación compleja por fosforilación por PKA y por unión directa de AMPc, cuyo resultado neto parece ser una reducción de la corriente dependiente de estos canales (37).

Por último, el sistema parasimpático, a través de la acetil colina, contrarresta las acciones del sistema adrenérgico. El receptor M_2 muscarínico es el principal subtipo expresado en el corazón. La activación de estos receptores provoca la activación de la proteína G_i , que inhibe a la adenilato ciclasa, con lo que disminuyen las concentraciones de AMPc. Esta disminución provoca el cierre de los canales de Ca^{2+} y la apertura de los canales de K^+ produciendo una rápida hiperpolarización.

3. POLIMORFISMOS DE LOS RECEPTORES β ADRENÉRGICOS

Una posibilidad muy interesante es que cambios en la expresión o en las propiedades funcionales de los receptores beta adrenérgicos, como consecuencia de un cambio polimórfico en un único nucleótido, puedan tener consecuencias fenotípicas, al alterar su función cardiovascular o metabólica. Datos recientes indican que los polimorfismos pueden contribuir a la fisiopatología de diferentes enfermedades, como la hipertensión, la insuficiencia cardiaca, asma u obesidad.

3.1. Polimorfismos del receptor beta 1 adrenérgico

El gen del receptor beta 1 adrenérgico humano exhibe una gran diversidad, presentando 18 polimorfismos, 17 de ellos dentro del exón codificante del receptor, de los cuales 7 provocan la sustitución de un aminoácido. Consecuentemente, se ha propuesto la existencia de 11 diferentes genotipos (38). En la actualidad, las investigaciones se han centrado en determinar las consecuencias funcionales de 2 polimorfismos concretos: uno localizado en el dominio amino terminal del receptor, G49S, que puede dar lugar a la presencia de una serina o una glicina, y el otro próximo al dominio carboxilo terminal, R389G (donde se sustituye una citosina por una guanina en el nucleótido 1165) que resulta en una sustitución no conservativa de una arginina por una glicina (39, 40). La frecuencia de la variante Gly 389 es de un 27% en individuos blancos y de un 42% en individuos de raza negra, mientras que la incidencia de la variante Gly 49 es de aproximadamente un 14% en los dos grupos étnicos.

El estudio de estas variantes polimórficas puede ser relevante desde un punto de vista farmacológico, ya que esta variabilidad genética puede explicar por qué un fármaco dado actúa de forma diferente, tanto cualitativa como cuantitativamente, en diferentes individuos (41).

Estudios realizados en células CHW han definido a la variante Arg389 como un genotipo de «ganancia de función», ya que se induce un mayor aumento en los niveles de AMPc tanto en estado basal como en respuesta a isoproterenol, debido a un mejor acoplamiento a la proteína G α_s en comparación con la variante Gly389 (Mason y cols 1999). Resultados semejantes fueron obtenidos por Sandilans y colaboradores en atrio miocárdico humano, observando una mayor respuesta inotrópica y niveles de AMPc (42). En el caso del polimorfismo G49S, existe discrepancia entre diferentes trabajos. Rathz y colaboradores (2002) llegaron a la conclusión de que las dos variantes poseen similares propiedades de unión a agonistas y antagonistas, así como similar estimulación de la actividad adenilato ciclasa y susceptibilidad a la internalización por agonista cuando transfectaban dichas variantes en células HEK293 y CHW. Por otro lado, Levin y cols (2002), en células HEK293 que sobreexpresaban las variantes del receptor en un grado 10 veces superior con respecto al trabajo de Rathz y cols, encontraron que la variante Gly49 presenta una mayor afinidad por agonista, un aumento en la actividad adenilato ciclasa y mayor susceptibilidad a la desensibilización por agonista. Ambos trabajos coinciden, sin embargo, en que la variante Gly49 presenta mayor susceptibilidad de regulación a la baja («down-regulation») inducida por agonista.

La variante β_1 AR Arg 389 en asociación con un polimorfismo del receptor alfa-adrenérgico α_2c AR (α_2c Del 322-325), que presenta menor funcionalidad, aumenta el riesgo de insuficiencia cardiaca en individuos de raza negra (43). Asimismo, la variante polimórfica Gly 389 se ha relacionado con una mayor propensión a producir hipertensión (44), y la forma Arg 389 presentaría una mayor predisposición a responder al tratamiento con beta bloqueantes (45, 46). Recientemente, se ha demostrado que animales transgénicos que sobreexpresan la forma polimórfica Arg389 del β_1 AR (comparada con la Gly389) presentan una potenciación de la contractilidad cardiaca y ritmo cardiaco tanto en condiciones basales como estimuladas (47). Con el tiempo, sin embargo, el ratón Arg389 desarrolla una falta de contractilidad que desencadena insuficiencia cardiaca, como consecuencia de profundas alteraciones en la señalización de la adenilato ciclasa y el Ca^{2+} . Es interesante señalar que el ratón Arg389 de edad avanzada también presenta un aumento en la sensibilidad al tratamiento con beta bloqueantes, manifestada por una mayor reducción en el ritmo cardiaco y disminución de la contractilidad.

Por el contrario, diferentes estudios sugieren un papel cardioprotector para el alelo Gly 49 del β_1 AR. Así, este polimorfismo se asocia a un menor riesgo de insuficiencia cardiaca en pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática o MDI (48).

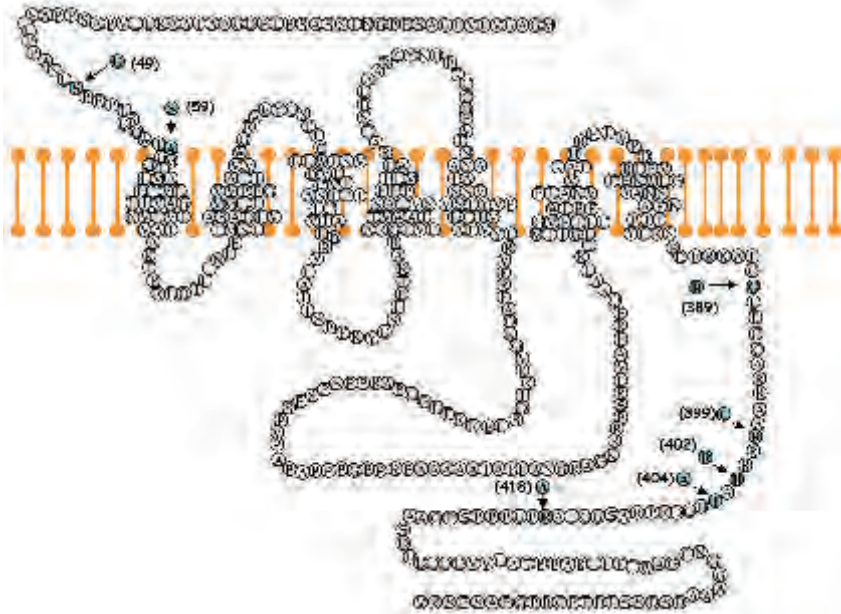


FIGURA 2. Polimorfismos del receptor beta 1 adrenérgico. El gen del receptor beta 1 adrenérgico humano exhibe una gran diversidad, presentando 18 polimorfismos de un nucleótido individual, 17 de ellos dentro del exón codificante del receptor, de los cuales 7 provocan la sustitución de un aminoácido, que se indican en el diagrama.

Por último, se han descrito repercusiones funcionales no cardiovasculares asociadas a estos polimorfismos. Así, existe un aumento en la probabilidad de padecer la enfermedad de Alzheimer con el polimorfismo Gly389R β_1 AR en combinación con el polimorfismo encontrado en la subunidad G β_3 de proteínas G heterotriméricas (C825T). La presencia simultánea de ambas variantes promueve notables cambios en la señalización, aumentando los niveles de AMPc, señalización a MAPK y producción de la proteína precursora del péptido beta-amiloide (49).

3.2. Polimorfismos del receptor beta 2 adrenérgico

La región codificante del gen del receptor beta 2 adrenérgico presenta 9 sustituciones de nucleótido individuales, de las que sólo cuatro (Arg16Gly, Gln27Glu, Val34Met, y Thr164Ile) provocan cambio de aminoácido y parecen ser funcionalmente relevantes. Se ha demostrado que esas sustituciones poseen efectos funcionales tanto in vitro como in vivo (50), salvo el poco común polimorfismo Val34Met (51, 52).

Las consecuencias fenotípicas causadas por los polimorfismos en las posiciones 16,27 y 164 se analizaron mediante su expresión en tipos celulares como COS-7 y CHW. Se ha determinado que ni la capacidad de unión del ligando ni la actividad adenilato ciclasa se encuentran alterados en los polimorfismos que provocan el cambio de aminoácido en la posición 16 (Arg→Gly) o en la posición 27 (Gln→Glu) (53). Sin embargo, la forma Gly16 presenta una mayor regulación a la baja en respuesta a agonista (51, 52), mientras que la forma Gln27Glu parece conferir al receptor una mayor resistencia a este proceso. De hecho, el receptor Arg16/Glu27 parece ser completamente resistente. Por otra parte, la presencia de un residuo aminoácido de isoleucina en la posición 164 provoca una fuerte disminución en la capacidad del receptor de unirse tanto a isoproterenol como a adrenalina y noradrenalina (54).

Agonistas específicos del receptor beta 2 adrenérgico son empleados de forma habitual como fármacos broncodilatadores en el tratamiento del asma. Numerosos grupos de investigación han intentado buscar una relación directa entre las distintas variantes polimórficas y el diagnóstico del asma, severidad de la enfermedad y respuesta a agonista beta 2 selectivos. La mayoría de estos estudios no ha podido correlacionar una mayor propensión a padecer asma con las distintas variantes polimórficas del receptor (55). Sin embargo, pueden estar implicados en la severidad y progresión de la enfermedad. Así, distintos estudios parecen sugerir que el alelo Gly16 puede estar asociado a una mayor severidad del asma (56, 57).

3.3. Polimorfismos del receptor beta 3 adrenérgico

Sólo se ha identificado un polimorfismo de nucleótido individual en la secuencia codificante del receptor beta 3 adrenérgico. Este se localiza en el codón 64 y puede dar lugar a la sustitución de un triptófano por una arginina. Se ha descrito que individuos homocigotos para Arg64 presentan obesidad abdominal y resistencia a insulina, aumento en la capacidad de ganar peso y una disminución en la edad de aparición de diabetes tipo 2, así como un menor ritmo metabólico (58-60).

4. PATOLOGÍAS CARDIOVASCULARES ASOCIADAS A DISFUNCIONES EN EL SISTEMA β -ADRENÉRGICO

Las enfermedades cardiovasculares abarcan un grupo muy heterogéneo de patologías. Común a todas ellas es la reducción progresiva de la funcionalidad del corazón, que puede finalmente desencadenar una insuficiencia cardíaca.

En la insuficiencia cardiaca el daño inicial sobre el corazón activa al sistema nervioso simpático y al sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. Estos mecanismos endógenos que aumentan la contractilidad y que son inicialmente beneficiosos, contribuyen sin embargo a empeorar la hemodinámica cardiaca al establecerse de modo crónico en un contexto de disfunción cardiaca permanente. Esto, a su vez, origina mayor actividad neurohumoral y las alteraciones neurohumorales y hemodinámicas se refuerzan entre sí, formando un círculo vicioso. La mayor demanda de bombeo del corazón en éstas situaciones de disfunción desencadena la hipertrofia del miocardio. Esta es una respuesta inicialmente adaptativa del corazón, caracterizada por un aumento del tamaño celular de los miocitos, incremento de organización sarcomérica y re-expresión de genes fetales (factor natriurético del atrio, α -actina y la cadena pesada de la β -miosina, entre otros). A pesar de que puede ser inicialmente beneficioso, el mantenimiento crónico de este fenotipo lleva a descompensación y contribuye al desarrollo de cardiomiopatía dilatada e insuficiencia cardiaca (61). Las alteraciones en la señalización de receptores β y α -adrenérgicos, y de otros receptores como angiotensina II o endotelina I parecen ser fundamentales en el origen y desarrollo de diferentes cardiopatías (62, 63). Por ello, estos receptores y los sistemas de transducción implicados constituyen la diana de múltiples fármacos utilizados en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva, la angina de pecho, o la hipertensión.

La insuficiencia cardiaca representa la expresión final de diversas afecciones (64). Existen varias características que definen este estadio, como la mayor estimulación adrenérgica producida por el aumento de catecolaminas circulantes, lo que a su vez promueve la desensibilización de los receptores adrenérgicos y una disminución selectiva en el número de receptores β_1 AR, tanto a nivel de proteína como de ARNm. Por el contrario, los niveles de β_2 AR no se encuentran alterados, aunque su señalización está muy atenuada (65). La regulación a la baja de β_1 AR parece ser una característica común a todas las cardiomiopatías que provocan disfunción sistólica. Por otro lado, cambios en la expresión de proteínas reguladoras de estos receptores contribuyen a reducir su capacidad de señalización. Así, la expresión de las quinasas reguladoras GRK2 y de GRK5 se encuentra aumentada en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva y con miocardiopatía dilatada, respectivamente. El aumento/alteración en los niveles de proteínas G α_i contribuyen también a atenuar la actividad de las adenilato ciclasas. Asimismo, se ha observado un aumento en la actividad de PKA y en los niveles de funcionalidad de PKC α , que contribuirían a reducir la efectividad de la señalización adrenérgica debido a la fosforilación del receptor y la desensibilización heteróloga (3, 63, 66, 67).

Todo este conjunto de alteraciones conduce a una fuerte falta de respuesta de los receptores beta adrenérgicos, y sugeriría la idoneidad de utilizar estrategias que aumentaran la señalización de estos receptores como medida terapéutica. Paradójicamente, el tratamiento con agonistas beta-adrenérgicos intensifica la sintomatología y acelera la progresión de distintas miopatías hacia la insuficiencia cardíaca, mientras que los antagonistas beta sí tienen capacidad para revertir las disfunciones observadas y mejorar el estado clínico de los pacientes. La acción de los antagonistas beta se centraría en reducir la población de receptores que son objeto de desensibilización, y aliviaría así la necesidad de activar estos procesos, cuya cronicidad sí incide directamente en la progresión de la enfermedad (68-71).

Estas observaciones ponen de manifiesto también que la continua activación del receptor β_1 AR puede tener consecuencias negativas en la fisiología del corazón. En efecto, distintos estudios en ratones transgénicos que expresan el β_1 AR humano en atrio y ventrículos bajo control del promotor de la cadena pesada de la α -miosina, confirman esta idea. Los estudios realizados en dos estirpes de ratones, que expresaban 5 ó 15 veces el nivel del receptor del ratón salvaje, indicaban que los animales transgénicos exhibían un aumento de la sensibilidad a catecolaminas y una mayor contractilidad, incluso en condiciones basales, acorde a la mayor actividad constitutiva del receptor asociada a su sobreexpresión. Sin embargo, estos ratones desarrollan a las 16 semanas insuficiencia cardíaca progresiva en una manera muy similar a la observada en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva: el corazón se encuentra estructuralmente alterado, con signos de hipertrofia y fibrosis. Estas observaciones confirman la toxicidad de la sobreestimulación de los receptores β_1 AR y su relación con alteraciones en la regulación del calcio (72). En efecto, la sobreexpresión del β_1 AR en estos animales afecta a la funcionalidad del receptor de rianodina, modificando la expresión de la proteína juncional (35). Es importante señalar las diferencias que se han encontrado entre estos ratones y los transgénicos que sobreexpresan niveles del β_2 AR entre 60 y 100 veces más que el ratón salvaje (73, 74). Estos últimos presentan un fenotipo de aumento en la función cardíaca sin deterioro en el corazón, aumentando la actividad de las adenilato ciclasas y contractilidad de forma independiente de la estimulación con agonista. Sólo cuando el receptor se sobreexpresa unas 200 veces más se produce una hipertrofia cardíaca asociada a la edad del ratón. La benignidad de la sobreexpresión del β_2 AR parece asociada a su diferente capacidad de señalización, que como ya hemos mencionado, permite, además de promover contractilidad, estimular vías de supervivencia.

4.1. Cardiomiopatía Isquémica

Esta patología se caracteriza por la presencia de zonas necróticas y fibróticas, como consecuencia de oclusiones valvulares y/o infarto de miocardio o angina de pecho. Estas situaciones provocan una masiva muerte celular o apoptosis de diversos tipos celulares cardiovasculares y desencadenan como respuesta un remodelaje celular caracterizado por la proliferación de fibroblastos, desarrollo de procesos inflamatorios e hipertrofia de los miocitos restantes. Se ha descrito que la estimulación de receptores β_1 -adrenérgicos promueve apoptosis en cardiomiocitos (16). Curiosamente, la estimulación de β_2 AR parece provocar el efecto contrario, promoviendo la supervivencia de células cardiacas por estimulación de la vía de las fosfatidilinositol 3'-quinasas (PI3K) y Akt (75). Los posibles mecanismos responsables de la apoptosis promovida por el β_1 AR incluyen la activación de la proteína calcineurina, debido al aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, dependiente de la activación de PKA. La calcineurina es una serina-treonina fosfatasa que es capaz de desfosforilar a la proteína Bad, siendo ésta a su vez capaz de unirse a Bcl-XL y por tanto de promover la apoptosis.

4.2. Miocardiopatía dilatada idiopática (MDI)

La miocardiopatía dilatada puede ser considerada como un síndrome clínico y fisiopatológico caracterizado por la dilatación progresiva del ventrículo izquierdo o ambos ventrículos, y una alterada contractilidad del miocardio, que exhibe atrofia e hipertrofia. Atendiendo a la definición de la Organización Mundial de la Salud, sólo podrían incluirse en el término de miocardiopatía dilatada aquellos casos de causa desconocida (miocardiopatía dilatada idiopática o primaria), aplicándose el término de «enfermedad específica del músculo cardíaco» a los casos de miocardiopatía dilatada secundarios a multitud de entidades patológicas (miocardiopatía viral, chagásica, genética, tóxica, familiar, inflamatoria, alcohólica, hipertensiva e isquémica).

Se han descrito diferentes alteraciones en el sistema β -adrenérgico en estas patologías: una reducción del 60-70% en el número de receptores β_1 -adrenérgicos, sin cambios en la densidad de receptores β_2 y una disminución en la capacidad de respuesta de ambos subtipos de receptores, indicando la presencia de una fuerte desensibilización del receptor β_2 AR (76). Estas alteraciones son responsables en gran medida de la mala prognosis de pacientes afectados con MDI, ya que el tratamiento con β -bloqueantes revierte parcialmente los proce-

sos de internalización del receptor, atenúa su grado de desensibilización y mejora la función contráctil del corazón.

Cabe destacar que una gran proporción de la población afectada con miocardiopatía dilatada presentan auto-anticuerpos contra antígenos cardiacos (77, 78), incluyendo componentes contráctiles, a la ATPasa del retículo sarcoplásmico, receptores M_2 muscarínicos y receptores β_1 -adrenérgicos. Estos últimos auto-anticuerpos se detectan en los primeros estadios de la enfermedad, disminuyendo a medida que esta progresa, lo que sugiere un fuerte componente autoinmune en la etiología de la enfermedad. En concreto, la incidencia de auto-anticuerpos β_1 es especialmente elevada en pacientes con cardiomiopatía dilatada frente a otras afecciones cardiacas tales como la cardiomiopatía hipertrófica, isquemia cardiaca o hipertensión, y de incidencia similar a la de la enfermedad de Chagas (79), que tiene un indiscutible origen autoinmune. Esta incidencia de auto-anticuerpos anti- β_1 AR varía entre el 30 y 95% en pacientes con miocardiopatía dilatada y de 0% a 16% en sujetos sanos, según el estudio examinado y la técnica empleada para el análisis (80-84).

Se ha identificado que los auto-anticuerpos anti β_1 AR se encuentra dirigidos contra los dominios amino terminal y segundo bucle extracelular del receptor, pero que sólo estos últimos son capaces de promover efectos cronotrópicos en miocitos de rata, que son bloqueados por la acción de beta bloqueantes específicos del β_1 AR, como el metoprolol y el bisoprolol. El mecanismo de acción de los auto-anticuerpos no es del todo equivalente al de los ligandos endógenos, ya que mientras éstos promueven la regulación a la baja de receptores y su desensibilización, se piensa que los auto-anticuerpos no (82, 85).

Diferentes estudios han demostrado la interacción directa entre estos auto-anticuerpos y el β_1 AR, mediante el uso de diversas técnicas, como inmunoprecipitación (86, 87), inmunofluorescencia (88, 89), o disminución en la unión de radioligando (86, 90). La producción de AMPc también se incrementa tras la estimulación con estos auto-anticuerpos de miocitos (91), preparaciones de membrana cardiaca de ratones (90) y células CHW que sobreexpresan el receptor β_1 AR (89), así como promueven aumentos en los picos de calcio y en el acortamiento celular (92).

Se han aportado distintas pruebas que confirman la naturaleza etiopatológica de estos auto-anticuerpos. Así, se ha observado que ratones inmunizados con péptidos sintéticos correspondientes al 2.º bucle extracelular del β_1 AR humano presentan cambios morfológicos en el corazón similares a aquellos encontrados en pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática (93), así como aumento en los

niveles de proteína de G α y de GRK5 (94). Liu y colaboradores han demostrado en dos modelos de insuficiencia cardiaca y miocardiopatía que el daño miocárdico por si mismo, es capaz de provocar una reacción autoinmune que da como resultado la producción de auto-anticuerpos anti receptores cardiacos en ausencia de otros factores (95). También existen numerosos trabajos en los que el proceso de inmuoadsorción de inmunoglobulinas anti- β_1 AR produce mejoras hemodinámicas en los pacientes con miocardiopatía dilatada (85, 91, 96, 97).

Será esencial conocer mejor las señales que desencadenan estos auto-anticuerpos β_1 AR y su posible contribución al desencadenamiento o progresión de la enfermedad. En este sentido, nuestro laboratorio ha descrito recientemente la capacidad de este auto-anticuerpos de estimular fuertemente cascadas de quinasas mitogénicas en cardiomiocitos, lo que puede cooperar a procesos hipertróficos y apoptóticos.

4.3. Tratamientos actuales contra la insuficiencia cardiaca

Cuando los beta bloqueantes fueron introducidos en la práctica clínica hace más de 30 años, su uso en insuficiencia cardiaca fue contraindicado. Sin embargo, la experiencia ha demostrado que agentes inotrópicos positivos y vasodilatadores (agentes que directa o indirectamente activan vías neurohormonales) inducen una mejora hemodinámica a corto plazo, pero presentan efectos a largo plazo que pueden acelerar la historia natural de la insuficiencia cardiaca. Por el contrario, los fármacos beta bloqueantes previenen o revierten muchos de los cambios estructurales y funcionales que se desarrollan durante la progresión de la insuficiencia cardiaca, prolongando la vida.

Cuatro clases de terapias farmacológicas han demostrado una reducción en la mortalidad en pacientes con fallo cardiaco; inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), antagonistas adrenérgicos, agonistas de aldosterona, y, al menos en ausencia de inhibidores de ACE, bloqueantes del receptor de angiotensina. Los beneficios de estos agentes son acumulativos y casi todos los pacientes deben recibir al menos tres agentes y posiblemente los cuatro (68, 71, 98).

Los mecanismos por los cuales los beta bloqueantes son beneficiosos son desconocidos (69, 98, 99). La reducción en el ritmo cardiaco, el aumento del flujo sistólico coronario (efecto anti-isquémico), la reducción de la presión sanguínea, la prevención de las arritmias y la inhibición de acciones metabólicas directas del miocardio parecen todas ellas estar implicadas en la acción de los beta bloqueantes.

El estudio en profundidad de la señalización y la regulación de estos receptores, tanto bajo condiciones normales como patológicas será pues esencial para entender mejor su papel en las diversas enfermedades cardiovasculares, y permitir así el desarrollo de nuevas estrategias preventivas, diagnósticas y terapéuticas.

REFERENCIAS

- (1) Ahlquist RP (1966) The adrenergic receptor. *J Pharm Sci* **55**, 359-367.
- (2) Krasnikov TL y Gabrusenko SA (2000) [Beta-adrenergic receptors of the normal heart and in heart failure] . *Usp Fiziol Nauk* **31**, 35-50.
- (3) Zheng M, Han QD y Xiao RP (2004) Distinct beta-adrenergic receptor subtype signaling in the heart and their pathophysiological relevance . *Sheng Li Xue Bao* **56**, 1-15.
- (4) Skeberdis VA (2004) Structure and function of beta3-adrenergic receptors. *Medicina (Kaunas)* **40**, 407-413.
- (5) Brodde OE, Bruck H, Leineweber K y Seyfarth T (2001) Presence, distribution and physiological function of adrenergic and muscarinic receptor subtypes in the human heart. *Basic Res Cardiol* **96**, 528-538.
- (6) Arch JR, Ainsworth AT, Ellis RD, Piercy V, Thody VE, Thurlby PL, Wilson C, Wilson S y Young P (1984) Treatment of obesity with thermogenic beta-adrenoceptor agonists: studies on BRL 26830A in rodents. *Int J Obes* **8 Suppl 1**, 1-11.
- (7) Wilson C, Wilson S, Piercy V, Sennitt MV y Arch JR (1984) The rat lipolytic beta-adrenoceptor: studies using novel beta-adrenoceptor agonists . *Eur J Pharmacol* **100**, 309-319.
- (8) Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C y Strosberg AD (1989) Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* **245**, 1118-1121.
- (9) Strosberg AD (1997) Structure and function of the beta 3-adrenergic receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**, 421-450.
- (10) Collins S, Daniel KW, Rohlfes EM, Ramkumar V, Taylor IL y Gettys TW (1994) Impaired expression and functional activity of the beta 3- and beta 1-adrenergic receptors in adipose tissue of congenitally obese (C57BL/6J ob/ob) mice. *Mol Endocrinol* **8**, 518-527.
- (11) Charon C, Krief S, Diot-Dupuy F, Strosberg AD, Emorine LJ y Bazin R (1995) Early alterations in the brown adipose tissue adenylate cyclase system of pre-obese Zucker rat fa/fa pups: decreased G-proteins and beta 3-adrenoceptor activities . *Biochem J* **312 (Pt 3)**, 781-788.

- (12) Susulic VS, Frederich RC, Lawitts J, Tozzo E, Kahn BB, Harper ME, Himms-Hagen J, Flier JS y Lowell BB (1995) Targeted disruption of the beta 3-adrenergic receptor gene. *J Biol Chem* **270**, 29483-29492.
- (13) Kiso T, Namikawa T, Tokunaga T, Sawada K, Kakita T, Shogaki T y Ohtsubo Y (1999) Anti-obesity and anti-diabetic activities of a new beta3 adrenergic receptor agonist, (S)-(Z)-[4-[[1-[2-[(2-hydroxy-3-phenoxypropyl)]amino]ethyl]-1-propenyl]phenoxy] acetic acid ethanedioic acid (SWR-0342SA), in KK- Δ y mice. *Biol Pharm Bull* **22**, 1073-1078.
- (14) Hoffmann C, Leitz MR, Oberdorf-Maass S, Lohse MJ y Klotz KN (2004) Comparative pharmacology of human beta-adrenergic receptor subtypes—characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* **369**, 151-159.
- (15) Xiao RP (2001) Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. *Sci STKE* **2001**, RE15.
- (16) Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK y Xiao RP (2001) Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1607-1612.
- (17) Rohrer DK (1998) Physiological consequences of beta-adrenergic receptor disruption. *J Mol Med* **76**, 764-772.
- (18) Xiang Y, Rybin VO, Steinberg SF y Kobilka B (2002) Caveolar localization dictates physiologic signaling of beta 2-adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes. *J Biol Chem* **277**, 34280-34286.
- (19) Steinberg SF (2004) beta(2)-Adrenergic receptor signaling complexes in cardiomyocyte caveolae/lipid rafts. *J Mol Cell Cardiol* **37**, 407-415.
- (20) Baillie GS, Sood A, McPhee I, Gall I, Perry SJ, Lefkowitz RJ y Houslay MD (2003) beta-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates beta-adrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 940-945.
- (21) Houslay MD y Baillie GS (2003) The role of ERK2 docking and phosphorylation of PDE4 cAMP phosphodiesterase isoforms in mediating cross-talk between the cAMP and ERK signalling pathways. *Biochem Soc Trans* **31**, 1186-1190.
- (22) Rohrer DK, Desai KH, Jasper JR, Stevens ME, Regula DP, Jr., Barsh GS, Bernstein D y Kobilka BK (1996) Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7375-7380.
- (23) Devic E, Xiang Y, Gould D y Kobilka B (2001) Beta-adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from beta(1) and beta(2) adrenoceptor knockout mice. *Mol Pharmacol* **60**, 577-583.

- (24) Chruscinski AJ, Rohrer DK, Schauble E, Desai KH, Bernstein D y Kobilka BK (1999) Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene . *J Biol Chem* **274**, 16694-16700.
- (25) Philipp M y Hein L (2004) Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes . *Pharmacol Ther* **101**, 65-74.
- (26) McKinsey TA y Olson EN (1999) Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry . *Curr Opin Genet Dev* **9**, 267-274.
- (27) Rockman HA, Koch WJ y Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function . *Nature* **415**, 206-212.
- (28) Myslivecek J y Trojan S (2003) Regulation of adrenoceptors and muscarinic receptors in the heart . *Gen Physiol Biophys* **22**, 3-14.
- (29) Lehnart SE, Wehrens XH, Kushnir A y Marks AR (2004) Cardiac ryanodine receptor function and regulation in heart disease . *Ann N Y Acad Sci* **1015**, 144-159.
- (30) Ruegg JC (1998) Cardiac contractility: how calcium activates the myofilaments . *Naturwissenschaften* **85**, 575-582.
- (31) Foerster K, Kaferstein T, Groner F, Engelhardt S, Matthes J, Koch WJ, Lohse MJ y Herzig S (2004) Calcium channel function and regulation in beta 1- and beta 2-adrenoceptor transgenic mice . *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**, 490-495.
- (32) Kamp TJ y Hell JW (2000) Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C . *Circ Res* **87**, 1095-1102.
- (33) Li J, Bigelow DJ y Squier TC (2003) Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase modulates the structural coupling between the transmembrane and cytosolic domains of phospholamban . *Biochemistry* **42**, 10674-10682.
- (34) El-Armouche A, Pamminger T, Ditz D, Zolk O y Eschenhagen T (2004) Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor -1 in failing human hearts . *Cardiovasc Res* **61**, 87-93.
- (35) Engelhardt S, Boknik P, Keller U, Neumann J, Lohse MJ y Hein L (2001) Early impairment of calcium handling and altered expression of junctin in hearts of mice overexpressing the beta1-adrenergic receptor . *Faseb J* **15**, 2718-2720.
- (36) Pena JR y Wolska BM (2004) Troponin I phosphorylation plays an important role in the relaxant effect of beta-adrenergic stimulation in mouse hearts . *Cardiovasc Res* **61**, 756-763.
- (37) Thomas D, Kiehn J, Katus HA y Karle CA (2004) Adrenergic regulation of the rapid component of the cardiac delayed rectifier potassium current, I(Kr), and the underlying hERG ion channel . *Basic Res Cardiol* **99**, 279-287.

- (38) Podlowski S, et al. (2000) Beta1-adrenoceptor gene variations: a role in idiopathic dilated cardiomyopathy? *J Mol Med* **78**, 87-93.
- (39) Maqbool A, Hall AS, Ball SG y Balmforth AJ (1999) Common polymorphisms of beta1-adrenoceptor: identification and rapid screening assay . *Lancet* **353**, 897.
- (40) Mason DA, Moore JD, Green SA y Liggett SB (1999) A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human beta1-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **274**, 12670-12674.
- (41) Small KM, McGraw DW y Liggett SB (2003) Pharmacology and physiology of human adrenergic receptor polymorphisms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**, 381-411.
- (42) Sandilands AJ, O'Shaughnessy KM y Brown MJ (2003) Greater inotropic and cyclic AMP responses evoked by noradrenaline through Arg389 beta 1-adrenoceptors versus Gly389 beta 1-adrenoceptors in isolated human atrial myocardium. *Br J Pharmacol* **138**, 386-392.
- (43) Small KM, Wagoner LE, Levin AM, Kardia SL y Liggett SB (2002) Synergistic polymorphisms of beta1- and alpha2C-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *N Engl J Med* **347**, 1135-1142.
- (44) Liang Y, Zhao YY, Liu H y Shi JP (2004) [The genotype analysis of beta adrenergic receptor gene family in high risk population of hypertension in northeast China]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* **21**, 124-127.
- (45) Liu J, Liu ZQ, Tan ZR, Chen XP, Wang LS, Zhou G y Zhou HH (2003) Gly389Arg polymorphism of beta1-adrenergic receptor is associated with the cardiovascular response to metoprolol. *Clin Pharmacol Ther* **74**, 372-379.
- (46) Brodde OE y Stein CM (2003) The Gly389Arg beta1-adrenergic receptor polymorphism: a predictor of response to beta-blocker treatment? *Clin Pharmacol Ther* **74**, 299-302.
- (47) Mialet Perez J, Rathz DA, Petrashevskaya NN, Hahn HS, Wagoner LE, Schwartz A, Dorn GW y Liggett SB (2003) Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms confer differential function and predisposition to heart failure. *Nat Med* **9**, 1300-1305.
- (48) Forleo C, et al. (2004) Association of beta-adrenergic receptor polymorphisms and progression to heart failure in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy . *Am J Med* **117**, 451-458.
- (49) Bullido MJ, Ramos MC, Ruiz-Gomez A, Tutor AS, Sastre I, Frank A, Coria F, Gil P, Mayor F, Jr. y Valdivieso F (2004) Polymorphism in genes involved in adrenergic signaling associated with Alzheimer's. *Neurobiol Aging* **25**, 853-859.
- (50) Liggett SB (1995) Genetics of beta 2-adrenergic receptor variants in asthma. *Clin Exp Allergy* **25 Suppl 2**, 89-94; discussion 95-86.

- (51) Green SA, Turki J, Bejarano P, Hall IP y Liggett SB (1995) Influence of beta 2-adrenergic receptor genotypes on signal transduction in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **13**, 25-33.
- (52) Green SA, Turki J, Hall IP y Liggett SB (1995) Implications of genetic variability of human beta 2-adrenergic receptor structure. *Pulm Pharmacol* **8**, 1-10.
- (53) Green SA, Turki J, Innis M y Liggett SB (1994) Amino-terminal polymorphisms of the human beta 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry* **33**, 9414-9419.
- (54) Green SA, Rathz DA, Schuster AJ y Liggett SB (2001) The Ile164 beta(2)-adrenoceptor polymorphism alters salmeterol exosite binding and conventional agonist coupling to G(s). *Eur J Pharmacol* **421**, 141-147.
- (55) Joos L y Sandford AJ (2002) Genotype predictors of response to asthma medications. *Curr Opin Pulm Med* **8**, 9-15.
- (56) Weir TD, Mallek N, Sandford AJ, Bai TR, Awadh N, Fitzgerald JM, Cockcroft D, James A, Liggett SB y Pare PD (1998) beta2-Adrenergic receptor haplotypes in mild, moderate and fatal/near fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **158**, 787-791.
- (57) Martinez FD, Graves PE, Baldini M, Solomon S y Erickson R (1997) Association between genetic polymorphisms of the beta2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing. *J Clin Invest* **100**, 3184-3188.
- (58) Clement K, Vaisse C, Manning BS, Basdevant A, Guy-Grand B, Ruiz J, Silver KD, Shuldiner AR, Froguel P y Strosberg AD (1995) Genetic variation in the beta 3-adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *N Engl J Med* **333**, 352-354.
- (59) Walston J, Silver K, Bogardus C, Knowler WC, Celi FS, Austin S, Manning B, Strosberg AD, Stern MP, Raben N y et al. (1995) Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the beta 3-adrenergic-receptor gene. *N Engl J Med* **333**, 343-347.
- (60) Widen E, Lehto M, Kanninen T, Walston J, Shuldiner AR y Groop LC (1995) Association of a polymorphism in the beta 3-adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns. *N Engl J Med* **333**, 348-351.
- (61) Chien KR (1999) Stress pathways and heart failure. *Cell* **98**, 555-558.
- (62) Swynghedauw B (1999) Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* **79**, 215-262.
- (63) Keys JR y Koch WJ (2004) The adrenergic pathway and heart failure. *Recent Prog Horm Res* **59**, 13-30.

- (64) Nicholas M (2004) Heart failure: pathophysiology, treatment and nursing care. *Nurs Stand* **19**, 46-51; quiz 52, 54.
- (65) Bunemann M, Lee KB, Pals-Rylaarsdam R, Roseberry AG y Hosey MM (1999) Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* **61**, 169-192.
- (66) Barki-Harrington L, Perrino C y Rockman HA (2004) Network integration of the adrenergic system in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* **63**, 391-402.
- (67) Ahmed A (2003) Myocardial beta-1 adrenoceptor down-regulation in aging and heart failure: implications for beta-blocker use in older adults with heart failure. *Eur J Heart Fail* **5**, 709-715.
- (68) Pfeffer MA (2004) Pharmacologic advances in long-term heart failure management. *Am Heart Hosp J* **2**, 15-20.
- (69) Abraham WT y Iyengar S (2004) Practical considerations for switching beta-blockers in heart failure patients. *Rev Cardiovasc Med* **5 Suppl 1**, S36-44.
- (70) Packer M (2003) Do beta-blockers prolong survival in heart failure only by inhibiting the beta1-receptor? A perspective on the results of the COMET trial. *J Card Fail* **9**, 429-443.
- (71) Guyatt GH y Devereaux PJ (2004) A review of heart failure treatment. *Mt Sinai J Med* **71**, 47-54.
- (72) Engelhardt S, Hein L, Dyachenkow V, Kranias EG, Isenberg G y Lohse MJ (2004) Altered calcium handling is critically involved in the cardiotoxic effects of chronic beta-adrenergic stimulation. *Circulation* **109**, 1154-1160.
- (73) Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN, Canning AM, Jantz TD, Mitarai S, Yatani A y Dorn GW, 2nd (2000) Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation* **101**, 1707-1714.
- (74) Milano CA, Allen LF, Rockman HA, Dolber PC, McMinn TR, Chien KR, Johnson TD, Bond RA y Lefkowitz RJ (1994) Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science* **264**, 582-586.
- (75) Chesley A, Lundberg MS, Asai T, Xiao RP, Ohtani S, Lakatta EG y Crow MT (2000) The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. *Circ Res* **87**, 1172-1179.
- (76) Bohm M y Lohse MJ (1994) Quantification of beta-adrenoceptors and beta-adrenoceptor kinase on protein and mRNA levels in heart failure. *Eur Heart J* **15 Suppl D**, 30-34.

- (77) Limas CJ (1997) Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy: a pathogenetic role? *Circulation* **95**, 1979-1980.
- (78) Eriksson U y Penninger JM (2005) Autoimmune heart failure: new understandings of pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 27-32.
- (79) Borda ES y Sterin-Borda L (1996) Antiadrenergic and muscarinic receptor antibodies in Chagas' cardiomyopathy. *Int J Cardiol* **54**, 149-156.
- (80) Magnusson Y, Hjalmarson A y Hoebeke J (1996) Beta 1-adrenoceptor autoimmunity in cardiomyopathy. *Int J Cardiol* **54**, 137-141.
- (81) Magnusson Y, Marullo S, Hoyer S, Waagstein F, Andersson B, Vahlne A, Guillet JG, Strosberg AD, Hjalmarson A y Hoebeke J (1990) Mapping of a functional autoimmune epitope on the beta 1-adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* **86**, 1658-1663.
- (82) Magnusson Y, Wallukat G, Waagstein F, Hjalmarson A y Hoebeke J (1994) Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the beta 1-adrenoceptor with positive chronotropic effect. *Circulation* **89**, 2760-2767.
- (83) Wallukat G, Morwinski M, Kowal K, Forster A, Boewer V y Wollenberger A (1991) Autoantibodies against the beta-adrenergic receptor in human myocarditis and dilated cardiomyopathy: beta-adrenergic agonism without desensitization. *Eur Heart J* **12 Suppl D**, 178-181.
- (84) Limas CJ, Goldenberg IF y Limas C (1992) Assessment of immune modulation of beta-adrenergic pathways in human dilated cardiomyopathy: influence of methodologic factors. *Am Heart J* **123**, 967-970.
- (85) Wallukat G, Fu ML, Magnusson Y, Hjalmarson A, Hoebeke J y Wollenberger A (1996) Agonistic effects of anti-peptide antibodies and autoantibodies directed against adrenergic and cholinergic receptors: absence of desensitization. *Blood Press Suppl* **3**, 31-36.
- (86) Mobini R, Magnusson Y, Wallukat G, Viguier M, Hjalmarson A y Hoebeke J (1999) Probing the immunological properties of the extracellular domains of the human beta(1)-adrenoceptor. *J Autoimmun* **13**, 179-186.
- (87) Podlowski S, Luther HP, Morwinski R, Muller J y Wallukat G (1998) Agonistic anti-beta1-adrenergic receptor autoantibodies from cardiomyopathy patients reduce the beta1-adrenergic receptor expression in neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation* **98**, 2470-2476.
- (88) Jahns R, Boivin V, Krapf T, Wallukat G, Boege F y Lohse MJ (2000) Modulation of beta1-adrenoceptor activity by domain-specific antibodies and heart failure-associated autoantibodies. *J Am Coll Cardiol* **36**, 1280-1287.

- (89) Jahns R, Boivin V, Siegmund C, Inselmann G, Lohse MJ y Boege F (1999) Autoantibodies activating human beta1-adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure . *Circulation* **99**, 649-654.
- (90) Iwata M, Yoshikawa T, Baba A, Anzai T, Nakamura I, Wainai Y, Takahashi T y Ogawa S (2001) Autoimmunity against the second extracellular loop of beta(1)-adrenergic receptors induces beta-adrenergic receptor desensitization and myocardial hypertrophy in vivo . *Circ Res* **88**, 578-586.
- (91) Staudt A, Mobini R, Fu M, Grosse Y, Stangl V, Stangl K, Thiele A, Baumann G y Felix SB (2001) beta(1)-Adrenoceptor antibodies induce positive inotropic response in isolated cardiomyocytes . *Eur J Pharmacol* **423**, 115-119.
- (92) Staudt A, Schaper F, Stangl V, Plagemann A, Bohm M, Merkel K, Wallukat G, Wernecke KD, Stangl K, Baumann G y Felix SB (2001) Immunohistological changes in dilated cardiomyopathy induced by immunoadsorption therapy and subsequent immunoglobulin substitution . *Circulation* **103**, 2681-2686.
- (93) Matsui S y Fu ML (1996) Distribution of serum autoantibodies against G-protein-coupled cardiovascular receptors in Japanese patients with cardiomyopathy . *Blood Press Suppl* **3**, 28-30.
- (94) Jahns R, Boivin V, Hein L, Triebel S, Angermann CE, Ertl G y Lohse MJ (2004) Direct evidence for a beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy . *J Clin Invest* **113**, 1419-1429.
- (95) Liu HR, Zhao RR, Jiao XY, Wang YY y Fu M (2002) Relationship of myocardial remodeling to the genesis of serum autoantibodies to cardiac beta(1)-adrenoceptors and muscarinic type 2 acetylcholine receptors in rats . *J Am Coll Cardiol* **39**, 1866-1873.
- (96) Dorffel WV, Felix SB, Wallukat G, Brehme S, Bestvater K, Hofmann T, Kleber FX, Baumann G y Reinke P (1997) Short-term hemodynamic effects of immunoadsorption in dilated cardiomyopathy . *Circulation* **95**, 1994-1997.
- (97) Felix SB, Staudt A, Landsberger M, Grosse Y, Stangl V, Spielhagen T, Wallukat G, Wernecke KD, Baumann G y Stangl K (2002) Removal of cardiodepressant antibodies in dilated cardiomyopathy by immunoadsorption . *J Am Coll Cardiol* **39**, 646-652.
- (98) Yan AT, Yan RT y Liu PP (2005) Narrative review: pharmacotherapy for chronic heart failure: evidence from recent clinical trials . *Ann Intern Med* **142**, 132-145.
- (99) Satwani S, Dec GW y Narula J (2004) Beta-adrenergic blockers in heart failure: review of mechanisms of action and clinical outcomes . *J Cardiovasc Pharmacol Ther* **9**, 243-255.

Metabolismo en la etapa perinatal y sus implicaciones en enfermedades del adulto

EMILIO HERRERA CASTILLÓN

RESUMEN

El desarrollo fetal depende del continuo aporte de metabolitos de la circulación materna, y aunque los lípidos cruzan con dificultad la placenta, juegan un papel fundamental en dicho desarrollo. En los dos primeros tercios de la gestación se produce en la madre un acumulo de depósitos grasos, que son movilizados durante el último tercio, con un incremento en la producción hepática de triglicéridos, disminución de la actividad lipoproteína lipasa en tejido adiposo y aumento del contenido de triglicéridos en todas las lipoproteínas circulantes. La presencia en la placenta de receptores de lipoproteínas, de lipasas y de proteínas que unen a los ácidos grasos, garantiza el aporte de ácidos grasos esenciales (EFA) y de sus derivados de cadena larga al feto. Una reducción de EFA en la dieta durante la gestación se asocia a un menor crecimiento fetal, pero un efecto similar se observa también cuando la dieta se suplementa con proporciones elevadas de aceite de pescado, rico en ácidos grasos ω -3, que inhiben competitivamente la actividad de la Δ^6 desaturasa, dando lugar a una deficiencia en ácido araquidónico y un aumento en la susceptibilidad a la peroxidación lipídica. Además de retrasar el desarrollo postnatal, estos cambios predisponen al desarrollo de diabetes cuando adultos. También la malnutrición durante la primera mitad de la gestación o la lactancia dan lugar a un retraso en el desarrollo de las crías, con efectos negativos en las relaciones glucosa-insulina cuando adultos. A su vez, una dieta rica en colesterol desencadena una mayor hipercolesterolemia en la gestante que en la no-gestante, lo que puede causar lesiones en el feto, predisponiéndolo a sufrir aterosclerosis en etapas avanzadas de la vida. Se necesitan estudios que determinen la ventana de seguridad de cantidad, calidad y temporalidad de cambios en la dieta durante la etapa perinatal, antes

de realizar recomendaciones dietéticas descontroladas, las cuales pueden tener consecuencias negativas e irreversibles en el riesgo de padecer determinadas patologías en el adulto.

1. INTRODUCCIÓN

Estudios epidemiológicos han llevado a la hipótesis de que alteraciones en el desarrollo intrauterino que conllevan una reducción del peso al nacer se asocian a un incremento en la predisposición a desarrollar determinadas patologías en el adulto, tales como enfermedades cardiovasculares, hipertensión o diabetes (1). Esta hipótesis ha sido posteriormente ratificada y ampliada (2-6), añadiendo al menor peso al nacer un lento crecimiento en el primer año de vida, seguido de una rápida ganancia de peso.

La nutrición durante la etapa intrauterina influye en el desarrollo y puede dar lugar a cambios adaptativos y permanentes en la estructura, fisiología y metabolismo del recién nacido (7), con consecuencias tanto en su peso como en su posterior desarrollo. La disponibilidad de nutrientes en el feto depende de los que cruzan la placenta, que a su vez dependen de la nutrición materna (8,9). A pesar de ello, desconocemos el verdadero impacto de la dieta materna sobre el desarrollo fetal, y aunque los estudios de intervención dietética durante la gestación en humanos han llevado a la creencia errónea de que la nutrición materna afecta muy poco al desarrollo fetal (10), hay estudios en ovejas y ratas demostrando que la malnutrición de la madre da lugar a retraso intrauterino y tiene efectos negativos a largo plazo, alterando la tolerancia a la glucosa en los adultos (11,12).

El desarrollo fetal depende del continuo aporte de nutrientes procedentes de la circulación materna. La glucosa es el metabolito que cruza la placenta más abundantemente, seguida de los aminoácidos (13-17). Sin embargo, aunque los lípidos la cruzan con mayor dificultad (18,19), juegan un papel fundamental en el desarrollo fetal. De hecho, cambios en la disponibilidad de determinados lípidos como consecuencia de variaciones en la composición de grasas de la dieta de la madre, tienen importantes implicaciones en el desarrollo fetal y postnatal (20). A su vez, desviaciones en el metabolismo lipídico de la madre, como la hipercolesterolemia, pueden dar lugar a alteraciones en el feto y le predisponen a la aterosclerosis cuando adulto (21-23). Dadas sus importantes implicaciones en las enfermedades del adulto, en este capítulo se pretenden revisar los aspectos más relevantes del metabolismo durante la etapa perinatal. A su vez, puesto que la dieta durante la gestación y/o la lactancia y las altera-

ciones en el metabolismo lipídico durante la etapa intrauterina tienen una especial relevancia en el desarrollo postnatal, se hará hincapié en estos dos aspectos para analizar su influencia en la predisposición a largo plazo a las mencionadas patologías.

2. ADAPTACIONES METABÓLICAS EN LA MADRE DURANTE LA GESTACIÓN

A lo largo de la gestación se pueden distinguir dos etapas claramente diferenciadas. Durante los dos primeros tercios, en que el crecimiento fetal es escaso, la madre acumula una considerable cantidad de reservas metabólicas, preferentemente en forma de grasas (24,25). Ello es facilitado por su hiperinsulinemia y una sensibilidad insulínica normal, o incluso aumentada (26-28). Sin embargo, durante el último tercio de la gestación, en que el crecimiento del feto es muy rápido, la madre cambia a una situación catabólica. Esto se manifiesta mediante una acelerada degradación de las reservas grasas que había acumulado (activa lipólisis del tejido adiposo) (29-31), que es facilitada por la disminuida sensibilidad insulínica (resistencia insulínica) que se presenta regularmente en esta última etapa de la gestación (32-34).

2.1. Metabolismo de carbohidratos y aminoácidos en la gestante

A lo largo de la gestación, y sobre todo en el tercer trimestre, la madre tiende a sufrir episodios de hipoglucemia, especialmente en los periodos de ayuno (35,36). Ello ocurre a pesar de que, precisamente en estas condiciones, la gestante tiene aumentada su actividad gluconeogénica (36-38), siendo el glicerol derivado de la lipólisis del tejido adiposo un sustrato preferente para esta vía metabólica (9). Puesto que el consumo de glucosa por los tejidos maternos está disminuido como consecuencia de la resistencia insulínica, la hipoglucemia de la gestante es el resultado de la intensa transferencia de glucosa materna al feto. De hecho, para el feto la glucosa es un sustrato oxidativo esencial, y al no hacer gluconeogénesis, su aporte depende únicamente de la que le llega de la madre. Cuantitativamente, la glucosa materna es transportada a través de la placenta incluso más eficazmente que los aminoácidos (13,39). Su transferencia placentaria se realiza mediante un proceso de difusión facilitada, por lo que es dependiente del gradiente materno-fetal de glucosa (14,16,40), de forma que cambios en los niveles circulantes de glucosa en la madre influyen directamente en los del feto.

A diferencia de la glucosa, la concentración de aminoácidos en plasma fetal es normalmente superior a la del plasma materno (14,41,42), debido a que su transferencia placentaria se realiza mediante un proceso activo, dependiente de energía metabólica y de transportadores selectivos (14,16,43-45). Todo ello permite la llegada al feto de estos metabolitos esenciales para la formación de sus tejidos, y es responsable de las tendencias de la madre a desarrollar hipoa-minoacidemia (13).

2.2. Metabolismo lipídico en la madre y sus repercusiones en el feto

A pesar de que los lípidos atraviesan la placenta en menor proporción y mayor dificultad que otros metabolitos (ver mas adelante), en la gestante se producen regularmente dos cambios importantes en su metabolismo lipídico: acumulo de grasas de reserva en sus tejidos (24,46) y desarrollo de hiperlipidemia (47,48). Como cabría esperar, es el tejido adiposo de la madre el principal responsable de estos cambios.

2.2.1. Metabolismo del tejido adiposo

El acumulo de depósitos grasos en la madre se produce en los dos primeros tercios de la gestación (46,49-51). Es el resultado de su hiperfagia (52,53), que permite el adecuado aporte de sustratos, unida a un aumento en la síntesis de glicéridos en el tejido adiposo, la cual corresponde tanto a la formación de ácidos grasos en forma de acil-CoA como a la del glicerol-3-fosfato que los esterifica (39,54). Este efecto es consecuencia del aumento en la sensibilidad insulínica del tejido adiposo de la madre que tiene lugar precisamente en la primera fase de la gestación (28).

La disminución de las grasas corporales que se produce durante el último tercio de la gestación es el resultado de dos cambios en tejido adiposo: una disminución de la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) y una activación de la lipólisis. La LPL, anclada mediante moléculas de heparán sulfato en el endotelio capilar de los tejidos extrahepáticos, hidroliza los triglicéridos que circulan en sangre asociados a las lipoproteínas ricas en ellos, quilomicrones y VLDL (55), y los productos que se forman, ácidos grasos y glicerol, son captados por el tejido subyacente (56). De esta forma, la acción de la LPL es un requisito para la captación de grasas por el tejido adiposo. Mientras que a lo largo de los dos primeros tercios de la gestación hay escasos cambios en la actividad LPL del te-

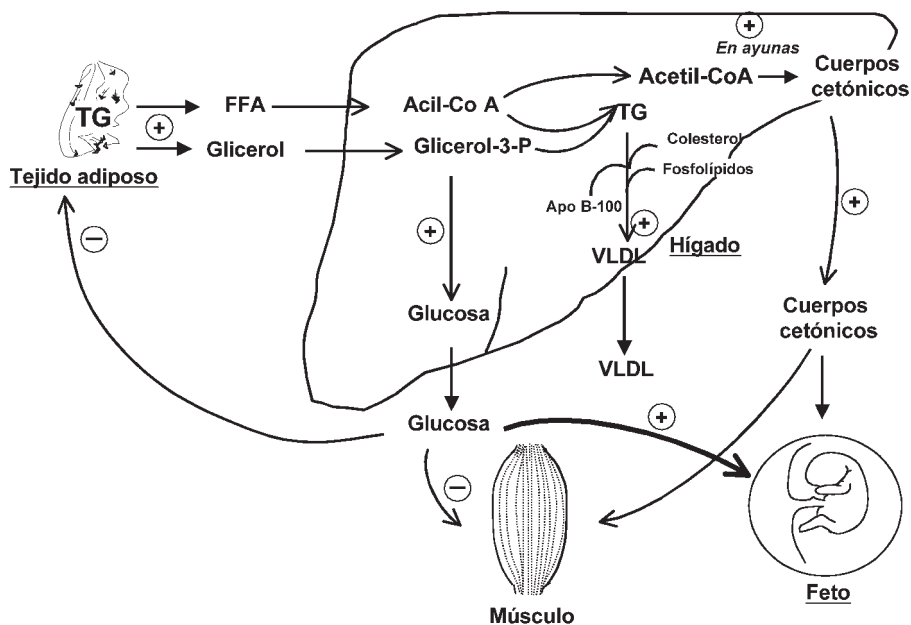


FIGURA 1. Interrelaciones metabólicas en la gestación. TG= Triglicéridos; VLDL= Lipoproteínas de muy baja densidad; FFA= Ácidos grasos libres. Signos + indican vías o reacciones aumentadas y signos - vías disminuidas.

jido adiposo (31,47), en el último tercio se produce una importante reducción, como se ha podido observar directamente en la rata (49,57-59) y en la actividad de LPL post-heparínica en la mujer (47). Así pues, este efecto reduce la captación de lípidos circulantes por el tejido adiposo, lo que unido a un incremento en su actividad lipolítica, contribuye a la movilización neta de las grasas de la madre en el último tercio de la gestación, en el que el ritmo de crecimiento del feto, y consecuentemente sus necesidades nutritivas, es máximo (49,60).

La actividad lipolítica del tejido adiposo de la madre aumenta en el último tercio de la gestación (30,61-64), y los productos de la lipólisis, ácidos grasos libres (FFA) y glicerol, salen a sangre, donde se incrementa su concentración. Puesto que la transferencia placentaria de estos productos es relativamente baja (18), su principal destino es el hígado de la madre (65), donde son transformados en sus formas activas, acil-CoA y glicerol-3-fosfato respectivamente, para ser reesterificados en la síntesis de triglicéridos y reenviados así a la circulación asociados a las VLDL (figura 1). La condición de resistencia insulínica y el incremento en la concentración de estrógenos que tiene lugar en esta etapa de la gestación, contribuyen activamente a estos cambios (48,66).

La actividad lipolítica del tejido adiposo aumenta en la gestante especialmente en ayunas (29,30,64,67). En estas condiciones, aparte de la utilización de los productos de la lipólisis en la formación de triglicéridos, el glicerol puede utilizarse para la gluconeogénesis y los FFA para la β -oxidación y la síntesis de cuerpos cetónicos (figura 1). Precisamente estas vías metabólicas aumentan muy intensamente en la gestante al tercer trimestre, y en particular en los periodos de ayuno (36,38,68,69). Estos cambios metabólicos son importantes para el feto: Por un lado, la utilización preferente de glicerol para la síntesis de glucosa garantiza su disponibilidad al feto cuando la de otros metabolitos también esenciales para su desarrollo, como los aminoácidos, está reducida (38,70). Por otro lado, los cuerpos cetónicos cruzan eficazmente la placenta (71,72) y pueden ser utilizados por el feto tanto como sustratos oxidativos (73) como para la síntesis de lípidos cerebrales (74), por lo que su aumentada síntesis en el lado materno contribuye también a cubrir las necesidades metabólicas del feto en los periodos de ayuno de la madre (figura 1).

2.2.2. *Hiperlipidemia materna*

La aumentada lipólisis del tejido adiposo durante el último tercio de la gestación se asocia también al desarrollo de una hiperlipidemia, la cual corresponde a un incremento en los niveles circulantes de triglicéridos más que a los de colesterol o de fosfolípidos (48). Esos triglicéridos aumentan tanto en las VLDL como en las otras lipoproteínas que normalmente los transportan en mucha menor proporción, las LDL y las HDL (47).

Ese incremento de triglicéridos circulantes en la madre es el resultado de varios factores (figura 2): 1. El aumento de la llegada al hígado de glicerol y ácidos grasos derivados de la lipólisis del tejido adiposo, que facilita la producción hepática de triglicéridos, que salen a la circulación asociados a las VLDL (75,76). 2. La disminución de la actividad LPL del tejido adiposo (31,47), comentada mas arriba, de forma que ambos efectos dan lugar a un aumento en los triglicéridos de las VLDL circulantes. 3. Esa abundancia de triglicéridos de las VLDL y un incremento en la actividad de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) (47,77), que facilitan el acumulo de triglicéridos en las lipoproteínas de mas alta densidad, LDL y HDL (47,78), mediante su intercambio por ésteres de colesterol. 4. Se produce también en la madre una disminución de la actividad de la lipasa hepática (HL) como consecuencia de la elevación de los estrógenos (47), y ello inhibe la conversión de las partículas HDL_{2b}, de gran tamaño y ricas en triglicéridos, en HDL₃, de pequeño tamaño y ricas en colesterol esterificado pero pobres en triglicéridos, permitiendo el acumulo de las primeras (47) (figura 2).

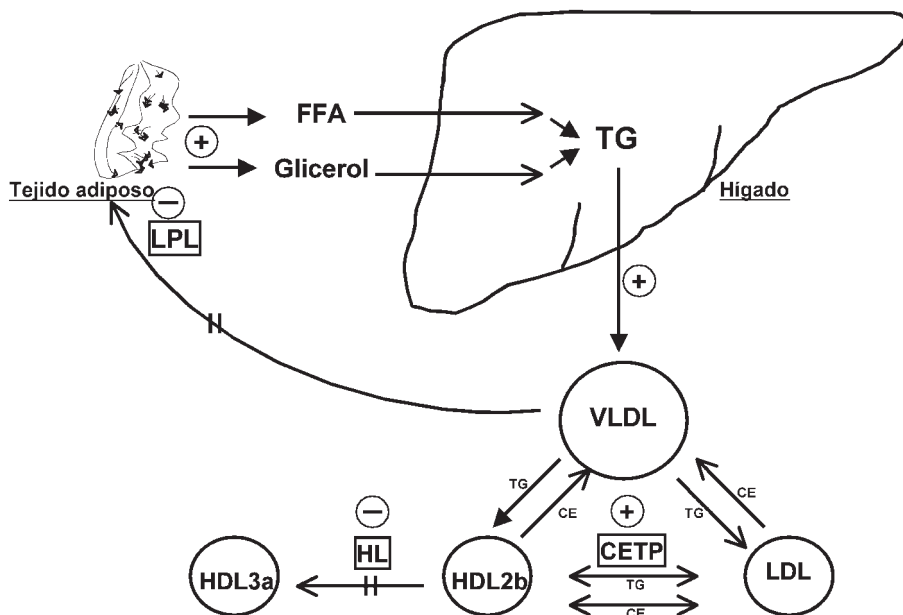


FIGURA 2. Esquema de los cambios en el metabolismo de lipoproteínas en el último trimestre de la gestación. TG= Triglicéridos; VLDL= Lipoproteínas de muy baja densidad; FFA= Ácidos grasos libres; HDL= Lipoproteínas de alta densidad; LDL= Lipoproteínas de baja densidad; CETP= Proteína transferidora de ésteres de colesterol; HL= Lipasa hepática; LPL= Lipoproteína lipasa. Signos + indican vías o reacciones aumentadas y signos - vías disminuidas.

2.2.3. Llegada de ácidos grasos al feto

Para llevar a cabo la síntesis de sus lípidos estructurales y de compuestos funcionales tales como las prostaglandinas y otros eicosanoides, el feto necesita tanto de los ácidos grasos esenciales (EFA, ácido linoleico [18:2 ω -6] y α -linoléico [18:3 ω -6]) como de sus derivados poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA), tales como el ácido araquidónico (20:4 ω -6), procedente del primero, y los ácidos eicosapentaenoico (20:5, EPA) y docosahexaenoico (22:6 ω -3, DHA), procedentes del segundo (figura 3). Puesto que la capacidad del feto para sintetizar LCPUFA a partir de sus precursores es escasa (79), tanto los EFA como los LCPUFA deben proceder de la circulación materna, a través de la placenta. Estos ácidos grasos no circulan en el plasma materno en forma libre sino esterificados en los triglicéridos presentes en las distintas lipoproteínas (80), y no atraviesan directamente la placenta (18). Sin embargo, la presencia de receptores de VLDL, LDL y HDL (81-86) y de diferentes actividades lipolíticas (LPL,

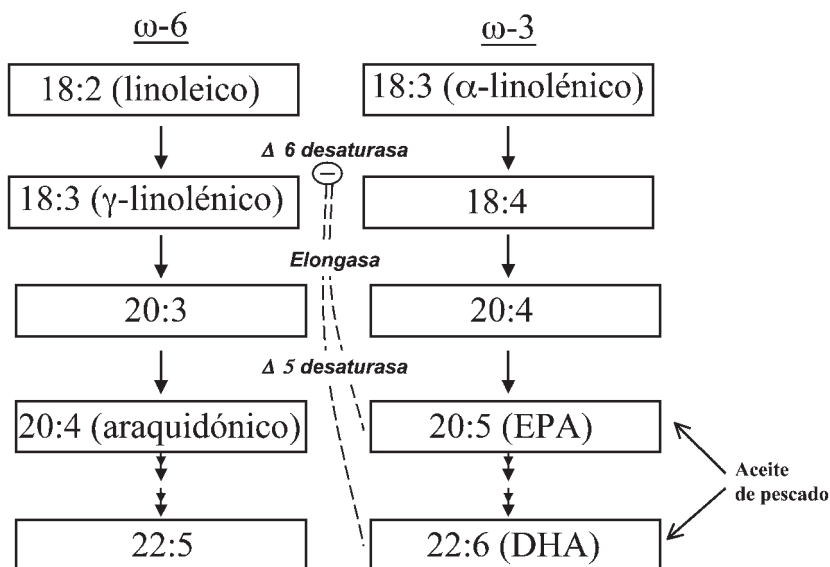


FIGURA 3. Esquema del metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados de las series ω -6 y ω -3, con indicación del efecto inhibitorio del exceso de los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), abundantes en el aceite de pescado, sobre la $\Delta 6$ -desaturasa.

fosfolipasa A₂ y triglicérido-lipasa intracelular) (87-94) en la placenta, permite que los triglicéridos de las lipoproteínas plasmáticas de la madre sean captados, hidrolizados y reesterificados. Ello hace que la placenta disponga regularmente de una reserva de ácidos grasos esterificados en forma de triglicéridos y de fosfolípidos, que subsiguientemente son hidrolizados, y los ácidos grasos liberados difunden a la circulación fetal. El proceso se resume de forma esquemática en la figura 4.

Así pues, la hiperlipidemia de la madre juega un papel fundamental en la llegada de EFA y LCPUFA al feto, y de hecho, el tratamiento con fármacos hipolipemiantes durante la gestación tiene consecuencias indeseables para el desarrollo fetal (95,96).

La placenta también dispone de proteínas que unen específicamente a los ácidos grasos, como la denominada F-ABP_{pm} (por su nombre inglés, «membrane fatty acid-binding protein»), la FAT («fatty acid translocase») y otras (97,98), que facilitan la captación y transferencia preferente al feto de determinados LCPUFA: docosahexaenoico > α-linolénico > linoleico > ácido araquidónico (99). Este transporte selectivo de determinados ácidos grasos

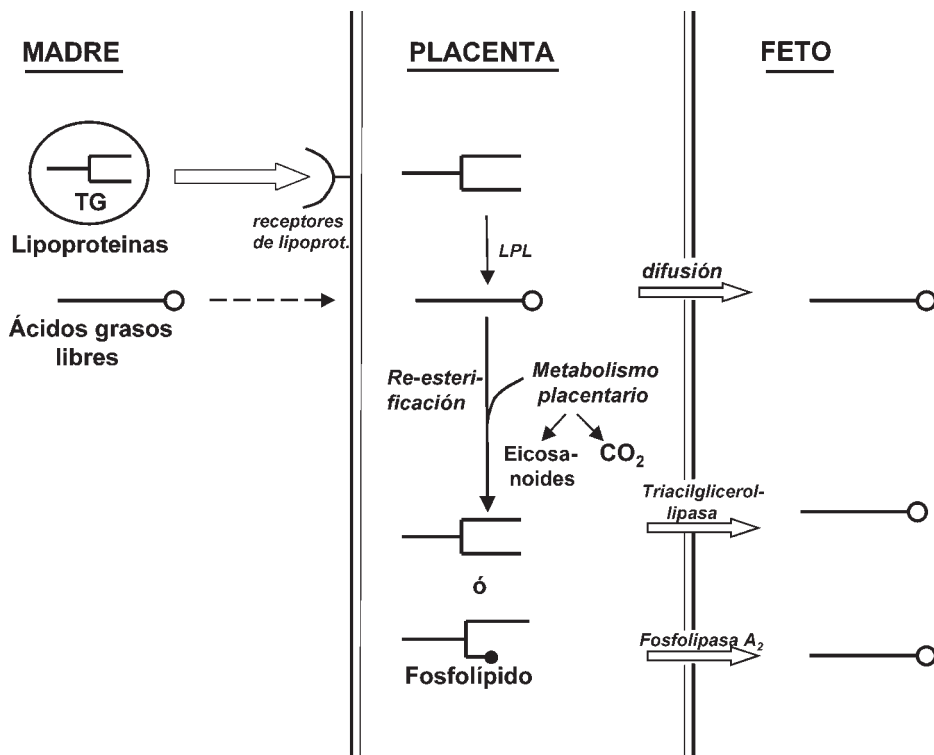


FIGURA 4. Esquema del transporte de ácidos grasos poliinsaturados a través de la placenta. La mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados circula en sangre materna en forma de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TG), y no en forma de ácidos grasos libres (FFA). La presencia de receptores de lipoproteínas, así como de proteínas que unen específicamente a los ácidos grasos y de enzimas hidrolíticas de glicéridos en la placenta, permite que dichas lipoproteínas sean captadas y sus glicéridos hidrolizados. En la propia placenta hay procesos de re-esterificación de ácidos grasos y un activo metabolismo intrínseco, y los ácidos grasos liberados como resultado de todas estas reacciones difunden a la circulación fetal.

parece contribuir activamente a la captación de ácidos grasos por la placenta y a su metabolismo intrínseco: transformación en prostaglandinas y otros eicosanoides (100), incorporación a fosfolípidos de membrana (101), oxidación (102) o síntesis en la propia placenta (103), así como a su transferencia al feto.

En consecuencia, la contribución de todos estos procesos determina el transporte placentario de ácidos grasos y su selectividad, permitiendo el enriquecimiento proporcional de algunos de los LCPUFAs, como los ácidos docosaheptaenoico y araquidónico, en el lado fetal con relación al materno (104,105).

2.2.4. *Colesterol*

El colesterol es un componente esencial de las membranas celulares y precursor de ácidos biliares, de hormonas esteroideas y de moléculas implicadas en la regulación de procesos metabólicos (como los oxisteroles); a su vez, también participa en procesos de diferenciación celular y comunicación intercelular. Todo ello justifica que las demandas de colesterol por parte del embrión y el feto sean relativamente altas. Tanto la transferencia placentaria de colesterol (106-108) como su síntesis por tejidos fetales se ha demostrado activa en varias especies (109-113).

En el hombre, la comparación de los niveles de colesterol en plasma materno y fetal ha llevado a obtener correlaciones positivas en algunos casos (114,115) pero no en otros (116-119). Parece ser que la edad gestacional determina estas diferencias, puesto que en plasma fetal los niveles de colesterol son más altos en el quinto que en el séptimo mes, y en los fetos más jóvenes de seis meses esos niveles se correlacionan con los de la madre (21). Ello indica que en las primeras etapas de la gestación, el colesterol materno contribuye activamente al colesterol fetal, mientras que en etapas más avanzadas esta contribución es escasa (116).

3. PAPEL DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA DIETA DURANTE LA GESTACIÓN O LA LACTANCIA EN EL DESARROLLO INTRAUTERINO Y POSTNATAL

En humanos, una reducción en los EF A de la dieta durante la gestación se asocia a un menor crecimiento neonatal (120), y en mujeres sanas los niveles de LCPUFA en plasma se correlacionan con los del feto o recién nacido (121-123). A su vez, la suplementación de la dieta con aceite de pescado (rico en ácidos grasos ω -3) durante la gestación incrementa los niveles plasmáticos de ácido docosahexaenoico en la madre y en los recién nacidos (124,125). Aunque estos resultados han llevado a proponer que durante el último trimestre de la gestación, la dieta de la madre debe ser suplementada regularmente con aceite de pescado (124,125), esta práctica podría tener efectos negativos. La presencia en exceso de algún LCPUF A en la dieta puede inhibir competitivamente a las Δ^6 - and Δ^5 - desaturasas, que controlan la conversión de los EF A en sus derivados LCPUFA de las series ω -3 y ω -6, y consecuentemente inhibir la síntesis endógena de otros LCPUF A que pudieran ser también esenciales para el normal desarrollo fetal (126). De hecho, cuando se consumen altas cantidades de aceite de pescado, los niveles de ácido araquidónico en sangre disminuyen (126,127) como consecuencia de la abundancia en ácidos eicosapentanoico (20:5 ω -3) y

docosahexaenoico (22:6 ω -3) en ese aceite y la consecuente inhibición específica que producen en la Δ^6 -desaturasa, que cataliza un paso obligatorio en la conversión de ácido linoleico en araquidónico (128,129) (figura 3).

La disminución en ácido araquidónico como consecuencia del consumo excesivo de ácidos grasos ω -3 puede tener importantes consecuencias en la etapa perinatal, ya que los niveles plasmáticos de ácido araquidónico se han relacionado con el peso corporal en los niños prematuros (130-132) y se han descrito también efectos adversos de bajas concentraciones de ácido araquidónico sobre el crecimiento corporal en la infancia (130,133,134).

El exceso de LCPUF A en la dieta puede también aumentar la susceptibilidad a la peroxidación lipídica como consecuencia de un incremento del estrés oxidativo o de una reducción de la capacidad antioxidante del organismo, como se ha demostrado tanto en el caso de los ácidos grasos de la serie ω -6 (135-138) como en los de la serie ω 3 (127,139-142). Un incremento en la peroxidación lipídica es ciertamente negativo durante la etapa perinatal, como se muestra en estudios experimentales de diabetes en la gestación, donde la producción de especies reactivas del oxígeno y de la peroxidación lipídica están aumentadas, y se asocian a un daño en el desarrollo fetal, ya que el efecto es revertido mediante el tratamiento con antioxidantes, tales como la vitamina E (143-149).

4. EFECTOS A LARGO PLAZO SOBRE LA SALUD DE MODIFICACIONES EN LA DIETA DURANTE LA GESTACIÓN O LA LACTANCIA

En los últimos años ha quedado claramente establecido que determinados cambios en la nutrición durante la etapa perinatal pueden tener consecuencias a largo plazo en la salud del adulto (150-160). Aunque la mayor parte de los problemas nutricionales que se producen durante la etapa fetal pueden ser corregidos cuando se actúa rápidamente tras el nacimiento (161), hay situaciones o condiciones que dan lugar a efectos irreversibles.

4.1. Malnutrición

4.1.1. Malnutrición durante la primera mitad de la gestación

Mediante un modelo experimental de hipotiroidismo y tratamiento con tiroxina en determinadas fases de la gestación en la rata, nosotros habíamos obser-

vado que la incapacidad de la madre para acumular grasas durante la primera mitad de la gestación reducía su respuesta catabólica en la segunda mitad, y disminuía el crecimiento fetal (162,163). Estos resultados nos llevaron a proponer que el acumulo de grasas que normalmente ocurre en la madre durante la primera mitad de la gestación, juega un papel importante en el aporte de nutrientes al feto. Con el fin de constatar esta hipótesis, estudiamos en la rata preñada las consecuencias a corto y largo plazo sobre la descendencia de la malnutrición (60% de la ingesta de las ratas controles) circunscrita a la primera mitad de la gestación; de esta forma se impedía el acumulo de grasas que normalmente ocurre en esta etapa. Los resultados obtenidos muestran (164) que, al nacimiento, el número y peso de las crías era inferior en las ratas subalimentadas que en las controles, y que a pesar de ser alimentadas *ad libitum* durante la lactancia y normalizar su peso corporal, cuando adultas presentaban una disminución en la respuesta a la insulina. Así pues, estos resultados ponen de manifiesto no sólo que la malnutrición de la madre durante la primera mitad de la gestación compromete el normal desarrollo intrauterino, sino que tiene consecuencias a largo plazo, predisponiendo a la descendencia al desarrollo de diabetes.

4.1.2. *Malnutrición durante la lactancia*

Puesto que una malnutrición circunscrita a la lactancia podría también tener consecuencias negativas a largo plazo, realizamos un experimento en el que ajustamos las camadas de ratas lactantes a un número elevado de crías (16 crías/madre lactante), utilizando como controles crías lactadas por madres a las que la camada se ajustaba a 9 crías. Desde el destete todas las crías se alimentaron *ad libitum* y se estudiaron cuando adultas (16 semanas de edad). Se observó no sólo que las crías malnutridas durante la lactancia (es decir, aquellas que habían pertenecido a una camada de 16 crías) crecían peor y mantenían permanentemente un menor peso corporal que las controles, sino que cuando adultas presentaban una disminuida tolerancia a la administración oral de glucosa (164). Así pues, estos resultados ponen de manifiesto no solo que la malnutrición durante la lactancia causa un retraso permanente en el desarrollo corporal, sino también una intolerancia glucídica cuando adultos, con el consiguiente riesgo de desarrollar diabetes.

Aparte de la reducción en los lípidos de reserva de la madre durante la primera mitad de la gestación, que impide los cambios catabólicos que normalmente tienen lugar durante el último tercio de la gestación y consecuentemente la llegada de nutrientes al feto, no conocemos con certeza el mecanismo por el

que la malnutrición durante la gestación o la lactancia tiene efectos negativos a largo plazo en la descendencia, y en particular sobre el eje glucosa-insulina. Se ha propuesto que la menor ingesta de proteínas podría ser responsable de algunos de esos cambios (154). Estudios en ratas han puesto de manifiesto que las crías de madres que se han sometido a una dieta deficiente en proteínas durante la gestación y la lactancia, pero que se han alimentado normalmente a partir del destete, cuando son jóvenes (6-12 semanas de edad) presentan un incremento en su tolerancia a la glucosa (1, 165, 166). Sin embargo, a la edad de 44 semanas se normaliza la tolerancia a la glucosa (167), mientras que en edades más avanzadas (17 meses) desarrollan una diabetes manifiesta (168). Aún desconocemos el mecanismo que subyace en esta respuesta dependiente de la edad, pero resulta evidente de los estudios epidemiológicos realizados en hombres y de los experimentos de intervención en animales, que una alteración en la cantidad y/o calidad de los nutrientes que llegan al feto y/o al lactante da lugar a cambios que se manifiestan en el adulto con el desarrollo de alguna de las patologías comentadas más arriba.

4.4. Papel de los lípidos de la dieta

La hipercolesterolemia materna durante las primeras etapas del embarazo puede causar lesiones en el feto que desencadenen una mayor susceptibilidad a sufrir aterosclerosis en etapas avanzadas de la vida. Se han realizado estudios histopatológicos en aortas de fetos humanos procedentes de abortos de mujeres que fueron hipercolesterolémicas solamente durante la gestación o que ya lo eran de forma permanente, comparados con los procedentes de mujeres no-hipercolesterolémicas. Se observó que la hipercolesterolemia materna se asociaba con la presencia de estrías grasas en dichas aortas (21). Estos resultados muestran que los procesos aterogénicos están ya presentes en las aortas fetales, y que se aceleran de forma importante cuando la madre es hipercolesterolémica. En estudios en la rata, nosotros hemos observado que durante la gestación la madre es más susceptible de desarrollar hipercolesterolemia como consecuencia de un aumento de colesterol en la dieta que en la situación de no-gestación (169). A su vez, mediante estudios en conejos (22), el mecanismo por el que la hipercolesterolemia materna incrementa la susceptibilidad aterogénica de su descendencia a largo plazo se ha asociado a un aumento en la peroxidación lipídica que se produce (170-172). De hecho, se podría hipotetizar que condiciones en las que se incrementa el estrés oxidativo durante la etapa perinatal, como ocurre cuando se produce un aumento exagerado de LCPUF A en la dieta durante la gestación y la lactancia, comentado más arriba, aumenta la susceptibilidad de

desarrollo de la aterosclerosis en el adulto. Por otro lado, experimentos en ratas a las que se les ha alimentado con dietas semisintéticas e isocalóricas conteniendo un 10% de aceite de pescado o de oliva exclusivamente durante la lactancia, han puesto de manifiesto que cuando adultas las primeras desarrollan una intolerancia a la glucosa oral, la cual no se observa en las segundas (I. López-Soldado y E. Herrera, observaciones sin publicar). Estos resultados muestran que un incremento exagerado en los ácidos grasos ω -3 en la dieta durante la lactancia puede predisponer a la descendencia al desarrollo de diabetes en el adulto.

Como se ha revisado recientemente (158), se han realizado varios estudios donde se ha asociado la ingesta de grasas durante la etapa perinatal con el desarrollo posterior de aterosclerosis. De hecho, la leche materna tiene un alto contenido de colesterol, y un tiempo exageradamente largo de lactancia materna se ha relacionado con alteraciones arteriales 20 años más tarde (173). A pesar de estos datos, también hay estudios en los que se ha encontrado un efecto protector de la lactancia materna durante largos periodos sobre el desarrollo de diabetes de tipo 2, dislipidemia y sobrepeso en adultos (174) o en adolescentes (175), por lo que se necesitan estudios más directos que permitan dilucidar sobre los potenciales efectos positivos o negativos a largo plazo de una lactancia materna prolongada.

5. CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

Aunque el conjunto de resultados aquí analizados permite concluir que tanto la cantidad como la calidad de la dieta durante la gestación y la lactancia tienen implicaciones importantes en la salud del adulto, el mecanismo por el que se producen estos efectos no se conoce. Por ello, se necesitan más estudios para, al menos, determinar la ventana de seguridad necesaria para aplicar el suplemento adecuado en cuanto a calidad y cantidad, antes de realizar unas recomendaciones dietéticas descontroladas. En este contexto, es necesario tener en cuenta las importantes consecuencias que tienen las desviaciones dietéticas durante las primeras etapas de la gestación, en las que el crecimiento fetal es muy escaso. En estas primeras etapas de la gestación, además de que el embrión y posteriormente el feto son especialmente sensibles a los cambios que ocurren en la madre, ésta se ha de preparar para afrontar la situación catabólica que se desencadena durante el último tercio, garantizando así el adecuado aporte de nutrientes para el rápido crecimiento del feto.

Después de revisar la bibliografía sobre el tema, y en base a la influencia que tiene el bajo peso al nacer en la incidencia de enfermedades en el adulto,

uno estaría tentado de buscar y aconsejar los alimentos funcionales mas eficaces para garantizar un adecuado crecimiento y desarrollo fetal. Sin embargo, el riesgo de generalizar podría llevar a efectos indeseables, como hemos visto aquí en el caso de suplementos excesivos con determinados LCPUFA, y por ello resulta necesario analizar las circunstancias particulares que permitan establecer los tratamientos dietéticos más apropiados en cada caso.

Los avances tecnológicos permitirán en un futuro monitorizar la situación nutricional y metabólica de la madre antes y durante la gestación, estableciendo las condiciones óptimas de sus depósitos grasos durante la primera fase de la gestación, determinando su respuesta catabólica en el último trimestre, e incluso establecer cómo se afecta el transporte placentario de metabolitos ante cambios en la dieta. Ello nos llevará a establecer regímenes alimenticios que beneficien el correcto desarrollo fetal, evitando alteraciones como la hipercolesterolemia, diabetes gestacional, obesidad, etc., que puedan predisponer a la descendencia a padecer determinadas enfermedades cuando adultos. Es evidente que estas acciones deberán ir precedidas de investigaciones en modelos experimentales apropiados, que permitan extrapolar los resultados al hombre. Cualquier esfuerzo que se realice en esta dirección estará compensado no solo por el avance en el conocimiento de los mecanismos intrínsecos que controlan la «programación fetal» y las consecuencias para el adulto que supone una desviación de la misma, sino por el beneficio que ello supondrá para nuestras futuras generaciones, que estableciendo las pautas nutricionales mas adecuadas durante las fases de gestación y lactancia, podrán disminuir el riesgo de padecer determinadas enfermedades en el adulto.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Barker DJP (1992) *Fetal and infant origins of adult disease*. London: BMJ Publishing Group.
- (2) Fall DHD, Stein CE, Kumaran K *et al.* (1998) Size at birth, maternal weight, and Type 2 diabetes in South India. *Diabetic Medicine* **15**: 220-227.
- (3) Law CM, Egger P, Dada O *et al.* (2001) Body size at birth and blood pressure among children in developing countries. *Int.J.Epidemiol.* **30**: 52-57.
- (4) Osmond C, Barker DJP (2000) Fetal, infant and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ.Health Perspect.* **108**: 545-553.
- (5) Eriksson JG, Forsén T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJP (2001) Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *Br.Med.J.* **322**: 949-953.

- (6) Barker DJP (2004) Fetal origin of adult disease. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH, eds. *Fetal and Neonatal Physiology*. Philadelphia: Saunders, pp. 160-165.
- (7) Lucas A (1998) Programming by early nutrition: an experimental approach. *J.Nutr.* **128**: 401S-406S.
- (8) Herrera E (2002) Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development - A review. *Placenta* **23**: S9-S19.
- (9) Herrera E (2000) Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur.J.Clin.Nutr.* **54, Suppl. 1**: S47-S51.
- (10) Harding JE (2001) The nutritional basis of the fetal origin of adult disease. *Int.J.Epidemiol.* **30**: 15-23.
- (11) Langley SC, Browne RF, Jackson AA (1994) Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets *in utero*. *Comp.Biochem.Physiol.[A]* **109A**: 223-229.
- (12) Vonnahme KA, Hess BW, Hansen TR *et al.* (2003) Maternal undernutrition from early- to mid-gestation leads to growth retardation, cardiac ventricular hypertrophy, and increased liver weight in the fetal sheep. *Biol.Reprod.* **69**: 133-140.
- (13) Herrera E, Palacín M, Martín A, Lasunción MA (1985) Relationship between maternal and fetal fuels and placental glucose transfer in rats with maternal diabetes of varying severity. *Diabetes* **34(Suppl.2)**: 42-46.
- (14) Lasunción MA, Lorenzo J, Palacín M, Herrera E (1987) Maternal factors modulating nutrient transfer to fetus. *Biol.Neonate.* **51**: 86-93.
- (15) Hay WW, Jr. (1994) Placental transport of nutrients to the fetus. *Horm.Res.* **42**: 215-222.
- (16) Knipp GT, Audus KL, Soares MJ (1999) Nutrient transport across the placenta. *Adv Drug Deliv. Rev.* **38**: 41-58.
- (17) Sibley C, Glazier J, D'Souza S (1997) Placental transporter activity and expression in relation to fetal growth. *Exp.Physiol.* **82**: 389-402.
- (18) Herrera E, Lasunción MA (2004) Maternal-fetal transfer of lipid metabolites. In: Polin RA, Fox WW, Abman SH, eds. *Fetal and neonatal physiology*. Philadelphia: W.B.Saunders Co., pp. 375-388.
- (19) Herrera E, Bonet B, Lasunción MA (1998) Maternal-fetal transfer of lipid metabolites. In: Polin RA, Fox WW, eds. *Fetal and neonatal physiology*. Philadelphia: W.B.Saunders Co., pp. 447-458.
- (20) Herrera E (2002) Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development - A review. *Placenta* **23, Suppl. A 16**: S9-S19.

- (21) Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP *et al.* (1997) Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia - Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J.Clin.Invest.* **100**: 2680-2690.
- (22) Napoli C, Witztum JL, Calara F, De Nigris F, Palinski W (2000) Maternal hypercholesterolemia enhances atherogenesis in normocholesterolemic rabbits, which is inhibited by antioxidant or lipid-lowering intervention during pregnancy - An experimental model of atherogenic mechanisms in human fetuses. *Circ.Res.* **87**: 946-952.
- (23) Palinski W, D'Armiento FP, Witztum JL *et al.* (2001) Maternal hypercholesterolemia and treatment during pregnancy influence the long-term progression of atherosclerosis in offspring of rabbits. *Circ.Res.* **89**: 991-996.
- (24) Villar J, Cogswell M, Kestler E, Castillo P, Menendez R, Repke JT (1992) Effect of fat and fat-free mass deposition during pregnancy on birth weight. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **167**: 1344-1352.
- (25) López-Luna P, Muñoz T, Herrera E (1986) Body fat in pregnant rats at mid- and late-gestation. *Life Sci.* **39**: 1389-1393.
- (26) Buch I, Hornnes PJ, Kuhl C (1986) Glucose tolerance in early pregnancy. *Acta Endocrinol.(Copenh)* **112**: 263-266.
- (27) Crombach G, Siebolds M, Mies R (1993) Insulin use in pregnancy—Clinical pharmacokinetic considerations. *Clin.Pharmacokinet.* **24**: 89-100.
- (28) Ramos MP, Crespo-Solans MD, del Campo S, Herrera E (2003) Fat accumulation in the rat during early pregnancy is modulated by enhanced insulin responsiveness. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* **285**: E318-E328.
- (29) Chaves JM, Herrera E (1978) In vitro glycerol metabolism in adipose tissue from fasted pregnant rats. *Biochem.Biophys.Res.Communic.* **85**: 1299-1306.
- (30) Knopp RH, Herrera E, Freinkel N (1970) Carbohydrate metabolism in pregnancy.VIII. Metabolism of adipose tissue isolated from fed and fasted pregnant rats during late gestation. *J.Clin.Invest.* **49**: 1438-1446.
- (31) Martin-Hidalgo A, Holm C, Belfrage P, Schotz MC, Herrera E (1994) Lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activity and mRNA in rat adipose tissue during pregnancy. *Am.J.Physiol.* **266**: E930-E935.
- (32) Catalano PM, Tyzbit ED, Wolfe RR *et al.* (1993) Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* **264**: E60-E67.
- (33) Cousins L (1991) Insulin sensitivity in pregnancy. *Diabetes* **40**: 39-43.

- (34) Muñoz C, López-Luna P, Herrera E (1995) Glucose and insulin tolerance tests in the rat on different days of gestation. *Biol.Neonate* **68**: 282-291.
- (35) Bleicher SJ, O'Sullivan JB, Freinkel N (1964) Carbohydrate metabolism in pregnancy. *N.Engl.J.Med.* **271**: 866-872.
- (36) Herrera E, Knopp RH, Freinkel N (1969) Carbohydrate metabolism in pregnancy VI. Plasma fuels, insulin, liver composition, gluconeogenesis and nitrogen metabolism during gestation in the fed and fasted rat. *J.Clin.Invest.* **48**: 2260-2272.
- (37) Assel B, Rossi K, Kalhan S (1993) Glucose metabolism during fasting through human pregnancy: Comparison of tracer method with respiratory calorimetry. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* **265**: E351-E356.
- (38) Zorzano A, Lasunción MA, Herrera E (1986) Role of the availability of substrates on hepatic and renal gluconeogenesis in the fasted late pregnant rat. *Metabolism* **35**: 297-303.
- (39) Herrera E, Lasunción MA, Palacín M, Zorzano A, Bonet B (1991) Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freinkel era. *Diabetes* **40 Suppl 2**: 83-88.
- (40) Baumann MU, Deborde S, Illsley NP (2002) Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocrine* **19**: 13-22.
- (41) Martín A, Palacín M, Lasunción MA, Herrera E (1990) Fetal/maternal plasma amino acid relationships in the streptozotocin diabetic rat. In: Cuezva JM, Pascual Leone AM, Patel MS, eds. *Endocrine and biochemical development of the fetus and neonate*. New York: Plenum Press, pp. 277-282.
- (42) Silver M, Fowden AL, Taylor PM, Knox J, Hill CM (1994) Blood amino acids in the pregnant mare and fetus: The effects of maternal fasting and intrafetal insulin. *Exp.Physiol.* **79**: 423-433.
- (43) Regnault TRH, De Vrijer B, Battaglia FC (2002) Transport and metabolism of amino acids in placenta. *Endocrine* **19**: 23-41.
- (44) Paolini CL, Marconi AM, Ronzoni S *et al.* (2001) Placental transport of leucine, phenylalanine glycine, and proline in intrauterine growth-restricted pregnancies. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **86**: 5427-5432.
- (45) Palacín M, Lasunción MA, del Rio RM, Herrera E (1985) Placental formation of lactate from transferred L-alanine and its impairment by aminooxyacetate in the late-pregnant rat. *Biochim.Biophys.Acta* **841**: 90-96.
- (46) Hytten FE, Leitch I (1971) *The physiology of human pregnancy*. Oxford: Blackwell Scient Publisher, p 286.
- (47) Alvarez JJ, Montelongo A, Iglesias A, Lasunción MA, Herrera E (1996) Longitudinal study on lipoprotein profile, high density lipoprotein subclass, and postheparin lipases during gestation in women. *J.Lipid Res.* **37**: 299-308.

- (48) Knopp RH, Bonet B, Lasunción MA, Montelongo A, Herrera E (1992) Lipoprotein metabolism in pregnancy . In: Herrera E, Knopp RH, eds. *Perinatal Biochemistry*. Boca Raton: CRC Press, pp. 19-51.
- (49) Herrera E, Lasunción MA, Gomez Coronado D, Aranda P, Lopez Luna P, Maier I (1988) Role of lipoprotein lipase activity on lipoprotein metabolism and the fate of circulating triglycerides in pregnancy . *Am.J.Obstet.Gynecol.* **158**: 1575-1583.
- (50) Lopez Luna P, Maier I, Herrera E (1991) Carcass and tissue fat content in the pregnant rat. *Biol.Neonate.* **60**: 29-38.
- (51) Sohlström A, Kabir N, Sadurskis A, Forsum E (1994) Body composition and fat distribution during the first 2 weeks of gestation in *ad lib.*-fed and energy-restricted rats. *Br.J.Nutr.* **71**: 317-333.
- (52) Murphy SP, Abrams BF (1993) Changes in energy intakes during pregnancy and lactation in a national sample of US women. *Am.J.Public Health* **83**: 1161-1163.
- (53) Piers LS, Diggavi SN, Thangam S, Van Raaij JMA, Shetty PS, Hautvast JGAJ (1995) Changes in energy expenditure, anthropometry, and energy intake during the course of pregnancy and lactation in well-nourished Indian women. *Am.J.Clin.Nutr.* **61**: 501-513.
- (54) Palacín M, Lasunción MA, Asunción M, Herrera E (1991) Circulating metabolite utilization by periuterine adipose tissue in situ in the pregnant rat. *Metabolism* **40**: 534-539.
- (55) Braun JEA, Severson DL (1992) Regulation of synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem.J.* **287**: 337-347.
- (56) Lasunción MA, Herrera E (1983) Changes with starvation in the rat of the lipoprotein lipase activity and hydrolysis of triacylglycerols from triacylglycerol-rich lipoproteins in adipose tissue preparations. *Biochem.J.* **210**: 639-643.
- (57) Otway S, Robinson DS (1968) The significance of changes in tissue clearing-factor lipase activity in relation to the lipaemia of pregnancy . *Biochem.J.* **106**: 677-682.
- (58) Hamosh M, Clary TR, Chernick SS, Scow RO (1970) Lipoprotein lipase activity of adipose and mammary tissue and plasma triglyceride in pregnant and lactating rats. *Biochim.Biophys.Acta* **210**: 473-482.
- (59) Ramirez I, Llobera M, Herrera E (1983) Circulating triacylglycerols, lipoproteins, and tissue lipoprotein lipase activities in rat mothers and of offspring during the perinatal period: effect of postmaturity. *Metabolism* **32**: 333-341.
- (60) Herrera E, Muñoz C, Lopez-Luna P, Ramos P (1994) Carbohydrate-lipid interactions during gestation and their control by insulin. *Brazilian J.Med.Biol.Res.* **27**: 2499-2519.

- (61) Elliott JA (1975) The effect of pregnancy on the control of lipolysis in fat cells isolated from human adipose tissue. *Eur.J.Clin.Invest.* **5**: 159-163.
- (62) Sivan E, Homko CJ, Chen XH, Reece EA, Boden G (1999) Effect of insulin on fat metabolism during and after normal pregnancy. *Diabetes* **48**: 834-838.
- (63) Williams C, Coltart TM (1978) Adipose tissue metabolism in pregnancy: the lipolytic effect of human placental lactogen. *Br.J.Obstet.Gynaecol.* **85**: 43-46.
- (64) Freinkel N, Herrera E, Knopp RH, Ruder HJ (1970) Metabolic realignments in late pregnancy: a clue to diabetogenesis. In: Camarini Davalos R, Cole HS, eds. *Early diabetes*. New York: Academic Press, pp. 205-215.
- (65) Mampel T, Villarroya F, Herrera E (1985) Hepatectomy-nephrectomy effects in the pregnant rat and fetus. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **131**: 1219-1225.
- (66) Ramos P, Herrera E (1995) Reversion of insulin resistance in the rat during late pregnancy by 72-h glucose infusion. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* **269**: E858-E863.
- (67) Chaves JM, Herrera E (1980) In vitro response of glycerol metabolism to insulin and adrenalin in adipose tissue from fed and fasted rats during pregnancy *Biol.Neonate* **38**: 139-145.
- (68) Zorzano A, Herrera E (1984) Liver and kidney cortex gluconeogenesis from L-alanine in fed and starved rats. *Int.J.Biochem.* **16**: 263-267.
- (69) Scow RO, Chernick SS, Brinley MS (1964) Hyperlipemia and ketosis in the pregnant rat. *Am.J.Physiol.* **206**: 796-804.
- (70) Herrera E, Lasunción MA, Martín A, Zorzano A (1992) Carbohydrate-lipid interactions in pregnancy. In: Herrera E, Knopp RH, eds. *Perinatal biochemistry*. Boca Raton: CRC Press, pp. 1-18.
- (71) Alonso de la Torre SR, Serrano MA, Medina JM (1992) Carrier-mediated β -D-hydroxybutyrate transport in brush-border membrane vesicles from rat placenta. *Pediatr.Res.* **32**: 317-323.
- (72) Herrera E, Gomez Coronado D, Lasunción MA (1987) Lipid metabolism in pregnancy. *Biol.Neonate.* **51**: 70-77.
- (73) Shambaugh GE, III, Metzger BE, Radosevich JA (1992) Nutrient metabolism and fetal brain development. In: Herrera E, Knopp RH, eds. *Perinatal biochemistry*. Boca Raton: CRC Press, pp. 213-231.
- (74) Patel MS, Johnson CA, Ratan R, Owen DE (1975) The metabolism of ketone bodies in developing human brain: development of ketone-body utilizing enzymes and ketone bodies as precursors for lipid synthesis. *J.Neurochem.* **25**: 905-908.
- (75) Wasfi I, Weinstein I, Heimberg M (1980) Increased formation of triglyceride from oleate in perfused livers from pregnant rats. *Endocrinology* **107**: 584-596.

- (76) Wasfi I, Weinstein I, Heimberg M (1980) Hepatic metabolism of [1-¹⁴C]oleate in pregnancy. *Biochim.Biophys.Acta* **619**: 471-481.
- (77) Iglesias A, Montelongo A, Herrera E, Lasunción MA (1994) Changes in cholesterol ester transfer protein activity during normal gestation and postpartum. *Clin.Biochem.* **27**: 63-68.
- (78) Montelongo A, Lasunción MA, Pallardo LF, Herrera E (1992) Longitudinal study of plasma lipoproteins and hormones during pregnancy in normal and diabetic women. *Diabetes* **41**: 1651-1659.
- (79) Szitanyi P, Koletzko B, Mydlilova A, Demmelmair H (1999) Metabolism of ¹³C-labeled linoleic acid in newborn infants during the first week of life. *Pediatr.Res.* **45**: 669-673.
- (80) Herrera E (2002) Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine* **19**: 43-55.
- (81) Alsat E, Bouali Y, Goldstein S, Malassine A, Laudat MH, Cedard L (1982) Characterization of specific low-density lipoprotein binding sites in human term placental microvillous membranes. *Mol.Cell Endocrinol.* **28**: 439-453.
- (82) Alsat E, Bouali Y, Goldstein S *et al.* (1984) Low-density lipoprotein binding sites in the microvillous membranes of human placenta at different stages of gestation. *Mol.Cell Endocrinol.* **38**: 197-203.
- (83) Cummings SW, Hatley W, Simpson ER, Ohashi M (1982) The binding of high and low density lipoproteins to human placental membrane fractions. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **54**: 903-908.
- (84) Furuhashi M, Seo H, Mizutani S, Narita O, Tomoda Y, Matsui N (1989) Expression of low density lipoprotein receptor gene in human placenta during pregnancy. *Mol.Endocrinol.* **3**: 1252-1256.
- (85) Henson MC, Pepe GJ, Albrecht ED (1992) Developmental increase in placental low density lipoprotein uptake during baboon pregnancy. *Endocrinology* **130**: 1698-1706.
- (86) Malassine A, Besse C, Roche A *et al.* (1987) Ultrastructural visualization of the internalization of low density lipoprotein by human placental cells. *Histochemistry* **87**: 457-464.
- (87) Bonet B, Brunzell JD, Gown AM, Knopp RH (1992) Metabolism of very-low-density lipoprotein triglyceride by human placental cells: the role of lipoprotein lipase. *Metabolism* **41**: 596-603.
- (88) Elphick MC, Hull D (1977) Rabbit placental clearing-factor lipase and transfer to the foetus of fatty acids derived from triglycerides injected into the mother. *J.Physiol.(Lond)* **273**: 475-487.

- (89) Rotherwell JE, Elphick MC (1982) Lipoprotein lipase activity in human and guinea pig placenta. *J.Dev.Physiol.* **4**: 153-159.
- (90) Farrugia W, Aitken MA, Van Dunné F *et al.* (1993) Type II phospholipase A₂ in human gestational tissues: Subcellular distribution of placental immuno- and catalytic activity. *Biochim.Biophys.Acta Lipids Lipid Metab.* **1166**: 77-83.
- (91) Rice GE, Wong MH, Farrugia W, Scott KF (1998) Contribution of type II phospholipase A₂ to *in vitro* phospholipase A₂ enzymatic activity in human term placenta. *J.Endocrinol.* **157**: 25-31.
- (92) Biale Y (1985) Lipolytic activity in the placentas of chronically deprived fetuses. *Acta Obstet.Gynecol.Scand.* **64**: 111-114.
- (93) Kaminsky S, D'Souza SW, Massey RF, Smart JL, Sibley CP (1991) Effects of maternal undernutrition and uterine artery ligation on placental lipase activities in the rat. *Biol.Neonate.* **60**: 201-206.
- (94) Mochizuki M, Morikawa H, Ohga Y, Tojo S (1975) Lipolytic action of human chorionic somatomammotropin. *Endocrinol.Jpn.* **22**: 123-129.
- (95) Hrab RV, Hartman HA, Cox RH, Jr. (1994) Prevention of fluvastatin-induced toxicity, mortality, and cardiac myopathy in pregnant rats by mevalonic acid supplementation. *Teratology* **50**: 19-26.
- (96) Soria A, Bocos C, Herrera E (2002) Opposite metabolic response to fenofibrate treatment in pregnant and virgin rats. *J.Lipid Res.* **43**: 74-81.
- (97) Campbell FM, Gordon MJ, Dutta-Roy AK (1996) Preferential uptake of long chain polyunsaturated fatty acids by isolated human placental membranes. *Mol.Cell.Biochem.* **155**: 77-83.
- (98) Campbell FM, Gordon MJ, Dutta-Roy AK (2000) Plasma membrane fatty acid binding protein from human placenta: identification and characterization. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **209**: 1011-1017.
- (99) Haggarty P, Page K, Abramovich DR, Ashton J, Brown D (1997) Long-chain polyunsaturated fatty acid transport across the perfused human placenta. *Placenta* **18**: 635-642.
- (100) Kuhn DC, Crawford M (1986) Placental essential fatty acid transport and prostaglandin synthesis. *Prog.Lipid Res.* **25**: 345-253.
- (101) Shand JH, Noble RC (1985) Incorporation of linoleic and arachidonic acids into ovine placental phospholipids *in vitro*. *Biol.Neonate* **48**: 299-306.
- (102) Zimmermann T, Hummel L, Möllr U, Kinzl U (1979) Oxidation and synthesis of fatty acids in human and rat placental and fetal tissues. *Biol.Neonate* **36**: 109-112.

- (103) Tulenko TN, Rabinowitz JL (1981) Fatty acid metabolism in human fetal placental vasculature. *Am.J.Physiol.* **240**: E65-E71.
- (104) Crawford MA, Hassan AG, Williams G, Whitehouse WL (1976) Essential fatty acids and fetal brain growth. *Lancet* **i**: 452-453.
- (105) Herrera E, Ortega H, Gioia L, Amusquivar E, Cetin I (2004) Fatty acids profile and antioxidant vitamins along pregnancy in healthy women. *Eur .J.Clin.Nutr.* **58**, 1231-1238.
- (106) Chevallier F (1964) Transferts et synthese du cholesterol chez le rat au cours de sa croissance. *Biochim.Biophys.Acta.* **84**: 316-319.
- (107) Connor WE, Lin DS (1967) Placental transfer of cholesterol-4-14C into rabbit and guinea pig fetus. *J.Lipid Res.* **8**: 558-564.
- (108) Pitkin RM, Connor WE, Lin DS (1972) Cholesterol metabolism and placental transfer in the pregnant rhesus monkey . *J.Clin.Invest.* **51**: 2584-2592.
- (109) Yount NY, McNamara DJ (1991) Dietary regulation of maternal and fetal cholesterol metabolism in the guinea pig. *Biochim.Biophys.Acta* **1085**: 82-90.
- (110) Belknap WM, Dietschy JM (1988) Sterol synthesis and low density lipoprotein clearance in vivo in the pregnant rat, placenta, and fetus. Sources for tissue cholesterol during fetal development. *J.Clin.Invest.* **82**: 2077-2085.
- (111) Woollett LA (1996) Origin of cholesterol in the fetal Golden Syrian hamster: Contribution of de novo sterol synthesis and maternal- derived lipoprotein cholesterol. *J.Lipid Res.* **37**: 1246-1257.
- (112) Jurevics HA, Kidwai FZ, Morell P (1997) Sources of cholesterol during development of the rat fetus and fetal organs. *J.Lipid Res.* **38**: 723-733.
- (113) Haave NC, Innis SM (2001) Cholesterol synthesis and accretion within various tissues of the fetal and neonatal rat. *Metabolism* **50**: 12-18.
- (114) Ortega RM, Gaspar MJ, Cantero M (1996) Influence of maternal serum lipids and maternal diet during the third trimester of pregnancy on umbilical cord blood lipids in two populations of Spanish newborns. *J.Vitam.Nutr.Res.* **66**: 250-257.
- (115) Nakai T, et al. (1981) Plasma lipids and lipoproteins of Japanese adults and umbilical cord blood. *Artery* **9**: 132-150.
- (116) Parker CR, Jr., Deahl T, Drewry P, Hankins G (1983) Analysis of the potential for transfer of lipoprotein- cholesterol across the human placenta. *Early Hum.Dev.* **8**: 289-295.
- (117) Devi CS, Sastry BS, Kumar M, Raju GR, Suryaprabha K (1982) Concentration of triglyceride and cholesterol in lipoprotein fractions in maternal and cord blood samples. *Clin.Chim.Acta* **123**: 169-173.

- (118) Neary RH, Kilby MD, Kumputula P *et al.* (1995) Fetal and maternal lipoprotein metabolism in human pregnancy. *Clin.Sci.* **88**: 311-318.
- (119) Ramon y Cajal J, Pocovi M, Romero MA, Jimenez D, Martinez J, Grande F (1988) Plasma lipids and high density lipoprotein cholesterol in maternal and umbilical vessels in twin pregnancies. *Artery* **15**: 109-117.
- (120) Jumpson J, Van Aerde J, Clandinin MT (1997) Fetal lipid requirements: implications in fetal growth retardation. In: Battaglia FC, ed. *Placental function and fetal nutrition*. Philadelphia: Nesttec Ltd., Vevey/Lippincott-Raven Publ., pp. 157-165.
- (121) Crastes de Paulet P, Sarda P, Boulot P, Crastes de Paulet A (1992) Fatty acids blood composition in foetal and maternal plasma. In: Ghisolfi J, Putet G, eds. *Essential fatty acids and infant nutrition*. Paris: John Libbey Eurotext, pp. 65-77.
- (122) Al MDM, Hornstra G, Van der Schouw YT, Bulstra-Ramakers MTEW, Huisjes HJ (1990) Biochemical EF A status of mothers and their neonates after normal pregnancy. *Early Hum.Dev.* **24**: 239-248.
- (123) Matorras R, Perteagudo L, Sanjurjo P, Ruiz JI (1999) Intake of long chain w3 polyunsaturated fatty acids during pregnancy and the influence of levels in the mother on newborn levels. *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.* **83**: 179-184.
- (124) Van Houwelingen AC, Sorensen JD, Hornstra G *et al.* (1995) Essential fatty acid status in neonates after fish-oil supplementation during late pregnancy. *Br.J.Nutr.* **74**: 723-731.
- (125) Connor WE, Lowensohn R, Hatcher L (1996) Increased docosahexaenoic acid levels in human newborn infants by administration of sardines and fish oil during pregnancy. *Lipids* **31**: S183-S187.
- (126) Uauy-Dagach R, Mena P (1995) Nutritional role of omega-3 fatty acids during the perinatal period. *Clin.Perinatol.* **22**: 157-175.
- (127) Amusquivar E, Rupérez FJ, Barbas C, Herrera E (2000) Low arachidonic acid rather than α -tocopherol is responsible for the delayed postnatal development in offspring of rats fed fish oil instead of olive oil during pregnancy and lactation. *J.Nutr.* **130**: 2855-2865.
- (128) Garg ML, Thomson ABR, Clandinin MT (1990) Interactions of saturated, n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids to modulate arachidonic acid metabolism. *J.Lipid Res.* **31**: 271-277.
- (129) Raz A, Kamin-Belsky N, Przeddecki F, Obukowicz MG (1997) Fish oil inhibits delta6 desaturase activity in vivo: utility in a dietary paradigm to obtain mice depleted of arachidonic acid. *J.Nutr.Biochem.* **8**: 558-565.

- (130) Koletzko B, Braun M (1991) Arachidonic acid and early human growth: Is there a relation? *Ann.Nutr.Metab.* **35**: 128-131.
- (131) Leaf AA, Leighfield MJ, Costeloe KL, Crawford MA (1992) Factors affecting long-chain polyunsaturated fatty acid composition of plasma choline phosphoglycerides in preterm infants. *J.Pediatr.Gastroent.Nutr.* **14**: 300-308.
- (132) Woltil HA, Van Beusekom CM, Schaafsma A, Muskiet F AJ, Okken A (1998) Long-chain polyunsaturated fatty acid status and early growth of low birth weight infants. *Eur.J.Pediatr.* **157**: 146-152.
- (133) Carlson SE, Cooke RJ, Rhodes PG, Peeples JM, Werkman SH, Tolley EA (1991) Long-term feeding of formulas high in linolenic acid and marine oil to very low birth weight infants: phospholipid fatty acids. *Pediatr.Res.* **30**: 404-412.
- (134) Carlson SE, Werkman SH, Pepples JM (1993) Arachidonic acid status correlates with first year growth in preterm infants. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **90**: 1073-1077.
- (135) Reaven P, Grasse BJ, Tribble DL (1994) Effects of linoleate-enriched and oleate-enriched diets in combination with alpha-tocopherol on the susceptibility of LDL and LDL subfractions to oxidative modification in human. *Arterioscler.Thromb.* **14**: 557-566.
- (136) Abbey M, Belling GB, Noakes M, Hirata F, Nestel PJ (1993) Oxidation of low-density lipoproteins: Intraindividual variability and the effect of dietary linoleate supplementation. *Am.J.Clin.Nutr.* **57**: 391-398.
- (137) Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Steinberg D, Witztum JL (1993) Effects of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects. *J.Clin.Invest.* **91**: 668-676.
- (138) Berry EM, Eisenberg S, Haratz D *et al.* (1991) Effects of diets rich in monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins - the Jerusalem Nutrition Study: high MUFAs vs high PUFAs. *Am.J.Clin.Nutr.* **53**: 899-907.
- (139) Cho S-H, Choi Y (1994) Lipid peroxidation and antioxidant status is affected by different vitamin E levels when feeding fish oil. *Lipids* **29**: 47-52.
- (140) Haeghele AD, Briggs SP, Thompson HJ (1994) Antioxidant status and dietary lipid unsaturation modulate oxidative DNA damage. *Free Radic.Biol.Med.* **16**: 111-115.
- (141) Mazière C, Dantin F, Conte MA *et al.* (1998) Polyunsaturated fatty acid enrichment enhances endothelial cell-induced low-density-lipoprotein peroxidation. *Biochem.J.* **336**: 57-62.
- (142) Song JH, Fujimoto K, Miyazawa T (2000) Polyunsaturated (n-3) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid-containing oils. *J.Nutr.* **130**: 3028-3033.

- (143) Viana M, Herrera E, Bonet B (1996) Teratogenic effects of diabetes mellitus in the rat. Prevention by vitamin E. *Diabetologia* **39**: 1041-1046.
- (144) Eriksson UJ, Bor g LAH (1991) Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations in vitro. *Diabetologia* **34**: 325-331.
- (145) Simán CM, Eriksson UJ (1997) Vitamin E decreases the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats. *Diabetes* **46**: 1054-1061.
- (146) Reece EA, Wu YK (1997) Prevention of diabetic embryopathy in offspring of diabetic rats with use of a cocktail of deficient substrates and an antioxidant. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **176**: 790-797.
- (147) Wentzel P, Welsh N, Eriksson UJ (1999) Developmental damage, increased lipid peroxidation, diminished cyclooxygenase-2 gene expression, and lower PGE2 levels in rat embryos exposed to a diabetic environment. *Diabetes* **48**: 813-820.
- (148) Cederberg J, Eriksson UJ (2001) Increased rate of lipid peroxidation and protein carbonylation in experimental diabetic pregnancy. *Diabetologia* **44**: 766-774.
- (149) Viana M, Castro M, Barbas C, Herrera E, Bonet B (2003) Effect of different doses of vitamin E on the incidence of malformations in pregnant diabetic rats. *Ann.Nutr.Metab.* **47**: 6-10.
- (150) Barker DJP (1993) Fetal origins of coronary heart disease. *Br.Heart J.* **69**: 195-196.
- (151) Barker DJP, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS (1993) Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* **341**: 938-941.
- (152) Couzin J (2002) Quirks of fetal environment felt decades later. *Science* **296**: 2167-2069.
- (153) Ozanne SE, Nave BT, Wang CL, Shepherd PR, Prins J, Smith GD (1997) Poor fetal nutrition causes long-term changes in expression of insulin signaling components in adipocytes. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* **273**: E46-E51.
- (154) Ozanne SE, Hales CN (2002) Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends Endocrinol.Metab.* **13**: 368-373.
- (155) Petry CJ, Ozanne SE, Hales CN (2001) Programming of intermediary metabolism. *Mol.Cell.Endocrinol.* **185**: 81-91.
- (156) Roseboom TJ, Van der Meulen JHP, Osmond C, Barker DJP, Ravelli ACJ, Bleker OP (2000) Plasma lipid profiles in adults after prenatal exposure to the Dutch famine. *Am.J.Clin.Nutr.* **72**: 1101-1106.
- (157) Shiell AW, Campbell DM, Hall MH, Barker DJP (2000) Diet in late pregnancy and glucose-insulin metabolism of the offspring 40 years later. *Br.J.Obstet.Gynaecol.* **107**: 890-895.

- (158) Viikari JSA, Raitakari OT, Simell O (2002) Nutritional influences on lipids and future atherosclerosis beginning prenatally and during childhood. *Curr.Opin.Lipidol.* **13**: 11-18.
- (159) Barker DJ (1999) Fetal origins of cardiovascular disease. *Ann.Med.* **31 (Suppl. 1)**: 3-6.
- (160) Rasmussen KM (2001) The «fetal origins» hypothesis: challenges and opportunities for maternal and child nutrition. *Annu.Rev.Nutr.* **21**: 73-95.
- (161) Palinski W, Napoli C (2002) The fetal origins of atherosclerosis: maternal hypercholesterolemia, and cholesterol-lowering or antioxidant treatment during pregnancy influence in utero programming and postnatal susceptibility to atherogenesis. *FASEB J.* **16**: 1348-1360.
- (162) Bonet B, Herrera E (1988) Different response to maternal hypothyroidism during the first and second half of gestation in the rat. *Endocrinology* **122**: 450-455.
- (163) Bonet B, Herrera E (1991) Maternal hypothyroidism during the first half of gestation compromises normal catabolic adaptations of late gestation in the rat. *Endocrinology* **129**: 210-216.
- (164) Herrera E, López-Soldado I, Limones M, Amusquivar E, Ramos MP (2005) Lipid metabolism during the perinatal phase, and its implications on postnatal development. *Int.J.Vitam.Nutr.Res.* In press.
- (165) Holness MJ (1996) Impact of early growth retardation on gluco-regulatory control and insulin action in mature rats. *Am.J.Physiol.* **270**: E946-E954.
- (166) Shepherd PR, Crowther N, Desai M, Hales CN (1997) Altered adipocyte properties in the offspring of protein malnourished rats. *Br.J.Nutr.* **78**: 121-129.
- (167) Petry CJ, Ozanne SE, Wang CL, Hales CN (1997) Early protein restriction and obesity independently induce hypertension in year old rats. *Clin.Sci.* **93**: 147-152.
- (168) Petry CJ, Dorling MW, Pawlak DB, Ozanne SE, Hales CN (2001) Diabetes in old male offspring of rat dams fed a reduced protein diet. *Int.J.Exp.Diabetes Res.* **2**: 139-143.
- (169) Munilla MA, Herrera E (1997) A cholesterol-rich diet causes a greater hypercholesterolemic response in pregnant than in nonpregnant rats and does not modify fetal lipoprotein profile. *J.Nutr.* **127**: 2239-2245.
- (170) Chait A, Brazg RL, Tribble DL, Krauss RM (1993) Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. *Am.J.Med.* **94**: 350-356.
- (171) Napoli C, Ambrosio G, Scarpato N *et al.* (1997) Decreased low-density lipoprotein oxidation after repeated selective apheresis in homozygous familial hypercholesterolemia. *Am.Heart J.* **133**: 585-595.

- (172) Reilly MP, Praticó D, Delanty N *et al.* (1998) Increased formation of distinct F₂ isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation* **98**: 2822-2828.
- (173) Leeson CP, Kattenhorn M, Deanfield JE, Lucas A (2001) Duration of breast-feeding and arterial distensibility in early adult life: population based study *Br.Med.J.* **322**: 643-647.
- (174) Ravelli AC, van der Meulen JH, Osmond C, et al. (2000) Infant feeding and adult glucose tolerance, lipid profile, blood pressure, and obesity. *Arch.Dis.Child.* **82**: 248-252.
- (175) Gillman MW, Rifas-Siman SL, Camargo CA (2001) Risk of overweight among adolescents who were breastfed as infants. *JAMA* **285**: 2461-2467.

Alteraciones del desarrollo postnatal del cerebro. Prematuridad y daño hipóxico-isquémico

JOSÉ MARÍA MEDINA JIMÉNEZ

En la especie humana gran parte del desarrollo del SNC tiene lugar después del nacimiento. Este hecho pone de manifiesto que el correcto funcionamiento del metabolismo durante el periodo perinatal es crítico para que el desarrollo del cerebro se lleve a cabo en el *tempus* y el *tempo* adecuados. Por consiguiente, cualquier alteración patológica que tenga lugar durante este periodo puede incidir desfavorablemente en el desarrollo normal del cerebro del recién nacido, causando secuelas irreversibles. En este trabajo revisaremos las causas no genéticas más frecuentes que conducen a la alteración del desarrollo del cerebro y, particularmente, las relacionadas con el proceso hipóxico-isquémico.

1. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO

Cuando Ramón y Cajal dio a conocer su trascendental descubrimiento de la discontinuidad de las fibras nerviosas, el de la solución de continuidad que supone la sinapsis, estableció los fundamentos de la estructura del Sistema Nervioso. Sin embargo, este hallazgo ha postergado a un innecesario segundo plano su descubrimiento más apreciado hoy en día, es decir, la descripción de las pautas por las que se lleva a cabo el desarrollo del Sistema Nervioso. En efecto, Ramón y Cajal realizó de manera casi sincrónica ambos descubrimientos, es decir, el de la estructura del Sistema Nervioso y el camino escogido por la Naturaleza para su desarrollo. Así, con objeto de disminuir la complejidad de su preparación histológica escogió estructuras centrales inmaduras puesto que, como pensaba acertadamente, lo primitivo adolece de estructura final y, por consiguiente, de ello puede deducirse el principio de donde coagular su complejidad final. De esta manera, los centros inmaduros de embrión de pollo no sólo le permitieron deducir la estructura discreta de las neuronas, sino que le permitieron

sentar las bases del desarrollo del Sistema Nervioso. De hecho, describió el desarrollo laminar del córtex, así como la migración dirigida de las neuronas.

Para entender en su conjunto el origen y desarrollo del SN es necesario comenzar por el embrión, porque es durante la fase embrionaria cuando se diseña un detallado esquema del Sistema Nervioso, que se perfilará durante el desarrollo fetal para, durante el periodo perinatal, terminar definitivamente de «amueblarse» con extraordinaria precisión.

1.1. Formación del tubo neural

Cuando la gastrulación del embrión se completa, una parte del mesodermo dorsal, denominado «organizador de Spemann» o nódulo de Hensen, induce a una parte cercana del ectodermo a convertirse en neuroepitelio, el cual dará posteriormente origen al tubo neural y, finalmente, al Sistema Nervioso. De hecho, la formación del neuroepitelio comienza con la activación del mesodermo para convertirse en ectodermo, proceso que se induce por la actividad, un factor de crecimiento de la familia de los PGFs («polypeptide-growth factors»). Las células ectodérmicas producen a su vez unos factores de crecimiento de la propia familia PGF, denominados BMF-2 y BMF-4 («bone morphogenic factors»), que inducen la transformación del ectodermo en epidermis. Sin embargo, el «organizador de Spemann» segrega folistatina, noggina y cordina, que contrarrestan específicamente los efectos de los BMF-2 y BMF-4, permitiendo que la zona ectodérmica cercana al organizador se convierta en neuroepitelio.

En el estado de blástula el mesodermo sufre una invaginación a partir del labio del blastoporo, de manera que el organizador se coloca debajo del ectodermo proximal, es decir, aquél que va a convertirse en neuroepitelio. La proa de esta invaginación se convertirá en telencéfalo, mientras que el mesodermo posterior lo hará en mesencéfalo, romboencéfalo y espina dorsal. De esta manera, el neuroepitelio forma la placa neural, que comienza a doblarse en sitios específicos para cerrarse en forma de tubo gracias al reconocimiento entre sí de las diferentes cadherinas. Durante el desarrollo embrionario, el tubo neural está formado por una sola capa de células, que permanece más o menos estable hasta que el tubo neural se ha diferenciado en el «tubo neural en cinco vesículas», que muestra ya lo que serán las partes futuras del Sistema Nervioso. Llegado este momento se inicia la proliferación celular del neuroepitelio, comenzando por la zona más cercana al ventrículo, es decir, la denominada zona ventricular.

En un principio, el neuroepitelio está formado por una sola clase de células alargadas que, en un momento dado, retraen sus procesos hacia la zona ventricular, donde entran en el ciclo celular. Las primeras células en diferenciarse son las células gliales radiales, que extienden sus procesos perpendiculares a la superficie del neuroepitelio, a la que finalmente alcanzan. De esta manera extienden sus procesos en toda la anchura del neuroepitelio, constituyendo el «andamio» por el que las neuronas van a trepar en busca de destinos más lejanos. En efecto, las neuronas primordiales se disponen en estratos y comienzan a avanzar hacia la superficie del neuroepitelio trepando por los procesos de las células gliales radiales para, finalmente, constituir las diversas capas en las que se distribuyen las células del córtex.

Uno de los fenómenos más importantes en el desarrollo del Sistema Nervioso es el de la migración neuronal, puesto que este fenómeno es el responsable, en definitiva, de la arquitectura del Sistema Nervioso. Un hecho fundamental dentro de la migración radial es que cuanto más jóvenes sean las neuronas más lejano será su lugar de residencia definitivo, de manera que las primeras que salen de la zona germinal (ventricular) ocupan los lugares más cercanos, mientras que las que se generan posteriormente alcanzan estratos más externos. Sin embargo, el andamio glial es permisivo y no instructivo, es decir, las células gliales radiales permiten la migración de las neuronas pero no determinan ni su lugar de residencia ni sus características fenotípicas. De hecho, podemos concebir el proceso de diferenciación neuronal en dos pasos. Primero se iniciaría la proliferación de células progenitoras no comprometidas que, al alcanzar su penúltimo ciclo celular, reciben la señal que las conduce a su lugar de destino (revisado en ref. 1). Más tarde, una vez en su lugar de residencia, se produciría la diferenciación definitiva. Así, la formación de las capas de la corteza cerebral está condicionada por los estratos previamente existentes. En este sentido, cada célula diferenciada liberaría los factores neurotróficos necesarios para la diferenciación de la siguiente capa, generándose un gradiente de factores que pondrían en funcionamiento la expresión de conjuntos de genes («subrutinas») que originarían las características tópicas y fenotípicas propias de cada capa (revisado en ref. 2)

1.2. Desarrollo postnatal del cerebro humano

El cerebro del recién nacido humano sigue su crecimiento durante el período postnatal, multiplicando por cuatro su peso debido a la proliferación neuronal y glial, con el correspondiente crecimiento de axones, dendritas y proce-

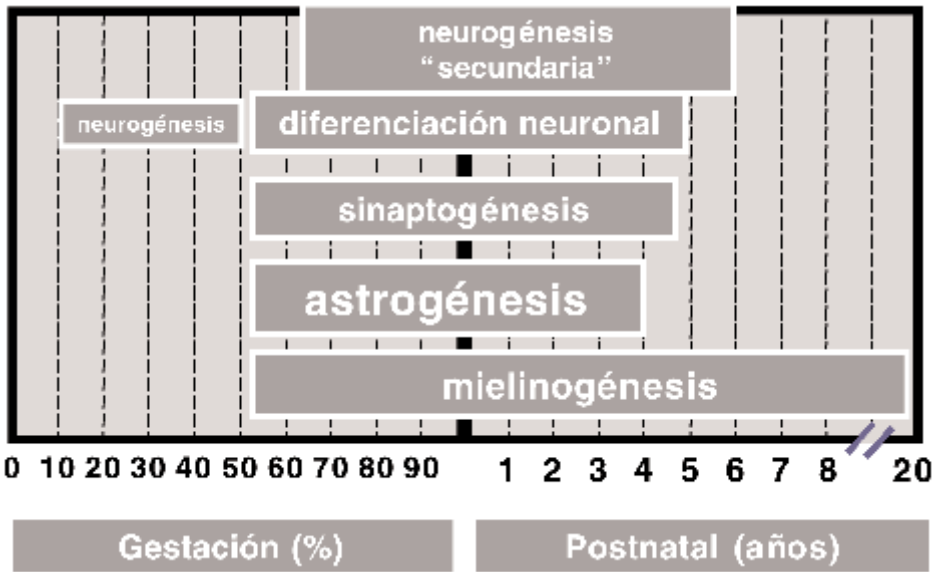


FIGURA 1. Diferenciación celular del Sistema Nervioso en el hombre. Nótese la existencia de una neurogénesis secundaria que tiene lugar durante el periodo perinatal, prolongándose después del nacimiento hasta los 6 años de vida. Ésta es una característica de la especie humana, en la que gran parte del desarrollo del SNC tiene lugar durante la vida extrauterina.

los gliales (Fig. 1). En efecto, durante los dos primeros años ocurren los mayores avances en la estructura del SNC, pues aunque los surcos y los giros son visibles en el momento del nacimiento, éstos aún están inmaduros en cuanto a sus interconexiones. Es más, la apariencia del cerebro del adulto se alcanza a los 2 años, mientras que el volumen de la materia gris aumenta rápidamente hasta los cuatro años y sólo a los tres años son visibles todas las fibras nerviosas. Asimismo, la mielinización es un proceso eminentemente postnatal, contribuyendo muy sensiblemente al aumento de volumen y peso del cerebro del neonato. Este crecimiento se corresponde con un aumento del volumen del cráneo, a la vez que el aumento de las circunvoluciones cerebrales aprovecha eficientemente el espacio disponible. En efecto, en la etapa postnatal, concretamente durante el primer año, se desarrollan totalmente los denominados surcos terciarios, circunvoluciones cerebrales que han aparecido durante los dos últimos meses de la gestación (3).

En el momento del nacimiento en el hombre, la mayor parte de las neuronas han migrado a sus correspondientes localizaciones. Sin embargo, la subplaca está aún muy activa en el córtex frontal del recién nacido, particularmente en las re-

giones opercular y prefrontal. En este sentido, sus neuronas, grandes y polimórficas, continúan su diferenciación durante el periodo postnatal inmediato, aunque desaparecen pasados seis meses. Esta es la neurogénesis «secundaria», llamada así porque tiene lugar en la segunda fase de proliferación neuronal y , en el hombre, tiene lugar durante el período postnatal. De hecho, durante la neurogénesis postnatal se genera un importante número de poblaciones neuronales de gran importancia en el desarrollo final del SNC. La proliferación neuronal secundaria se lleva a cabo en las denominadas «zonas germinales secundarias», áreas del cerebro y del cerebelo que continúan generando neuronas hasta el segundo año de vida. En el recién nacido, la corteza cerebral está limitada en su extremo inferior por la materia blanca, que excepcionalmente se interrumpe por las zonas germinales secundarias, que por su situación próxima al ventrículo y bajo el resto de la corteza se denominan «zonas subventriculares» (4). En el caso del cerebelo, estos núcleos o zonas compactas están situadas cercanas al labio rómbico, siendo la migración de las nuevas neuronas de carácter centrípeto y no centrífugo, es decir , siguiendo un comportamiento similar a las neuronas «primarias». En estas zonas del cerebro y del cerebelo la neurogénesis y la gliogénesis continúan durante el período postnatal. En el cerebro, la zonas subventriculares dan origen a neuronas que emigran al bulbo olfatorio o forman las células granulares del hipocampo, aunque también se forman células gliales de la corteza. En el cerebelo, las zonas germinales subventriculares dan lugar a interneuronas, mientras que las del labio rómbico generan células granulares, que formarán la capa granular interna del cerebelo. Las neuronas «secundarias» generadas en esta segunda fase se intercalan en las estructuras ya existentes creadas durante la neurogénesis primaria, completando así la compleja estructura del SNC. Es necesario mencionar que algunas neuronas parecidas a las de la subplaca germinal permanecen debajo de la capa IV y sobre la materia blanca durante la vida adulta, posiblemente hasta los 26 años.

El crecimiento postnatal del número de neuronas (Fig. 1) tiene lugar principalmente en el córtex donde, dependiendo de las zonas, el crecimiento neuronal continúa hasta los cinco meses, como en el caso de la corteza visual, o hasta los siete años, como en el córtex frontal (4). La proliferación neuronal se acompaña del crecimiento de las dendritas, lo que indica que la diferenciación sigue a la proliferación. Así, el número de espinas dendríticas aumenta en la corteza visual hasta los cinco meses, coincidiendo con la neurogénesis. De hecho, el número de sinapsis crece exponencialmente tras el nacimiento, multiplicándose por dos entre el segundo mes y el final del primer año. Asimismo, el consumo de glucosa, un excelente índice del metabolismo energético, aumenta significativamente hasta el cuarto año, lo que refleja el esfuerzo sinaptogénico que se lleva a cabo durante este periodo (revisado en ref. 5).

En este sentido, la captación de glucosa es un excelente índice del desarrollo cerebral. Así, en el córtex sensoriomotor, tálamo, bulbo raquídeo y vermis cerebelar la captación de glucosa es muy elevada a las 5 semanas después del nacimiento. Más tarde, a los 3 meses, aumenta en el córtex parietal, temporal y occipital, así como en el ganglio basal y en el córtex cerebelar. A partir de este momento la captación de glucosa decrece, hasta alcanzar el nivel basal del adulto en reposo a los 9 años (revisado en ref. 5).

En cuanto a la sinaptogénesis, aunque principalmente postnatal, transcurre con ritmo diferente según las zonas cerebrales. Así, existe una fuerte sinaptogénesis perinatal en todas las áreas del córtex, aunque en el córtex visual el incremento de la sinaptogénesis tiene lugar entre los 3 y los 4 meses, alcanzando el máximo (150% del adulto) entre los 4 y los 12 meses. En el córtex prefrontal, sin embargo, aunque la sinaptogénesis comienza al tiempo que en el visual, alcanza su máximo el final del 1 año. A partir de este momento, sigue aumentando en ambas áreas, descendiendo a los niveles de adulto al final de la niñez (revisado en ref. 5). Incluso los receptores de los neurotransmisores parecen adaptarse a esta plasticidad neuronal del recién nacido. Así, el receptor de glutamato de tipo NMDA posee subunidades diferentes a las del adulto, que le confieren una mayor sensibilidad, por lo que puede permanecer abierto durante largos periodos (6).

Finalmente, la mayor parte de la mielinización tiene lugar durante el período perinatal. Así, en el momento del nacimiento comienza en el puente y en los pedúnculos cerebelares y a los 3 meses se ha extendido por las ramificaciones ópticas y por el esplenio del cuerpo calloso (revisado en ref. 5).

2. VULNERABILIDAD BIOQUÍMICA DEL NEONATO PREMATURO

Para intentar objetivar bioquímicamente las causas de la vulnerabilidad metabólica del recién nacido prematuro, buscamos un modelo experimental que se ajustase en lo posible a la situación real en el neonato humano. Como sabemos, la rata presenta las suficientes similitudes metabólicas y de desarrollo cerebral como para constituir un excelente modelo para estudiar la adaptación del recién nacido a la vida extrauterina. Así, después de numerosos ensayos pudimos encontrar el momento adecuado en que, interrumpida la gestación, se consigue un neonato prematuro de rata (7, 8). El modelo perfeccionado (9, 10) demostró que mimetiza con extraordinaria fidelidad todo aquello que ocurre en el recién nacido prematuro de la especie humana.

2.1. Prematuridad y mortalidad postnatal

Con el perfeccionamiento del manejo y cuidado del neonato prematuro ha disminuido considerablemente la incidencia de la mortalidad en este grupo de neonatos. Sin embargo, los neonatos prematuros siguen constituyendo, aún hoy, un grupo de alto riesgo de mortalidad postnatal. Consideramos, pues, muy interesante observar la mortalidad en nuestro modelo de prematuridad en rata, puesto que en él se obvian muchas de las subjetividades y modificaciones que inciden sobre los cálculos realizados en la especie humana. En este sentido, la mortalidad postnatal del neonato de rata a término es muy baja (Fig. 2), aunque significativa, en el momento del nacimiento, desapareciendo prácticamente una vez transcurrido el «ayuno postnatal» (ver ref. 11). Sin embargo, los neonatos de rata nacidos prematuramente (un día antes del término de la gestación), muestran una mortalidad diez veces mayor en el momento del nacimiento (Fig. 2). Por consiguiente, el neonato prematuro es muy vulnerable en el momento del nacimiento, aunque pasado el ayuno postnatal la mortalidad decrece drásticamente.

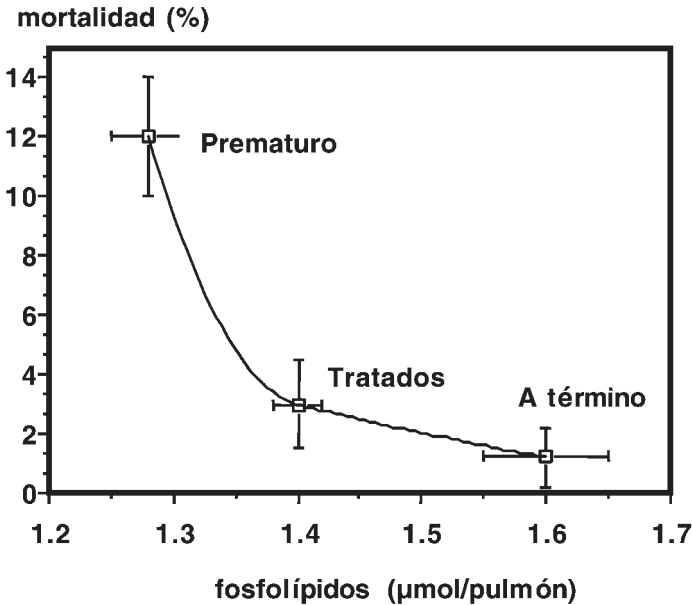


FIGURA 2. Porcentaje de mortalidad postnatal en la rata en relación con la concentración de fosfolípidos del surfactante pulmonar. Como puede observarse, la mortalidad postnatal es muy alta en el recién nacido prematuro, disminuyendo significativamente en el nacido a término. La mortalidad postnatal cae, asimismo, en los neonatos prematuros cuya madre había sido tratada con dexametasona («Tratados»). Modificado de ref. 10).

2.2. Hándicaps metabólicos del neonato pr ematuro

El neonato prematuro accede a la vida extrauterina con una serie de hándicaps que van a dificultar su adaptación al nuevo medio. A continuación describiremos algunos de ellos, especialmente aquéllos relacionados con las disponibilidades de glucosa y oxígeno.

2.2.1. *Inmadurez endocrina del neonato pr ematuro*

Es bien conocido que la insulina y el glucagón son las hormonas más importantes por lo que se refiere a la regulación endocrina del metabolismo. Teniendo en cuenta que el par insulina/glucagón dirige el metabolismo, es lógico esperar que en la transición a la vida extrauterina ocurran cambios drásticos en la razón insulina/glucagón, con objeto de adecuar el metabolismo a la nueva situación del entorno. En efecto, inmediatamente tras el nacimiento, la insulina, que permanece a concentraciones muy altas en la sangre del feto, comienza su caída paulatina hasta casi su total aclaramiento, hecho que tiene lugar dentro de la primera hora de vida extrauterina en la rata (9, 12). Por el contrario, el glucagón manifiesta un súbito aumento, alcanzando muy altas concentraciones durante las primeras horas de vida extrauterina. Por consiguiente, en un corto período de tiempo la razón insulina/glucagón experimenta una subida extraordinaria (9). Naturalmente, los cambios metabólicos no se hacen esperar, la glucogenolisis hepática y la muscular (13) se inducen y, más tarde, lo hace la gluconeogénesis (14).

Sin embargo, ninguno de estos cambios tiene lugar en el prematuro con la rapidez necesaria. Así, el aclaramiento de la insulina fetal se retrasa considerablemente en el neonato prematuro (9, 12), de tal manera que sus concentraciones son aún altas dos horas después del nacimiento. Por otro lado, la secreción postnatal de glucagón es mínima en el neonato prematuro, al menos por lo que se refiere a las dos primeras horas de vida extrauterina. Por consiguiente, la caída de la razón insulina/glucagón que tiene lugar en el neonato maduro se reduce considerablemente en el prematuro (9), lo que influirá decisivamente en el aumento de la vulnerabilidad metabólica del recién nacido prematuro.

2.2.2. *Indigencia glucídica del neonato pr ematuro*

Dada la pobreza glucídica de la leche materna, el neonato depende durante toda la lactancia de sus fuentes endógenas de glucosa, es decir, de la gluco-

nolisis y de la gluconeogénesis. Es más, durante el «ayuno postnatal» la ausencia de aporte exógeno obliga a la glucogenolisis a aportar la poca glucosa disponible. Pues bien, en el momento del nacimiento, el neonato prematuro posee aproximadamente el 60% de las reservas de glucógeno hepático observadas en el neonato maduro (9). Este hecho indica que el neonato prematuro se enfrenta a la vida extrauterina con, aproximadamente, la mitad de las reservas glucídicas que el neonato maduro. A esta considerable desventaja hay que sumar la bajísima velocidad glucogenolítica postnatal observada en el neonato prematuro (9). Por consiguiente, las reservas energéticas del neonato prematuro, no sólo son muy inferiores a las necesarias, sino que, además, no pueden ser utilizadas en el momento oportuno. Sin duda éste es uno de los principales hándicaps del neonato prematuro en el transcurso de su adaptación a la vida extrauterina.

Inmediatamente tras el nacimiento, las necesidades de glucosa son tales que, aún en el neonato a término, se presenta la denominada «hipoglucemia postnatal» típica del recién nacido (Fig. 3). Pues bien, la hipoglucemia postnatal es mucho más prolongada en el neonato prematuro, hasta el punto de que la duración del

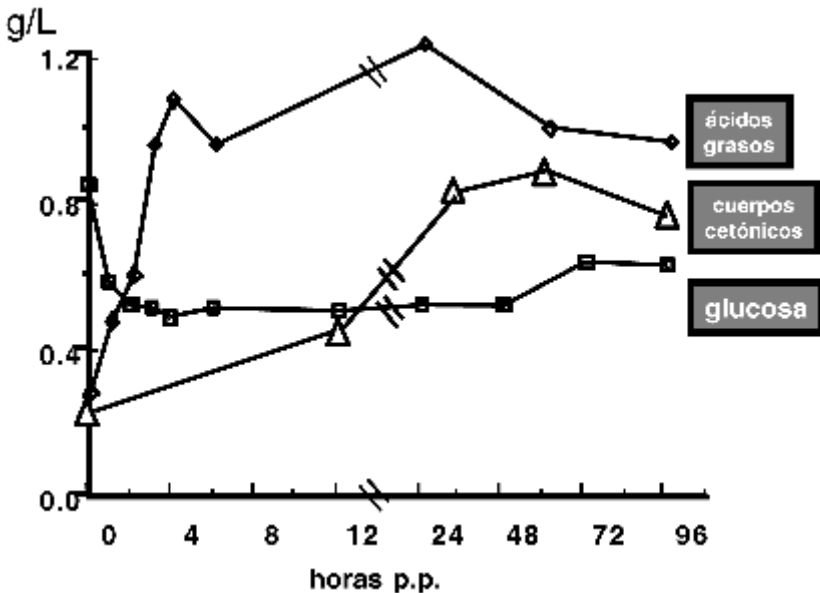


FIGURA 3. Concentración de los principales sustratos metabólicos en plasma de neonato humano durante las primeras horas después del nacimiento. Nótese que el neonato sufre una fuerte hipoglucemia durante este periodo y que los cuerpos cetónicos no adquieren altas concentraciones hasta pasadas 24 horas. Sólo el ácido láctico (véase fig. 4) puede servir de sustrato metabólico durante este periodo («ayuno postnatal»). Modificado de ref. 136).

período hipoglucémico se dobla en los neonatos nacidos prematuramente (7, 15). La responsable del retraso en la reaparición de la normoglucemia parece ser, indudablemente, la incapacidad del prematuro de poner en funcionamiento los mecanismos de síntesis de glucosa «de novo», es decir, la gluconeogénesis. En efecto, el neonato prematuro muestra un considerable retraso en la inducción de las enzimas gluconeogénicas hepáticas y renales (14, 15), lo que da como resultado una disminución muy sustancial de la capacidad gluconeogénica del prematuro.

Podemos concluir, por consiguiente, que una de las causas más importantes de la vulnerabilidad neonatal del prematuro es el déficit glucídico que padece durante el primer período de vida extrauterina. El déficit glucídico, junto con la hipoxia que sufre el neonato prematuro (véase mas adelante), constituirán una isquemia «técnica», en la que la falta de glucosa potenciará los efectos del déficit de oxígeno hasta alcanzar una situación metabólica incompatible con la vida.

2.2.3. *Hipoxia e hiperlactacidemia postnatal del neonato prematuro*

La medida de las concentraciones de oxígeno en sangre (16, 10, 17, 18), indican que el neonato prematuro sufre un retraso sustancial en la adquisición de las oxemias postnatales normales. Es más, la evolución postnatal de la oxemia en los neonatos maduros sometidos a hipoxia experimental (10, 19), semeja extraordinariamente a la observada en los prematuros. Por consiguiente, puede afirmarse que los tejidos del neonato prematuro sufren una hipoxia transitoria durante las primeras horas después del nacimiento. Asimismo, la hipoxia postnatal del recién nacido prematuro afecta desfavorablemente a su metabolismo oxidativo. De hecho, existe una correlación inversa, estadísticamente significativa, entre las concentraciones plasmáticas de lactato y oxígeno (10, 16). De estos resultados se colige que el metabolismo del lactato plasmático depende muy estrictamente del oxígeno disponible. Este hecho es de una importancia extraordinaria si pensamos que el prematuro es incapaz de utilizar lactato, uno de los sustratos neonatales más importantes durante las primeras horas de vida.

En este sentido, debemos recordar la importancia del lactato como sustrato neonatal (20-23). Así, la enorme cantidad de lactato acumulado durante el período fetal se utiliza rápidamente durante las primeras horas de vida extrauterina (Fig. 4). Es más, la mayor parte del lactato desaparecido es utilizado por vía oxidativa, resultando en el CO_2 espirado (24). Por consiguiente, la importancia del lactato como metabolito energético del neonato es evidente, no sólo por la cantidad y velocidad con que se consume, sino, muy decisivamente, por la vía elegida, una vía exclusivamente energética.

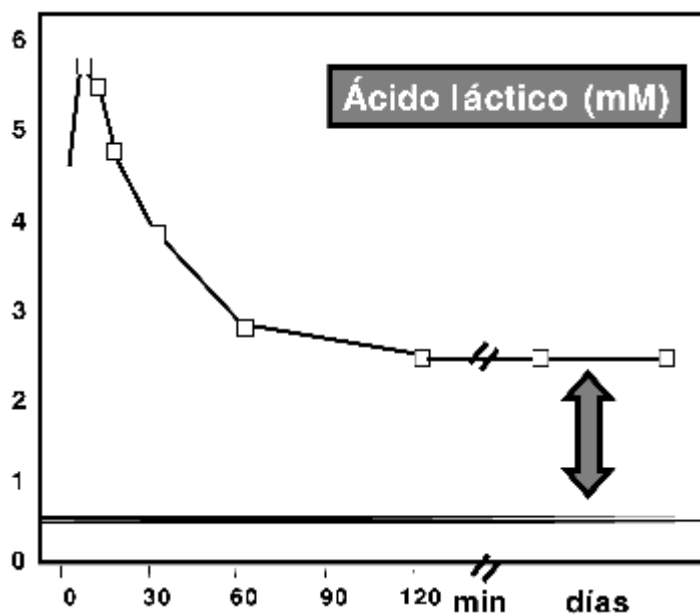


FIGURA 4. Concentración de ácido láctico en plasma de neonato humano durante las primeras horas/días después del nacimiento. Nótese que las concentraciones de ácido láctico son elevadísimas inmediatamente después del nacimiento, permaneciendo durante toda la lactancia muy por encima de las concentraciones normales del adulto (en línea rayada). Modificado de ref. 136).

Sin embargo, la importancia del lactato como sustrato neonatal adquiere su verdadera dimensión al demostrarse que puede servir durante la lactancia como sustrato energético del cerebro. En este sentido, el cerebro consume lactato durante la vida neonatal temprana (23, 25-28), lo que tiene una importancia extraordinaria si se piensa que el cerebro recibe poca glucosa tras la interrupción del suministro transplacentario. Es más, durante el «ayuno postnatal» el cerebro del neonato carece de los sustratos alternativos a la glucosa, es decir, de los cuerpos cetónicos. En efecto, los cuerpos cetónicos se sintetizan en el hígado a partir de los ácidos grasos lácteos, proceso que requiere carnitina, cuyo suministro por parte de la madre se retrasa considerablemente. Por consiguiente, el lactato es el sustrato del cerebro, «puente» entre la glucosa materna y los cuerpos cetónicos, salvando el vacío de la transición a la vida extrauterina. Muy en concordancia con lo anteriormente dicho, la utilización de lactato por el cerebro del neonato es muy sensible al suministro de oxígeno (25-28). Por consiguiente, podemos afirmar que el cerebro del neonato prematuro dispondrá de escasa energía para su supervivencia, puesto que el sustrato disponible en mayor cantidad, es decir, el lactato, no podrá ser utilizado eficientemente.

2.3. Remisión de la hipoxia y de la hiperlactacidemia por el tratamiento materno con dexametasona

El prematuro posee, en el momento del nacimiento, concentraciones de surfactante pulmonar muy inferiores a las observadas en el neonato maduro (10). De hecho, la existencia de menores concentraciones de surfactante podría ser la causa de la hipoxemia encontrada en el neonato prematuro inmediatamente tras el parto, así como de la persistencia de la lactiacidemia en el prematuro, dado que las lactiacidemias y las oxemias están inversamente relacionadas. En efecto, el neonato prematuro no consigue remontar las bajas oxemias que presenta tras el parto, permaneciendo hipóxico después del nacimiento (10). Asimismo, la evolución del pH en ambos grupos de neonatos sigue un perfil inverso a la concentración sanguínea de lactato, lo que sugiere que la acidosis en ambos grupos de neonatos tiene un componente metabólico mayoritario, relacionado directamente con la hiperlactacidemia.

Pues bien, el tratamiento materno con dexametasona remite absolutamente la hipoxemia postnatal del neonato prematuro, recuperando las concentraciones de oxígeno observadas en el neonato maduro (10). Por consiguiente, podemos concluir que el tratamiento de la madre con dexametasona suprime uno de los principales hándicaps del neonato prematuro, es decir, la hipoxemia postnatal. Como sabemos, éste es un hecho importantísimo en estas circunstancias, dado que el metabolismo oxidativo es vital durante las primeras horas de vida extrauterina. De hecho, el tratamiento materno con dexametasona remite parcialmente la hiperlactiacidemia, hasta alcanzar niveles similares a los observados en el neonato nacido a término (10). Podemos concluir, pues, que el tratamiento materno con dexametasona remite la hipoxia postnatal del recién nacido prematuro, lo que se refleja, muy decisivamente, en la mejora de la utilización de los sustratos metabólicos y, en especial, del lactato. De hecho, el tratamiento con dexametasona disminuye drásticamente la mortalidad postnatal (Fig. 2), lo que sugiere que la hipoxia es la causa de la vulnerabilidad del neonato pretérmino.

2.4. Prematuridad e insuficiencia de surfactante pulmonar

Es bien conocido que los mamíferos poseen «pulmones activos», es decir, pulmones que son responsables por sí mismos de la ventilación pulmonar. En este sentido, los pulmones autoventilados deben poseer una membrana luminal especialmente diseñada. Así, no sólo debe extenderse y contraerse con una fre-

cuencia determinada, sino que debe conservar , durante la tensión y la distensión, las cualidades propias de su papel como solución de continuidad entre un líquido, la sangre, y el aire que llena los alveolos. Para ello, la membrana alveolar posee un complejo lipoproteico denominado «surfactante». En este complejo los fosfolípidos, gracias a sus peculiares características químicas, disminuyen extraordinariamente la tensión superficial de la membrana alveolar . Así, la especial disposición de sus extremos zwitteriónicos, en contraposición a las largas cadenas hidrófobas, aumenta la extensibilidad de la membrana luminal, aun conservando las cualidades idóneas para el transporte de oxígeno. Pues bien, la síntesis de los fosfolípidos del surfactante pulmonar tiene lugar durante el último período de la gestación (10), concretamente durante el último 10% de la gestación. Por consiguiente, el neonato prematuro accede a la vida extrauterina con un déficit de surfactante (10), lo que, presumiblemente, debe afectar a la correcta adquisición de oxígeno en las estructuras alveolares (Fig. 2). En efecto, la hipoxia postnatal sólo es manifiesta en los neonatos que muestran déficit de surfactante (10). Es más, la remisión de la hipoxia postnatal del prematuro causada por el tratamiento materno con dexametasona, coincide con el aumento del contenido de surfactante pulmonar (10), lo que parece indicar claramente la existencia de una relación causa-efecto entre el déficit de surfactante y la hipoxia postnatal.

2.5. Oclusión del ducto arterioso e hipoxia postnatal

Cuando el ducto arterioso permanece abierto tras el nacimiento, se produce el síndrome denominado «ductus arterioso patente», que cursa con dificultades respiratorias. En este sentido, algunos autores han sugerido que algunos de los trastornos postnatales del prematuro podrían estar relacionados con la persistencia de un ducto arterioso funcional. Dado que la oclusión del ducto arterioso ocurre tras la obliteración del cordón umbilical, decidimos diseñar un modelo en el cual el neonato no se separaba del cordón umbilical tras el nacimiento, con lo que se conseguía que permaneciese abierto el ducto arterioso. La determinación de los parámetros bioquímicos en el mencionado modelo dio como resultado la constatación de la presencia de hipoxia en los neonatos que permanecieron unidos al cordón umbilical (29). Es más, la hipoxia cursa con hiperlactacidemia, lo que demuestra que siempre que existe hipoxia se inhibe la utilización de lactato. Sin embargo, el perfil de la evolución de estos parámetros no es coincidente con el observado en los neonatos prematuros, lo que parece indicar que el retraso en la oclusión del ducto arterioso no es la causa de la hipoxia sufrida por el recién nacido prematuro.

3. EL PROCESO HIPÓXICO-ISQUÉMICO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Como hemos visto antes, los principales problemas con los que se encuentra el neonato prematuro están directamente relacionados con la falta de oxígeno y de glucosa. La hipoxia es debida al déficit de surfactante, que le impide la correcta adquisición del oxígeno, y la fuerte hipoglucemia a la falta de reservas de glucógeno, dado que la glucogenogénesis se ha interrumpido en el momento del nacimiento. Este fenómeno, es decir, el déficit de oxígeno coincidente con la restricción de las disponibilidades de glucosa es el paradigma del proceso isquémico, en el cual la disminución del flujo sanguíneo somete al tejido irrigado a la peor de las circunstancias. Así, la hipoxia reduce severamente el rendimiento del metabolismo al obligar al uso exclusivo de la vía anaerobia. En otras circunstancias, la baja eficiencia del proceso energético se compensaría con el aumento de la actividad de la glucólisis anaerobia, pero la falta de glucosa conduce al consumo inmediato de sus reservas. A continuación revisaremos el proceso hipóxico-isquémico, con especial énfasis en sus efectos deletéreos sobre el desarrollo del SNC.

La rotura de un vaso sanguíneo cerebral ocasiona la caída del flujo sanguíneo en la zona irrigada, lo que da lugar a una isquemia intensa en el centro del territorio infartado y a una isquemia menos pronunciada en la periferia del mismo. Las células del núcleo isquémico mueren en pocos minutos, mientras que las periféricas, situadas en la denominada «penumbra isquémica», resultan dañadas, pues aunque el contenido de ATP permanece constante, las disponibilidades de glucosa están comprometidas. Sin embargo, las neuronas localizadas en la «penumbra isquémica» y que han sobrevivido al daño isquémico pueden recuperarse cuando se restablecen las condiciones hemodinámicas y el suministro normal de glucosa y oxígeno (30).

Aunque se desconocen los mecanismos que median el daño celular asociado al proceso hipóxico-isquémico (31), la disminución del flujo sanguíneo provoca un aumento del Ca^{2+} y del Na^{+} citosólicos (32, 33), así como el aumento de la producción de lactato a través de la glucólisis anaerobia, con la subsecuente disminución del pH intra y extracelular (34). El desequilibrio iónico conduce a la despolarización de la membrana plasmática, que provoca el aumento de la liberación de glutamato y la pérdida de la integridad mitocondrial, así como la alteración del metabolismo de los fosfatidilinositoles, factores todos ellos que llevan consigo la pérdida de la viabilidad celular (35-37).

En efecto, durante el proceso hipóxico-isquémico las neuronas son incapaces de mantener la polarización de la membrana plasmática, lo que produce

la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (38). Esta despolarización trae consigo el inicio del proceso «excitotóxico», que consiste en la liberación al espacio intercelular de grandes cantidades de glutamato y otros neuroexcitadores (39-41).

El glutamato, principal neurotransmisor excitador en el SNC (42, 43), estimula los receptores ionotrópicos, acoplados al transporte de iones, del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (39, 42, 44), así como el receptor metabotrópico (42). La estimulación del receptor NMDA es responsable del fuerte aumento del Ca^{2+} intracelular postsináptico que se produce durante el proceso hipóxico-isquémico (revisado en ref. 42), lo que pone en marcha una serie de procesos dependientes de Ca^{2+} que desembocarán en la muerte celular. Por otro lado, la estimulación del receptor de glutamato del tipo AMPA provoca el aumento intracelular de la concentración de Na^+ , que origina edema celular, uno de los causantes del daño celular producido por el proceso hipóxico-isquémico (41). El aumento de las concentraciones de Ca^{2+} activa una serie de enzimas, tales como ciertas proteínas quinasas, proteasas (45), fosfolipasas (46), endonucleasas y proteínas fosfatasa (36), así como sintasas de óxido nítrico (47-49).

Durante el proceso isquémico se originan cambios en ciertas macromoléculas implicadas en la señalización celular, tales como el factor nuclear κB (NF κB), el factor AP-1 y el factor HIF-1 (hypoxia inducible factor), que van a inducir la expresión de determinados genes implicados en la muerte celular por necrosis o por apoptosis. De hecho, el factor NF κB induce la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), de la ciclooxigenasa-2, de metaloproteinasas, de moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) y de citoquinas, tales como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), lo que contribuye al daño isquémico mediante la producción de radicales libres y la rotura de la barrera hematoencefálica (50-52).

Tras el infarto cerebral, las neuronas de la zona central del núcleo isquémico mueren rápidamente. Por el contrario, las neuronas situadas en la zona de «penumbra isquémica» permanecen viables durante horas (53). En este sentido, la presencia de glutamato *in vitro* produce la muerte inmediata de determinadas subpoblaciones neuronales, mientras que en otras se observa un retraso similar al observado *in vivo* en la zona de penumbra isquémica (39, 54-58). Este hecho sugiere que durante el proceso isquémico algunas poblaciones neuronales mueren rápidamente por necrosis, mientras que otras lo hacen más tardíamente por apoptosis (53).

En este sentido, es bien conocido que existen dos modos diferentes de muerte celular: la necrosis y la apoptosis (59). La necrosis es un proceso pasivo ca-

racterizado por la pérdida de la homeostasis celular, la alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática, el hinchamiento y la ruptura de los orgánulos celulares y la pérdida de las reservas energéticas celulares. El resultado de la necrosis es, normalmente, una reacción inflamatoria que produce infiltración local, daño vascular y edema (60). Por el contrario, la apoptosis es un proceso activo que necesita de la inducción de determinados procesos (60). La apoptosis se caracteriza por cambios en la estructura de la membrana celular (exposición de las fosfatidilserinas), la disminución en el volumen plasmático (formación de cuerpos apoptóticos), el cambio de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (apertura del poro de transición), la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA, entre otros (59-61).

La apoptosis se inicia por la activación de unas cisteína-proteasas denominadas caspasas, las cuales se activan por degradación proteolítica desencadenando la muerte celular. La caspasa-3 se activa específicamente por citocromo c, un componente de la cadena respiratoria mitocondrial (62-65). En este sentido, la salida de citocromo c de la mitocondria, tras la apertura del poro de transición, activa un complejo llamado apoptosoma, que es el responsable de la activación de la caspasa-3 (66). Es importante resaltar que el poro de transición regula el potencial de membrana mitocondrial, un parámetro que se altera durante la apoptosis inducida por Ca^{2+} , excitotoxinas y radicales libres, sustancias que se producen, todas ellas, durante el proceso hipóxico-isquémico (49, 52, 58).

Posteriormente, las células apoptóticas expresan en sus membranas moléculas de adhesión, que son reconocidas por los macrófagos, los cuales proceden a su fagocitosis y posterior degradación, evitando así un posible daño para las células colindantes (67, 68). Por tanto, la necrosis y la apoptosis constituyen dos formas distintas de muerte celular, con diferentes consecuencias para el tejido dañado.

3.1. Metabolismo de la glucosa en el SNC durante el proceso hipóxico-isquémico

Con excepción de la situación perinatal, en la que los cuerpos cetónicos pueden hacerse cargo de hasta el 60% de las necesidades energéticas, la glucosa es el único sustrato metabólico utilizado por el cerebro. De hecho, el SNC depende casi exclusivamente de la oxidación aeróbica de glucosa para la obtención de energía. Este hecho explica los efectos devastadores del proceso hipóxico-isquémico, puesto que, en estas circunstancias, no sólo el suministro de oxígeno está comprometido, sino que la glucosa llega al tejido con dificultad

como consecuencia de la disminución del riego sanguíneo. Por consiguiente, la alteración del metabolismo de la glucosa en el SNC es una de las claves para entender los daños producidos por el proceso hipóxico-isquémico. A continuación revisaremos brevemente las características más destacadas del metabolismo glucídico en el SNC

3.1.1. *Captación de glucosa por el cerebro durante el proceso hipóxico-isquémico*

La glucosa se transporta a través de la barrera hematoencefálica (BHE) y a través de la membrana plasmática de las células nerviosas por un proceso de transporte facilitado, que está mediado por transportadores de glucosa de la familia GLUT. De ellos, el GLUT-1 y el GLUT-3 son las isoformas predominantes en cerebro, expresándose el GLUT -1 en las células endoteliales de la BHE, así como en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (69). Sin embargo, el GLUT-3 se expresa únicamente en las neuronas post-mitóticas (70, 71). El transportador GLUT-3 posee una mayor afinidad por la glucosa que el GLUT -1 (69), por lo que se ha sugerido que la presencia de GLUT -3 en las neuronas permite a éstas captar glucosa del espacio extracelular, aun en condiciones de escasa disponibilidad de la misma.

Durante el período perinatal, el proceso hipóxico-isquémico provoca el aumento de la síntesis del GLUT -1, lo que se traduce en el incremento de la captación de glucosa por el cerebro (72). La isquemia cerebral también aumenta la expresión del GLUT-3, como un mecanismo compensatorio de la deficiencia de glucosa asociada al proceso (73). Por tanto, el aumento en la expresión de los sistemas transportadores de glucosa durante el proceso hipóxico-isquémico desempeña un importante papel en la prevención del daño causado por el déficit de glucosa que se produce como consecuencia de la disminución del riego sanguíneo.

3.1.3. *Regulación de la glucólisis durante el proceso hipóxico-isquémico*

Durante el proceso hipóxico-isquémico se produce la activación de la glucólisis anaerobia, con objeto de compensar la disminución de la síntesis de ATP en la mitocondria. De hecho, se ha podido comprobar que los astrocitos, que disponen de una alta capacidad glucolítica por vía anaerobia, son capaces de sobrevivir aun que la síntesis de ATP mitocondrial esté comprometida (74-76). Sin

embargo, las neuronas, que carecen de esa actividad glucolítica, mueren rápidamente por la falta de oxígeno, al no disponer de una síntesis alternativa de ATP (74). Por otro lado, la acidosis láctica producida por la actividad glucolítica parece ser responsable, asimismo, de la muerte neuronal que tiene lugar en estas circunstancias. Sin embargo, este hecho parece depender de la concentración de láctico alcanzada, puesto que el lactato sintetizado en la glucólisis durante la isquemia cerebral podría ser utilizado como sustrato energético en la fase de reoxigenación (77, 78).

3.1.3. *El ciclo de las pentosas fosfato*

El ciclo de las pentosas fosfato posee importantes funciones en el tejido nervioso (79, 80), dado que es la principal vía de suministro del NADPH(H⁺) necesario para el funcionamiento de los sistemas antioxidantes celulares. Así, en la primera parte del ciclo se producen dos moléculas de NADPH(H⁺) a partir del NADP⁺ (80). En este sentido, las neuronas sometidas a un estrés oxidativo responden con un aumento de la actividad del ciclo de las pentosas fosfato, así como de la actividad de la glutatión peroxidasa. Asimismo, el estrés oxidativo causado por el exceso de óxido nítrico induce la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en astrocitos, con objeto de producir el NADPH(H⁺) necesario para regenerar el glutatión reducido con que luchar contra el estrés oxidativo (57, 81).

3.2. **Disfunción mitocondrial en el proceso hipóxico-isquémico**

Como hemos mencionado antes, la isquemia provoca una fuerte caída en los niveles intracelulares de ATP, siendo, posiblemente, el déficit energético el responsable de la muerte neuronal (82). En este sentido, el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial constituye uno de los factores decisivos del daño cerebral producido por el proceso hipóxico-isquémico. Este fenómeno se caracteriza por la incapacidad de la mitocondria para llevar a cabo la transferencia de energía al ATP, disipándose ésta en forma de calor (83).

3.2.1. *Daños mitocondriales producidos por el proceso hipóxico-isquémico*

Los componentes de la cadena respiratoria son especialmente susceptibles al daño producido por el proceso hipóxico-isquémico y posterior reperfusión. En este sentido, la disminución del flujo sanguíneo cerebral inhibe específica-

mente la actividad de los complejos I y II-III de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (84, 85), mientras que la actividad del complejo IV (citocromo c oxidasa) disminuye drásticamente durante el periodo de reperfusión (85, 86). En cualquier caso, los complejos mitocondriales I, II-III y IV son muy sensibles al ataque de los radicales libres que se generan durante el proceso hipóxico-isquémico (52). Sin embargo, mientras que el complejo I es muy susceptible al daño producido por el anión $O_2^{\bullet-}$, debido a su alto contenido en centros sulfoférricos (52, 87, 88), los complejos II-III y IV son los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial más sensibles a la acción del $\bullet NO$ y, sobre todo, a la del $ONOO^-$ (revisado en ref. 89), formado a partir de la reacción entre el $\bullet NO$ y el $O_2^{\bullet-}$ (90, 91). Asimismo, durante el proceso hipóxico-isquémico se produce la liberación de determinados componentes mitocondriales al citoplasma celular, tales como el citocromo c, probablemente como consecuencia de la producción de radicales libres por la mitocondria (52, 92-94). La salida del citocromo c provoca no sólo la disfunción mitocondrial, sino que desencadena, además, una serie de señales celulares que conducen a la apoptosis.

Durante el período perinatal, el proceso hipóxico-isquémico produce la disfunción mitocondrial de las células nerviosas. En este sentido, se ha demostrado que, en estas condiciones, la actividad del complejo mitocondrial II-III se inhibe por la disminución en la disponibilidad de oxígeno (95), lo que se traduce en la caída de las concentraciones de ATP. Asimismo, dichos efectos se previenen con la administración de inhibidores de la síntesis de $\bullet NO$, como el NAME, lo que involucra a este radical libre en la disfunción mitocondrial asociada a la isquemia cerebral (95)

3.2.2. *Producción de radicales libres por la mitocondria durante el proceso hipóxico-isquémico*

La función respiratoria mitocondrial se considera una de las principales fuentes de producción de radicales libres durante el proceso hipóxico-isquémico (96). La producción mitocondrial de radicales libres, en concreto del anión $O_2^{\bullet-}$, se lleva a cabo, principalmente, a nivel de los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (revisado en ref. 88). Los principales productores de $O_2^{\bullet-}$ son la ubiquinona, que transfiere los electrones del complejo I y II al complejo III, y el citocromo bc_1 , componente del complejo mitocondrial III (97-99). Como hemos visto anteriormente, el $O_2^{\bullet-}$ generado en condiciones fisiológicas es degradado por las superóxido dismutasas, que transforman el $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 , y por la catalasa y la glutatión peroxidasa que convier-

ten el H_2O_2 en H_2O . Sin embargo, en determinadas circunstancias patológicas, generalmente relacionadas con alteraciones en la función mitocondrial, se produce un aumento en la producción de $O_2^{\bullet-}$, produciéndose un desequilibrio entre su velocidad de síntesis y la de degradación, creándose una situación de estrés oxidativo (52, 100). En estas circunstancias, el $O_2^{\bullet-}$, que tiene una gran afinidad por los centros sulfoférricos de las proteínas (87), provoca la liberación del anión Fe^{2+} , lo que causa la formación de $\bullet OH$ en la reacción de Fenton. En estas condiciones, el $O_2^{\bullet-}$ y el $\bullet OH$ alteran la estructura de diversos lípidos, proteínas e, incluso, del DNA (revisado en ref. 52).

Por tanto, la producción de radicales libres por la mitocondria es uno de los principales factores responsables de la muerte celular asociada al proceso hipóxico-isquémico. De hecho, se ha sugerido que la mitocondria juega un papel esencial en la decisión del tipo de muerte celular que se produce en situaciones de estrés oxidativo, necrosis o apoptosis (fig. 6). Así, cuando el daño producido es intenso, como ocurre en la isquemia severa, se produce el hinchamiento y la rotura de la mitocondria, lo que provoca la caída de las concentraciones de ATP y la subsecuente necrosis. Sin embargo, si el daño producido es más leve, la muerte por apoptosis predomina sobre la necrosis (62, 63, 66, 101, 102). En este sentido, durante la isquemia cerebral transitoria la liberación de citocromo c (52, 92-94) parece ser una de las principales señales celulares implicadas en el inicio de la apoptosis (64, 65).

3.3. Producción de óxido nítrico en el SNC

El óxido nítrico ($\bullet NO$) es un radical libre que actúa como mensajero fisiológico en el SNC (47). El $\bullet NO$ se sintetiza en la reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS), que sintetiza $\bullet NO$ y L-citrulina a partir de L-arginina (103). Sus acciones biológicas derivan, fundamentalmente, de la capacidad del $\bullet NO$ para activar la guanilato ciclasa soluble, causando el aumento de la concentración intracelular de GMP cíclico (cGMP) (104, 105). En situaciones fisiológicas, las neuronas producen $\bullet NO$ por la activación, Ca^{2+} -dependiente, de la NOS neuronal (nNOS), que se expresa constitutivamente en estas células. Sin embargo, en determinadas situaciones patológicas se produce una excesiva producción de $\bullet NO$, lo que genera efectos neurotóxicos (48). En este sentido, los astrocitos y, en general, las células gliales del SNC (astrocitos, microglía y oligodendrocitos), aumentan la síntesis de $\bullet NO$ por la inducción de otra isoenzima, denominada NOS inducible (iNOS). La actividad de la iNOS es independiente de calcio, por lo que, una vez que se induce la síntesis de su mRNA, la

proteína se sintetiza y los astrocitos producen el \bullet NO de forma continua e incontrolada (106). La iNOS se induce por citoquinas, tales como el interferón- γ (IFN- γ), la interleuquina-1 β (IL-1 β) y el factor necrótico tumoral- α (TNF- α), así como por los lipopolisacáridos (LPS), es decir la endotoxina de la pared celular de las bacterias gram-negativas (107). Estas citoquinas se encuentran elevadas en el cerebro en algunas situaciones neuropatológicas, por lo que se ha sugerido que la inducción de la iNOS en las células gliales juega un importante papel en la muerte neuronal presente en estas situaciones patológicas (89, 108-110). Por otro lado, la actividad de la iNOS se inhibe por noradrenalina, AMP cíclico (111), interleuquina-4, interleuquina-10 y dexametasona (107), así como por el propio \bullet NO mediante un mecanismo de autoinactivación (112).

En los últimos años numerosos estudios han implicado al \bullet NO en el control de las respuestas fisiológicas del cerebro frente a la hipoxia-isquemia (49). En efecto, se ha puesto de manifiesto, de manera directa, que la síntesis de \bullet NO aumenta durante la isquemia cerebral (113-115). Asimismo, la isquemia produce un importante aumento de las concentraciones cerebrales de cGMP, sintetizado como consecuencia de la activación de la guanilato ciclasa por \bullet NO (116-118).

Recientemente se ha comprobado que las células gliales son, asimismo, importantes fuentes de producción de \bullet NO durante el proceso hipóxico-isquémico (49). De hecho, la isquemia induce la expresión de la iNOS en los astrocitos (119-122). Las células endoteliales cerebrales también parecen contribuir al aumento de la producción de \bullet NO en el curso de la isquemia cerebral, aunque se ha sugerido que el \bullet NO producido por este mecanismo podría tener efectos neuroprotectores que conducirían, posiblemente, a la recuperación del flujo sanguíneo cerebral para evitar, en lo posible, el daño neuronal. (123, 124).

En condiciones normales, la activación Ca^{2+} -dependiente de la nNOS, iniciada por la estimulación de los receptores de glutamato, se enmarca dentro de las respuestas neurofisiológicas que siguen a la liberación presináptica de este neurotransmisor y, por tanto, de la transmisión de la señal nerviosa. Sin embargo, en determinadas situaciones patológicas se produce una excesiva estimulación del receptor de glutamato, lo que convierte la concentración de \bullet NO en neurotóxica (48). Por otra parte, dado que las mismas citoquinas responsables de la inducción de la iNOS se encuentran elevadas en el proceso hipóxico-isquémico, se ha sugerido que la inducción de iNOS por parte de las células gliales juega un importante papel importante en la neurotoxicidad asociada a esta patología (89, 108-110).

En efecto, la síntesis masiva de \bullet NO en el cerebro produce la muerte neuronal, a través de una serie de mecanismos que implican la pérdida de la carga ener-

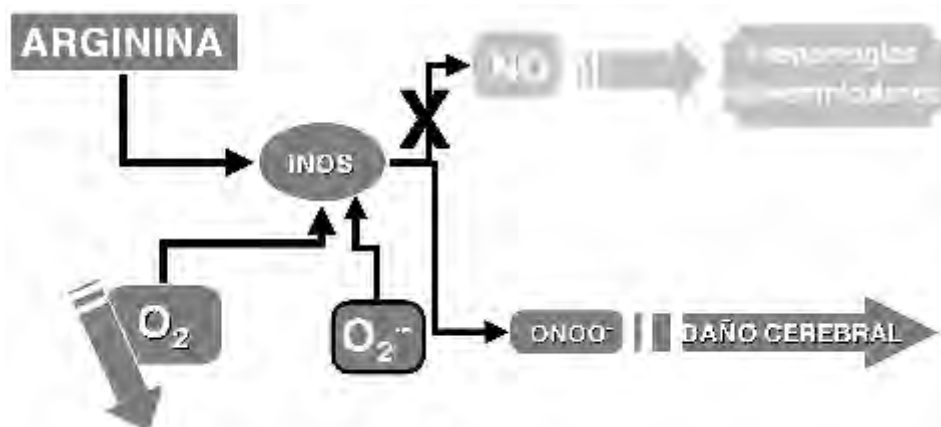


FIGURA 5. Producción de óxido nítrico (NO) y de peroxinitrito ($ONOO^-$) por el cerebro durante el proceso hipóxico-isquémico. En condiciones normales, la óxido nítrico sintasa (iNOS) sintetiza NO a partir de oxígeno y arginina. Sin embargo, cuando existe déficit de oxígeno disminuye la síntesis de NO, provocándose la vasoconstricción y la subsecuente hemorragia intracraneal. Asimismo, el déficit de oxígeno provoca la síntesis de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que, junto con el NO residual, sintetiza $ONOO^-$ que inicia el daño cerebral.

gética celular, la peroxidación de lípidos y proteínas, la nitrosilación proteica y el daño del DNA. Es más, la formación endógena de peroxinitrito ($ONOO^-$), generado a partir de la reacción espontánea (Fig. 5) del $\bullet NO$ con el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (90, 91), puede ser la responsable de la neurotoxicidad del propio $\bullet NO$ (revisado en ref. 89). En este sentido, estudios realizados en cultivos puros de neuronas corticales han puesto de manifiesto que el peroxinitrito es capaz de inhibir las actividades de los complejos II-III y IV de la cadena respiratoria, comprometiendo así el estado energético celular, lo que desencadena la muerte neuronal (76). Asimismo, la inducción de la iNOS en los astrocitos produce la muerte neuronal en cocultivo (109, 125), de modo similar a la producida por el peroxinitrito en los cultivos puros de neuronas (76), lo que pone de manifiesto el papel neurotóxico de esta sustancia. En este sentido, la administración de inhibidores de la NOS, tales como el NAME y la N^w -nitro-L-arginina (95, 126, 127), muestra una clara protección frente al daño neuronal producido por el proceso hipóxico-isquémico.

3.4. Principales mecanismos antioxidantes en el SNC

La formación de radicales libres que tiene lugar durante el estrés oxidativo puede dañar el metabolismo llegando, incluso, a producir la muerte ce-

lular. Para evitar esta situación las células disponen de mecanismos intracelulares, llamados sistemas antioxidantes, que les permiten defenderse de la acción de los radicales libres evitando, en lo posible, el daño producido por los mismos.

3.4.1. *El glutatión como principal sistema antioxidante en el SNC*

De todos los sistemas antioxidantes de los que disponen las células del SNC, el sistema glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) es el más importante, especialmente en los astrocitos (revisado en ref. 128). El GSH se transforma en GSSG a través de la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa, reacción que se acopla con la reducción de compuestos que contienen grupos peróxidos (ROOH), lo que constituye un importante mecanismo de detoxificación celular. La recuperación del GSH se realiza por la reacción catalizada por la glutatión reductasa. Así, el GSSG se reduce de nuevo a GSH, mientras que el NADPH(H⁺) se oxida a NADP.

3.4.2. *Otros sistemas antioxidantes en el SNC*

Aunque el mecanismo antioxidante GSH/GSSG representa el principal sistema de defensa celular contra el estrés oxidativo, la célula dispone de otros mecanismos de defensa contra los radicales libres, tales como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa, sistemas que permiten la eliminación del O₂⁻ y del H₂O₂. El hecho de que la SOD de astrocitos se active en la esclerosis lateral amiotrófica (129) indica que los astrocitos cumplen un importante papel en la defensa antioxidante del SNC.

Otros sistemas antioxidantes del SNC incluyen el ascorbato, que se acumula hasta alcanzar concentraciones mucho mayores que en la mayoría de los tejidos. La función antioxidante del ascorbato se lleva a cabo mediante inactivación directa de especies oxidantes o bien acoplándose al sistema GSH/GSSG. Así, el ascorbato suministra los equivalentes de reducción necesarios para la regeneración del GSH (130). Asimismo, la vitamina E es un importante antioxidante liposoluble, capaz de proteger a la célula contra la peroxidación lipídica de las membranas (131). En este sentido, la vitamina E tiene una concentración unas dos veces y media superior en los astrocitos que en las neuronas (132), lo que hace que se considere un importante agente antioxidante en el SNC.

4. LA HEMORRAGIA INTRACRANEAL: CAUSA Y EFECTO DEL PROCESO HIPÓXICO-ISQUÉMICO

Es bien conocido que el cerebro del recién nacido es menos sensible a la hipoxia que el del adulto y que dicha sensibilidad decrece aún mas en el prematuro (133). Sin embargo, dependiendo de la duración de la hipoxia, así como del momento del desarrollo, el proceso hipóxico-isquémico puede producir episodios de hemorragia intracraneal, afectándose zonas críticas en donde la neurogénesis secundaria esta aún activa. Así, la fragilidad de los capilares de la matriz germinal del prematuro aumentan la vulnerabilidad de éste a la hemorragia intracraneal (Fig. 6), con el posible riesgo de que estas zonas puedan ser afectadas irreversiblemente (134, 135). Asimismo, la materia blanca inmadura es muy sensible al daño producido por el proceso hipóxico-isquémico, produciéndose un reblandecimiento de la materia blanca, denominado leucomalacia periventricular (PVL). Por último, los oligodendrocitos inmaduros son muy sensibles al estrés oxidativo, lo que puede contribuir a los efectos deletéreos del proceso hipóxico-isquémico (6).

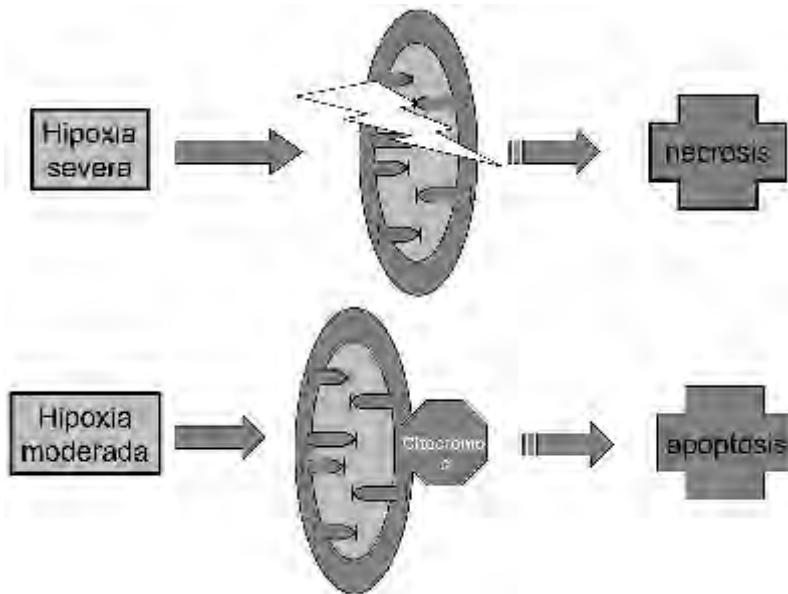


FIGURA 6. Participación de la mitocondria en la muerte celular durante el proceso hipóxico-isquémico. Si la hipoxia es severa se produce la rotura de la estructura mitocondrial y la muerte celular por necrosis. Sin embargo, si la hipoxia es moderada se abre el poro de transición, liberándose citocromo c e iniciándose la apoptosis.

Por lo que respecta a la materia gris, su principal vulnerabilidad radica en la diferente sensibilidad de los receptores de glutamato durante el periodo perinatal. En efecto, aproximadamente el 65% de las sinapsis del SNC utilizan el glutamato como neurotransmisor, el cual en condiciones normales es recaptado tras realizar su función. Sin embargo, el proceso hipóxico-isquémico produce un considerable aumento de la concentración de glutamato en el compartimento extracelular, no sólo por el aumento de la liberación presináptica del aminoácido, sino por la inhibición de su recaptación producida por el ácido araquidónico liberado de las membranas neuronales por el proceso hipóxico-isquémico. El acúmulo de glutamato produce el fenómeno denominado excitotoxicidad, que consiste en la respuesta de las células adyacentes a un estímulo glutamatergico exagerado (véase más arriba). El efecto se lleva a cabo a través del receptor de glutamato de tipo NMDA, que produce la entrada masiva de Ca^{2+} , la activación de la NOS y la correspondiente producción de radicales libres. Durante el periodo perinatal este proceso se agudiza, dado que el receptor de glutamato de tipo NMDA posee subunidades diferentes a las del adulto, lo que le confiere una mayor sensibilidad al glutamato (6).

Como vemos, se trata de un ciclo vicioso, dado que el proceso hipóxico-isquémico provoca la hemorragia intracraneal y ésta acelera, a su vez, el proceso hipóxico-isquémico. Dada la especial susceptibilidad del cerebro del neonato y, especialmente, el del prematuro, el proceso hipóxico-isquémico puede provocar considerables efectos deletéreos que, en algunos casos, resultan irreversibles.

REFERENCIAS

- (1) Hollyday, M., (2001), Neurogenesis in the vertebrate neural tube . *J. Devel. Neuroscience*. **19**: 161-173.
- (2) McConnell, S.K., J.L. Roberts, N.C. Spitzer , M.J. Zigmond, L.R. Squire, y F .E. Bloom, (2003) *Fundamental Neuroscience*. Second ed. London: Academic Press.
- (3) Brown, M., R. Keynes, y A. Lumsden, (2001) *The Developing Brain*. New York: Oxford University Press.
- (4) Kostovic, I., N. Lukinovic, M. Judas, N. Bogdanovic, L. Mrzljak, N. Zecevic, y M. Kubat, (1989), Structural basis of the developmental plasticity in the human cerebral cortex: The role of the transient subplate zone . *Metabol. Brain Disease* . **4**: 17-23.
- (5) Johnson, M.H., (2001), Functional brain development in humans . *Nature Rev. Neurosci.* **2**: 475-483.

- (6) Johnston, M.V., (1995), Neurotransmitters and vulnerability of the developing brain. *Brain Develop.* **17**: 301-306.
- (7) Cuezva, J.M., F.J. Moreno, J.M. Medina, y F. Mayor, (1980), Prematurity in the rat. I. Fuels and gluconeogenic enzymes. *Biol. Neonate.* **37**: 88-95.
- (8) Cuezva, J.M. y J.M. Medina, (1981), Prematurity in the rat. III. Effect of oxygen supply. *Biol. Neonate.* **39**: 70-77.
- (9) Arizmendi, C., T. Caldés, M. Benito, y J.M. Medina, (1984), Decreased glucose supply in the premature newborn rat and its relationship with the glucagon/insulin ratio. *IRCS Med. Sci.* **12**: 592-593.
- (10) Juanes, M.C., C. Arizmendi, y J.M. Medina, (1986), Attenuation of postnatal hypoxia in the premature newborn rat by maternal treatment with dexamethasone: its relationship with lung phospholipid content. *Biol. Neonate.* **50**: 337-344.
- (11) Kuma, A., M. Hatano, M. Matsui, A. Yamamoto, H. Nakaya, T. Yoshimori, Y. Ohsumi, T. Tokuhisa, y N. Mizushima, (2004), The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature.* **432**: 1032-6.
- (12) Martín, A., T. Caldés, M. Benito, y J.M. Medina, (1981), Regulation of glycogenolysis in the liver of the newborn rat in vivo. Inhibitory effect of glucose. *Biochim. Biophys. Acta.* **672**: 262-267.
- (13) Cuezva, J.M., C. Valcarce, y J.M. Medina, (1985) Substrates availability of energy homeostasis in the immediate postnatal period of the fasted newborn rat, in *The Physiological Development of the Fetus and Newborn*, C.T. Jones and P.W. Nathanielz, Editors. Academic Press: London. p. 63-69.
- (14) Cuezva, J.M., E. Fernández, C. Valcarce, y J.M. Medina, (1983), The role of ATP / ADP ratio in the control of hepatic gluconeogenesis during the early neonatal period. *Biochim. Biophys. Acta.* **759**: 282-295.
- (15) Fernández, E., C. Valcarce, J.M. Cuezva, y J.M. Medina, (1983), Postnatal hypoglycaemia and gluconeogenesis in the newborn rat. Delayed onset of gluconeogenesis in prematurely delivered newborns. *Biochem. J.* **214**: 525-532.
- (16) Cuezva, J.M., F.J. Moreno, y J.M. Medina, (1981), Blood oxygen concentrations in premature newborn rats during the early neonatal period. *IRCS Med. Sci.* **9**: 644.
- (17) Arizmendi, C., M. Maties, M. Benito, y J.M. Medina, (1983), Effect of postnatal hypoxia on the energy homeostasis of the newborn rat during the early neonatal period. *Biol. Neonate.* **44**: 36-41.
- (18) Vicario, C., M.C. Juanes, J. Martín-Barrientos, y J.M. Medina, (1990), Effect of postnatal hypoxia on ammonia metabolism during the early neonatal period in the rat. *Biol. Neonate.* **57**: 119-125.

- (19) Cuezva, J.M., M. Benito, F.J. Moreno, y J.M. Medina, (1980), Prematurity in the rat. II. Effect of hypothermia. *Biol. Neonate*. **37**: 218-223.
- (20) Medina, J.M., (1978), Utilización de lactato durante el periodo neonatal . *Anal. Real Acad. Far.* **44**: 545-560.
- (21) Medina, J.M., (1985), The role of lactate as an energy substrate for the brain during the early neonatal period . *Biol. Neonate*. **48**: 237-244.
- (22) Medina, J.M., E. Fernández, J.P. Bolaños, C. Vicario, y C. Arizmendi, (1990) Fuel supply to the brain during the early postnatal period, in *Endocrine and Biochemical Development of the Fetus and Neonate* , J.M. Cuezva, A.M. Pascual-Leone, and M.S. Patel, Editors. Plenum Press: New York. p. 175-194.
- (23) Medina, J.M. y A. Tabernero, (2005), Lactate utilization by brain cells and its role in CNS development. *J. Neurosci. Res.* **79**: 2-10.
- (24) Medina, J.M., J.M. Cuezva, y F. Mayor, (1980), Non-gluconeogenic fate of lactate during the early neonatal period in the rat . *FEBS Lett.* **114**: 132-134.
- (25) Arizmendi, C. y J.M. Medina, (1983), Lactate as an oxidizable substrate for rat brain in vivo during perinatal period . *Biochem. J.* **214**: 633-635.
- (26) Fernández, E. y J.M. Medina, (1986), Lactate utilization by the neonatal rat brain in vitro. Competition with glucose and 3-hydroxybutyrate . *Biochem. J.* **234**: 489-492.
- (27) Vicario, C., C. Arizmendi, J.G. Malloch, J.B. Clark, y J.M. Medina, (1991), Lactate utilization by isolated cells from early neonatal rat brain . *J. Neurochem.* **57**: 1700-1707.
- (28) Vicario, C. y J.M. Medina, (1992), Metabolism of lactate in the rat brain during the early neonatal period . *J. Neurochem.* **58**: 32-40.
- (29) Arranz, L., M.A. Ruiz, E. Fernández, y J.M. Medina, (1990), Metabolic effects of the delay in obliteration of the umbilical cord in the newborn rat . *Biol. Neonate*. **57**: 46-53.
- (30) Castillo, J., (2000), Physiopathology of cerebral ischemia . *Rev. Neurol.* **30**: 459-464.
- (31) Siesjö, B.K., (1988), Mechanisms of ischemic brain damage . *Crit. Care Med.* **16**: 954-963.
- (32) Sontheimer, H., (1994), Voltage-dependent ion channels in glial cells . *Glia*. **11**: 156-172.
- (33) Cooper, C.E. y G.C. Brown, (1995), The interactions between nitric oxide and brain nerve terminals as studied by electron paramagnetic resonance . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**: 404-412.
- (34) Deitmer, J.W. y C.R. Rose, (1996), pH regulation and proton signalling by glial cells. *Prog. Neurobiol.* **48**: 73-103.

- (35) Meldrum, D. y J. Garthwaite, (1990), Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**: 379-387.
- (36) Lipton, S.A. y P.A. Rosenberg, (1994), Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* **330**: 613-622.
- (37) Choi, D., (1995), Calcium - still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.* **18**: 58-60.
- (38) Kristián, T. y B.K. Siesjö, (1998), Calcium in ischemic cell death. *Stroke.* **29**: 705-718.
- (39) Choi, D.W. y S.M. Rothman, (1990), The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* **13**: 171-182.
- (40) Takagi, K., M.D. Ginsberg, M.Y.T. Globus, W.D. Dietrich, E. Martínez, y S. Kraydieh, (1993), Changes in amino acid neurotransmitters and cerebral blood flow in the ischemic penumbral region following middle cerebral artery occlusion in the rat: Correlation with histopathology. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **13**: 575-585.
- (41) Castillo, J., A. Dávalos, y M. Noya, (1997), Progression of ischemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet.* **349**: 79-83.
- (42) Choi, D.W., (1988), Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* **1**: 623-634.
- (43) Ikonomidou, C. y L. Turski, (1995), Excitotoxicity and neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Neurol.* **8**: 487-497.
- (44) McBain, C.J. y M. Mayer, (1994), N-Methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol. Rev.* **74**: 723-760.
- (45) Siman, R. y J.C. Noszek, (1988), Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. *Neuron.* **1**: 279-287.
- (46) Bondy, S.C. y D.K. Lee, (1993), Oxidative stress induced by glutamate receptor agonists. *Brain Res.* **610**: 229-233.
- (47) Garthwaite, J., S.L. Charles, y R. Chess-Williams, (1988), Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests a role as intercellular messenger in the brain. *Nature.* **336**: 385-387.
- (48) Dawson, V.L., T.M. Dawson, E.D. London, D.S. Brecht, y S.H. Snyder, (1991), Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 6368-6371.
- (49) Bolaños, J.P. y A. Almeida, (1999), Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochim. Biophys. Acta.* **1411**: 415-436.
- (50) Lipton, P., (1999), Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* **79**: 1431-1568.

- (51) Tamatani, M., N. Mitsuda, H. Matsuzaki, H. Okado, S. Miyake, M.P. Vitek, A. Yamaguchi, y M. Tohyama, (2000), A pathway of neuronal apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation: roles of nuclear factor κ B and Bcl-2. *J. Neurochem.* **75**: 683-693.
- (52) Chan, P.H., (2001), Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **21**: 2-14.
- (53) Siesjö, B.K., (1992), Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J. Neurosurg.* **77**: 169-184.
- (54) Hahn, J.S., E. Aizenman, y Lipton, (1988), Central mammalian neurons resistant to glutamate toxicity are made sensitive by elevated extracellular calcium: toxicity blocked by the N-methyl-D-aspartate antagonist MK-801. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 6556-6560.
- (55) Manev, H., M. Fararon, A. Guidotti, y E. Costa, (1989), Delayed increase of Ca^{2+} influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol. Pharmacol.* **36**: 106-112.
- (56) Garthwaite, J. y G. Garthwaite, (1990), Mechanisms of excitatory amino acid neurotoxicity in rat brain slices. *Adv. Exp. Med. Biol.* **268**: 505-518.
- (57) Delgado-Esteban, M., A. Almeida, y J.P. Bolaños, (2000), D-Glucose prevents glutathione oxidation and mitochondrial damage after glutamate receptor stimulation in rat cortical primary neurons. *J. Neurochem.* **75**: 1618-1624.
- (58) Almeida, A., M. Delgado-Esteban, J.P. Bolaños, y J.M. Medina, (2002), Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture. *J. Neurochem.* **81**: 207-217.
- (59) Kerr, J.F., A.H. Wyllie, y A.R. Currie, (1972), Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* **26**: 239-57.
- (60) Sastry, P.S. y K.S. Rao, (2000), Apoptosis and the nervous system. *J. Neurochem.* **74**: 1-20.
- (61) Wyllie, A.H., J.F. Kerr, y A.R. Currie, (1980), Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**: 251-306.
- (62) Ankarcona, M., J.M. Dypbukt, E. Bonfoco, B. Zhivotovsky, S. Orrenius, S.A. Lipton, y P. Nicotera, (1995), Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.* **15**: 961-973.
- (63) Bonfoco, E., C. Krainc, M. Ankarcona, P. Nicotera, y S.A. Lipton, (1995), Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 7162-7166.

- (64) Zou, H., W.J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg, y X. Wang, (1997), Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. **90**: 405-413.
- (65) Yoshida, H., Y.Y. Kong, R. Yoshida, A.J. Elia, R. Hakem, J.M. Penninger, y T.W. Mak, (1998), Apaf-1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell*. **94**: 739-750.
- (66) Green, D.R. y J.C. Reed, (1998), Mitochondria and apoptosis. *Science*. **281**: 1309-1312.
- (67) Duvall, E., A.H. Wyllie, y R.G. Morris, (1985), Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology*. **56**: 351-358.
- (68) Savill, J., V. Fadok, P. Henson, y C. Haslett, (1993), Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today*. **14**: 131-136.
- (69) Maher, F., S.J. Vannucci, y I.A. Simson, (1994), Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J*. **8**: 1003-1011.
- (70) Mantych, G.J., D.E. James, H.D. Chung, y S.U. Devaskar, (1992), Cellular localization and characterization of Glut 3 glucose transporter isoform in human brain. *Endocrinology*. **131**: 1270-8.
- (71) Nagamatsu, S., J.M. Kornhauser, C.F. Burant, S. Seino, K.E. Mayo, y G.I. Bell, (1992), Glucose transporter expression in brain. cDNA sequence of mouse GLUT3, the brain facilitative glucose transporter isoform, and identification of sites of expression by in situ hybridization. *J. Biol. Chem.* **267**: 467-472.
- (72) Vannucci, S.J., L.B. Seaman, y R.C. Vannucci, (1996), Effects of hypoxia-ischemia on GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in immature rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* **17**: 77-81.
- (73) Devaskar, S.U., P.A. Rajakumar, R.B. Mink, R.A. McKnight, S. Thamocharan, y S.J. Hicks, (1999), Effect of development and hypoxic-ischemia upon rabbit brain glucose transporter expression. *Brain Res.* **823**: 113-128.
- (74) Walz, W. y S. Mukerji, (1988), Lactate release from cultured astrocytes and neurons: a comparison. *Glia*. **1**: 366-370.
- (75) Walz, W. y S. Mukerji, (1990), Simulation of aspects of ischaemia in cell culture: changes in lactate compartmentation. *Glia*. **3**: 522-528.
- (76) Bolaños, J.P., S.J.R. Heales, J.M. Land, y J.B. Clark, (1995), Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary cultures. *J. Neurochem.* **64**: 1965-1972.
- (77) Siesjö, B.K. y T. Wieloch, (1985), Cerebral metabolism in ischaemia: neurochemical basis for therapy. *Br. J. Anaesth.* **57**: 47-62.

- (78) Schurr, A., C.A. West, y B.M. Rigor, (1988), Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation . *Science*. **240**: 1326-1328.
- (79) Baquer, N.Z., J.S. Hothersall, P. McLean, y A.L. Greenbaum, (1977), Aspects of carbohydrate metabolism in developing brain . *Develop. Med. Child. Neur. ol.* **19**: 81-104.
- (80) Baquer, N.Z., J.S. Hothersall, y P. McLean, (1988) Function and regulation of the pentose phosphate pathway in brain, in *Current Topics in Cellular Regulation*, B.L. Horecker and E.R. Stadtman, Editors. Academic Press: New York. p. 265-289.
- (81) García-Nogales, P., A. Almeida, E. Fernández, J.M. Medina, y J.P. Bolaños, (1999), Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase by lipopolysaccharide contributes to preventing nitric oxide-mediated glutathione depletion in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* **72**: 1750-1758.
- (82) Siesjö, B.K., (1984), Cerebral circulation and metabolism *J. Neurosurg.* **60**: 883-908.
- (83) Siesjö, B.K., (1981), Cell damage in the brain: a speculative synthesis . *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1**: 155-185.
- (84) Sims, N.R., (1991), Selective impairment of respiration in mitochondria isolated from brain subregions following transient forebrain ischemia in the rat . *J. Neurochem.* **56**: 1836-1844.
- (85) Almeida, A., K.L. Allen, T.E. Bates, y J.B. Clark, (1995), Effect of reperfusion following cerebral ischaemia on the activity of the mitochondrial respiratory chain in the gerbil brain . *J. Neurochem.* **65**: 1698-1703.
- (86) Soliven, B., S. Szuchet, y D.J. Nelson, (1991), Tumor necrosis factor inhibits K⁺ current expression in cultured oligodendrocytes. *J. Membrane Biol.* **124**: 127-137.
- (87) Flint, D.H., J.F. Tuminello, y M.H. Emptage, (1993), The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide . *J. Biol. Chem.* **268**: 22369-22376.
- (88) Raha, S. y B.H. Robinson, (2000), Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 502-508.
- (89) Bolaños, J.P., A. Almeida, V. Stewart, S. Peuchen, J.M. Land, J.B. Clark, y S.J.R. Heales, (1997), Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases *J. Neurochem.* **68**: 2227-2240.
- (90) Beckman, J.S., T.W. Beckman, J. Chen, P.A. Marshall, y B.A. Freeman, (1990), Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 1620-1624.
- (91) Radi, R., J.S. Beckman, K.M. Bush, y B.A. Freeman, (1991), Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide . *J. Biol. Chem.* **266**: 4244-4250.

- (92) Fujimura, M., -F. Morita, Y. K. Murakami, M. Kawase, y P. H. Chan, (1998), Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **18**: 1239-1247.
- (93) Pérez-Pinzón, M.A., G.P. Xu, J. Born, J. Lorenzo, R. Busto, M. Rosenthal, y T.J. Sick, (1999), Cytochrome c is released from mitochondria into the cytosol after cerebral anoxia or ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **19**: 39-43.
- (94) Sugawara, T., M. Fujimura, Y. Morita-Fujimura, M. Kawase, y P.H. Chan, (1999), Mitochondrial release of cytochrome c corresponds to the selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons in rats after transient global cerebral ischemia. *J. Neurosci.* **39**: 1.
- (95) Bolaños, J.P., A. Almeida, y J.M. Medina, (1998), Nitric oxide mediates brain mitochondrial damage during perinatal anoxia. *Brain Res.* **787**: 117-122.
- (96) Braugher, J.M. y E.D. Hall, (1989), Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **6**: 289-301.
- (97) Boveris, A. y B. Chance, (1973), The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **134**: 707-716.
- (98) Boveris, A. y E. Cadenas, (1975), Mitochondrial production of superoxide anions and its relationships to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett.* **54**: 311-314.
- (99) Poderoso, J.J., C. Lisdero, F. Schopfer, N. Riobo, M.C. Carreras, E. Cadenas, y A. Boveris, (1999), The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol. *J. Biol. Chem.* **274**: 37709-37716.
- (100) Halliwell, B., (1992), Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* **59**: 1609-1623.
- (101) Pettmann, B. y C.E. Henderson, (1998), Neuronal cell death. *Neuron.* **20**: 633-647.
- (102) Fujimura, M., Y. Morita-Fujimura, N. Noshita, T. Sugawara, M. Kawase, y P. H. Chan, (2000), The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice. *J. Neurosci.* **20**: 2817-2824.
- (103) Bredt, D.S., P. M. Hwang, y S.H. Snyder, (1990), Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* **347**: 768-770.
- (104) Bredt, D.S. y S.H. Snyder, (1989), Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 9030-9033.

- (105) Knowles, R.G., M. Palacios, R.M.J. Palmer, y S. Moncada, (1989), Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 5159-5162.
- (106) Murphy, S., M.L. Simmons, L. Agulló, A. García, D.L. Feinstein, E. Galea, D.J. Reis, D. Minc-Golomb, y J.P. Schwartz, (1993), Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci.* **16**: 323-328.
- (107) Simmons, M.L. y S. Murphy, (1992), Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J. Neurochem.* **59**: 897-905.
- (108) Bolaños, J.P., S. Peuchen, S.J.R. Heales, J.M. Land, y J.B. Clark, (1994), Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes. *J. Neurochem.* **63**: 910-916.
- (109) Bolaños, J.P. y J.M. Medina, (1996), Induction of nitric oxide synthase inhibits gap junction permeability in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* **66**: 2091-2099.
- (110) Murphy, S. y D. Grzybicki, (1996), Glial NO. Normal and pathological roles *Neuroscientist.* **2**: 90-99.
- (111) Feinstein, D.L., E. Galea, y D.J. Reis, (1993), Norepinephrine suppresses inducible nitric oxide synthase activity in rat astroglial cultures *J. Neurochem.* **60**: 1945-1948.
- (112) Stuehr, D.J., N.S. Kwon, C.F. Nathan, y O.W. Griffith, (1991), N^w-Hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J. Biol. Chem.* **266**: 6259-6263.
- (113) Sato, S., T. Tominaga, T. Ohnishi, y S.T. Ohnishi, (1993), EPR spin-trapping study of nitric-oxide formation during bilateral carotid occlusion in the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* **1181**: 195-197.
- (114) Tominaga, T., S. Sato, T. Ohnishi, y S.T. Ohnishi, (1993), Potentiation of nitric-oxide formation following bilateral carotid occlusion and focal cerebral-ischemia in the rat. In vivo detection of nitric-oxide radical by electron-paramagnetic-resonance spin-trapping. *Brain Res.* **614**: 342-346.
- (115) Tominaga, T., S.Y. Sato, T. Ohnishi, y S.T. Ohnishi, (1994), Electron-paramagnetic-resonance (EPR) of nitric-oxide produced during forebrain ischemia of the rat. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* **14**: 715-722.
- (116) Kader, A., V.I. Frazzini, R.A. Solomon, y R.R. Triffiletti, (1993), Nitric-oxide production during focal cerebral-ischemia in rats. *Stroke.* **24**: 1709-1716.
- (117) Shibata, M., N. Araki, J. Hamada, K. Shimazu, y Y. Fukuuchi, (1996), Brain nitrite production during global ischemia and reperfusion. An in vivo microdialysis study. *Brain Res.* **734**: 86-90.

- (118) Todd, M.M., S. Farrell, y B. Wu, (1997), Cerebral blood flow during hypoxemia in rabbits: Different roles for nitric oxide? *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* **17**: 1319-1325.
- (119) Endoh, M., K. Maiese, W.A. Pulsinelli, y J.A. Wagner, (1993), Reactive astrocytes express NADPH diaphorase in vivo after transient ischemia. *Neurosci. Lett.* **154**: 125-128.
- (120) McElhaney, M.R., L.J. Chandler, y W.J. Streit, (1994), Astrocytes but not microglia express NADPH diaphorase activity after motor-neuron injury in the rat. *Neurosci. Lett.* **180**: 67-70.
- (121) Kawase, M., H. Kinouchi, I. Kato, A. Akabane, T. Kondo, S. Arai, M. Fujimura, H. Okamoto, y T. Yohimoto, (1996), Inducible nitric oxide synthase following hypoxia in rat cultured glial cells. *Brain Res.* **738**: 319-322.
- (122) Moro, M.A., J. DeAlba, J.C. Leza, P. Lorenzo, A.P. Fernandez, M.L. Bentura, L. Bosca, J. Rodrigo, y I. Lizasoain, (1998), Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Eur. J. Neurosci.* **10**: 445-456.
- (123) Gajkowska, B. y M.J. Mossakowski, (1997), Endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium of rat hippocampus after ischemia: Evidence and significance. *Folia Neuropathol.* **35**: 171-180.
- (124) Beasley, T.C., F. Bari, C. Thore, N. Thrikawala, T. Louis, y D. Busija, (1998), Cerebral ischemia/reperfusion increases endothelial nitric oxide synthase levels by an indomethacin-sensitive mechanism. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* **18**: 88-96.
- (125) Dawson, V.L., H.P. Brahmabhatt, J.A. Mong, y T.M. Dawson, (1994), Expression of inducible nitric oxide synthase causes delayed neurotoxicity in primary mixed neuronal-glial cortical cultures. *Neuropharmacology.* **33**: 1425-1430.
- (126) Nagafuji, T., T. Matsui, T. Koide, y T. Asano, (1992), Blockade of nitric-oxide formation by N-omega-nitro-L-arginine mitigates ischemic brain edema and subsequent cerebral infarction in rats. *Neurosci. Lett.* **147**: 159-162.
- (127) Matsui, T., T. Nagafuji, T. Mori, y T. Asano, (1997), N-omega-nitro-L-arginine attenuates early ischemic neuronal damage of prolonged focal ischemia and recirculation in rats. *Neurol. Res.* **19**: 192-203.
- (128) Peuchen, S., J.P. Bolaños, S.R. Heales, A. Almeida, M.R. Duchon, y J.B. Clark, (1996), Interrelations between astrocyte function, oxidative stress, and antioxidant status within the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* **52**: 261-281.
- (129) Blaauwgeers, H.G.T., J.M.B.V. De Jong, H.W. Verspaget, F.M. Van der Berg, y D. Troost, (1996), Enhancement superoxide dismutase-2 immunoreactivity of astrocytes and occasional neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **140**: 21-29.

- (130) Meister, A., (1992), On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione . *Biochem. Pharmacol.* **44**: 1905-1915.
- (131) Niki, E., T. Saito, A. Kawakami, y Y. Kamiya, (1984), Oxidation of lipids. 6. Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C . *J. Biol. Chem.* **259**: 4177-4182.
- (132) Makar, T.K., M. Nedergaard, A. Preuss, A.S. Gelbard, A.S. Perumal, y A.J.L. Cooper, (1994), Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurones: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain *J. Neurochem.* **62**: 45-53.
- (133) Myers, R.E., G. deCourten-Myers, y K.R. Wagner, (1984) Effect of hypoxia on fetal brain, in *Fetal Physiology and Medicine*, R.W. Beard and P.W. Nathanielz, Editors. Marcel Dekker: New York. p. 419-458.
- (134) Volpe, J.J., (1989), Intraventricular hemorrhage in the premature infant-Current concepts. Part I. *Ann. Neurol.* **25**: 3-11.
- (135) Volpe, J.J., (1989), Intraventricular hemorrhage in the premature infant-Current concepts. Part II. *Ann. Neurol.* **25**: 109-116.
- (136) Medina, J.M., C. Vicario, J.P. Bolaños, A. Tabernero, y E. Fernández, (1993) Lactate utilization and neonatal brain vulnerability, in *Physiologic Basis of Perinatal Care*, J.M. Medina and J. Quero, Editors. Ediciones Ergon S.A.: Madrid. p. 187-201.

Socios de la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia a quien expresamos nuestra sincera gratitud por su mecenazgo:

CAJA MADRID

Farmaindustria

Alcaliber S. A.
Almirall Prodesfarma
Bristol-Myers Squibb, S.L.
Fundación Aventis
Grupo Ferrer Internacional
Laboratorios Esteve
Laboratorios Lilly
Laboratorios Menarini
Laboratorios Rovi
Novartis Farmacéutica
Tedec-Meiji Farma S.A.

Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos
Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid

Colegios Oficiales de Farmacéuticos de: A Coruña, Alicante, Badajoz, Barcelona, Bizkaia, Burgos, Cáceres, Cádiz, Ciudad Real, Girona, Palencia, Principado de Asturias, Santa Cruz de Tenerife, Tarragona, Toledo y Zaragoza.

