

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

VOLUMEN 86. NÚMERO 4 (2020) · OCTUBRE-DICIEMBRE
ACCESO ABIERTO





ANALES RANF

REAL ACADEMIA
NACIONAL DE FARMACIA

REVISTA CIENTÍFICA

AÑO 2020 - NÚMERO 04

DOI:

DEPÓSITO LEGAL: M. 3.869-1958

I.S.S.N. 1697-428X / E-ISSN: 1697-428X

VOLUMEN 86. NÚMERO 4 (2020) · OCTUBRE - DICIEMBRE

SUMARIO

EDITORIAL

A FINAL DE AÑO LLEGÓ LA ESPERANZA...
MERCEDES SALAICES Y JOSÉ CARLOS MENÉNDEZ

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

CONFORMIDAD DE LAVANDINAS COMERCIALES Y
ESTABILIDAD DE DILUCIONES 1G/L UTILIZANDO
DIFERENTES FUENTES DE AGUA POTABLE
MARÍA E. GAVELLI, LAURA C. LUCIANI,
CAROLINA BUSTOS, MARÍA E. OLIVERA

REVISIONES

APLICACIÓN DE LA CALIDAD POR DISEÑO (QBD) EN EL DESARROLLO
DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS DE ERITROCITOS HUMANOS
POR CITOFEROMETRÍA: COMPARACIÓN CON LA
METODOLOGÍA DE DESARROLLO TRADICIONAL
FERNANDO FERRANDIZ VINDEL

GESTIÓN INTEGRAL DE LA NUTRICIÓN ARTIFICIAL DOMICILIARIA:
HUMANIZACIÓN E INNOVACIÓN AL SERVICIO DEL PACIENTE.
JOSÉ MANUEL MARTÍNEZ SESMERO

LA VEGETACIÓN ANTÁRTICA, CENTINELA
DEL CAMBIO CLIMÁTICO.
LEOPOLDO GARCÍA SANCHO

RELACIÓN ENTRE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y LA
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
CARMEN ARAGÓN RUEDA

SESIÓN CIENTÍFICA CELEBRADA EL 26 DE NOVIEMBRE DE 2020 PARA CONME-
MORAR LOS PREMIOS NOBEL EN FISIOLOGÍA O MEDICINA Y EN QUÍMICA 2020
JUAN RAMÓN LACADENA, PABLO GASTAMINZA Y LLUIS MONTOLIU



imagen: www.pixabay.com



**REAL ACADEMIA
NACIONAL DE FARMACIA**

Protección de datos: Anales RANF declara cumplir lo dispuesto por la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal.

Depósito Legal: M. 3.869-1958

I.S.S.N. 1697-428X

DOI: 10.1016/j.anales.2020.100000

Publicación trimestral

(4 números al año)

© 2020. Anales RANF

Reservados todos los derechos. El contenido de la presente publicación no puede ser reproducido, ni transmitido por ningún procedimiento electrónico o mecánico, incluyendo fotocopia, grabación magnética, ni registrado por ningún sistema de recuperación de información, en ninguna forma, ni por ningún medio, sin la previa autorización por escrito del titular de los derechos de explotación de la misma.

Anales RANF, a los efectos previstos en el artículo 32.1 párrafo segundo del vigente TRLPI, se opone de forma expresa al uso parcial o total de las páginas de Anales RANF con el propósito de elaborar resúmenes de prensa con fines comerciales.

Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra sólo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley.

Disponible en internet:

www.analesranf.com

Atención al lector:

anales@ranf.com

Anales RANF.



REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
Calle de la Farmacia, 9-11 (Madrid)
Teléfonos: 91 531 03 07 / 91 531 65 51
I.S.S.N 1697-428X



Presidente Comité Editorial

*Doadrio Villarejo, Antonio L.
Presidente de la Real Academia
Nacional de Farmacia*

Directora Ejecutiva

*Salaices Sánchez, Mercedes.
Vicesecretaria de la Real Academia
Nacional de Farmacia*

Editor Científico

*Menéndez Ramos, José Carlos
Académico de Número de la Real Academia
Nacional de Farmacia*

Consejo Editorial

*Avendaño López, Carmen
Ribas Ozonas, Bartolomé
Villar del Fresno, Ángel María
Sellés Flores, Eugenio
Lacadena Calero, Juan Ramón
Francés Causapé, M^a Del Carmen
Pascual-Leone Pascual, Ana María
Rodríguez-Boto, Gregorio
Salinas Sánchez, Jesús
Académicos de la Real Academia
Nacional de Farmacia*

Coordinación RANF

Manuel Tirado Juárez

Coordinación ARP

Luis Javier Aróstegui Plaza

Diseño web

Montse López Ferres

Diseño revista

M. Nieves Gallardo Collado

Comité Científico

*Tamargo Menéndez, Juan
Mayor Zaragoza, Federico
Rodríguez Artalejo, Antonio
Puerto Sarmiento, Javier
García Sacristán, Albino
Vilas Sánchez, Vicente
Rivas Martínez, Salvador
Nombela Cano, César
del Castillo García, Benito
Sentandreu Ramón, Rafael
Sánchez Muniz, Francisco José
Abelló Gallo, Juan
Ortega Ortiz de Apodaca, Fidel
Basante Pol, Rosa
Alonso Fernández, María José
Ortiz Melón, José Miguel
Giménez Gallego, Guillermo
Medina Jiménez, José M^a
Cerdán García-Esteller, Sebastián
Barcina Angulo, Yolanda
Domínguez-Gil Hurlé, Alfonso
Esteban Rodríguez, Mariano
Monge Vega, Antonio
Cabezas Fernández del Campo, J. Antonio
Sanz Pérez, Bernabé
Guinovart Cirera, Joan J.
Vallet Regí, María
Martínez Fernández, Antonio Ramón
Miras Portugal, M^a Teresa
Manzanares Robles, Jorge*

Comité Científico Internacional

*Prof. Aquiles Arancibia Orrego (Chile)
Prof. Lucette Bardet (Francia)
Kazuhiro Imai (Japón)
Fernando Quevedo Ganoza (Perú)
Vincenzo Tortorella (Italia)
Geoffrey Burnstock (Gran Bretaña)
Bernard Portha (Francia)
Joaquim Alexandre Ribeiro (Portugal)
Herbert Zimmermann (Alemania)
Adolfo Pérez Miravete (Méjico)
Carl - Göran Eden (Suecia)*

ÍNDICE

EDITORIAL

p. 225

A FINAL DE AÑO LLEGÓ LA ESPERANZA...

MERCEDES SALAICES Y JOSÉ CARLOS MENÉNDEZ

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

p. 231

CONFORMIDAD DE LAVANDINAS COMERCIALES Y ESTABILIDAD DE DILUCIONES 1G/L UTILIZANDO DIFERENTES FUENTES DE AGUA POTABLE

MARÍA E. GAVELLI, LAURA C. LUCIANI, CAROLINA BUSTOS, MARÍA E. OLIVERA

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

p. 237

APLICACIÓN DE LA CALIDAD POR DISEÑO (QBD) EN EL DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS DE ERITROCITOS HUMANOS POR CITOFEROMETRÍA: COMPARACIÓN CON LA METODOLOGÍA DE DESARROLLO TRADICIONAL

FERNANDO FERRANDIZ VINDEL

p. 257

GESTIÓN INTEGRAL DE LA NUTRICIÓN ARTIFICIAL DOMICILIARIA: HUMANIZACIÓN E INNOVACIÓN AL SERVICIO DEL PACIENTE

JOSÉ MANUEL MARTÍNEZ SESMERO

p. 269

LA VEGETACIÓN ANTÁRTICA, CENTINELA DEL CAMBIO CLIMÁTICO.

LEOPOLDO GARCÍA SANCHO

p. 281

RELACIÓN ENTRE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

CARMEN ARAGÓN RUEDA

p. 287

SESIÓN CIENTÍFICA CELEBRADA EL 26 DE NOVIEMBRE DE 2020 PARA CONMEMORAR LOS PREMIOS NOBEL EN FISIOLÓGIA O MEDICINA Y EN QUÍMICA 2020

JUAN RAMÓN LACADENA, PABLO GASTAMINZA Y LLUIS MONTOLIU

Y A FINAL DE AÑO LLEGÓ LA ESPERANZA...

AT THE END OF THE YEAR HOPE CAME...

Mercedes Salaices Sánchez¹ y José Carlos Menéndez Ramos²

¹Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Editora Jefe de Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia

²Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Editor Científico de Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia

*corresponding author: anales@ranf.com

Editorial

Acaba un año en el que han sucedido acontecimientos que jamás pudimos imaginar. Ni siquiera percibimos el peligro que corríamos aquel 31 de diciembre del 2019 cuando las autoridades sanitarias de Wuhan (China) comunicaron la existencia de unas decenas de casos de neumonía de etiología desconocida, ni tampoco cuando en enero de 2020 se confinó a toda esa población de 11 millones de habitantes. Estábamos muy lejos de China y eso no nos iba a pasar en Europa, al menos eso es lo que pensábamos muchos.

¡Qué equivocados estábamos! Desde esa primera notificación, los casos no dejaron de multiplicarse, lo que hizo que el 11 de marzo la Organización Mundial de la Salud (OMS) declarara esta infección como pandemia mundial. Lo que ocurrió después lo sabemos todos, la saturación de los sistemas sanitarios, el confinamiento, la paralización social y económica a nivel mundial, las curvas, la desescalada, las fases, los rebrotes, las tasas, las cuarentenas, las sucesivas olas, las restricciones de movilidad, el teletrabajo, las PCR, las mascarillas, el lavado de manos, la distancia social, la ventilación,... A fecha de 31 de diciembre de 2020 nos encontramos inmersos en lo que se puede decir ya que es la tercera ola; se han notificado más de 84.000.000 de casos y, lo que es peor, más de 1.800.000 muertos en todo el mundo, como causa directa de esta infección.

Nada ha sido fácil en este año tan insólito y sobre todo tan doloroso. Sin embargo, la comunidad científica se puso de inmediato en marcha y, tanto a nivel público como privado, se han invertido cantidades ingentes de dinero en la investigación de esta infección; nunca se ha publicado tanto y en tan poco tiempo acerca de una enfermedad. El agente causal fue identificado rápidamente como un virus de la familia Coronaviridae, desconocido hasta entonces, y al que se denominó SARS-CoV-2 y el cuadro clínico asociado se denominó COVID-19. En enero no sabíamos casi nada de este virus, pero se tenían muchos conocimientos previos que posibilitaron que enseguida se avanzara en la investigación del mismo. Así, ya a en enero, se publicó la secuencia completa de 29.903 ribonucleótidos del ARN del coronavirus SARS-CoV-2 (1) y la secuen-

cia de aminoácidos de la glicoproteína S (del inglés spike, de la espícula de la corona del virus), responsable de la infectividad de éste. También rápidamente estuvieron disponibles los test para diagnosticar la infección, que posteriormente se fueron ampliando y sofisticando. Además, durante el tiempo que llevamos de pandemia los investigadores han conocido numerosos aspectos del virus y de su infectividad y los clínicos han aprendido mucho de la enfermedad; saben ahora como tratarla mejor y se han desarrollado numerosos ensayos clínicos para probar la eficacia de numerosos fármacos, ya conocidos por ser utilizados para otras enfermedades. Desgraciadamente, los ensayos no han dado los resultados esperados, por lo que todavía no disponemos de fármacos suficientemente eficaces para controlar los síntomas más graves de esta enfermedad. Afortunadamente, no ha ocurrido lo mismo con las vacunas.

Los rápidos esfuerzos mundiales para desarrollar y probar vacunas contra el SARS-CoV-2 han llevado a que un número sin precedentes de vacunas candidatas hayan comenzado los ensayos clínicos durante 2020. Entre los diferentes prototipos de vacunas que se están desarrollando para desarrollar inmunidad frente al coronavirus SARS-CoV-2 se incluyen: 1) Vacunas de virus inactivados o debilitados. 2) Vacunas que utilizan fragmentos inofensivos de proteínas o capas proteicas que imitan al virus. 3) Vacunas de vectores virales, que utilizan virus que ha sido modificado genéticamente para producir proteínas de coronavirus. 4) Vacunas de ARN o ADN, un enfoque nuevo que utiliza ARN o ADN del virus, genéticamente modificado para generar proteínas del virus que provocan la respuesta inmune. A finales de diciembre, la OMS ha contabilizado 172 prototipos de vacunas en investigación preclínica y 60 que se encuentran ya en evaluación clínica (2). Varios de los ensayos clínicos han demostrado una buena respuesta inmunitaria en humanos, algunas vacunas han demostrado ya su eficacia clínica y seguridad en ensayos de fase 3 y una de ellas se ha empezado ya a administrar antes de finalizar el año 2020 en España y en el resto de Europa, entre otros países. Las Agencias reguladoras de todo el mundo están autorizando estas vacunas en "un plazo de



tiempo acelerado", debido a la emergencia sanitaria, aunque han remarcado que solo se dará la autorización condicional si los datos presentados son suficientemente sólidos para demostrar la seguridad y eficacia de la vacuna.

A continuación se comentan algunos aspectos y resultados de los ensayos clínicos de las vacunas, desarrolladas por Pfizer/BioNTech, Moderna y AstraZeneca/Universidad de Oxford, que ya han recibido o recibirán en breve la autorización de la EMA (European Medicines Agency), para ser administradas a los ciudadanos europeos. Además, la Unión Europea (UE) tiene también comprometida la compra de vacunas con otras cuatro empresas (Sanofi/GSK, Curevac, Janssen/Johnson & Johnson, y Novavax), si reciben la pertinente autorización, previsible a lo largo de 2021. Con estas vacunas se pretende vacunar a unos 900 millones de personas, más del doble de la población de la UE.

VACUNA DE PFIZER/BIONTECH

El pasado 9 de noviembre la farmacéutica Pfizer y la biotecnológica alemana BioNTech anunciaron en un comunicado de prensa (3), los resultados del ensayo clínico en fase 3 de su vacuna, que indicaban que tenía una eficacia de más del 90% para prevenir la enfermedad COVID-19 y un buen nivel de seguridad. Una semana después comunicaron un aumento de la eficacia hasta el 95%, coincidiendo con el anuncio de la misma eficacia por parte de vacuna de Moderna. Solo el primer comunicado de Pfizer, sin aun poder ver los resultados, que todavía tardarían un mes en ser publicados en una revista científica (4), hizo que el entusiasmo fuera general, lo que se tradujo en un incremento desmesurado de las cotizaciones en bolsa y, por desgracia, una confianza excesiva con un descuido de parte de la población en las medidas de protección.

Tras el anuncio, Reino Unido se convirtió el primer país occidental en aprobar (2 de diciembre) y en empezar a utilizar (8 de diciembre) esta vacuna para inmunizar a su población contra este coronavirus; seguirían Estados Unidos, tras la aprobación por la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA, en inglés) y otros países. El 21 de diciembre esta vacuna fue aprobada por la EMA y el domingo 27 de diciembre de 2020 se empezó a administrar en España y en el resto de los países de la UE, empezando por la población mas vulnerable. Fue realmente emocionante ver a Araceli, una mujer de 96 años, residente en un centro de mayores de Guadalajara, y a Mónica, una trabajadora de 40 años de la misma residencia, recibir la primera dosis de la vacuna en España; la segunda la recibirán 21 días después.

La vacuna desarrollada por las empresas Pfizer/BioNTech tiene como nombre técnico BNT162b2, la denominación común internacional es Tozinameran y el nombre comercial Comirnaty. Se

trata de la primera vacuna autorizada que utiliza una tecnología basada en ARN, cuya ciencia básica llevaba investigándose desde hace años, pero que ha necesitado una situación de emergencia, como en la que nos encontramos, y que se inviertan enormes recursos económicos para desarrollarlas adecuadamente y reducir el tiempo de evaluación de los ensayos clínicos. El mismo día 27 de diciembre en que se iniciaba la vacunación en nuestro país, el Dr. Lluís Monteliu explicaba muy bien en un artículo, publicado en su blog "Gen-ética", las características principales de esta vacuna (5). En resumen, se trata de una molécula modificada del ARN mensajero, que porta la información de una de las proteínas del coronavirus SARS-CoV-2, la glicoproteína S. Este ARN mensajero se combina con una mezcla de lípidos para darle la forma de nanopartícula lipídica, que envuelve a la molécula de ARN, permitiéndole así penetrar en el interior celular, donde la información genética que transporta se traduce en glicoproteína S, utilizando la maquinaria ribosomal. La proteína S así fabricada, y fragmentos de esta, formados tras su procesamiento por proteasas celulares, son los que acaban exponiéndose en la superficie celular, nuestro sistema inmunitario las reconoce como extrañas, y se desencadena la producción de anticuerpos y de linfocitos contra estas proteínas. Una vez activado el sistema inmunitario, la próxima vez que la persona vacunada se vea expuesta al coronavirus SARS-CoV-2 el sistema inmunitario recordará que tiene anticuerpos y linfocitos contra la proteína S, conseguirá inactivar al coronavirus y se impedirá así que la infección progrese. Al producirse anticuerpos contra diferentes partes de la proteína S, se garantiza que, aunque aparezcan nuevas mutaciones en ella, siempre habrá otras partes de la proteína que seguirán siendo diana de la respuesta inmunitaria. Así, la variante del virus conocida como B.1.1.7, aparecida en el Reino Unido y que se está expandiendo por Europa, se caracteriza por una mayor infectividad y por la presencia de ocho mutaciones en la proteína S. Aunque estos estudios están todavía sin completar, parece haberse demostrado que la mutación N501Y, la primera en investigarse, no parece afectar significativamente a la respuesta inmune causada por la vacuna de Pfizer/BioNTech (6).

Aunque es teóricamente muy simple, el Dr. Monteliu nos recuerda en su artículo la gran cantidad de ciencia básica que hay detrás de esta vacuna. Ciencia desarrollada por muchos grupos, incluidos los investigadores de BioNTech y muchos otros estudios previos desarrollados por otros grupos, que finalmente en 2020 han servido para completar con rapidez los ensayos pre-clínicos y clínicos, que han demostrado la seguridad y la eficacia de la misma. Por otro lado, las tecnologías de vacunas basadas en ARNm ya habían sido desarrolladas previamente como estrategias frente al cáncer, lo que ha permitido el "reciclaje" y la readaptación de desarrollos tecnológicos ya existentes.

En el ensayo clínico (7), que ha demostrado la eficacia y seguridad de la vacuna BNT162b2 han participado 43.448 voluntarios de 16 años o más de seis países (Estados Unidos, Argentina, Brasil, Sudáfrica, Alemania y Turquía), reclutados entre el 27 de julio y el 14 de noviembre de 2020. Los voluntarios se dividieron aleatoriamente en dos grupos, 21.720 participantes recibieron dos dosis de BNT162b2 (30 µg por dosis), separadas por 21 días, y 21.728 participantes recibieron dos dosis de placebo. Los resultados del ensayo muestran que hubo solo 8 casos de COVID-19 entre los participantes que recibieron la vacuna BNT162b2, frente a los 162 casos que ocurrieron entre los asignados a placebo, resultado que les ha permitido concluir que esta vacuna tiene un 95% de eficacia. Se observó una eficacia similar de la vacuna (del 90 al 100%) en los subgrupos definidos por edad, sexo, raza, origen étnico, índice de masa corporal y la presencia de patologías coexistentes. Por otra parte, entre los 10 casos de Covid-19 grave que ocurrieron después de la primera dosis, 9 ocurrieron en los participantes que recibieron el placebo y 1 en los que recibieron BNT162b2. En cuanto al perfil de seguridad, los efectos adversos que aparecieron han sido leves (dolor a corto plazo de leve a moderado en el lugar de la inyección, fatiga y dolor de cabeza) siendo la incidencia de eventos adversos graves baja y similar en los grupos de vacuna y placebo. Por tanto, en este ensayo se demuestra que la administración de dos dosis de BNT162b2 confiere una protección del 95% contra COVID-19 en personas de 16 años o más, con un nivel de seguridad similar al de otras vacunas virales, al menos en el tiempo que han tenido para hacer el seguimiento. Tras el comienzo de su administración, se han observado algunas reacciones alérgicas a la vacuna; por ejemplo, en Estados Unidos se han producido 21 casos de anafilaxis en las 1.893.360 dosis administradas en el período 14-23 de diciembre, lo que supone 11,1 casos por cada millón de dosis (8).

VACUNA DE MODERNA

La vacuna denominada mRNA-1273, que ha desarrollado la empresa biotecnológica Moderna, utiliza la misma tecnología que la de Pfizer, consistente en una molécula modificada del ARN mensajero que porta la información de la glicoproteína S y que se rodea de lípidos para formar una nanopartícula lipídica, que permite hacerla llegar al interior celular. Las diferencias en la formulación de esta vacuna con respecto a la de Pfizer hacen que sea más estable, necesiéndose solo temperaturas de -20 °C para almacenarla, lo que sin duda puede facilitar su distribución. Esta vacuna recibió la autorización de la FDA para su uso en Estados Unidos el 18 de diciembre de 2020 y el 6 de enero de 2021 también se espera que la autorice la EMA.

Si bien los resultados de eficacia y seguridad del ensayo

clínico que se está realizando con esta vacuna fueron comunicados por la empresa a mediados de noviembre (9), no fue hasta el 30 de diciembre de 2020 cuando se publicó el artículo, en la revista *New England Journal of Medicine* (10), con dichos resultados y las características del ensayo clínico (11). El ensayo se ha desarrollado en 99 centros de Estados Unidos con más de 30.420 voluntarios de 18 años o más, que se dividieron de forma aleatoria en dos grupos del mismo tamaño, que recibieron la vacuna o el placebo. El proceso de selección de voluntarios se ajustó con el fin de incluir un número representativo de personas de minorías raciales y personas que por sus circunstancias tuvieran riesgo de contraer la infección. Hasta el 50% de los participantes se consideraban en riesgo de enfermedad grave y el 24,8% tenía 65 años o más. Se utilizaron dos dosis de 100 µg de la vacuna ARNm-1273 o placebo separadas por 28 días, que se inyectaron entre el 27 de julio y el 23 de octubre de 2020. Los resultados publicados muestran que, tras la segunda inyección, la enfermedad sintomática por COVID-19 ocurrió en 185 voluntarios del grupo placebo y en 11 del grupo de ARNm-1273, lo que les ha permitido concluir que esta vacuna tiene una eficacia del 94,1%. Realmente impresiona ver la Figura 3 de este ensayo clínico, así como la también Figura 3 del ensayo de la vacuna de Pfizer. En ambas se puede apreciar cómo, desde las primeras semanas, se separan las curvas de incidencia de casos en los grupos tratados con las vacunas y los grupos placebo. Otro resultado importante de este ensayo fue que ningún voluntario que recibió la vacuna desarrolló COVID-19 grave mientras que, entre los del grupo control, se dieron 30 casos graves, uno de los cuales murió. En cuanto a la seguridad, la mayoría de los efectos adversos de la vacuna detectados en este ensayo fueron leves o moderados y comunes a otras vacunas, incluyendo reacciones locales (dolor, hinchazón, eritema), dolor de cabeza, fatiga y mialgia que desaparecieron en 1 a 3 días.

VACUNA DE OXFORD-ASTRAZENECA

El 8 de diciembre se publicaron en la revista *Lancet* los resultados de eficacia y seguridad del ensayo clínico de la vacuna ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222), desarrollada por la empresa farmacéutica AstraZeneca y la Universidad de Oxford (12). La Agencia Reguladora de Medicinas y Productos Sanitarios del Reino Unido autorizó esta vacuna el 30 de diciembre y a partir del 4 de enero de 2021 se empezará a administrar en este país. Se espera que esta primera aprobación abra el paso a la aprobación de esta vacuna también en la UE y en otros países.

La vacuna ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) fue desarrollada en la Universidad de Oxford en los primeros meses de 2020, probada en los primeros voluntarios en abril, y desde entonces ha estado sometida a sucesivos ensayos clínicos con miles de personas de



18 años o más. Utiliza una tecnología diferente a la de las vacunas Pfizer y Moderna. Mientras que esas dos vacunas usan ARNm del coronavirus, la de Oxford-AstraZeneca utiliza un "vector viral", en este caso un adenovirus que causa el resfriado común en los chimpancés (ChAdOx1), modificado con el gen de la proteína de la espícula del virus SARS-CoV-2 (spike protein; nCoV-19) para así estimular la respuesta inmune.

En el artículo publicado en Lancet se muestran los resultados de eficacia deducidos de los ensayos realizados con 11.636 voluntarios de Reino Unido y Brasil y los datos de seguridad de más de 23.745 participantes en cuatro ensayos clínicos llevados a cabo en Reino Unido, Brasil y Sudáfrica (13,14,15,16). En los estudios de eficacia, la mitad de los participantes recibieron dos dosis estándar de ChAdOx1 nCoV-19, conteniendo 5×10^{10} partículas virales, separadas por un periodo de 28 días, y la otra mitad recibieron dos dosis de placebo. Probablemente por equivocación, un subgrupo de los participantes británicos recibió solo la mitad de la dosis de vacuna en su primera administración y la dosis estándar en la segunda. La eficacia de esta vacuna fue del 62,1 % en los participantes que recibieron las dos dosis estándar y, curiosamente, del 90% en los participantes que recibieron una primera administración con la mitad de la dosis seguida de la dosis estándar. Otro resultado interesante fue que 21 días después de la primera administración hubo diez casos de hospitalizaciones por COVID-19, todos en el grupo control, dos de las cuales fueron graves con fallecimiento de uno de los pacientes. En cuanto a la seguridad, se observaron efectos adversos leves similares a los de las otras dos vacunas; solo un paciente al que se le administró esta vacuna tuvo un efecto indeseable grave (mielitis transversa), susceptible de estar relacionado con la vacuna, lo que motivó la interrupción temporal del ensayo a comienzos de septiembre. Una limitación a este estudio es que menos del 4% de los participantes era mayor de 70 años, solo una minoría de los participantes presentaba comorbilidades y no hubo participantes mayores de 55 años que recibieran el régimen de administración mixto que fue más eficaz.

A pesar de que esta vacuna puede ser algo menos eficaz que las dos vacunas de ARNm, tienen dos ventajas importantes. En primer lugar, su bajo coste (2-3 euros por dosis), en comparación con el alto coste de las dos vacunas de ARNm (entre 17 y 30 euros por dosis), lo cual es muy prometedor para que pueda ser administrada en países de ingresos bajos y medianos. En segundo lugar, es más fácil de transportar y almacenar. A diferencia de la vacuna de Pfizer, que debe almacenarse en ultracongeladores a -80°C o la de Moderna, que requiere almacenarse a -20°C , la vacuna de Oxford-AstraZeneca puede ser almacenada y distribuida a temperaturas entre 2 y 8°C . Por tanto, la aprobación de esta vacuna puede constituir un punto de inflexión para controlar la pandemia, ya que con

ella es más fácil que se pueda llegar a las personas que viven en las regiones más pobres del mundo. Sin embargo, existirán otros problemas a solucionar en muchos de los países de ingresos bajos y medianos, donde faltan medios para identificar, ubicar y llegar (dos veces) fácilmente a los adultos que han de ser vacunados.

Una de las limitaciones de los estudios con las tres vacunas es el corto periodo que se ha tenido para obtener los datos de eficacia y seguridad. Así, todavía se necesita tiempo y experiencia para estar seguros de que estas tres vacunas, y las que vendrán, son realmente eficaces para controlar esta pandemia y quedan preguntas sin responder, como la duración de la protección, si se necesitarán dosis de refuerzo, si van a prevenir las formas más graves de la enfermedad, si funcionan bien en todas las edades, si realmente son tan seguras como parece, ... Con el seguimiento que se hará de los participantes en los distintos ensayos clínicos, al menos durante dos años, y con la vacunación a la población, tendremos muchos más datos para confirmar y ampliar los datos obtenidos hasta ahora de estas vacunas.

En resumen, estamos viviendo una situación de desarrollo de vacunas impensable hace tan solo un año y la población en general estamos siendo testigos de cada paso que se va dando. Nunca se había dado tanta importancia a los científicos y a la ciencia en general como este año 2020. Es difícil no entusiasmarse con los hallazgos realizados y, concretamente, con la existencia de estas tres vacunas COVID-19 seguras y eficaces, así como con las que se están utilizando en Rusia (Sputnik V), en China (Sinopharm y otras cuatro) y otros países, así como con muchas otras que ya están en ensayos clínicos o cerca de iniciarlos. Entre ellas, algunas vacunas españolas, como son las que están desarrollando los grupos del Dr. Mariano Esteban, basada en vectores virales modificados de Vaccinia, un virus inactivado de viruela, a los que se le han insertado el gen de la glicoproteína S, la del grupo del Dr. Luis Enjuanes y la Dra. Isabel Sola, que consiste en replicones de ARN derivados del genoma del virus SARS-CoV-2, que obtienen mediante ingeniería genética para eliminar las partes que causan propagación y virulencia del virus y conservar aquellas que ayudan a inmunizarse (como la proteína de la espícula), o la del grupo del Dr. Vicente Larraga, basada en ADN recombinante, que contiene genes de las proteínas de la superficie del virus. Algunas de estas vacunas españolas van a empezar los ensayos clínicos y si todo va bien, a finales del año 2021 o en 2022 podrían estar también listas para su comercialización, aunque para ello, como estos investigadores han manifestado varias veces, se necesita que las grandes empresas apuesten también por ellas.

Con esta variedad de vacunas, que previsiblemente vamos a tener, y si hay una inversión global grande en la producción, adquisición, distribución y cooperación, parece probable que en 2021

las vacunas puedan estén disponibles para llegar a todos los países del mundo, al menos para vacunar a los grupos prioritarios. El haber conseguido desarrollar, evaluar y aprobar vacunas COVID-19 en menos de un año es un triunfo rotundo de la ciencia y esperamos que ésto haga ver a los gobernantes la importancia de la invertir en ciencia para resolver los problemas tanto sanitarios como no sanitarios de la población.

Hace unos días oíamos a una enfermera decir “Este año nos ha tocado ser fuertes, el próximo año nos tiene que tocar ser felices”. Gracias a las vacunas desarrolladas en un tiempo record, esperamos que estos deseos se cumplan y vayamos recuperando la normalidad perdida. Para que ello sea posible, las autoridades sanitarias de los distintos países se enfrentan ahora a un plan de vacunación de unas dimensiones jamás conocidas; la ciencia ha cumplido, ahora les toca a ellos organizar, también en un tiempo récord, la logística de la vacunación. Solo si lo hacen bien y si son capaces de que llegue a la mayoría de la población mundial, quizás para finales del próximo año podamos celebrar el control global del SARS-CoV-2. ¡Ojalá en 2021 podamos decir adiós a esta pandemia y nos volvamos a quejar solo de las cosas “poco importantes” de la vida!

REFERENCIAS

1. GenBank: MN908947.3. Severe acute respiratory syndrome coronavirus isolate Wuhan-Hu-1, complete genome. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947>
2. World Health Organization. Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> (Actualizado a 28 de diciembre).
3. Pfizer and Biontech announce vaccine candidate against COVID-19 achieved success in first interim analysis from phase 3 study. <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer-and-biontech-announce-vaccine-candidate-against>
4. Polack FP, Thomas SJ., Kitchin N *et al.* Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. N Engl J Med. 2020 Dec 31;383(27):2603-2615. Epub 2020 Dec 10.
5. Montoliu LI. La ciencia que hay detrás de la primera vacuna contra la COVID-19- Gen-Ética. <https://montoliu.naukas.com/2020/12/27/la-ciencia-que-hay-detras-de-la-primera-vacuna-contra-la-covid-19/>
6. Callaway E. Could new COVID variants undermine vaccines? Labs scramble to find out. <https://www.nature.com/articles/d41586-021-00031-0/>.
7. ClinicalTrials.gov number, NCT04368728. Study to Describe the Safety, Tolerability, Immunogenicity, and Efficacy of RNA Vaccine Candidates Against COVID-19 in Healthy Individuals <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04368728>.
8. CDC COVID-19 Response Team; Food and Drug Administration. Allergic reactions including anaphylaxis after receipt of the first dose of Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccine — United States, December 14–23, 2020. <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/70/wr/mm7002e1.htm>
9. Moderna’s COVID-19 Vaccine Candidate Meets its Primary Efficacy End-point in the First Interim Analysis of the Phase 3 COVE Study. <https://investors.modernatx.com/news-releases/news-release-details/modernas-covid-19-vaccine-candidate-meets-its-primary-efficacy>
10. Baden LR, El Sahly HM, Essink B *et al.* Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. N Engl J Med 2020 Dec 30.doi: 10.1056/NEJMoa2035389. Online ahead of print
11. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04470427. A Study to Evaluate Efficacy, Safety, and Immunogenicity of mRNA-1273 Vaccine in Adults Aged 18 Years and Older to Prevent COVID-19. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04470427>
12. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. Lancet 2020; published online Dec 8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32661-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32661-1)
13. ISRCTN89951424. A phase III study to investigate a vaccine against COVID-19. <https://doi.org/10.1186/ISRCTN89951424>
14. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04324606. A Study of a Candidate COVID-19 Vaccine (COV001) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04324606>
15. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04400838. Investigating a Vaccine Against COVID-19. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04400838>
16. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04444674. COVID-19 Vaccine (ChAdOx1 nCoV-19) Trial in South African Adults With and Without HIV-infection. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04444674>

Si desea citar nuestro artículo:
Mercedes Salaices y José Carlos Menéndez

Y al final de año llegó la esperanza...

An Real Acad Farm [Internet].

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 4 (2020) · pp. 225 - 230

DOI: <http://>

COMPLIANCE OF COMMERCIAL BLEACHES AND STABILITY OF 1 G/L-DILUTIONS USING DIFFERENT SOURCES OF DRINKING WATER

CONFORMIDAD DE LAVANDINAS COMERCIALES Y ESTABILIDAD DE DILUCIONES 1G/L UTILIZANDO DIFERENTES FUENTES DE AGUA POTABLE

María Emilia Gavelli¹#, Laura Carolina Luciani Giacobbe²#, Carolina Bustos Fierro¹, María Eugenia Olivera^{2*}

¹ Farmacia Central del Hospital Nacional de Clínicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Santa Rosa 1564, X5000 ETF, Córdoba, Argentina

² Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA), CONICET and Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Haya de la Torre and Medina Allende, 5000, Córdoba, Argentina.

Both authors contributed equally to this work.

*corresponding author: eugenia.olivera@unc.edu.ar

RESUMEN

Introducción y Objetivos: En el contexto de COVID-19, la Organización Mundial de la Salud recomienda el uso de soluciones de hipoclorito de sodio 1 g/L, como una concentración capaz de inactivar el SARS-CoV-2 y la gran mayoría de patógenos presentes en el entorno sanitario. En consecuencia, hay un renovado interés en realizar estudios de estabilidad de estas disoluciones. El objetivo de este trabajo es verificar la concentración de cloro activo en varias marcas comerciales de hipoclorito de sodio y proponer una fecha límite de uso para soluciones de 1 g/L, obtenidas por dilución con agua potable proveniente de diferentes fuentes.

Métodos: La concentración de cloro activo de preparaciones comerciales con concentración nominal entre 25-60 g/L fue valorada por titulación iodométrica. A partir de una de las marcas comerciales se prepararon diluciones de 1 g/L usando agua proveniente de diferentes plantas potabilizadoras en Córdoba, Argentina. Las disoluciones se almacenaron a temperatura ambiente, tanto expuestas como protegidas de la luz y fueron posteriormente tituladas a intervalos de tiempo preestablecidos. La fecha límite de uso se alcanzó cuando la concentración de cloro activo cayó por debajo del 90 % de la inicial.

Resultados: La concentración de cloro activo en las soluciones comerciales estuvo dentro de los valores establecidos por la normativa vigente. Las diluciones protegidas de la luz mostraron una disminución menor al 10 % en la concentración de cloro activo durante los primeros 10 días de ensayo. Sin embargo, una muestra superó el límite de aceptación luego de 14 días. En contraste, en las muestras expuestas a la luz, la concentración de cloro activo cayó a 96.4 % a las 24 horas y 79.3 % después de 48 horas. No se observaron diferencias relacionadas con las fuentes de agua potable.

Conclusiones: se confirmó la concentración nominal de cloro activo en todas las marcas comerciales evaluadas. Independientemente de la fuente de agua potable utilizada para la dilución, las soluciones de 1 g/L fueron estables durante 10 días cuando se almacenaron a temperatura ambiente y protegidas de la luz. En contraste, las soluciones expuestas a la luz mantienen la concentración de cloro activo durante solo 24 horas.

ABSTRACT

Introduction and objectives: In the context of COVID-19, the World Health Organization has recommended the use of extemporaneously prepared bleach solutions of 1 g/L, as a conservative concentration able to inactivate SARS-CoV-2 and the vast majority of other pathogens that may be present in the healthcare setting. Consequently, there is a renewed interest in conducting stability studies of these solutions. The goal of this work was to verify the available chlorine concentration in several bleach solutions trademarks and to propose a beyond use date for 1 g/L bleach solutions, obtained after dilution with drinking water from different sources.

Methods: Bleach trademarks, with nominal concentrations between 25-60 g/L, were subjected to iodometric titration to determine the available chlorine concentration. One trademark was used to prepare 1 g/L dilutions using water from different purification plants in Córdoba, Argentina. The samples were stored at room-temperature, both exposed or protected from light. The available chlorine concentration was determined by titration at preestablished time intervals. The beyond use date was reached when the available chlorine concentration dropped below 90 % of its initial.

Results: The concentration of active chlorine in the different trademark bleaches was within the values established by current regulations. Diluted solutions protected from light showed a decrease of less than 10 % in active chlorine concentration during the first 10 days of assay. However, one sample exceeded the acceptance limit after 14 days. In contrast, in the samples exposed to light, the concentration of active chlorine dropped to 96.4 % at 24 hours and 79.3 % after 48 hours. No differences related to drinking water sources were observed.

Conclusions: Compliance of the nominal available chlorine concentration in trademark bleach solutions was confirmed. Regardless the water source used for dilution, 1 g/L bleach solutions were stable for 10 days when stored at room temperature and protected from light. Instead, solutions exposed to light maintain their available chlorine concentration for only 24 hours.

Palabras Clave:

coronavirus
desinfección
blanqueadores
control de infecciones
control de calidad

Keywords:

coronavirus
disinfection
bleaching agents
infection control
quality control

1. INTRODUCCIÓN

The recent emergence of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) causing COVID-19 is a major burden for health care systems worldwide. Consistent and correct disinfection procedures are of enormous importance.

Bleach, also known as sodium hypochlorite solution, is a germicidal agent, commonly used for surface disinfection. It is fast-acting and effective against bacteria, fungi and viruses, even when used in very low concentrations. It is also widely available at a low cost (1–4).

Sodium hypochlorite solution is a strong oxidizing agent, in which the Cl atom of the available chlorine species, i. e. hypochlorous acid (HOCl) and hypochlorite ion (OCl⁻) behave as Cl⁺, a strong electrophile that reacts with substances of high electronic densities (5).

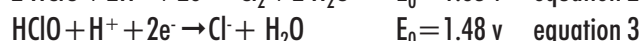
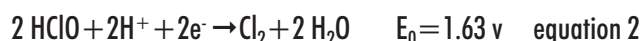
The germicidal activity of sodium hypochlorite solutions mainly depends on the concentration of HOCl species, since it can passively diffuse through the cell wall and plasmatic membrane of microbes, affecting both the exterior and interior of the cell. On the contrary, the ionized OCl⁻ has a low germicidal activity due to its limited ability to diffuse through the microbial cell wall, and mainly acts oxidizing the cell surface (Figure 1).

The relative concentration of available chlorine species is significantly affected by the solution pH, which is known to also affect the chemical stability of the solution (5).

As shown in equation 1, Cl₂ predominates at acid pH; however, it easily escapes from the solution since it is a low water soluble gas. As the solution pH increases, the equilibrium shifts towards the formation of the HOCl species (prevalent at pHs between 5.5–9.5) and OCl⁻ (pHs above 11).



As can be seen in equations 2 to 5, the standard electrode potentials for the reduction of HOCl is higher than that of OCl⁻ (5), which means that HOCl species is more reactive; the challenge for practical use of bleach is that although chlorine solution shelf-life is greatest at pH > 11 (pH of concentrated solutions), it is more effective in disinfecting at pH < 8 (pH of diluted solutions) (6,7).



Concentrated trademark presentations of bleach with available chlorine concentrations between 20 to 110 g/L are regulated as household products.

In the context of COVID-19, the World Health Organization (WHO) has recommended the use of extemporaneously prepared bleach solutions of 1 g/L, as a conservative concentration able to inactivate SARS-CoV-2 and the vast majority of other pathogens that

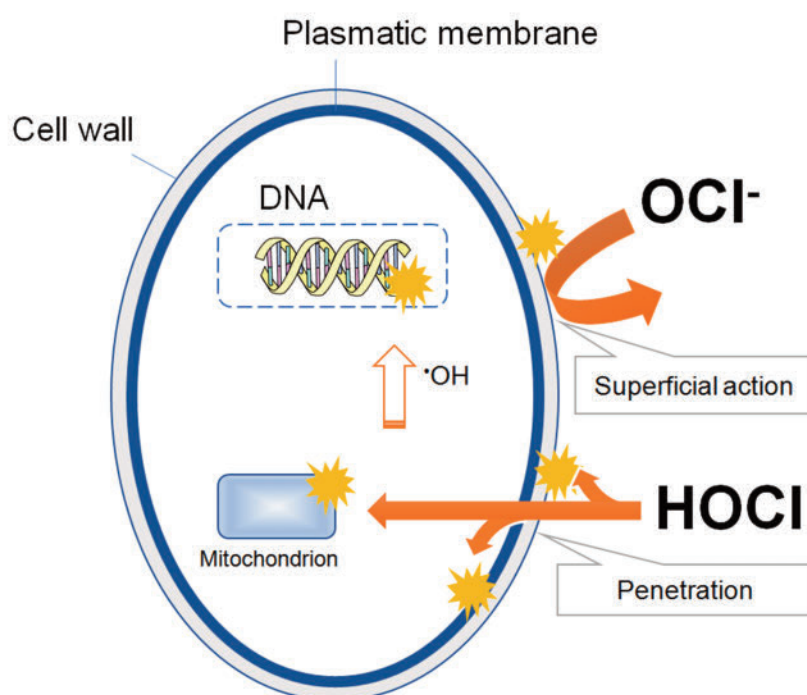


Figure 1. A model that represent the mechanisms of the germicidal actions of HOCl and OCl⁻ based on their ability to penetrate the membrane into the microbial cell. Adapted from reference (5).

may be present in the healthcare setting (8). To ensure the proper disinfection, concentration and time of application are of great concern.

Some authors have determined that bleach solutions of 0.5 g/L and 5 g/L remain stable for several days (6,9), however, the chemical stability of 1 g/L solutions has not yet been demonstrated.

It is widely known that concentrated bleach solutions have an expected and permitted reduction in the available chlorine concentration from up to 33 % during the 150 days of shelf-life (10), which may affect significantly the concentration of diluted solutions if they are made based on the nominal labeled concentration. In addition, the effect of light, heat, contact with air, and the presence of traces of metals, metal ions and organic matter can accelerate chemical degradation (5, 7, 11,12, 13).

In Córdoba City (Argentina), drinking water comes from different sources as lakes, dams and waterholes, and is processed in different purification plants. Although the quality of drinking water can be guaranteed, there is a wide range of acceptable limits in their mineral and organic content, which could affect the chemical stability of diluted bleach.

Finally, the unusually high demand for bleach (and other sanitary products) during COVID-19, may exceed the control capacity of sanitary authorities, generating a favourable field for the appearance of counterfeit or adulterated products (14–16), which suggests the convenience of performing some quality controls.

The objectives of this work were to determine the compliance of the available chlorine concentration in trademark bleach solutions and to propose a beyond use date (BUD) for 1 g/L bleach solutions obtained using different drinking water sources as diluent.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Water sources

Samples of drinking water were taken from five different sources around Córdoba city, named from I to V (see table 1). To avoid variations related to water storage conditions, samples were taken directly from the drinking water network, from the tap located at the previous entrance to the tank. Their conductivity and pH were directly measured with a Mettler Toledo pHmeter, at 25 °C using a 2-steel poles conductivity sensor and a glass electrode of Ag/AgCl, respectively. The Chemical Oxygen Demand (COD) was determined by the Standard Methods for the examination of water and wastewater (5220 D) with a detection/quantification limit of 15/42 mg/L of O₂ (17) in the Center of Applied Chemistry (CEQUIMAP; Córdoba, Argentina). Values of pH between 6.5–8.5, conductivity below 1000 µS/cm were considered acceptable. The COD levels are not established for drinking water, however, it is known that surface waters present values of 20 mg/L of O₂ or less in unpolluted waters up to more than 200 mg/L of O₂ in waters receiving effluents (18).

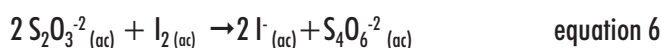
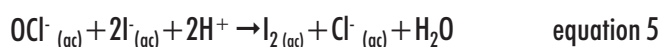
3. BLEACH COMMERCIAL SOLUTIONS

Three trademark bleach presentations, with expiration dates within the next 150 days and nominal concentration between 25 to 60 g/L, were used in this study. The new containers were opened on the day of the assay.

4. AVAILABLE CHLORINE TITRATION

Reagents: Potassium iodide (analytical grade; Pura Química ®, Argentina), glacial acetic acid 99.5 % (pro-analysis quality, Cicarelli ®, Argentina), sodium thiosulfate 0.05 M (normalized analytical reagent Anedra ®, Argentina) and distilled water (Regondi ®, Argentina). Starch solution was prepared dissolving 1 g of soluble starch in 200 mL of water as described in Farmacopea Argentina 7 (FA 7) (19).

Procedure: Immediately after reception the concentrated bleach solutions were titrated as described by FA 7 (19). Briefly, 1 mL of the concentrated bleach solutions was diluted 1:50 with distilled water. An exactly measured 1 mL aliquot of this dilution was added to a glass flask containing 5 mL of distilled water and 0.5 mL of glacial acetic acid. Then, 0.10 g of potassium iodide were added to react with the available chlorine species producing a stoichiometric amount of molecular iodine (equation 5) to be titrated with 0.05 M sodium thiosulfate (equation 6). Just before reaching the theoretical end point, a few drops of starch solution were added. Each mL of 0.05 M sodium thiosulfate solution consumed in the reaction was equivalent to 3.723 mg of sodium hypochlorite. Additionally, a blank titration was performed and the volume of sodium thiosulfate consumed was discounted from the volume of the end point. The titrations were performed in triplicate. The pH of the solutions before and after titration was 2.40 ± 0.05.



5. BUD DETERMINATION FOR DILUTED BLEACH SOLUTION

The 1 g/L solutions were prepared by diluting concentrated bleach with drinking water, based on the labeled concentration of available chlorine. Briefly, 2.2 mL of trademark A (46 g/L of available chlorine) were added to a 100 mL volumetric flask and taken to final volume with drinking water coming from five different sources (I to V, see table 1).



Table 1. Sources of drinking water used to prepare bleach dilutions in this study.

Name	Sampling region	Water source	Water purification plant
I	North	San Roque Lake	Suquía (Agua Cordobesas)
II	Eastern	San Roque Lake	Barrio Patricios Cooperative
III	South	Los Molinos Lake	Los Molinos (Agua Cordobesas)
IV	West	Rio Icho Cruz Dam	Coopi-Carlos Paz Cooperative
V	Central	San Roque Lake	Suquia (Agua Cordobesas)

The diluted solutions were transferred to disinfected plastic bottles, tightly closed and stored at room-controlled temperature (20-25 °C) under the conditions described in table 2. In addition, a solution obtained with drinking water number V was transferred to a transparent container and exposed to room light.

Table 2. Conditions of preparing and storage of diluted bleach solutions

Sample number	Drinking water used for dilution	Type of container
1	I	Opaque
2	II	Opaque
3	III	Opaque
4	IV	Opaque
5	V	Opaque
6	V	Transparent

To determine chlorine concentrations, 1 mL of each 1 g/L solution was titrated (in triplicate) at 0, 1, 12 hours and 1, 2, 3, 5, 7, 10 and 14 days, using the experimental procedure described for the concentrated bleach solutions. The BUD of the diluted solutions were considered achieved when the average chlorine dropped below 90 % of its initial concentration. The normal chlorine amount contained in the different drinking water sources was considered negligible.

6. RESULTS AND DISCUSSION

The pH, conductivity and COD values of drinking water samples were within the limits established by international recommendations (18). However, sample N° 5 has a COD value higher than expected (table 3).

Table 3. Drinking water analysis

Water sample	Conductivity ($\mu S/cm$)	pH	COD (mg/L)
I	296	7.40	< 15
II	301	7.93	< 15
III	143.5	6.93	< 15
IV	120.7	7.73	< 15
V	295	8.04	130

The WHO has proposed the use of 1 g/L bleach solutions for disinfection in institutional settings since it provides a large margin of safety regarding the effective concentration necessary to inactivate the majority of microorganisms on inert surfaces.

Bleach solutions are usually prepared based on standard procedures that consider the labeled available chlorine of the concentrated bleach, which is known to decrease with time. Thus, the confirmation that nominal concentration is maintained within the accepted range during the shelf-life period is an additional warranty that the expected concentrations can be obtained after dilution, provided that correct procedures are followed.

Table 4 shows the available chlorine of the assayed concentrated solutions. As can be seen there, the values obtained are in agreement with those declared in their respective labels and also with the concentration decrease permitted for the time elapsed from the date of elaboration (Argentinian regulation 7355/2019) (10).

Table 4. Available chlorine concentration in several trademark bleaches as determined by iodometric titration.

Brand	Labeled concentration (g/L)	Experimental (g/L)	Time ^a	Allowed concentration declining (%) ^b	Requirement compliance
A	25	27.01	29	to 3	Yes
	25	27.01	78	up to 7	Yes
	25	27.38	92	up to 9	Yes
	46	49.58	14	up to 3	Yes
	58	52.17	116	up to 20	Yes
B	25	24.79	59	up to 5	Yes
C	60	52.17	138	up to 25	Yes

^aTime elapsed from the manufacturing date and the day of titration

^bAllowed reduction of available chlorine concentration considering the time elapsed from the date of elaboration (Argentinian regulation 7355/2019).

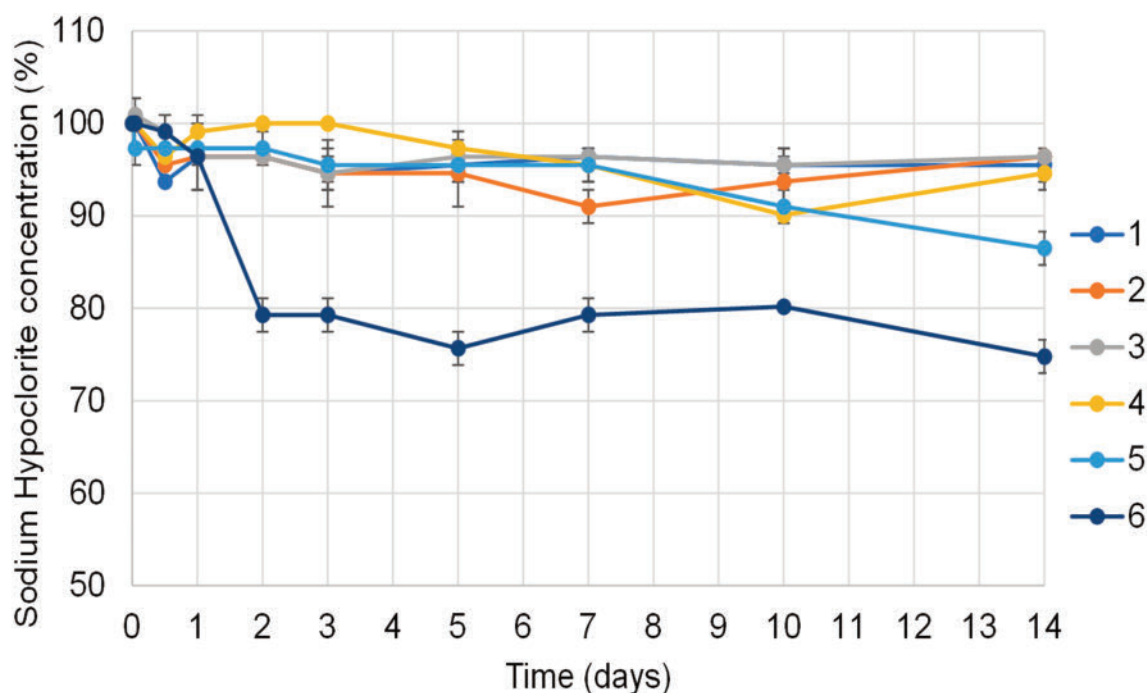


Figure 2. Mean available chlorine concentrations determined in 1 g/L bleach solutions studied over a 14-days period. All the samples were prepared using drinking water from different sources around Cordoba City as diluent. All samples were stored at room-controlled temperature in opaque containers, except for sample number 6, which was stored in a transparent container and exposed to light.

Notice that the standard iodometric titration requires acidification of the solution in order to shift the equilibrium towards the formation of HClO as the only species. Therefore, the results obtained correspond to the total available chlorine.

Since bleach dilutions are usually performed with drinking water, which is known to contain salts, metals and organic matter, it is important to know if the different water sources of the city have an impact on the solutions' BUDs.

Figure 2 shows the variation of available chlorine in 1 g/L bleach solutions relative to their initial concentration.

During the first 10 days of assay all the solutions protected from light showed less than 10 % decrease in the available chlorine concentrations. On the 14th day, however, the concentration of available chlorine in sample N° 5 fell below the acceptance limit for the BUD (13.5 %). This behaviour can be related to the higher COD value observed in its respective water sample. In addition, the differences in water pH and conductivity could also explain the small variations observed among the solutions protected from light (Figure 2). In fact, it is known that the presence of salts, organic matter along with metal salts with redox activity, such as Fe, Cu or Zn can affect the stability of hypochlorite solutions.

In the sample exposed to light (sample N° 6), a sharp decrease of available chlorine concentration was observed, with a 3.6 % decrease at 24 h and 20.7 % at 48 h. These results confirm the importance of light protection to preserve bleach stability, whose BUD cannot be extended to more than 24 h when it is not protected from light. In line with this results, Rutala et al (20) informed a decrease in available chlorine concentration of 50 to 60 % after a 30 days storing period in transparent bottles.

These results are in agreement with those reported by Iqbal et al that recommended a maximum shelf-life of 4–6 days for bleach solutions of 0.5 g/L and 5 g/L, prepared with drinking water and maintained in inactivic containers at 20–35 °C (6). Other authors informed a longer BUD of, at least, 200 days for 5 g/L bleach solutions stored in the darkness at 24 °C (9). This increase in stability could be related to the use of sterile distilled water, where the presence of organic matter or other contaminants would be negligible.

Assigning the appropriate BUD to chlorine solutions is essential to quality control and to ensure the expected benefits of disinfection in both institutional and community settings. In our work, we have developed evidence-based recommendations to assign a BUD for 1 g/L bleach solutions prepared with drinking water. These conditions could be extrapolated to the household or hospital level, provided that clean and disinfected containers are used; and must be understood as a guideline to assign the BUD of bleach solutions used for disinfection purposes that could bring several benefits.

It is important to note that degradation can be accelerated under non-ideal conditions of preparation or storage, such as using contaminated water, storing solutions in open or non-opaque containers (20), or exposing them to high temperatures (21). Moreover, improper manipulation of the concentrated solutions or the more frequent opening of the containers could allow the external factors to have a more substantial influence in the degradation rate. In this context, the intervention of the Pharmacy Services is recommended, providing use protocols and training and supervising staff (10). Their involvement in determining active chlorine in both concentrated and diluted bleach solutions can also provide a greater certainty for its correct use in the health care settings.



7. CONCLUSIONS

The compliance of the available chlorine concentration in several trademark bleach solutions was confirmed. In addition, this study provides conclusive information on the period and storage conditions under which 1 g/L bleach solutions can be used as a surface disinfectant. Solutions were stable for 10 days when were stored at room temperature and in an opaque container. Instead, solutions stored without protection from light, only maintains its stability for 24 hours.

8. REFERENCES

1. Ponzano GP. Sodium hypochlorite: History, properties, electrochemical production. *Contrib Nephrol*. 2007;154:7–23.
2. World Health Organization. Infection prevention and control of epidemic- and pandemic-prone acute respiratory infections in health care. WHO Guidel. 2014;1–156.
3. Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *J Hosp Infect*. 2020;104(3):246–51.
4. Grupo de trabajo Farmacotecnia de la SEFH. RECOMENDACIONES SOBRE EL USO DE DESINFECTANTES Y LIMPIEZA EN LAS ÁREAS DE ELABORACIÓN DE MEDICAMENTOS FRENTE AL COVID 19 [Internet]. Madrid; 2020 [cited 2020 July 8]: [about 8 p.]. Available from: <https://www.sefh.es/fichadjuntos/Desinfeccion-limpieza-Farmacotecnia-COVID19.pdf>
5. Fukuzaki S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Sci*. 2006;11(4):147–57.
6. Iqbal Q, Lubeck-Schricker M, Wells E, Wolfe MK, Lantagne D. Shelf-life of chlorine solutions recommended in Ebola virus disease response. *PLoS One*. 2016;11(5):1–12.
7. Gordon G, Adam L, Bubnis B. Minimizing chlorate ion formation. *J Am Water Works Assoc*. 1995;87(6):97–106.
8. World Health Organization. Cleaning and disinfection of environmental surfaces in the context of COVID-19: interim guidance. Geneva, Switzerland; 2020.
9. Pişkin B & Türkün M. Stability of various sodium hypochlorite solutions. *J Endod*. 1995;21(5):253–5.
10. Aguas Lavandinas. DI-2019-7355-APN-ANMAT#MSYDS Argentina; (Sept 6, 2019) p. 1–6.
11. Johnson BR, Remeikis NA. Effective shelf-life of prepared sodium hypochlorite solution. *J Endod*. 1993;19(1):40–3.
12. Gélinais P, Goulet J. Heat and Light Stability of Eight Sanitizers. *J Food Prot*. 1982;45(13):1195–6.
13. Sirtes, G., Waltimo, T., Schaetzle, M., & Zehnder, M. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *J Endod*. 2005; 31(9), 669–6.
14. ABL. Detienen a tres personas en El Alto por envasar lavandina adulterada. *Los Tiempos* [Internet]. 2020 May 11 [cited 2020 Jun 8]: [about 1 p.]. Available from: <https://www.lostiempos.com/actualidad/pais/20200511/detienen-tres-personas-alto-ensasar-lavandina-adulterada-ser-comercializada>
15. Incautaron presunta lavandina adulterada de supermercados chinos. *Noticias Las Flores* [Internet]. 2020 May 2;1 [cited 2020 Jun 8]: [about 1 p.]. Available from: https://www.noticiaslasflores.com.ar/69699/la-ciudad/incautaron-presunta-lavandina-adulterada-de-supermercados-chinos/?fb_comment_id=297848553227019_2988464374562468
16. Docentes compararon la lavandina que entregaban en la escuela y el resultado fue sorprendente. *RIO NEGRO* [Internet]. 2020 Mar 13 [cited 2020 Jun 8]: [about 2 p.]. Available from: <https://www.rionegro.com.ar/docentes-cuestionaron-productos-de-limpieza-entregados-por-el-gobierno-1286392/>
17. 5220 CHEMICAL OXYGEN DEMAND (COD) (2017). In: *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater*. 23rd. 2018.
18. Chapman D, Kimstach V. Chapter 3: Selection of Water Quality Variables. In: Chapman D, editor. *Water Quality Assessments- A Guide to Use of Biota, Sediments and Water in Environmental Monitoring*. 2nd ed. UNESCO/WHO/UNEP; 1996.
19. Ministerio de Salud, Secretaría de Políticas Regulación e Institutos, Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica, Instituto Nacional de Medicamentos. *Farmacopea Argentina* [Internet]. 7th ed. Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina, editor. Farmacopea Argentina. Ciudad Autónoma de Buenos Aires; 2003 [cited 2020 Jun 8]: [2745 p.]. Available from: http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/fna_pdfs.asp
20. Rutala WA, Cole EC, Thomann CA, Weber DJ. Stability and bactericidal activity of chlorine solutions. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1998 May;19(5):323–7. doi: 10.1086/647822
21. Nicoletti MA, Siqueira EL, Bombana AC, Oliveira GG. Shelf-life of a 2.5% sodium hypochlorite solution as determined by Arrhenius equation. *Braz Dent J*. 2009; 20(1): 27–31.

ACKNOWLEDGMENTS

LCLG thanks CONICET for her postdoctoral fellowship. MEO is a member of CIC CONICET.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

Si desea citar nuestro artículo:

María E. Gavelli, Laura C. Luciani, Carolina Bustos, María E. Olivera

Compliance of commercial bleaches and stability of 1 g/L-dilutions using different sources of drinking water

An Real Acad Farm [Internet].

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 4 (2020) · pp. 231 - 236

DOI: <http://>

APLICACIÓN DE LA CALIDAD POR DISEÑO (QbD) EN EL DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS DE ERITROCITOS HUMANOS POR CITOFEROMETRÍA: COMPARACIÓN CON LA METODOLOGÍA DE DESARROLLO TRADICIONAL

APPLICATION OF QUALITY BY DESIGN (QbD) APPROACH TO THE DEVELOPMENT OF A CYTOPHEROMETRIC ANALYTICAL METHOD OF HUMAN RED BLOOD CELLS: COMPARISON WITH TRADITIONAL DEVELOPMENT METHODOLOGY

Fernando Ferrándiz Vindel

División de Relaciones Corporativas – GlaxoSmithKline, S.A., 28760 Tres Cantos (Madrid)

*corresponding author: ferrandiz.gonzalez@gmail.com

REVISIÓN

Discurso de ingreso como Académico Correspondiente en la Real Academia Nacional de Farmacia.

RESUMEN

Las guías ICH más recientes en el apartado Q incluyen el concepto de Calidad por Diseño (QbD) que queda definida como un enfoque sistemático para el desarrollo que comienza con unos objetivos previamente definidos y que enfatiza la comprensión de los productos y de los procesos, y el control del proceso basándose en el rigor científico y en la gestión de riesgos para la calidad.

Aunque en esta definición no se menciona expresamente a los métodos analíticos, desde el año 2007 ha habido autores que han defendido la posibilidad de aplicar los principios de la QbD al desarrollo y validación de métodos analíticos para asegurar su precisión intermedia y su robustez, especialmente en el ámbito de los métodos físicos y físico-químicos relacionados con el análisis cuantitativo de medicamentos.

Sin embargo, en nuestra experiencia, el ámbito real de aplicación de la QbD para métodos analíticos puede abarcar no sólo el análisis cuantitativo de medicamentos, sino también otros métodos analíticos en los que se determinan otras propiedades, como es el caso de la citofeometría, modalidad específica de electroforesis de células y partículas en suspensión, con la que es posible determinar la movilidad electroforética de eritrocitos normales y patológicos.

Los datos del desarrollo original de un método citofeométrico realizado en 1988 se han reprocesado de acuerdo con los principios QbD actuales, y se han comparado los resultados obtenidos con la metodología tradicional y con la metodología QbD.

Con esta comparación se demuestra que los resultados procesados siguiendo la QbD aportan un mayor conocimiento y control del método citofeométrico, así como una mayor flexibilidad en el manejo de los parámetros físicos y físico-químicos necesarios y unas herramientas adecuadas para controlar las principales fuentes de variabilidad analítica.

ABSTRACT

Quality by Design (QbD) is defined as a systematic approach to development that begins with predefined objectives and emphasizes product and process understanding and process control, based on sound science and quality risk management, according to ICH Q section guidelines definition.

Although this definition does not specifically mention analytical methods, since 2007 there have been authors who have defended the possibility of applying the principles of QbD to the development and validation of analytical methods in order to ensure their ruggedness and robustness, especially in the field of physical and physicochemical methods related to the quantitative drug analysis.

However, in our experience, the real scope of application of QbD for analytical methods can include not only the quantitative analysis of drugs, but also other analytical methods in which other properties are determined, such as cytopherometry, a specific type of cell and particle suspension electrophoresis, with which it is possible to determine the electrophoretic mobility of normal and pathological erythrocytes.

Data of the original development of a cytopherometric method carried out in 1988 have been reprocessed according to current QbD principles, and the results obtained with the traditional methodology and with the QbD methodology have been compared.

This comparison demonstrates that the results processed following QbD show an enhancement in the knowledge and control of the cytopherometric method, giving more flexibility on physical and physico-chemical parameters management and appropriate tools to control the principal sources of analytical variability.

Palabras Clave:

QbD
método analítico
citofeometría

Keywords:

QbD
analytical method
cytopherometry

1. INTRODUCCIÓN

No cabe duda de que lo que nos ha ocurrido a todos con la pandemia y lo que ocurre en el día a día del trabajo analítico está gobernado por la sorpresa. En el ámbito analítico es la sorpresa de obtener resultados no esperados ya sea dentro de especificaciones o fuera, ya sea dentro de expectativas o fuera.

Y esa sorpresa necesariamente lleva a la necesidad de obtener soluciones lo antes posible. El tiempo es fundamental y debe además llevar implícita la seguridad de que la solución es la adecuada.

Desde que empecé a trabajar en el Laboratorio de Técnicas instrumentales y a lo largo de los años transcurridos en mi actividad profesional, he ido obteniendo resultados analíticos que, como digo, no siempre son los esperados. Esta situación conlleva una serie de preguntas como las siguientes:

- ¿Cuáles son los resultados analíticos que se acercan más a la verdad? ¿Los esperados o los obtenidos?
- Si hay discrepancia entre resultados obtenidos en ensayos repetidos siguiendo los mismos pasos analíticos, ¿cuál es la causa de dicha discrepancia?
- ¿Qué hacer ante valores analíticos fuera de especificaciones o fuera de expectativas?
- En general, ¿podemos estar seguros de la validez de los resultados analíticos incluso cuando están dentro de los límites de normalidad?

Desgraciadamente, la mayoría de esas preguntas no tienen respuesta o, por lo menos, una respuesta inequívoca, pero, en su momento, me estimularon a entrar en el mundo de la validación analítica como herramienta para reducir a límites razonables los errores en los laboratorios analíticos y a estar permanentemente en contacto con la evolución de la normativa que se ha ido generando a este respecto.

2. LA ICH Y SUS GUÍAS DE CALIDAD

La armonización de los requisitos reglamentarios, tan necesaria en el ámbito de la industria farmacéutica, fue iniciada por la Comunidad Europea (CE), en la década de 1980 (1), ya que la CE (actualmente Unión Europea) se movió hacia el desarrollo de un mercado único de los productos farmacéuticos. El éxito obtenido en Europa demostró que la armonización era factible por lo que se empezaron a mantener conversaciones multilaterales entre Europa, Japón y los EE.UU. sobre las posibilidades de armonización.

Sin embargo, hasta 1989 no empezó a materializarse ningún plan de acción específico, lo que ocurrió en la Conferencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de Autoridades Reguladoras de Medicamentos (ICDRA) de París. Poco después, las autoridades se reunieron en el seno de la International Federation of Pharmaceutical Manufacturers and Associations (IFPMA) para discutir una iniciativa conjunta de regulación internacional armonizada de la industria farmacéutica.

TIPO DE PROCEDIMIENTO ANALÍTICO					
Características		Identificación	Ensayo de impurezas		Valoración
			Cuantitativo	Límite	Disolución (medición) Contenido / potencia
Exactitud		-	+	-	+
Precisión	Repetitividad		+	-	+
	Precisión intermedia		+(*)	-	+(*)
Especialidad (**)		+	+	+	+
Límite de detección		-	-(***)	+	-
Límite de cuantificación		-	+	-	-
Linealidad		-	+	-	+
Intervalo		-	+	-	+

- esta característica no se evalúa normalmente

+ esta característica se evalúa normalmente

* en caso de que hayan realizado las pruebas de reproducibilidad, no es necesaria la precisión

** la falta de ESPECIFICIDAD podrá compensarse con otro procedimiento

*** puede necesitarse en algunos casos

Figura 1: parámetros evaluados según la guía ICH Q2(R1)

El nacimiento de la ICH (actualmente International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) tuvo lugar en una reunión organizada por la European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA) en Bruselas en abril de 1990 en la que los representantes de las agencias reguladoras y las asociaciones industriales de Europa, Japón y los EE.UU. discutieron las implicaciones y los términos de referencia más amplios de la ICH. En la primera reunión del Comité Directivo de la ICH se decidió que los temas seleccionados para la armonización se dividirían en Seguridad, Calidad y Eficacia para reflejar los tres criterios que sirven de base para la aprobación y autorización nuevos medicamentos, siendo las guías encuadradas en el campo de la Calidad (codificadas con la letra Q) las que más interesan desde el punto de vista del análisis de los medicamentos.

2.1. La guía ICH Q2

Dentro de la categoría Q, una de las guías ICH con mayor solera es la Q2-Validación Analítica (2), finalizada y emitida en octubre de 1994 como "Guía Q2A-Texto", y que identifica los parámetros necesarios para la validación de métodos analíticos, incluyendo también las características que deben ser tenidas en cuenta durante la validación de los procedimientos analíticos que vayan a formar parte de las solicitudes de registro.

De forma análoga, en noviembre de 1996 se emitió la "Guía Q2B-Metodología", en la que se incluyeron las pruebas experimentales requeridas, junto con su interpretación estadística, para la validación de los procedimientos analíticos. En noviembre de 2005 se fusionaron ambas guías en un único texto rebautizado como Q2 (R1), sin ningún cambio en el contenido de las dos directrices originales.

En la figura 1 se muestran las características o parámetros que deben ser evaluados durante la validación de diferentes tipos de métodos analíticos, de acuerdo con la guía Q2 (R1).

Esta lista no es exhaustiva ya que es de destacar que otras características fundamentales, como la Robustez, no aparecen en la tabla, si bien la guía indica claramente que este tipo de parámetros deben ser tenidos en cuenta durante el desarrollo de un método analítico.

A pesar de este tipo de carencias, el contenido de la guía está plenamente incorporado a las Farmacopeas y guías oficiales más importantes, lo que hace que la validación de un método analítico sea de facto y de iure, un requisito legal imprescindible en cualquier solicitud de registro.

Esta situación tiene, como principal ventaja, la homogeneización global de prácticas de validación, con el consiguiente reconocimiento por parte de las diferentes Autoridades Sanitarias. Sin embargo, la presencia en las guías de una lista de características

como las de la figura anterior, agravada por la extendida costumbre de utilizar como definitivos unos criterios de aceptación generales recomendados para cada uno de dichas características, en muchos casos ha convertido el ejercicio de validación basada en la guía ICH Q2 (R1) en una especie de "formulario" que hay que rellenar, sin que con ello se llegue a un conocimiento profundo del funcionamiento de los métodos analíticos y de los factores internos y externos que pueden afectar a los resultados obtenidos.

Esto resulta especialmente importante cuando se obtienen resultados analíticos atípicos o fuera de especificaciones (OOS) ya que, en el entorno de las Normas de Correcta Fabricación, estos resultados no se pueden descartar sin haber efectuado una investigación de laboratorio cuyo objeto es conocer su "causa raíz", es decir, intentando identificar y corregir las causas profundas de los acontecimientos, en lugar de tratar simplemente sus síntomas.

Es evidente que la investigación de laboratorio puede llegar a indicar que, desde el punto de vista analítico, el resultado sea correcto y que, por lo tanto, se haya puesto de manifiesto un problema en la muestra analizada. Pero también puede darse el caso de que la "causa raíz" esté en la propia metodología analítica y que, como consecuencia, haya que poner en marcha acciones correctivas y preventivas que impidan, o reduzcan de forma significativa, que el error analítico vuelva a producirse. En muchos casos, estas acciones pasan por una modificación del método lo que resulta especialmente grave si se ven afectados parámetros operativos validados según la ICH e incluidos en los correspondientes dosieres de registros lo que, consecuentemente, obliga a presentar variaciones ante las Autoridades Sanitarias, con la consiguiente pérdida de tiempo y de confianza en los resultados analíticos obtenidos hasta ese momento.

2.2. Nuevas guías ICH y la calidad por diseño

A lo largo del tiempo, los trabajos de la ICH en el ámbito de la calidad han dado como resultado más guías que han proporcionado una nueva dimensión tanto al proceso de desarrollo de los medicamentos como al de la producción. Estas guías son las siguientes:

- Q8 (R2): PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT (Step 5), de agosto de 2009 (3)
- Q9: QUALITY RISK MANAGEMENT (Step 5) de noviembre de 2005 (4)
- Q10: PHARMACEUTICAL QUALITY SYSTEM (Step 5) de junio de 2008 (5)
- Q11: DEVELOPMENT AND MANUFACTURE OF DRUG SUBSTANCES (CHEMICAL ENTITIES AND BIOTECHNOLOGICAL/BIOLOGICAL ENTITIES) (Step 5) de mayo de 2012 (6)
- Q12: TECHNICAL AND REGULATORY CONSIDERATIONS FOR PHARMACEUTICAL PRODUCT LIFECYCLE MANAGEMENT (Step 5) de noviembre de 2019 (7)

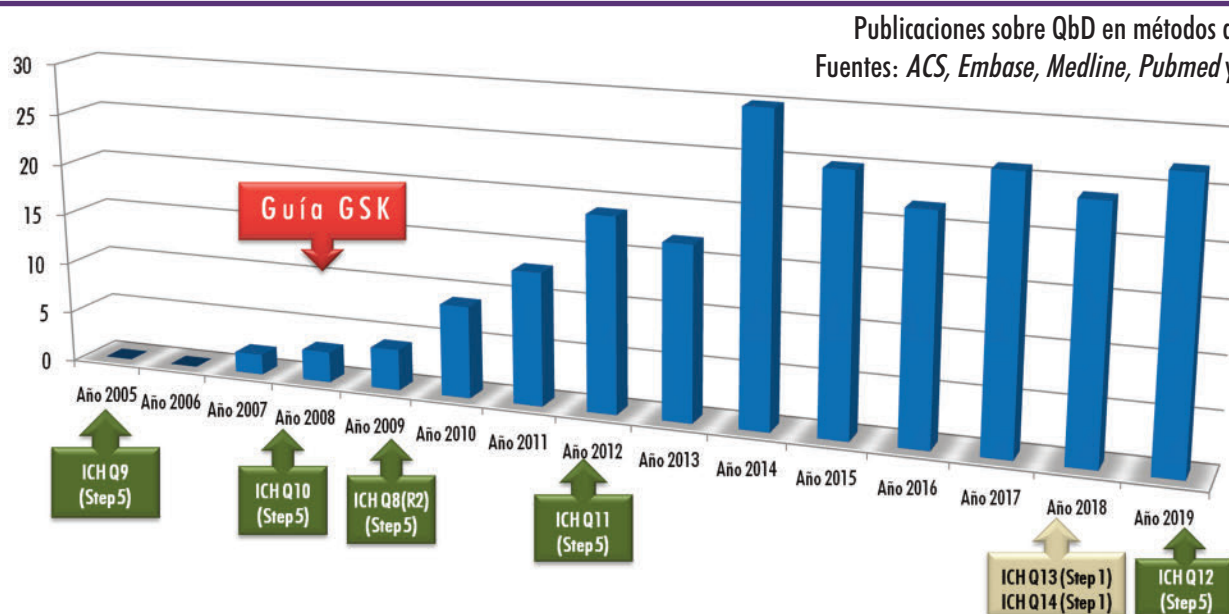


Figura 2: número de publicaciones sobre QbD en métodos analíticos (2005-2019)

- Q13: CONTINUOUS MANUFACTURING OF DRUG SUBSTANCES AND DRUG PRODUCTS (Step 1) de noviembre de 2018 (8)

- Q14: ANALYTICAL PROCEDURE DEVELOPMENT GUIDELINE (Step 1) de noviembre de 2018 (9).

Llamo la atención sobre estas dos últimas guías por estar aún en fase de desarrollo y sobre la revisión de la Q2 (R1) que se está llevando en paralelo.

Según indica el Expert Working Group encargado de estas tareas *“El alcance de la revisión de la guía Q2 (R1) incluirá principios de validación que cubren el uso analítico de datos espectroscópicos o de espectrometría (por ejemplo, NIR, Raman, NMR o MS) (...). Estas pautas propuestas (Q2 (R2) y Q14) están destinadas a complementar las guías ICH de la Q8 a la Q12, así como la guía Q13 para la fabricación continua, actualmente en Step 1”*(9).

Con respecto a la guía Q14 (9), el mencionado grupo indica que *“Esta nueva directriz está destinada a mejorar la comunicación regulatoria entre la industria y los reguladores y facilitar una aprobación más eficiente, sólida basada en los riesgos y en la ciencia, así como la gestión de cambios analíticos posteriores a la aprobación”*.

Es importante destacar que estamos en un momento muy interesante ya que, según el plan de trabajo publicado, está previsto que se abra un periodo de consulta pública a partir de enero de 2021 que permitirá no sólo verificar si se ratifica el proceso de desarrollo y validación de métodos analíticos que se describe a continuación, sino poder participar directamente en la redacción final de las guías.

En estas guías, la Calidad por Diseño (QbD) viene definida como un *“enfoque sistemático que comienza con unos objetivos pre-*

viamente definidos y que enfatiza la comprensión de los productos y de los procesos, y el control del proceso basándose en el rigor científico y en la gestión de riesgos para la calidad”. Esta definición ya está incluida en el Anexo 15 de las Normas de Correcta Fabricación (NCF) (10).

Como se puede observar, hasta ahora la QbD ha ido claramente enfocada a los procesos productivos desde la fase de desarrollo, pero en ningún caso las guías actualmente en vigor mencionan expresamente a los métodos analíticos, explicando así la necesidad de la guía Q14 y la actualización de la Q2(R1).

Sin embargo, ya en el año 2007, Borman et al. (11) indicaban que existía la posibilidad de aplicar los principios de la QbD al desarrollo y validación de métodos analíticos para asegurar su precisión intermedia y su robustez (incluyendo las de la tecnología analítica de procesos – PAT), tal como se define en la guía ICH Q2(R1) y en la USP, y proponían una metodología que se está aplicando cada vez con mayor frecuencia. Hay que indicar que los métodos oficiales de Farmacopeas y los métodos microbiológicos quedan excluidos de esta metodología.

En cualquier caso, cabe destacar que hay autores (12) que hablan de Validación de Métodos por Diseño (*Method Validation by Design – MVbD*) y que citan iniciativas presentadas a la FDA en el ámbito del proyecto “Pharmaceutical Quality for the 21st Century. A Risk-Based Approach” (13), como puede ser el documento *“Lifecycle Management of Analytical Procedures: Method Development, Procedure Performance Qualification and Procedure Performance Verification”* emitido en septiembre de 2013, por un comité de la USP creado al efecto.

En definitiva, se trata de una herramienta de desarrollo cuyo interés en la comunidad científica va incrementándose con el

tiempo. Como aportación personal, la figura 2 muestra una pequeña revisión bibliográfica que cubre desde el año 2005 al año 2019, utilizando bases de datos habituales como Embase, Medline, Pubmed o American Chemical Society (14-25).

De su observación resulta evidente el incremento del número de trabajos científicos posterior a la publicación de las Guías ICH Q8, Q10 y Q11, aunque resultan llamativas las publicaciones pioneras del año 2007, de autores pertenecientes al laboratorio en el que desarrollo mi actividad profesional, y que coinciden con la puesta en marcha de una guía interna de manejo de la QbD en el desarrollo y validación de métodos analíticos.

Queda pendiente por ver si la metodología que se describa en la nueva guía Q14 y la actualización de la Q2(R1) recoge los enfoques científicos del desarrollo de procedimientos analítico utilizados hasta ahora, uno de los cuales, quizá el más empleado, es el que se describe a continuación.

3. APLICACIÓN DE LA QbD. EL MÉTODO ANALÍTICO COMO PROCESO PRODUCTIVO

El primer paso para la aplicación de la QbD en el desarrollo y validación de un método analítico es considerarlo como un conjunto de operaciones secuenciales (preparación de la muestra objeto de análisis, metodología instrumental, calibración, definición de resultados y de especificaciones, etc.) que, partiendo de una "entrada" (*inputs*) permiten la obtención de unas "salidas" (*outputs*) o, en otros términos, la obtención de unos "productos" – los resultados analíticos – que deben cumplir unas especificaciones para considerarlos válidos per se, independientemente de las consecuencias a las que puedan dar lugar (por ejemplo, la aceptación o el rechazo de un lote de un medicamento).

En este sentido, como cualquier proceso productivo, la ejecución de un método analítico está sujeto a la influencia de factores externos que pueden dar lugar a que los resultados no sean válidos per se y que su utilización conlleve una decisión errónea.

La esencia de la QbD es el conocimiento de esos factores externos y de sus efectos e interacciones, lo que, en principio se plantea como una tarea casi inabarcable si se intentan conocer todos los posibles factores y todas las posibles interacciones. Es lo que se denomina el Espacio de Conocimiento que, en una primera aproximación, puede ayudar a definir qué partes de ese espacio tienen un efecto negativo sobre un determinado método analítico.

Sin embargo, desde un punto de vista de desarrollo y tomando como base el conocimiento existente, es mucho más útil definir el Espacio de Diseño, es decir, el que contiene la suma de todos los factores que dan lugar a unas condiciones aceptables en cuanto a sus efectos sobre el método analítico.

Finalmente, desde un punto de vista pragmático, el objetivo final es el de definir el Espacio de Control, que se puede mover dentro del Espacio de Diseño, y que es el que delimita las condiciones operativas normales en la ejecución de un método analítico.

Aunque, en general, los Espacios de Conocimiento, Diseño y Control son combinaciones e interacciones multidimensionales de los factores considerados, la figura 3 describe, de manera gráfica y en tres dimensiones, las relaciones entre estos tres Espacios.

La aplicación de la QbD, por lo tanto, permite obtener evidencias científicas del desarrollo de métodos robustos, capaces de resistir la influencia de esos factores externos, es decir, de producir datos de calidad de forma consistente, siempre que el Espacio de Control se mueva dentro del Espacio de Diseño.

Para ello, la metodología de la QbD se basa en los siguientes cuatro pasos secuenciales:

- Definición del diseño
- Selección del diseño
- Definición de control
- Verificación del control



Figura 3: Espacio de Conocimiento, Espacio de Diseño y Espacio de Control según QbD

Terminología QbD analítica (inglés)	Terminología QbD analítica (español)	Ejemplos
Analytical Target Profile (ATP)	Perfil Analítico Diana	Cuantificación exacta de un API sin interferencias de productos de degradación
Critical Method Parameters (CMP)	Parámetros Críticos del Método	Flujo, temperatura, pH
Critical Method Attributes (CMA)	Atributos Críticos del Método	Precisión, exactitud, linealidad, resolución, factor de simetría
Control Strategy	Estrategia de Control	pH $\pm 0,1$; $\lambda \pm 2$ nm

Figura 4: terminología QbD analítica.

3.1. Definición del diseño

Es evidente que el primer paso debe ser el propósito del método analítico (14), distinguiendo, por ejemplo, si se trata de un método que se va a utilizar para la liberación de lotes o para caracterizar un producto, y teniendo claro cuál es el perfil de calidad del objeto de análisis (QTPP) y sus atributos críticos de calidad (CQA) según la guía ICH Q8 (R2), incluyendo las especificaciones del producto ya que son éstas las que definen el perfil analítico del método (Analytical Target Profile o ATP, análogo al QTPP en terminología ICH) y no al contrario (17).

En términos generales, la terminología QbD en el ámbito analítico puede resumirse conforme a lo indicado en la figura 4.

Para construir el ATP es necesario determinar los indicadores del comportamiento del método analítico (sus CMA), que no son otros que los parámetros tradicionalmente utilizados en la validación analítica (precisión, exactitud, linealidad, etc.), pero, sobre todo, hay que determinar los criterios de aceptación aplicables a cada uno de los indicadores en función del objeto de análisis (18) para que el método desarrollado y validado se ajuste a su propósito (fit-to-purpose).

Si se estudian con detalle los CMA con el fin de asignarles criterios de aceptación, se observa que hay dos grupos claramente diferenciados:

Atributos cuya naturaleza matemático-estadística o cuyo origen instrumental permite la asignación de criterios de aceptación a priori (y en cierto modo, independiente del objeto de análisis);

Atributos para los que es necesario conocer las características del producto objeto de análisis antes de asignar criterios de aceptación.

En la tabla 1 se detallan los componentes de los dos grupos.

Por citar un ejemplo, supongamos que se quiere establecer el criterio de aceptación de un ensayo de repetitividad, lo que im-

plica asignar un valor numérico al Coeficiente de Variación (%CV). Para ello, es posible utilizar la relación precisión-tolerancia (P/TOL), definida por la siguiente fórmula:

$$P/TOL = 6\sigma_{\text{método}} / (\text{Límite superior} - \text{Límite inferior})$$

donde σ es la desviación estándar del método analítico.

Generalmente se considera que, si P/TOL es menor o igual a 0,3, la precisión del método es aceptable, pero si P/TOL es mayor que 0,3, dicha precisión es inaceptable.

Sin embargo, no es este el punto final del proceso ya que sus implicaciones se extienden también al equipo instrumental que se pretenda utilizar, toda vez que no será adecuado el empleo de un equipo cuya precisión sea peor que el mencionado Coeficiente de Variación.

En definitiva, la gran revolución de la definición del diseño, como primer paso en la aplicación de la QbD en el desarrollo y validación de métodos analíticos, consiste en condicionar todos los elementos que intervienen en el análisis a las características del medicamento que se pretende analizar, partiendo de los límites superior e inferior obtenidos a partir de los ensayos clínicos.

3.2. Selección del diseño

Describir la selección del diseño es equivalente a describir el desarrollo del proceso analítico en sí.

Es evidente que, al definir el diseño conforme a lo indicado en el apartado anterior, el desarrollador tiene en mente una técnica instrumental concreta, pero no la forma de realizar cada uno de los pasos del análisis, empezando por la preparación de las muestras y acabando con la expresión de los resultados finales. Por ello, es conveniente utilizar esquemas de trabajo secuenciales que cubran los siguientes puntos, siempre que sean aplicables:

- Tipo de equipo instrumental
- Condiciones ambientales
- Materiales y reactivos
- Preparación de las muestras
- Sistema de introducción de las muestras preparadas en el equipo instrumental
- Condiciones operativas del equipo instrumental
- Sistema de detección
- Sistema de obtención y proceso de datos

Obviamente, no se trata sólo de realizar un ejercicio teórico ya que cada uno de los puntos anteriores debe ir acompañado del correspondiente trabajo experimental, como tradicionalmente se ha realizado a lo largo de la historia. La diferencia con la aplicación de la QbD estriba en que se debe tener siempre presente el ATP para aceptar o descartar los resultados obtenidos durante el desarrollo analítico, si bien, dependiendo del estadio de dicho desarrollo y del tipo de análisis, no es necesario tener en cuenta todos los parámetros que definen el ATP. En este sentido, si se trata de un ensayo de valoración del componente principal de un medicamento, se puede obviar la precisión intermedia, la reproducibilidad, el intervalo y los límites de detección y cuantificación, además de la robustez, en las fases iniciales de desarrollo, incorporando estos parámetros en las fases finales. Algo parecido ocurre en las fases iniciales del desarrollo de un método de análisis cuantitativo de impurezas, para el que, además de los anteriores, se debe incorporar el límite de cuantificación en las fases finales (19).

3.3. Definición de control

Describir la definición de control es equivalente a realizar una evaluación de riesgos durante el desarrollo del proceso analítico, evaluación que necesariamente debe comenzar con la enumeración de todos los posibles factores que pueden afectar al ATP, tanto en un sentido positivo como negativo. Estos son los denominados "Parámetros Críticos del Método" o CMP, análogos a los "Parámetros

Críticos del Proceso" o CPP descritos en la guía ICH Q8.

La utilización de experiencias previas en el desarrollo de otros métodos analíticos, la bibliografía disponible y, especialmente, las opiniones de analistas experimentados (voice of the customer) deben ser las fuentes utilizadas para la obtención de una lista bruta de los CMP anteriormente mencionados. Esa lista bruta define el Espacio de Conocimiento que, como ya se ha indicado anteriormente, no es viable como tal salvo como punto de partida para la definición del Espacio de Diseño, mediante una labor de clasificación razonada y sistemática de los parámetros considerados.

Para ello, el primer paso consiste en tener en cuenta los puntos descritos en el apartado anterior como componentes de un esquema de trabajo secuencial para el desarrollo de un proceso analítico, ya que no son casuales. Responden a una estrategia necesaria para la definición de control ya que en cada uno de ellos deben encuadrarse los CMP que pueden influir en el comportamiento de un método analítico en desarrollo. Así habrá parámetros relacionados las condiciones ambientales, otros relacionados con la preparación de las muestras, u otros relacionados con las condiciones operativas del equipo instrumental.

En todo caso, la lista de CMP considerados en cada apartado debe ser lo más exhaustiva posible, huyendo de listados prefabricados similares a formularios, que podrían llevar a no tomar en consideración algún parámetro verdaderamente importante. Además, la cantidad y variedad de CMP hace necesario el uso de herramientas de permitan ordenarlos y clasificarlos, por lo que es frecuente el uso de un diagrama de Ishikawa.

Sin embargo, la mera enumeración de CMP no es suficiente para definir el control, toda vez que la influencia de cada uno de ellos no es uniforme. Así habrá fundamentalmente tres tipos de parámetros, denominados factores en esta clasificación:

- a) Factores que generan un cierto "ruido" en los resultados analíticos, denominados *factores N*, y que están



Figura 5: evaluación de riesgos en el desarrollo de métodos analíticos según QbD

relacionados con la precisión intermedia;

b) Factores que producen un efecto sustancial sobre los resultados analíticos, pero cuya cuantificación en términos de efectos y de los intervalos aceptables es desconocida. Se denominan *factores X* y están relacionados con la robustez;

c) Factores que, durante la ejecución del análisis, deben estar controlados para no producir ningún efecto. Se denominan *factores C*.

Cada uno de estos tipos de factores tiene un tratamiento distinto, tanto desde el punto de vista del análisis de riesgos y determinación de los más influyentes, como desde el punto de vista estadístico, tal como puede observarse en la figura 5.

FACTORES X – ROBUSTEZ

Son los primeros factores que hay que estudiar, ya que de su estudio se desprenden las condiciones operativas más adecuadas en primera instancia para ejecutar el procedimiento analítico.

La herramienta más útil para el análisis de riesgos es la denominada Matriz de Priorización, basada en la asignación de un valor numérico previamente definido al efecto o impacto de cada factor sobre cada uno de los CMA.

Una vez finalizado el análisis de riesgos, la herramienta estadística más adecuada para su análisis es el Diseño de Experimentos (DoE), que es un modelo estadístico clásico cuyo objetivo es averiguar si unos determinados factores influyen en una respuesta de interés y, en caso de existir, cuantificar dicha influencia.

FACTORES N – PRECISIÓN INTERMEDIA

El estudio de los factores N debe realizarse tras finalizar el estudio de los factores X y, al igual que con estos, debe comenzar con una tarea de clasificación de aquellos que presentan un mayor riesgo para la precisión intermedia en caso de fallo.

La herramienta más útil es el Análisis Modal de Fallos y Efectos, más conocida por sus siglas en inglés FMEA (*Failure Mode Effect Analysis*). La metodología para la realización de un FMEA establece las siguientes etapas:

1. Identificación de Riesgos: Identificación de fallos (*hazards*) y determinación de consecuencias para cada uno de los factores N.

2. Estimación del riesgo para cada uno de los fallos de tecta dos:

- Gravedad
- Probabilidad del fallo
- Clasificación del riesgo
- Prioridad del riesgo

3. Evaluación del riesgo y establecimiento de las medidas

de control necesarias para reducirlo.

La gravedad evalúa el impacto, en caso de que el fallo suceda, sobre la calidad de los resultados analíticos, en este caso en cuanto a la precisión intermedia (o indirectamente sobre la calidad/seguridad/eficacia del producto), de manera que se establecen cinco niveles:

CATASTRÓFICO (nivel 5): Impacto directo sobre la calidad de los resultados analíticos, que suponga una amenaza grave y no evitable para las decisiones sobre la calidad/seguridad/eficacia del producto.

ALTO (nivel 4): Impacto directo sobre la calidad de los resultados analíticos, que suponga una amenaza grave y evitable para las decisiones sobre la calidad/seguridad/eficacia del producto.

MEDIO (nivel 3): Impacto indirecto sobre la calidad de los resultados analíticos, que suponga una amenaza grave y no evitable para las decisiones sobre la calidad/seguridad/eficacia del producto.

BAJO (nivel 2): Impacto indirecto sobre la calidad de los resultados analíticos, que suponga una amenaza grave y evitable para las decisiones sobre la calidad/seguridad/eficacia del producto.

INSIGNIFICANTE (nivel 1): Ausencia de impacto.

Por otra parte, se evalúa la probabilidad de que el fallo suceda con criterios cualitativos, estableciendo los siguientes cinco niveles:

CASI SEGURA (nivel 5)

PROBABLE (nivel 4)

POSIBLE (nivel 3)

IMPROBABLE (nivel 2)

CASI NULA (nivel 1)

A partir de la probabilidad de que suceda el fallo y su impacto, se determina el riesgo asociado a cada uno de los fallos posibles.

Una vez finalizado el análisis de riesgos, y utilizando aquellos con riesgos altos y medios, la herramienta estadística más adecuada para su análisis es el Análisis del Sistema de Medida, más conocido por sus siglas MSA (*Measurement System Analysis*) que, partiendo de un diseño de ANOVA, permite no sólo conocer el grado de dispersión de los valores analíticos, sino también el porcentaje relativo de aportación de cada uno de los factores a la variabilidad total. Al analizar dichos valores, se pueden dar dos circunstancias:

Que la mayor contribución corresponda a las muestras analizadas lo que indica que el método analítico es adecuado y permite la discriminación de muestras de diferente origen;

Que la mayor contribución corresponda a los factores analíticos (analista o equipo instrumental), lo que obliga a poner en marcha acciones correctivas conforme al FMEA.

ESTABLECIMIENTO FINAL DE LA DEFINICIÓN DE CONTROL

A lo largo del estudio de los factores X y de los factores N, puede darse la circunstancia de que los resultados obtenidos no sean todo lo satisfactorios que cabría esperar.

Así puede ocurrir que el DoE no muestre cambios significativos en determinadas respuestas (por ejemplo, obteniendo superficies de respuesta planas) o que el MSA muestre que, a pesar de poner en marcha acciones correctivas se siga observando que los factores analíticos tienen porcentajes de aportación elevados.

Normalmente esto significa que muy probablemente se ha considerado como factor N uno que debía haber sido clasificado como factor X y viceversa, por lo que será conveniente rehacer la clasificación y repetir algunos de los ensayos en las nuevas condiciones.

En cualquier caso, es absolutamente imprescindible que todos los factores enumerados en el primer paso de la definición de control hayan tenido algún tratamiento, bien en el estudio de la robustez, bien en el estudio de la precisión intermedia. Una vez realizada la verificación correspondiente, denominada también "Procedure Performance Qualification" y que requiere un protocolo de trabajo previamente definido, se podrá pasar a expresar de manera completa el Espacio de Diseño que, en el caso de métodos analíticos, se denomina "Method Operable Design Region" o MODR.

4. VERIFICACIÓN DEL CONTROL

Una vez completadas las fases anteriores, e incluido el método en el dossier de registro, hay que mantener el estado de validación de forma permanente en su utilización habitual. Para

ello, lo más frecuente es hacer ensayos de idoneidad del sistema (*system suitability*) de forma periódica utilizando patrones analíticos o muestras completamente caracterizadas, es decir, con todas sus características conocidas en cuanto a identidad, composición o pureza. En este sentido, la frecuencia de realización podrá depender del uso al que esté destinado el método analítico y, por lo tanto, la criticidad de las decisiones que se puedan tomar a partir de los resultados obtenidos en un análisis con dicho método (por ejemplo, la liberación o el rechazo de un lote de medicamento para uso humano), pero en ningún caso se podrán obviar los resultados de los ensayos de idoneidad que deberán ser significativamente parecidos a los obtenidos durante la fase de desarrollo y validación, desde el punto de vista estadístico.

Por lo tanto, cualquier desviación implicará una investigación de laboratorio y las correspondientes acciones correctivas y, en su caso, preventivas. Si estas requieren la modificación de las condiciones operativas, habrá que verificar si dichas condiciones se mantienen dentro del Espacio de Diseño, en cuyo caso no será necesario llevar a cabo ninguna revalidación ni modificación del registro original. Obviamente, si las nuevas condiciones operativas se salen del Espacio de Diseño, habrá que repetir los pasos anteriores para definir uno nuevo con la consiguiente presentación de una variación del registro ante las Autoridades Sanitarias.

5. APLICACIÓN DE LA QbD FUERA DEL ÁMBITO DEL ANÁLISIS DE MEDICAMENTOS

Llegados a este punto en la descripción de la aplicación de la QbD en el desarrollo y validación de métodos analíticos, cabe plantearse dos preguntas:

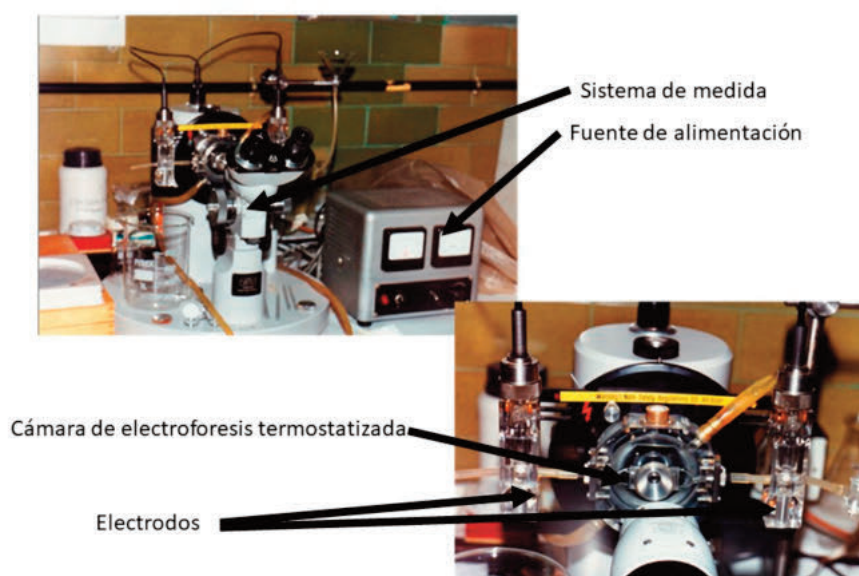


Figura 6: citoferómetro



- ¿Es posible aplicar la QbD fuera del ámbito del análisis de medicamentos?
- ¿Qué aporta un desarrollo analítico siguiendo QbD frente a la metodología tradicional?

La respuesta a la primera pregunta es obvia ya que no existe ningún impedimento regulatorio para la aplicación de QbD, siempre que se trate del desarrollo de un método analítico físico o físico-químico.

Por otra parte, en nuestra experiencia, podemos afirmar que el ámbito real de aplicación de la QbD para métodos analíticos puede abarcar no sólo el análisis cuantitativo de medicamentos, sino también otros métodos analíticos en los que se determinan otras propiedades. Tal es el caso de la citofenetría, modalidad de electroforesis de células y partículas en suspensión, con la que es posible determinar la movilidad electroforética de eritrocitos normales y patológicos, entre otras muestras.

Esta afirmación está basada en una serie de trabajos de validación de un programa informático desarrollado "ad hoc" en la fase PQ (*Process Qualification o Cualificación de Proceso*) según la Guía GAMP 5 (26). En estos trabajos se reprocesaron datos del desarrollo original de un método citofenetría realizado a partir del año 1986 como parte de mi tesis doctoral, de acuerdo con los principios QbD actuales de manera que fuera posible verificar el correcto funcionamiento del programa informático.

Los datos analíticos originales se obtuvieron con un citofenetrómetro Zeiss, equipo instrumental que se muestra en la figura 6 y que consta de las siguientes partes:

- Un microscopio de eje óptico horizontal, uno de cuyos oculares presenta una lente reticulada que permite medir el tiempo que tardan los eritrocitos en recorrer una determinada distancia.
- Una cámara de electroforesis de 1,4 cm de longitud y 7,6 x 10⁻² cm de profundidad introducida en una cámara termostatzada que permite variar la temperatura de trabajo.
- Una fuente de alimentación capaz de generar una diferencia de potencial entre 0 y 900 V.
- Dos electrodos de platino.
- Un conmutador que permite la inversión del campo eléctrico generado.

Para realizar las medidas de movilidad electroforética se aplicó un potencial determinado y se midió con un cronómetro de precisión el tiempo que tardan los eritrocitos en recorrer 0,0032 cm (dos intervalos de retículo) en las dos direcciones del campo eléctrico aplicado, cuando se encuentran en una solución salina isotónica cuya resistencia específica se conoce previamente.

Puesto que la movilidad electroforética μ se define mediante la expresión matemática,

$$\mu = \frac{l/T}{i \times r \over h \times t}$$

siendo: l = distancia recorrida (cm)

T = tiempo empleado (s)

i = intensidad de corriente aplicada (A)

r = resistencia específica del medio de suspensión ($\Omega \times \text{cm}$)

h = longitud de la cámara de electroforesis (cm)

t = profundidad de la cámara de electroforesis (cm)

es evidente que se puede trabajar directamente con las medidas de tiempo (inversamente proporcionales a los valores de movilidad electroforética) para seguir la metodología QbD de una manera rápida y eficaz.

Adicionalmente, los nuevos resultados se compararon con los obtenidos mediante la metodología tradicional de manera que se pudo responder a la segunda pregunta planteada al comienzo de este apartado.

Como punto de partida, y según el desarrollo del método citofenetría original (27), la metodología más conveniente consiste en la aplicación de un campo eléctrico de 10 mA a eritrocitos recién lavados (conservados a 4 °C si es necesario), suspendidos en solución salina fisiológica (pH = 5,65, fuerza iónica resistencia = 0.1 M) y medidos dentro de una cámara termostatzada a 25-30 °C, con el fin de obtener resultados analíticos con una precisión y una selectividad adecuadas.

Por su parte, para el desarrollo y validación del método analítico según la QbD se siguieron los siguientes pasos secuenciales (steps) descritos en las guías internas del laboratorio donde desarrollo mi actividad profesional:

- Step 1: desarrollo del método (method development), en el que habitualmente se diseña el método, se establece el ATP, los CPM y los CMA basados en la guía ICH Q2(R1) (2), así como los correspondientes criterios de aceptación que deben ser comprobados experimentalmente.
- Step 2: evaluación del riesgo (risk assessment), en el que se determinan todos los factores que potencialmente pueden tener un impacto en el comportamiento del método analítico, y se establece su nivel de prioridad y su posible efecto sobre la robustez (factores X) y la reproducibilidad (factores N).
- Step 3: robustez del método (method robustness), en el que se emplea el Diseño de Experimentos para definir el Espacio de Diseño que es la zona en la que los factores X permiten el cumplimiento de los criterios de aceptación

de los CMA (zona también denominada MODR o Method Operable Design Region) y el Espacio de Control, que es la zona en la que se obtienen los mejores resultados en el cumplimiento de dichos criterios y que, en principio, es la que define las condiciones normales de uso del método analítico.

- Step 4: reproducibilidad del método (method ruggedness), en el que se emplean técnicas de MSA (Measurement System Analysis) para definir el % de contribución a la variabilidad total del método analítico por parte de factores relacionados con el sistema de medida, con los analistas y con las muestras objeto de análisis.

Otras etapas, como el Step 5 (definición del control del método), el Step 6 (validación del método) y el Step 7 (mejora continua y control de cambios) quedan fuera del ámbito del presente trabajo.

5.1 Step 1. Desarrollo del método

Los resultados se muestran en las tablas 2 y 3. En esta última se muestran los criterios de aceptación de los CMA, indicando su aplicabilidad, los valores propuestos en función de los trabajos iniciales de desarrollo por QbD, y los aplicados en el desarrollo original.

Con respecto al criterio de aceptación del error, se tuvieron en cuenta las pautas del documento CEA-ENAC-LC/02 de enero de 1998 (30), ya que, al disponer de 20 valores experimentales, se pudo realizar una evaluación de la incertidumbre Tipo A que dio como resultado $U_A = 0,149715055 = 0,15$ s (para 19 grados de libertad y un nivel de confianza del 95,45 %).

Como dicha incertidumbre supone un 3,4 % del valor medio, inicialmente se consideró como % error admisible la diferencia entre el valor de tiempo para la movilidad electroforética de la bibliografía (28), que corresponde a 4,00 s y el experimental (4,37 s), lo que da 9,3 %, superior a la incertidumbre y, por lo tanto, detectable.

5.2 Step 2. Evaluación del riesgo

En cuanto al Step 2, el análisis de riesgo inicial, realizado mediante una matriz de priorización, permitió la construcción de un diagrama de Ishikawa y la determinación de los factores X susceptibles de ser incluidos en los diseños de experimentos correspondientes y que, tras una serie de ensayos realizados aplicando revisión bibliográfica, comparaciones de medias o análisis OFAT, quedaron definitivamente clasificados como se indica en la tabla 4.

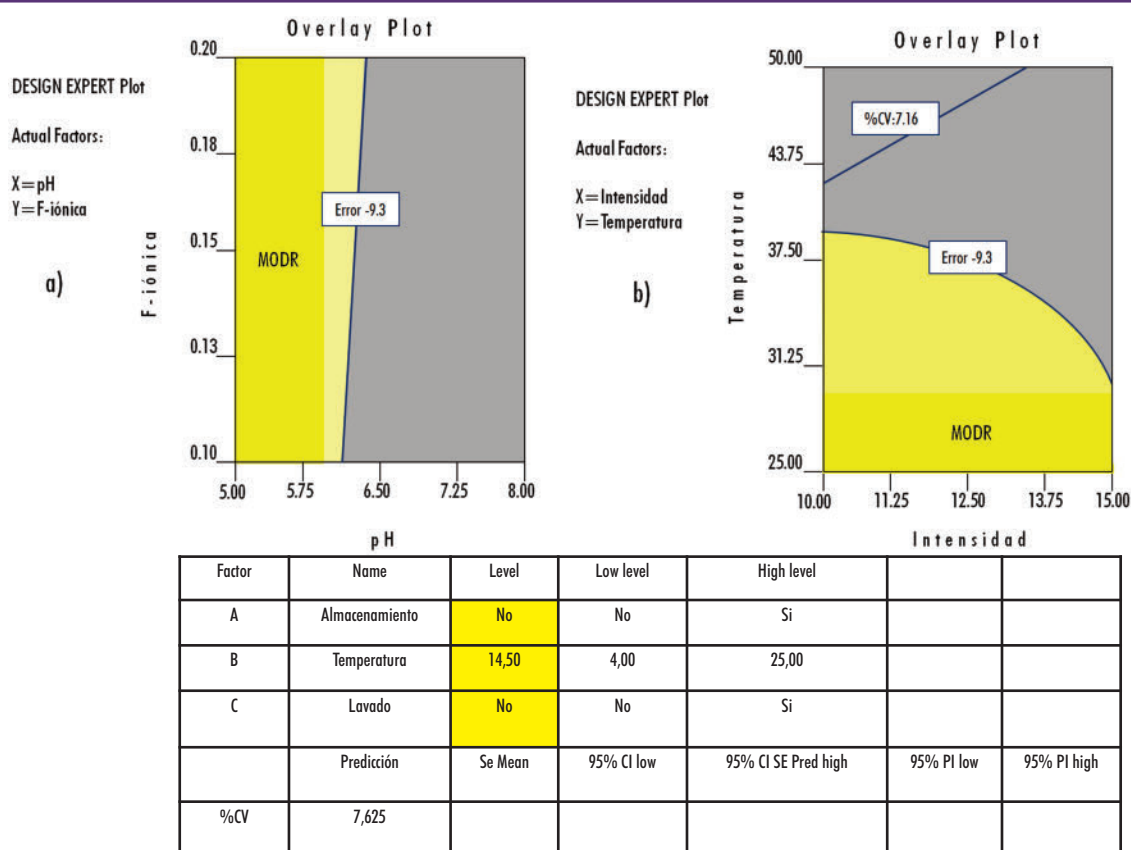


Figura 7: ensayos de robustez. a): dos factores numéricos (pH y Fuerza Iónica) y una respuesta medida (% Error); b) dos factores numéricos (temperatura e Intensidad de corriente) y dos respuestas (% Error y %CV); c) dos factores categóricos (almacenamiento y lavado), un factor numérico (temperatura de conservación) y una respuesta (% CV).

5.3 Step 3. Robustez del método

Como consecuencia de lo anterior, los resultados obtenidos en los experimentos diseñados, aplicando los correspondientes criterios de aceptación son los mostrados en la figura 7.

En el primer caso - Rama Método (core): dos factores numéricos (pH y Fuerza Iónica) y una respuesta medida (% Error) -, se considera que el MODR se define por la utilización de un medio isotónico con un pH entre 5,00 y 5,75, con una Fuerza Iónica entre 0,1 y 0,2 M.

En el segundo caso - Rama Método (core): dos factores numéricos (Temperatura e Intensidad de corriente) y dos respuestas (% Error y %CV) -, se considera que el MODR que cumple los criterios de aceptación de ambas respuestas medidas se define con una T entre 25 °C y 31 °C y una intensidad de corriente entre 10 y 15 mA.

En el tercer caso - Rama Materiales: dos factores categóricos (almacenamiento y lavado), un factor numérico (temperatura de conservación) y una respuesta (% CV) -, se considera que las condiciones experimentales óptimas consisten en la utilización de eritrocitos frescos y no lavados. En cuanto a la temperatura de conservación, en caso de ser necesaria, el sistema informático indica una $T = 14,50\text{ }^{\circ}\text{C}$ pero, al ser esto inviable desde un punto de vista práctico (atendiendo a una posible climatización del laboratorio o a una posible cámara de conservación con ese punto de consigna), se considera más adecuado conservar los eritrocitos a una $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. No es posible establecer un MODR al haber valores categóricos y no numéricos, por lo que estos pasan a ser factores C.

5.4 Step 4. Reproducibilidad del método

Una vez identificados los factores X, N y C en los pasos anteriores, y habiendo estudiado el efecto de los factores X, se centró la atención en los factores N para su estudio por MSA (Step 4).

Las causas potenciales de variabilidad pueden ser:

- debidas a las muestras, para las que hay que determinar su estabilidad;
- debidas al instrumento, que pueden afectar a la repetitividad y a la estabilidad;
- debidas al operador.

Se estudiaron los factores N determinados en el Step 1 para determinar cuáles afectan a la repetitividad y cuáles afectan a la reproducibilidad. El resultado de ese estudio es el siguiente:

- EQUIPO: mantenimiento, historia de uso, tipo de filtros utilizados. Estos afectan a la repetitividad.
- AMBIENTE: temperatura del laboratorio, HR del laboratorio, localización del equipo. Estos afectan a la reproducibilidad.
- INLET: introducción de muestras. Afecta a la repetitividad.
- DETECTOR: estado de la lámpara. Afecta a la repetitividad.
- PERSONAL: formación, competencia, precisión, patrones de trabajo, procedimientos. Estos afectan a la reproducibilidad.
- MUESTRA: lípidos, TG, índices eritrocitarios, sexo del paciente, grupo sanguíneo. Estos afectan a la repetitividad y a la reproducibilidad.

ANOVA Analysis				
Source	% Contrib	% Tol	% Proc	%Pp/PpK
Equipment	11.62	9.68	5.38	19.36
Appraiser	88.38	26.7	14.83	53.39
GRR	100	28.4	15.78	56.79
Parts	0	0	0	0
Total	100	28.4	15.78	56.79

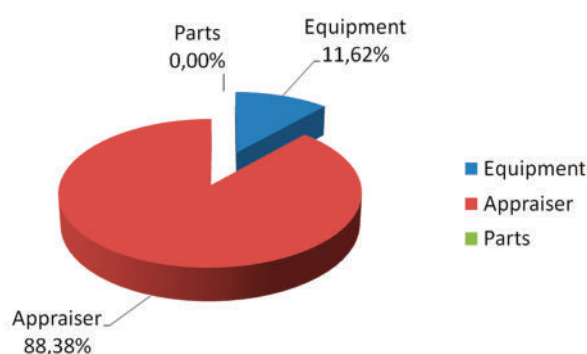


Figura 8: análisis MSA

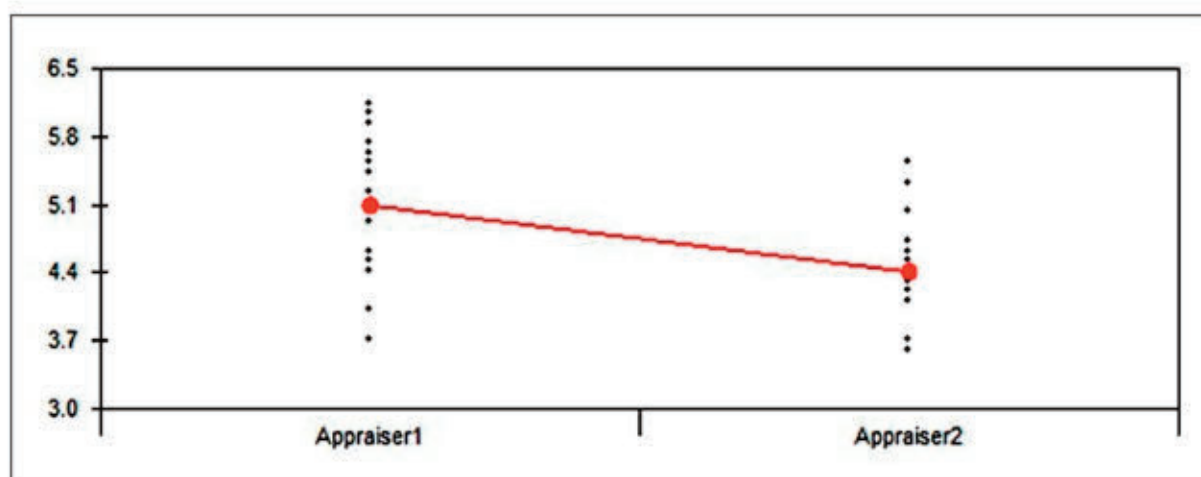


Figura 9: análisis de distribución de datos por "appraiser" en estudio MSA

Con estos datos se procedió a la realización del FMEA agrupando los factores por niveles de riesgo. Los resultados se muestran en la tabla 5 y en ellos se observa que conviene estudiar personal y equipo por ser los de riesgo ALTO y MEDIO.

Se planteó un protocolo estándar de trabajo de 5 muestras x 2 operadores x 2 replicados para estudiar el efecto de la formación y experiencia del operador y del cambio de ubicación de equipo y, con los resultados de este estudio (figura 8), se pudo constatar la poca capacidad de discriminación de muestras debido especialmente a la muy elevada influencia del personal (88% appraiser).

Este aspecto merece una consideración especial ya que aporta información muy interesante que puede ser aplicada en el ámbito académico. Hay que partir del hecho de que se tomaron datos del trabajo experimental de una tesis doctoral, obtenidos en momentos diferentes, es decir, al principio del doctorado (aproximadamente tras un año de experiencia, con el equipo ubicado en un laboratorio) y al final del doctorado (aproximadamente tras más de tres años de experiencia, con el mismo equipo ubicado en otro laboratorio). En ambos casos las muestras consideradas fueron del mismo tipo (eritrocitos humanos del mismo donante) y sin aportación porcentual a la variabilidad total. Analizando específicamente la representación gráfica de la variación por "appraiser" o analista (figura 9) donde Appraiser 1 corresponde a datos iniciales y Appraiser 2 corresponde a datos obtenidos varios años después, resulta evidente que los resultados de Appraiser 2 presentan una dispersión menor que los de Appraiser 1 y que la experiencia adquirida no deja de ser el resultado de un proceso de formación análogo al mencionado en la tabla FMEA. A esto hay que añadir que, al revisar los datos de la propia tesis doctoral, los resultados sobre la evidencia de subpoblaciones eritrocitarias mediante histogramas de frecuencias en muestras patológicas están más definidos tras varios años de experiencia, lo que es un claro reflejo de este proceso formativo.

Así pues, una importante aportación de la utilización de la metodología QbD en el ámbito académico es la de plantearse una repetición periódica y planificada de determinados ensayos a lo largo de la realización de un trabajo experimental prolongado en el tiempo, como puede ser una tesis doctoral, análogamente a lo que es una práctica habitual de la industria farmacéutica, como forma de verificación constante de cumplimiento de las condiciones idóneas de formación para la realización de ensayos analíticos y, consecuentemente, para la obtención de resultados analíticos válidos.

5.5 Comparación del desarrollo analítico siguiendo qbd frente a la metodología tradicional

A modo de resumen de los datos presentados en los apartados anteriores, se muestran dos tablas (una para factores X – tabla 6 – y otra para factores N- tabla 7) en la que se comparan ambas metodologías.

Se observa que los resultados obtenidos siguiendo QbD aportan un mayor conocimiento y control del método citofenométrico, así como una mayor flexibilidad en el manejo de los factores físicos y físico-químicos necesarios y unas herramientas adecuadas para controlar las principales fuentes de variabilidad analítica.

6. CONCLUSIONES

Independientemente de cómo quede redactada la nueva Guía ICH Q14 y de que la metodología descrita tenga cabida en dicha redacción, no cabe duda de que se han podido vislumbrar las ventajas de la aplicación de la QbD en el desarrollo y validación de métodos analíticos frente a las prácticas tradicionales, tanto en el ámbito del análisis de medicamentos como en otros ámbitos analíticos.



Para la industria farmacéutica, es evidente que poder demostrar cómo se han identificado los parámetros críticos de un método analítico y cómo estos están controlados en el trabajo habitual, constituyen el fundamento de una interacción necesaria entre analistas y estadísticos y de una relación productiva y bidireccional de la Industria con las Autoridades Sanitarias y con la Universidad, desde un punto de vista científico.

Sin embargo, como se ha pretendido demostrar en esta disertación, no hay que limitar esta visión a la actividad de la industria farmacéutica ya que, al tratarse la QbD de una metodología de trabajo muy rigurosa desde el punto de vista científico, su utilidad en el ámbito académico en general, y universitario en particular, es extremadamente grande.

La incorporación de nuevos métodos analíticos desarrollados con la metodología QbD conlleva un esfuerzo adicional, pero "a posteriori" aporta un significativo ahorro de tiempo, tanto en la investigación básica como en la I+D aplicada, lo que es especialmente importante cuando se trata de poner nuevos medicamentos a disposición de los pacientes y más en las circunstancias que nos está tocando vivir.

No olvidemos que los pacientes no pueden esperar. Muchas gracias.

7. REFERENCIAS

1. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). History. Disponible en: <https://www.ich.org/page/history>.
2. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1). Disponible en: https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1_Guideline.pdf
3. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Pharmaceutical Development Q8(R2). Disponible en: https://database.ich.org/sites/default/files/Q8_R2_Guideline.pdf
4. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Quality Risk Management Q9. Disponible en: https://database.ich.org/sites/default/files/Q9_Guideline.pdf
5. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Pharmaceutical Quality System Q10. Disponible en: https://database.ich.org/sites/default/files/Q10_Guideline.pdf
6. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Development And Manufacture Of Drug Substances (Chemical Entities And Biotechnological/Biological Entities) Q11. Disponible en: https://database.ich.org/sites/default/files/Q11_Guideline.pdf
7. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Technical And Regulatory Considerations For Pharmaceutical Product Lifecycle Management Q12. Disponible en: https://database.ich.org/sites/default/files/Q12_Guideline_Step4_2019_1119.pdf
8. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH): Final Concept Paper ICH Q13: Continuous Manufacturing of Drug Substances and Drug Products dated 14 November 2018. Endorsed by the Management Committee on 15 November 2018. Disponible en: https://database.ich.org/sites/default/files/Q13_EWG_Concept_Paper.pdf
9. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Final Concept Paper ICH Q14: Analytical Procedure Development and Revision of Q2(R1) Analytical Validation dated 14 November 2018. Endorsed by the Management Committee on 15 November 2018. Disponible en: https://database.ich.org/sites/default/files/Q2R2-Q14_EWG_Concept_Paper.pdf
10. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario Anexo 15: Cualificación y validación. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/industria/inspeccionNCF/guiaNCF/docs/anexos/anexo-15.pdf>
11. Borman P, Nethercote P, Chatfield M, Thompson D, Truman K. The Application of Quality by Design to Analytical Methods. Pharm Tech 2007; 31 (10): 142-152.
12. Alessandro M, Little T, Fleitman J. Method Validation by Design to Support Formulation Development. Pharm Tech Europe 2013; 25(4): 48-54.
13. Department of Health and Human Services. U.S Food and Drug Administration. Pharmaceutical cGMPs for the 21st Century — A risk-based approach. Final Report. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/77391/download>
14. Little T. Assay Development and Method Validation Essentials. BioPharm International 2012; 25(11): 48-51.
15. LoBrutto R. An Insight into Analytical Quality by Design in the Pharmaceutical Industry. The Column 2013; 9(15): 14-7.
16. Nethercote P, Ermer J. Quality by Design for Analytical Methods. Pharm Tech Europe 2012; 24(10): 52-6.
17. Burgess C. Calibration of Instruments: Is Your UV Spectrometer Accurate Enough? Pharm Tech 2014; 38(1): 56-9.



18. Burgess C. Evaluating Risk-Based Specifications for Pharmaceuticals. Pharm Tech Europe 2013; 25(7): 30-6.
19. Chambers D, Guo G, Kleintop B, Rasmussen H, Deegan S, Nowak S, Patterson K, Spicuzza J, Szulc M, Tombaugh K, Trone M, Yuabova Z. GMPs for Method Validation in Early Development. An Industry Perspective (Part II). Pharm Tech Europe 2012; 24(8): 26-32.
20. Rignall A, Christopher D, Crumpton A, Hawkins K, Lyapustina S, Memmesheimer H, Parkinson A, Smith MA, Wyka B, Kaerger S. Quality by Design for analytical methods for use with orally inhaled and nasal drug products. Pharm Tech Europe, 2008; 29(10): 24-31.
21. Embase® (página de inicio de Internet). Disponible en: <https://www.embase.com/>
22. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. Pubmed® (página de inicio de Internet). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
23. American Chemical Society (ACS) Publications (página de inicio de Internet). Disponible en: <https://pubs.acs.org/>
24. Ferrándiz F. Aplicación de la Calidad por Diseño (Quality by Design) en el desarrollo y validación de métodos analíticos. Discurso de ingreso. Academia de Farmacia de Castilla y León 2014.
25. McDowall D. Life Cycle and Quality by Design for Chromatographic Methods. LC-GC Europe 2014; 27(2): 91-7.
26. ISPE GAMP® 5 Guide: A Risk-Based Approach to Compliant GxP Computerized Systems (página de inicio de Internet). Disponible en: <https://ispe.org/publications/guidance-documents/gamp-5>.
27. Ferrándiz F, Ródenas S, Del Castillo B. Análisis citofotométrico de eritrocitos humanos. Análisis Clínicos 1988; XIII: 117-120.
28. Abramson HA, Moyer LS, Gorin MH. Electrophoresis of proteins and the chemistry of cell surfaces. New York: Reinhold Publishing Corporation 1942.
29. Liteanu C, Rica I. Statistical theory and methodology of trace analysis. New York: John Wiley & sons 1980.
30. Entidad Nacional de Acreditación — ENAC. Expresión de la incertidumbre de medida en las calibraciones. Disponible en: <http://www.proycal.com/Imagenes/CEA-ENAC-LC-02%20Rev.%201.pdf>

AGRADECIMIENTOS

Es de bien nacidos ser agradecidos. Por ello deseo que mis palabras sean de profundo agradecimiento a todos los Académicos que han depositado en mí su confianza al haberme acogido como Académico Correspondiente en esta Real Academia. Espero corresponder a dicha confianza con mi participación activa en la vida de la corporación. Ganas y entusiasmo no me van a faltar.

Permítanme que exprese además mi especial gratitud al Excmo. Prof. Dr. D Fidel Ortega por sus amables palabras en la pre-

sentación y, como no podía ser de otra manera, al Excmo. Prof. Dr. D Benito del Castillo García, mi maestro y amigo, desde que allá por el año 1984, tuvo la osadía de permitirme ser monitor de prácticas de Técnicas Instrumentales en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y dejarme defender mi Tesina y mi Tesis Doctoral, algunos años más tarde y en el mismo laboratorio. Hago más sus palabras: “amigos, en el acuerdo y en el desacuerdo, siempre”.

He de hacer mención también al no menos significativo hecho de que, al permitirme entrar en la Cátedra de Técnicas Instrumentales, D. Benito me puso en contacto directo con una de las personas que más han influido en mi desarrollo profesional, tanto en el ámbito académico como en la industria farmacéutica, y a la que estoy profundamente agradecido por ello. Me refiero a la Dra. Sofía Ródenas de la Rocha quien, mucho antes de que se publicase la Guía ICH Q2, tan importante para el análisis instrumental en la industria farmacéutica, ya aplicaba de manera práctica (y con 10 años de antelación respecto a la fecha de publicación de la mencionada Guía ICH) los conceptos de Calidad, GMP, GLP, precisión, exactitud, linealidad o validación, no sólo en el trabajo experimental sino en las mismas prácticas de la Facultad. Pocos conocen lo importante que es para la industria farmacéutica recibir alumnos que conocen estos términos y su contenido, especialmente si se dedican a tareas de I+D, Registros, Producción, Control de Calidad o Garantía de Calidad, que son el núcleo de la actividad farmacéutica industrial.

Es importante destacar también que la Dra. Ródenas me puso en contacto con la Dra. Ana Villegas del Servicio de Hematología del Hospital Clínico de Madrid, con la que codirigió mi tesis doctoral, y con la que tuve la oportunidad de ver la aplicación práctica de esos conceptos, que dejaban de ser meramente teóricos para convertirse en una forma de trabajo que, además, establecía puentes de colaboración con otros centros fuera de la Facultad.

Si desea citar nuestro artículo:

Fernando Ferrándiz Vindel

Aplicación de la calidad por diseño (QbD) en el desarrollo de un método de análisis de eritrocitos humanos por citofotometría: comparación con la metodología de desarrollo tradicional

An Real Acad Farm [Internet].

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 4 (2020) · pp. 237 - 256

DOI: <http://>



ANEXO I. TABLAS

Tabla 1: determinación de criterios de aceptación para CQA

ATRIBUTOS SEGÚN GUÍA ICH Q2(R1)		NATURALEZA	EJEMPLOS
Exactitud		Dependiente de producto	%Error = ?
Precisión	Repetitividad	Dependiente de producto	%CV = ?
	Precisión intermedia	Dependiente de producto	%CV = ?
Especificidad		Instrumental	Resolución de picos cromatográficos $\geq 1,5$ Pureza espectral
Límite detección (*)		Instrumental Estadística	Relación señal ruido (3:1 ó 2:1) Evaluación por la desviación típica de la respuesta y la pendiente $LDD = 3,3 \text{ STD/Pendiente}$
Límite cuantificación (*)		Instrumental Estadística	Relación señal ruido (10:1) Evaluación por la desviación típica de la respuesta y la pendiente $LDC = 10 \text{ STD/Pendiente}$
Linealidad		Estadística	Coefficiente de correlación $\geq 0,999$ Ordenada en el origen $\leq 2,0\%$
Intervalo		Dependiente de otros parámetros	-

(*) A su vez, se tiene que demostrar la precisión y la exactitud en el nivel de concentración determinado mediante este atributo.

Tabla 2: terminología analítica según QbD

Terminología QbD analítica (inglés)	Terminología QbD analítica (español)	Comentarios
Analytical Target Profile (ATP)	Perfil Analítico Diana	Determinación precisa y exacta de la movilidad electroforética de eritrocitos humanos por citofluorimetría, con capacidad de discriminar entre eritrocitos normales y patológicos, y sin interferencias de otras partículas en suspensión.
Critical Method Parameters (CMP)	Parámetros Críticos del Método	<ul style="list-style-type: none"> Fuerza iónica del medio de suspensión pH del medio de suspensión Intensidad de corriente Temperatura de trabajo Otros por determinar
Critical Method Attributes (CMA)	Atributos Críticos del Método	Precisión (dispersión de valores), Exactitud, distribución de células (histogramas de frecuencia)
Control Strategy	Estrategia de Control	Pendiente de determinar según los resultados obtenidos

Tabla 3: comparación de criterios de aceptación según la metodología aplicada

ATRIBUTOS		SI/ NO	COMENTARIOS	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DESARROLLO POR QbD	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DEL DESARROLLO ORIGINAL
Exactitud		SI	Se dispone de datos publicados en la bibliografía respecto a la movilidad electroforética de eritrocitos normales (28).	%Error \leq 9,3%	No considerado.
Precisión	Repetitividad	SI	Se trata de una determinación de un valor cuya dispersión puede ser crítica para distinguir poblaciones de células.	%CV \leq 7,16% Basado en medidas experimentales	%CV \leq 10% Basado en bibliografía (29)
	Precisión intermedia	SI		%CV \leq 7,16% Basado en medidas experimentales	%CV \leq 10% Basado en bibliografía (29)
Especificidad		SI	Se requiere discriminar los valores de eritrocitos frente a los de otras células sanguíneas y otras partículas en suspensión. Una posible forma es el empleo de histogramas de frecuencia.	Se determinará la presencia de subpoblaciones de eritrocitos por medio de histogramas de frecuencia. Los eritrocitos normales deben tener una única población.	Se determinará la presencia de subpoblaciones de eritrocitos por medio de histogramas de frecuencia.
Límite detección		NO	No se trata de una valoración cuantitativa.	N/A	N/A
Límite cuantificación		NO	No se trata de una valoración cuantitativa	N/A	N/A
Linealidad		NO	No se trata de una valoración cuantitativa	N/A	N/A
Intervalo		NO	No se trata de una valoración cuantitativa	N/A	N/A

Tabla 4: factores X

Rama Método (core)	Rama Materiales
Fuerza iónica del medio de suspensión	Temperatura de almacenamiento de la muestra
pH del medio de suspensión	Lavado de eritrocitos
Intensidad de corriente	
Temperatura de la cámara	



Tabla 5: tabla FMEA

Proceso	Posible error	Consecuencias	Probabilidad (1 a 5)	Severidad (1 a 5)	Riesgo	Acciones correctivas
Formación del personal	Personal no suficientemente formado en la preparación de muestras y en el manejo del equipo instrumental	Alta dispersión de resultados (%CV elevado)- Reproducibilidad	3	4	12 ALTO	Formación intensa del personal
Equipo instrumental	Mantenimiento inadecuado del equipo instrumental. Estado defectuoso de la lámpara o número de horas de uso excesivo.	Alta dispersión de resultados (%CV elevado)- Repetitividad	2	4	8 MEDIO	Mantenimiento adecuado conforme a plan
Equipo instrumental	Localización inadecuada. Temperatura y Humedad Relativa del laboratorio inadecuadas por excesivas.	Alta dispersión de resultados (%CV elevado)- Reproducibilidad	5	4	20 ALTO	Localización adecuada del equipo. Control ambiental.
Introducción de muestras	Incorrecta introducción de muestras de formación de burbujas	Alta dispersión de resultados (%CV elevado)- Repetitividad	1	2	2 BAJO	

Tabla 6: comparación de resultados para factores X

Factores X	ORIGINAL	ESTUDIO SEGÚN QbD	
	Condiciones de trabajo	Espacio de diseño (MODR)	Espacio de control
pH medio de suspensión	5.65	5.00 - 5.75	5.65
Fuerza iónica del medio	0.1 M	0.1 – 0.2	0.1 M
Temperatura de la cámara	25 – 30°C	25 – 31°C	25°C
Intensidad de corriente	10 mA	10 – 15 mA	10 mA
Temperatura de almacenamiento de las muestras (en caso necesario)	4°C	4°C	-
Lavado de eritrocitos	No	No	-
Uso de eritrocitos frescos (sin almacenamiento)	Si	Si	-

Tabla 7: comparación de resultados para factores N

Factores N	ORIGINAL	QbD
Relacionados con el equipo	Sólo se analiza la precisión del equipo (CV = 5.27%).	Se analiza el % de contribución a la variación total (11,62%).
Relacionados con el personal	No se analizan.	Se analiza el % de contribución a la variación total (88,38%). Es el factor que más influye y que requiere acciones correctivas predefinidas.
Relacionados con las muestras	Se analizan indirectamente a través de histogramas de frecuencias que demuestran la existencia de subpoblaciones eritrocitarias.	Poca capacidad de discriminación de muestras, corregible por la aplicación de las acciones correctivas descritas en el apartado de personal.

GESTIÓN INTEGRAL DE LA NUTRICIÓN ARTIFICIAL DOMICILIARIA: HUMANIZACIÓN E INNOVACIÓN AL SERVICIO DEL PACIENTE

HOLISTIC MANAGEMENT OF HOME ARTIFICIAL NUTRITION: HUMANIZATION AND INNOVATION AT PATIENT'S SERVICE

José Manuel Martínez Sesmero

Servicio de Farmacia. Hospital Clínico Universitario San Carlos. Madrid

*corresponding author: jmsesmero@salud.madrid.org

REVISIÓN

Discurso de ingreso como Académico Correspondiente en la Real Academia Nacional de Farmacia.

RESUMEN

La desnutrición relacionada con la enfermedad es una patología frecuente en el mundo desarrollado. Afecta a 30 millones de personas en Europa y tiene un coste asociado de ciento setenta mil millones de euros anuales. En España atañe en torno a 1,7 millones de adultos, lo que supone el 4,4% de la población. La desnutrición aqueja a uno de cada cuatro pacientes en el ingreso hospitalario. Se estima que los pacientes hospitalizados que se encuentran en estado de desnutrición a lo largo de su estancia oscilan entre un 23,7% y un 37%; agudizándose estas cifras en el caso de pacientes pluripatológicos mayores de 70 años, y casi un 10% se desnutre durante su estancia hospitalaria. Todo ello supone un aumento de las estancias hospitalarias y de los costes asociados; en concreto, los costes directos de la desnutrición hospitalaria se estimaron en 1,143 millones anuales en 2009, lo que supone el 1,8% del gasto sanitario del sistema nacional de salud. Los avances en tecnología e infraestructuras han facilitado la transferencia de servicios complejos de hospitales al hogar. Actualmente, la tendencia internacional apunta a un desarrollo cada vez mayor del domicilio como centro de cuidados. Un meta-análisis de 61 ensayos de asignación aleatoria y controlados, publicado en 2012, evidenció que los pacientes atendidos en el domicilio tenían una tasa de mortalidad a los seis meses entre un 19% y un 38% menor que los hospitalizados. La nutrición artificial domiciliaria (NAD) es la administración a domicilio de los nutrientes y demás agentes terapéuticos adjuntos a través de la vía digestiva -nutrición enteral domiciliaria (NED)- o intravenosa -nutrición parenteral domiciliaria (NPD)-, con la finalidad de mejorar o mantener, en el ámbito domiciliario, el estado de nutrición de un paciente. Esta modalidad de prestación facilita al paciente poder seguir con los compromisos familiares, sociales y laborales. El entorno en el que trabajan los profesionales sanitarios del siglo XXI está cambiando de manera significativa. Son múltiples las innovaciones en gestión por procesos, facilitadas por el creciente potencial que ofrecen las nuevas tecnologías en los cuidados a distancia. Todo ello favorece la permanencia del paciente en su casa, en su comunidad o en un entorno más familiar, es decir, en un ambiente más humanizado. Por último, se demuestra que la NPD es una alternativa coste-efectiva en relación con la atención hospitalaria clásica, lo que redundará en la adopción del criterio de eficiencia como elemento de priorización en sanidad.

ABSTRACT

Disease-related malnutrition is a common pathology in the developed world. It affects 30 million people in Europe and it has an associated cost of one hundred and seventy billion euros per year. In Spain, around 1.7 million adults, 4.4% of total population, are negatively affected. Malnutrition affects one out of four patients on hospital admissions. It is estimated that hospitalized patients who are malnourished throughout their stay range from 23.7% to 37%; sharpening these figures for multi-patients over 70 years old, and almost 10% are disensuated during their hospital stay. All this implies an increase in hospital stays and associated costs; in particular, the direct costs of hospital malnutrition were estimated at 1.143 million annually in 2009, representing 1.8% of health expenses within the national health system. Advances in technology and infrastructure have facilitated the transfer of complex hospital-to-home services. Nowadays, the international trend points to the increasing development of the domicile as a care center. A meta-analysis of 61 randomized and controlled trials, published in 2012, showed that patients treated at home had a six-month mortality rate between 19% and 38% lower than those who were hospitalized. Home artificial nutrition (HAN) is the nutrients home-administration, among other therapeutic agents, administered through the digestive tract -home enteral nutrition (HEN)- or intravenously -home parenteral nutrition (NPD)-, with the objective of improving or maintaining, at home, the patient's nutritional status. That reports into a benefit for the patient as being able to continue the family, social and work commitments. The environment, in which 21st century health professionals work, is changing significantly. There are multiple innovations in process management, given by the growing potential offered by new technologies in remote care. It supports the patient's home stay, either in the community or in a more familiar environment, that is, in a more humanized environment. Finally, HAN is shown to be an effective-cost alternative in relation to classical hospital care, resulting in the adoption of the efficiency criterion as an element of prioritization in healthcare.

Palabras Clave:

nutrición artificial domiciliaria
desnutrición
gestión sanitaria
innovación sanitaria
humanización

Keywords:

home artificial nutrition
malnutrition
health management
health innovation
humanization

1. INTRODUCCIÓN Y CONCEPTOS

La *European Society of Parenteral and Enteral Nutrition* (ESPEN) define la Nutrición Clínica (NC) como la disciplina que se ocupa de la prevención, diagnóstico y tratamiento de los cambios nutricionales y metabólicos relacionados con enfermedades agudas o crónicas y con condiciones causadas por un exceso o falta de energía (1).

El Soporte Nutricional (SN) es la provisión de los nutrientes necesarios para cubrir las necesidades (basales y/o derivadas de la situación patológica del paciente) por vía oral, enteral o parenteral, con el objetivo de mejorar o mantener el estado nutricional.

El Soporte Nutricional Especializado (SNE) incluye la intención terapéutica, es decir, que no se limita a la Nutrición Enteral (NE) o Parenteral (NP) para mantener y/o restaurar el estado de nutrición óptimo y la salud. El SNE está considerado como una terapia de alta complejidad, cuyo empleo se asocia con un riesgo elevado de aparición de complicaciones. Algunas de ellas son extremadamente graves y pueden llegar a tener consecuencias fatales para el paciente, mientras que otras, con carácter menos grave, tienen el riesgo de interferir con los objetivos nutricionales de los pacientes (2).

La NE consiste en el aporte de nutrientes al organismo a través de la vía digestiva, mediante una fórmula definida. Incluye la vía oral y la administración directa al tubo digestivo, vía nasogástrica, nasoentérica o percutánea. La NP es la administración de los nutrientes por la vía intravenosa, y ésta puede ser parcial o total en función si cubre o no respectivamente el 100 % de los requerimientos de macro y micronutrientes (Figura 1).

Cuando un paciente necesita NE o NP, ya sea de forma transitoria o definitiva, y no requiere de permanencia en el hospital, se puede realizar la administración de la nutrición en el domicilio del paciente siempre que sea posible. La utilización de la nutrición artificial fuera del ámbito hospitalario (NAD) ha demostrado su efectividad y seguridad a lo largo de los años, ya que permite una mejora de la calidad de vida de algunos pacientes que de otra forma estarían obligados a una estancia hospitalaria prolongada, con los riesgos y costes asociados a la misma (3). La NAD puede administrarse tanto por vía parenteral (NPD) como por vía enteral (NED) fuera del entorno hospitalario, pero siempre con los controles oportunos.

En los países occidentales, hasta el 50% de los pacientes hospitalizados están malnutridos, y sólo el 8% reciben un diagnóstico de malnutrición durante su estancia hospitalaria (4).

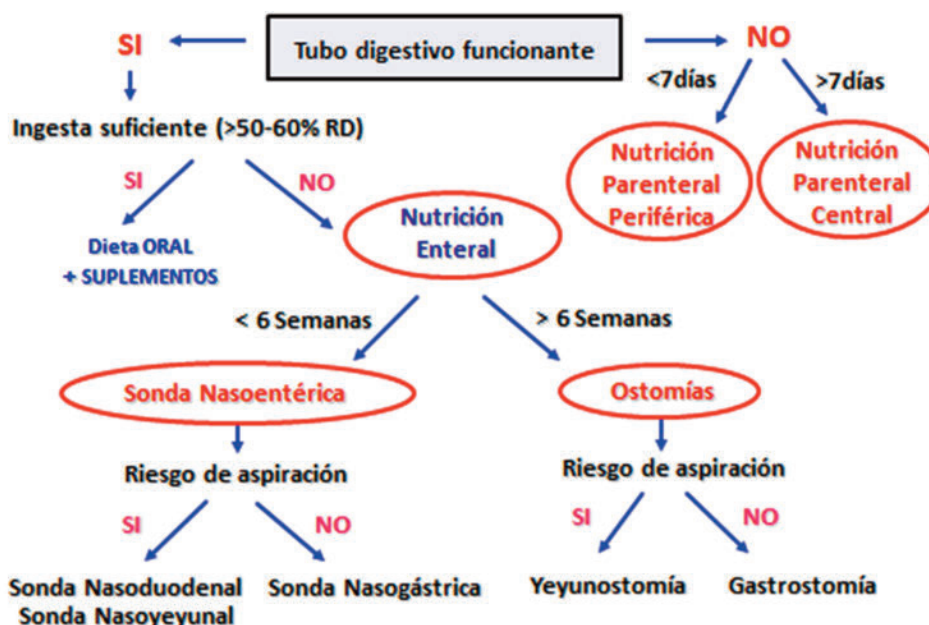


Figura 1: Algoritmo de decisión para el tratamiento, oral, enteral o parenteral. Se decide el tipo de alimentación oral, enteral o parenteral dependiendo de la integridad del tracto gastrointestinal. Si el tracto no es funcional se aporta Nutrición Parenteral. La Nutrición Parenteral será Periférica cuando se alargue menos de 7 días (menor requerimiento de nutrientes, siendo la vía de acceso es de menor calibre); la Nutrición Parenteral será Central, para tratamientos más largos que requieren más nutrición, más osmolaridad). Si el tracto es funcional se selecciona la Nutrición oral o la Enteral. Si la ingesta cubre más del 60% de las ingestas recomendadas de energía y nutrientes y puede darse por boca se elige dieta oral con suplementos. Cuando la Ingesta sea insuficiente (< 50% RDA): Nutrición Enteral. Para periodos menores de 6 semanas se aportará la nutrición enteral con Sondas Nasoentéricas, bien Nasogástricas (nariz-estómago) si no hay riesgo de aspiración o nasoduodenales (nariz-duodeno) y Nasoyeyunal (nariz-yeyuno) cuando haya riesgo. Para una Nutrición Enteral de más de 6 semanas, se emplearán Ostomías (acceso directo quirúrgico de la sonda) que se conocen por Gastrostomía (aporte directo a estómago) o Yeyunostomía (acceso directo a Yeyuno).

En España se realizó en el año 2010 el estudio PREDiCES (5) (Prevalencia de la Desnutrición y Costes Asociados en España), en el que participaron 31 hospitales e incluyó una muestra de más de 1500 pacientes. Utilizando como test de cribado nutricional el NRS 2002, el MNA y marcadores antropométricos y bioquímicos, este estudio mostró que 1 de cada 4 pacientes hospitalizados en España (23,7 %) está en riesgo de desnutrición, de los cuales un 37% son mayores de 70 años. Este simple hecho implica, en primer lugar, una recuperación subóptima de muchos pacientes y, en segundo lugar, un aumento del tiempo en la estancia hospitalaria, de los reingresos, de las tasas de infección y de mortalidad, especialmente en los mayores de sesenta y cinco años.

La medicina hoy está cambiando intensamente y a un ritmo vertiginoso, debido entre otros factores, a razones demográficas y por los formidables avances científico-técnicos que se están produciendo. Cada vez existen más pacientes complejos, cuyos resultados finales en términos de la medicina que se puede practicar en ellos, la experiencia que reciben en su proceso asistencial y los recursos económicos que se emplean en cubrir lo anterior, son mejores o presentan aún recorrido de mejora.

Son muchos los profesionales que prestan asistencia y cuidan a estos pacientes complejos y la realidad en España es positiva. Sin embargo, la no priorización de la nutrición y una prestación en un modelo organizativo fragmentado en general, indican que hay margen de mejora. Los profesionales sanitarios no pueden ser meros espectadores ante este hecho, y su rol está cambiando de forma inexorable. Ya no es suficiente con obtener resultados finales en salud con el excelente ejercicio de las competencias profesionales clásicas, sino que su rol y ámbito precisan ser ampliados con aspectos relacionados con la gestión, reingeniería de procesos, innovación y aplicación de las nuevas tecnologías. Por lo tanto, podemos afirmar que el profesional sanitario de alto valor en el antropoceno inmediato debe construir una organización más operativa y holística, pero sobre todo enfocada a las necesidades individuales de cada paciente. Por ejemplo, deben liderar equipos complejos y optimizar la eficiencia para hacer que su tarea clínica sea sostenible en el tiempo y mejorar así la experiencia de los pacientes en todo su recorrido asistencial.

El entorno en el que trabajan esos clínicos está cambiando de forma importante y se hace necesario, por ejemplo, usar todo el potencial disruptivo que ofrecen las Tecnologías de la Información y Comunicación (TICs) para ofrecer cuidados a distancia, facilitando al enfermo su permanencia en casa, en la comunidad o en un entorno más familiar. Por otro lado, la tendencia internacional apunta a un desarrollo cada vez mayor del domicilio como centro de cuidados. En 2012, un metaanálisis de 61 ensayos de asignación aleatoria y controlados encontró que los pacientes hospitalizados en

el hogar tenían una tasa de mortalidad a los seis meses entre un 19 % y un 38 % menor que los hospitalizados (6). Todo esto hace que el rol de los profesionales sanitarios sea más complejo en este entorno, y sólo los más capacitados serán definitivamente los que podrán co-crear con sus pacientes la modalidad de prestación sanitaria y de salud que satisfaga de forma adecuada a éstos y a ellos mismos para, finalmente, poder implementar dichas mejoras.

2. EPIDEMIOLOGÍA Y CONSECUENCIAS DE LA DESNUTRICIÓN RELACIONADA CON LA ENFERMEDAD

El concepto de desnutrición se refiere a una situación clínica provocada por un déficit de nutrientes (proteínas, nutrientes energéticos, otros nutrientes), que conlleva cambios en la composición corporal de los sujetos (pérdida de peso, de masa magra y masa grasa) que van a afectar a la función de los distintos tejidos y órganos del individuo y que repercuten negativamente en la evolución clínica de los sujetos (7). El origen de ese déficit de nutrientes puede deberse a una ingesta inadecuada (pérdida de apetito, problemas socioeconómicos), a un aumento de las pérdidas (diarrea, síndromes malabsortivos) o a un aumento de los requerimientos (ligados a la enfermedad).

De acuerdo con el documento de consenso de definición y clasificación de la desnutrición entre la ESPEN y la ASPEN (American Society for Parenteral and Enteral Nutrition), es importante conocer la existencia de inflamación para poder clasificar de forma adecuada la desnutrición. Esto nos sirve para distinguir la desnutrición por ayuno (característica de los países subdesarrollados o de los pacientes con anorexia nerviosa) en la que la causa de la desnutrición es el déficit de nutrientes, de la desnutrición relacionada con la enfermedad (DRE) mucho más prevalente en nuestro entorno sanitario, de etiología multifactorial y en la que siempre está presente un componente inflamatorio más o menos importante.

En los pacientes con DRE crónica (insuficiencia respiratoria, renal, cardíaca, hepática, obesidad sarcopénica, artritis reumatoide, cáncer de páncreas, etc.) existe una inflamación crónica de grado leve a moderado, mientras que en aquellos con DRE aguda (infecciones graves, politraumatismos, quemaduras, etc.) existe un componente inflamatorio agudo de grado importante.

La DRE ocurre en todos los niveles de atención sanitaria (atención primaria, especializada, residencias y hospitales). Es un problema que afecta a todos los países y se calcula que en Europa el 5 % de la población está desnutrida o en riesgo de desnutrición y este porcentaje aumenta al 10% entre los ancianos. En el estudio PREDiCES, la prevalencia de DRE fue mayor en los pacientes con enfermedades neoplásicas (35 %), del sistema circulatorio (29 %) y respiratorias (28%). La prevalencia de DRE también varía según



el nivel asistencial. Así se calcula que afecta al 2 % en ancianos sanos en residencias públicas españolas, al 5-8 % de los ancianos en domicilio, al 50 % de los ancianos enfermos institucionalizados, a un 44% de los ancianos ingresados en hospital por patología médica y hasta un 65 % de los ancianos ingresados por patología quirúrgica (5).

La DRE altera la respuesta inmunitaria facilitando la aparición de infecciones, además de favorecer la aparición de úlceras por presión. Todo ello retrasa la recuperación del paciente y, por lo tanto, se prolonga la estancia hospitalaria. Se incrementa la tasa de reingresos prematuros y se altera la independencia del individuo y su calidad de vida. Lo cual contribuye a aumentar la morbimortalidad y repercute negativamente en los costes sanitarios.

Según los resultados del estudio PREdyCES, el coste de la hospitalización se incrementa al menos un 50 % en los sujetos con desnutrición (5). Un porcentaje destacado de pacientes (10%) se desnutren durante su estancia hospitalaria, y este subgrupo representa los costes más elevados. Asimismo, en este estudio se pudo observar que el coste se multiplicaba por dos en los pacientes desnutridos (12.237 € vs. 6.408 €). Los costes directos de la desnutrición hospitalaria se estimaron en 1,143 millones anuales en 2009, lo que supone el 1,8 % del gato sanitario del sistema nacional de salud (8).

3. NUTRICIÓN ARTIFICIAL DOMICILIARIA: TIPOLOGÍA E INDICACIONES

Según las guías de la ASPEN, las indicaciones del soporte nutricional especializado domiciliario son las mismas que las del hospitalario (9). Se considera a un paciente candidato al soporte nutricional domiciliario cuando cumple criterios de inclusión derivados de su enfermedad de base y unas condiciones sociales que permiten un mantenimiento adecuado en el medio no hospitalario (10) (Tabla 1).

En el caso de la NPD, los pacientes candidatos presentan un síndrome de intestino corto con capacidad funcional absorbente intestinal, debido a una escasa longitud intestinal o a una afectación

de las áreas absorbentes. Algunos ejemplos son: pacientes con múltiples resecciones intestinales por enfermedad de Crohn, casos de enteritis rágida o trombosis mesentérica. Por tanto, la NPD estaría indicada cuando el tracto gastrointestinal no es funcional o accesible, en los casos de fallo intestinal y en pacientes malnutridos con mala respuesta al tratamiento con NE, así como en aquellos casos en que es imposible utilizar la nutrición enteral por imposibilidad de obtener un acceso al tubo digestivo.

La NPD se utilizó por primera vez en 1967 en EE.UU. Los primeros pacientes europeos se localizan en Dinamarca en 1970. En España, los primeros casos datan de 1984, indicada, en un principio, para el fallo intestinal sin enfermedad maligna de base. En relación con el paciente oncológico, la NPD ha experimentado, en siete años, un incremento de un 43 % (11).

Son candidatos a la NED aquellos pacientes que no pueden cubrir sus necesidades nutricionales mediante la alimentación oral, pero mantienen una capacidad funcional intestinal suficiente para ser alimentados por vía digestiva (Figura 1). Además de la indicación por la patología de base, se deben valorar ciertos criterios para el mantenimiento del soporte nutricional en el domicilio del paciente. La situación clínica del paciente debe ser apropiada para permitir su traslado al domicilio y debe encontrarse estabilizada la enfermedad de base. Antes de que el paciente se traslade a su domicilio, hay que asegurarse que tolera perfectamente el tratamiento, manteniendo las mismas características respecto a volumen, fórmula y tiempos de infusión que se pretende aplicar en el domicilio. En el caso de la NED, si el paciente presentara diarrea o molestias abdominales, y en la NPD, trastornos hidroelectrolíticos o metabólicos (fundamentalmente hiperglucemia), se debería retrasar el momento del alta hasta la estabilización del paciente (9) (Tabla 2).

El entorno familiar y social del paciente debe ser favorable, así como las expectativas de mejora de la calidad de vida, ya que una de las principales finalidades del soporte nutricional domiciliario es mejorar la calidad de vida de los pacientes, además de restaurar o mantener un adecuado estado nutricional. En el caso de la NPD, se debe estimar una duración del tratamiento de 4-5 semanas, como mínimo, y una expectativa de vida igual o superior a 3 meses (10).

Tabla 1. Criterios de Selección de pacientes candidatos a Nutrición Parenteral Domiciliaria

- Posibilidad de trasladar al paciente a su domicilio
- Entorno social y familiar favorable
- Expectativas de mejoría de calidad de vida
- Tolerancia demostrada al tratamiento nutricional (nutrición artificial)
- Comprensión por parte del paciente y/o cuidadores del programa educativo

Fuente: Martínez MA, Arbones MJ, Bellido D. Nutrición artificial domiciliaria. *Endocrinol Nutr* 2004;51(4):173-8

Tabla 2. Conocimientos del paciente y/o cuidadores imprescindibles en la Nutrición Enteral Domiciliaria

- Qué es la Nutrición Enteral
- Cuál es la vía de administración
- Qué material necesitará
- Cómo utilizarlo y conservarlo
- Cómo preparar y conservar la dieta
- Cómo administrar la Nutrición Enteral
- Qué complicaciones pueden surgir
- Cómo prevenir dichas complicaciones
- Qué actitud tomar ante la aparición de complicaciones: resolverlas, contactar con equipos de apoyo
- Qué controles deben realizar: temperatura, diuresis, deposiciones, control de peso
- Manejo de aparatos que puedan necesitar: bombas y equipos de infusión

Fuente: Martínez MA, Arbones MJ, Bellido D. Nutrición artificial domiciliaria. *Endocrinol Nutr* 2004;51(4):173-8

La composición de la NP que el paciente se administrará en su domicilio debe establecerse antes del alta, cuando esté ingresado en el hospital, y las modificaciones se realizarán en función de la situación clínica y los resultados analíticos (12). Las necesidades nutricionales de cada paciente se deben individualizar, considerando la enfermedad de base y el estado nutricional. Lo más frecuente es que la NPD se utilice durante un periodo de tiempo prolongado, por lo que se debe asegurar un aporte completo de todos los nutrientes esenciales, a fin de evitar deficiencias posteriores (3). En el caso de la NED, las fórmulas de NE son productos constituidos por una mezcla de macro y micronutrientes que se administran por vía digestiva. Se dispone en el mercado de distintos tipos de dietas, como se especifica a continuación: fórmulas completas generales, fórmulas especiales, suplementos, módulos y productos dietéticos. Estas fórmulas y productos se clasifican en función de la complejidad de los nutrientes, contenido de proteínas y calorías, así como su contenido en fibra y su osmolaridad.

4. SOPORTE NUTRICIONAL ARTIFICIAL EN UN CONTEXTO DE ATENCIÓN SANITARIA LÍQUIDA Y TRANSFORMACIÓN DIGITAL

El modelo asistencial en el que se presta la NPD está organizado en silos, lo que provoca fragmentación de cuidados, con un problema añadido, por la existencia de una enfermedad de base a manejar clínicamente. La evidencia indica que la fragmentación del sistema incrementa el gasto en un 77,6 % (13).

Los planes de nutrición parenteral para los pacientes oncológicos y quirúrgicos complejos son, en general, bien implemen-

tados mientras el paciente está en el hospital. Sin embargo, no existe una buena comunicación con los prestadores de atención primaria, bien por ser insuficiente o por estar poco estructurada, con lo cual, puede ocasionar un impacto negativo para su tratamiento y recuperación nutricional. Desafortunadamente, el paciente no transita de la mejor forma posible por el sistema, ya que los sistemas de salud siguen sin poner el foco en el paciente, sino en las enfermedades concretas. El paciente es quien más sufre la fragmentación de cuidados; así pues, el propio enfermo debe convertirse en el elemento integrador necesario en la trayectoria de cuidados (Figura2).

Es evidente que esto se corregirá, en parte, con la implementación entre niveles. En estos momentos, no toda España dispone de esta herramienta y, fundamentalmente, las interconsultas hospitalarias actúan como mecanismo de coordinación entre servicios. Es por ello que la propia HCE, allí donde está implantada, es un elemento integrador esencial para facilitar la comunicación.

En la última década se ha acuñado el concepto de "hospital líquido", que pretende sacar la atención sanitaria de las cuatro paredes físicas del hospital mediante el uso de diferentes herramientas de base tecnológica, por ejemplo, las TICs. De esta forma, se mejora la interrelación profesional sanitario-paciente y también las que existen entre los diferentes profesionales sanitarios implicados, teniendo como principales objetivos facilitar la atención de los pacientes y la promoción del intercambio de conocimientos entre profesionales. Los elementos que forman parte de la iniciativa hospital líquido son, entre otros: e-Salud (e-Health), las redes sociales, los portales temáticos y los espacios virtuales (14) (Figura 2).

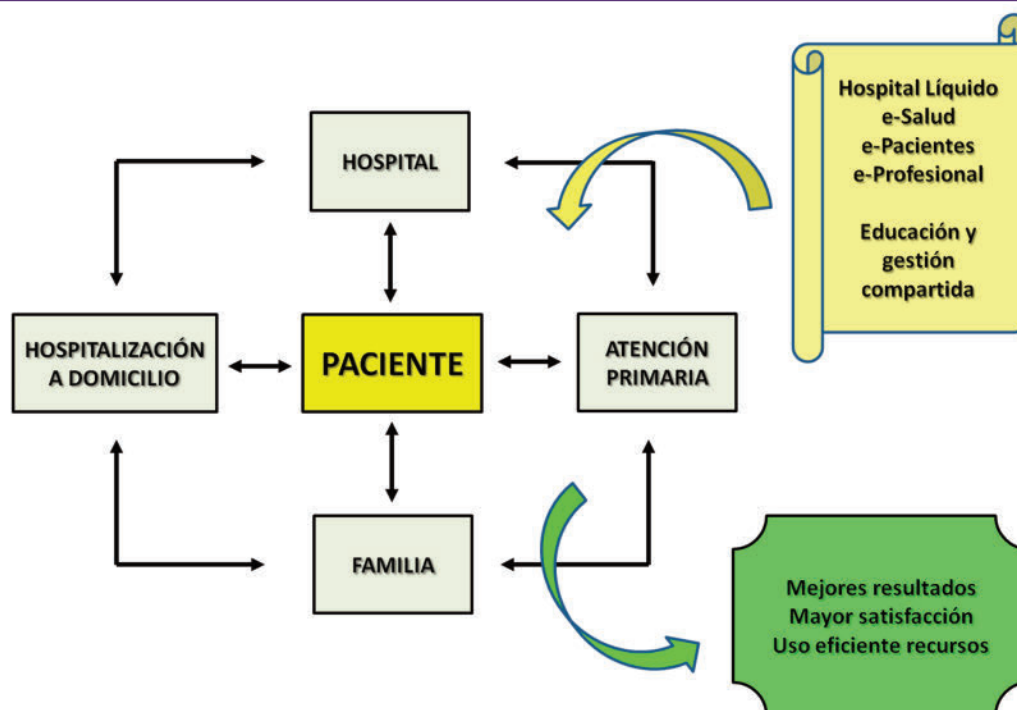
Ningún proyecto de transformación digital sería comprensible sin tener en cuenta a las personas involucradas, aquellas que



Un nuevo modelo basado en redes de información sobre el cual compartimos conocimiento y que potencia la participación y conversación, ha derivado en un nuevo tipo de sociedad a la que los ciudadanos se están adaptando y empiezan a aprovechar todas aquellas herramientas que hacen la vida más fácil y pueden también mejorar su salud. De esta forma ha aparecido el movimiento de los “e-pacientes”, que son aquellos que integran lo digital en todo lo

No existe un límite definido de lo que es un “e-paciente” y lo que no, ya que tanto los grados de alfabetización digital como los de empoderamiento son muy variables en cada persona. Pero sí podemos decir que el e-paciente es en definitiva aquella persona que quiere tener un mayor poder de participación y desea ser responsable en la toma de decisiones que afectan a su salud. De manera análoga, existe el concepto de “e-profesional” de la salud, ya que éstos no pueden quedarse atrás o actuar de forma reactiva ante las nuevas demandas de la sociedad, sino que deben adoptar una actitud pro-activa y aceptar las tecnologías móviles, y por tanto la TICs en general, como una oportunidad única de mejorar en su trabajo y aportar valor a las personas que atienden (15).

Según el Diccionario de la Lengua Española (16) humanizar es "hacer humano, familiar, afable a alguien o algo". Es "ablandarse, desenojarse, hacerse benigno". Qué duda cabe que, cuando



Holistic management of home artificial nutrition: humanization and innovation at patient's service



un ciudadano se acerca a un centro sanitario porque necesita asistencia sanitaria, espera recibir una atención "humanizada". Esta palabra la usamos habitualmente para expresar el deseo de que algo sea bueno, se ajuste a la condición humana, responda a la dignidad de la persona. No es lo mismo ser humano, que vivir y comportarse humanamente.

Los profesionales de la salud deben caracterizarse por poseer riqueza de humanidad, manifestada especialmente por un compromiso con los sujetos vulnerables. Se traduce también en una predisposición a escuchar y comprender a las personas, por su interioridad, mundo y cultura. Cuidar es una tarea fundamental de la condición humana (17).

Las principales barreras de la humanización de la asistencia sanitaria son la falta de tiempo de los profesionales, la escasez de recursos humanos y económicos, la insuficiente formación y sensibilización de profesionales sanitarios, así como la formación de los propios pacientes. Estos factores también deben aplicarse al ámbito de la gestión y organización sanitaria relativa a la NAD, es por ello que se debe analizar concienzudamente los procesos de atención a los pacientes candidatos a NAD, desde una perspectiva de mejora de su calidad de vida y un adecuado fomento de su experiencia en la cadena de cuidados sanitarios.

Un ejemplo paradigmático de tratamiento nutricional en el domicilio es el del paciente oncológico. La NAD es una alternativa terapéutica fácil y asequible para aquellos pacientes oncológicos con fallo oral o intestinal, que no requieran otras medidas terapéuticas de ámbito hospitalario. El principal objetivo de la NAD es mejorar la calidad de vida del paciente oncológico. Ello implica un enfoque multidisciplinario y coordinado entre el equipo responsable del soporte, la familia y todos los profesionales implicados en el tratamiento.

Es difícil valorar los efectos de la nutrición en este aspecto en un paciente con cáncer avanzado: la mejoría del estado funcional, la disminución de los síntomas y el menor número de complicaciones son variables difíciles de medir en estos pacientes. Pero lo que indiscutiblemente brinda un adecuado soporte nutricional es la posibilidad de adelantar el alta hospitalaria con la consecuente reintegración del paciente a su medio. Esto repercute positivamente en el estado anímico del paciente y, en muchas ocasiones, le permite reincorporarse a un ritmo de vida razonablemente normal. En general, se acepta que la NAD representa un cambio positivo en la calidad de vida de los pacientes con cáncer (18).

Un estudio reciente desarrollado en el ámbito del paciente oncológico define los criterios de selección que permiten la identificación de pacientes que se pueden beneficiar de la NAD. Esta investigación, llevada a cabo por Ruggeri et al. (19), ha demostrado que la NAD puede ser eficaz para evitar la muerte por desnutrición

en el 73% de los pacientes, y para mantener o mejorar el estado de funcionalidad o *Karfnosky Performance Status* (KPS) durante al menos un mes en el 90% de los casos. Asimismo, se demuestra que los beneficios proporcionados por la NAD en el grado de supervivencia y de la calidad de vida dependen del grado de caquexia al inicio de la NAD.

Los pacientes que reciben NPD requieren un estrecho seguimiento para comprobar la eficacia del tratamiento, realizar las modificaciones necesarias en función de la evolución clínica y detectar y resolver los problemas que pudieran surgir. Este seguimiento se realizará por todos los profesionales implicados en el proceso, la Unidad de Nutrición, el Servicio de Farmacia y el Servicio de Hospitalización a Domicilio, cuando sea necesario. Se deben realizar evaluaciones clínicas y analíticas con una frecuencia que se deberá ajustar en función de la estabilidad del paciente, la patología de base y la tolerancia al tratamiento (20).

6. EPIDEMIOLOGÍA Y EFICIENCIA DEL SOPORTE NUTRICIONAL A DOMICILIO

En España, sólo un tercio de los pacientes con riesgo de desnutrición al alta reciben apoyo nutricional (suplementos orales o nutrición enteral/parenteral) (21). Sin embargo, sabemos que un adecuado soporte nutricional mejora el estado general del paciente, aumenta la tolerancia al tratamiento y su eficacia, disminuyendo así mismo la mortalidad; en definitiva, existen evidencias de que el estado nutricional incide en los resultados finales de morbilidad, coste y calidad de vida (22). Por otro lado, la disminución de los costes del tratamiento con respecto a los costes hospitalarios se estima en un 75% en los pacientes con NED y en 60-76% en pacientes con NPD (23).

Según los datos obtenidos del registro del grupo NADYA-SENPE (www.nadya-senpe.com) del año 2017 (24), se registraron 308 pacientes con NPD (54,5 % mujeres) -38 niños y 270 adultos-, procedentes de 45 hospitales españoles; en total 312 episodios, lo que representa una tasa de prevalencia de 6,61 pacientes/millón de habitantes/año. El diagnóstico más frecuente en adultos fue "oncológico paliativo" (25,6 %), seguido de "otros". En niños fue la enfermedad de Hirschsprung, con seis casos (15,8%). El primer motivo de indicación fue síndrome de intestino corto tanto en niños (55,3 %) como en adultos (33,7 %). El tipo de catéter más utilizado fue el tunelizado tanto en niños (74,3 %) como en adultos (38,2%). Finalizaron 81 episodios; la causa más frecuente fue el fallecimiento (62,9%) y que pasaron a ser tratados por vía oral (34,7 %). Estos datos indican que se mantiene el incremento progresivo de centros y profesionales colaboradores en el registro de pacientes que reciben NPD, y que las principales indicaciones de NPD y de motivo de finalización, también se mantienen estables.



Si comparamos el uso de NPD en España frente a otros países europeos, empleando como fuente de datos el registro nacional del Grupo NADYA (Nutrición Artificial Domiciliaria y Ambulatoria) de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral (SENPE), la prevalencia de NPD presenta una tasa entre dos y cinco veces inferior a las de otros países europeos, mientras que las tasas de población subsidiaria de este tipo de tratamiento se estima que podrían ser similares a las de países como Reino Unido, Italia o Alemania (25). Los estudios epidemiológicos llevados a cabo en Europa por el *Home Artificial Nutrition Working Group* de la ESPEN registraron en 2011 una prevalencia de adultos con NPD de entre 3,25 y 6,6 pacientes/millón de habitantes. Respecto a la variabilidad de uso de la NPD en pacientes con cáncer, varía del 60% en Italia al 20-30 % en España, Francia y Bélgica y sólo el 8% en Reino Unido (22). Según los registros NADYA-SENPE, la patología oncológica ocupa el primer lugar para indicar NPD desde 2003. En 2013, el grupo oncológico ocupaba el 30,7 % (en tratamiento paliativo 20,1 % y con tratamiento radical 10,6 %), seguida por otras patologías. En el último registro publicado, de 2014, se observa un ligero aumento en el tratamiento de esta patología, ya la neoplasia paliativa ocupaba el 20,4% y la neoplasia con tratamiento radical, el 11,8 % (26).

Los estudios de coste-efectividad de la NPD son muy escasos y poco extrapolables a nuestro país por estar realizados en diferentes sistemas sanitarios. Dentro del ámbito europeo de Reino Unido, Francia y Holanda, la evidencia científica disponible sugiere que, comparada con la alternativa de trasplante intestinal, la NPD resultó en un menor coste por año de vida al tiempo que parece ser claramente más adecuada de la perspectiva de la coste-efectividad comparada con el mismo tipo de tratamiento administrado en el hospital (27).

7. ROL DE LA FARMACIA HOSPITALARIA EN LA NUTRICIÓN DOMICILIARIA

El documento desarrollado por el Grupo de Nutrición de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH) con la propuesta de estandarización del SNE (28) supuso una mejora en la práctica de esta modalidad terapéutica entre nuestro colectivo. Estos estándares reflejan la práctica considerada de referencia para asegurar una atención nutricional de calidad, segura y eficiente.

La NPD se ha de preparar en condiciones de estricta asepsia, en cabinas de flujo laminar horizontal y por un servicio acreditado para ello, realizándose así a través de los Servicios de Farmacia Hospitalaria (SFH). Desde el SFH se preparan las bolsas de NP de forma individualizada para cada paciente, en función

de su patología y requerimientos nutricionales. El farmacéutico encargado de la terapia parenteral ha de realizar un control de calidad para comprobar que las condiciones de preparación son correctas, así como del material de elaboración, todo ello previo a la dispensación del tratamiento. La dispensación de NPD requiere tradicionalmente del desplazamiento del paciente o sus familiares al hospital una o dos veces por semana. Si el paciente está a cargo de la Unidad de Hospitalización a Domicilio (UHD), un miembro de dicha unidad es el responsable de recoger las nutriciones semanalmente.

El desplazamiento del paciente al hospital, además de la recogida de la terapia parenteral, es necesario para la colocación por parte de enfermería de las vías de accesos para facilitar la alimentación a lo largo de la semana, así como para la recogida de todo el material requerido para poder alimentarse de la mejor manera posible y evitar complicaciones innecesarias.

Como alternativa a la elaboración de la NP en el Servicio de Farmacia, existen servicios de catering que elaboran las dietas de forma individualizada de acuerdo con la solicitud del SFH. El paciente gana en comodidad puesto que se le garantiza el suministro periódico de la NP en el domicilio del paciente, incluso en periodo de vacaciones allí donde se encuentre temporalmente, evitando los desplazamientos al hospital. El área de nutrición artificial se encarga de la realización de un seguimiento estrecho y monitorización de los pacientes, por lo que ante cualquier cambio en los parámetros clínicos o analíticos se valora la suplementación o sustitución de cualquier nutriente que sea necesario.

La NED, a diferencia de la NPD, no se dispensa en los SFH, sino que se recoge en las oficinas de farmacia con una receta médica que requiere visado de inspección. Constituyen una excepción los pacientes ingresados en la UHD, a los que sí se dispensa la NE desde el Servicio de Farmacia. En algunas CC.AA., como Cataluña y Galicia, la NED se dispensa en el SFH, donde además se llevan a cabo las actividades de seguimiento y racionalización del tratamiento.

Una vez establecida la necesidad de NAD, es preciso llevar a cabo un riguroso programa de educación y entrenamiento a los pacientes y/o cuidadores que permita poner en práctica una nutrición eficaz, reduciendo al máximo las complicaciones y procurando facilitar en lo posible la independencia y autosuficiencia de los pacientes. El programa debe comprender aspectos tales como: conocimiento del motivo de la indicación, método de administración, cuidados de la vía de acceso y material necesario, correcta manipulación y almacenaje de la fórmula, mantenimiento del equipo de administración y normas de infusión, reconocimiento y respuesta adecuada ante complicaciones, descripción de la estructura sanitaria de apoyo, modo de contacto ante cualquier duda o problema y garantizar todos los aspectos éticos y legales (29).

Los equipos multidisciplinares aportan importantes beneficios a los pacientes y a los profesionales que los atienden. Estos beneficios incluyen mejoras en los resultados en salud, mayor satisfacción de los usuarios y un uso más eficiente de los recursos. En la práctica clínica actual, aunque cada vez el movimiento hacia un mayor trabajo en equipo parece despertar, se detecta aún, la escasa existencia de trabajo conjunto estructurado y continuado entre los agentes implicados en la nutrición parenteral domiciliar. Existe recorrido de mejora en la coordinación entre dichos agentes. Parece necesaria una participación mayor de endocrinos, nutricionistas y farmacéuticos de hospital en las unidades multidisciplinares que atienden a los pacientes con NAD, además de seguir participando en comisiones de tumores y comisiones de nutrición pero que a veces avanzan de forma paralela, sin demasiada interconexión.

El campo de la NAD no debe ser ajeno a la aplicación del concepto "Gestión Clínica", entendido como la estrategia que permite sistematizar y ordenar los procesos de atención sanitaria de forma adecuada y eficiente. Esto implica algo más que un modelo de administración de nuestros servicios de salud. Se trata de un verdadero cambio de actitud no sólo del personal administrativo, sino de todo el personal asistencial, que deberá asumir el liderazgo de las tareas administrativas garantizando el logro de los objetivos de la institución. Para ello tendrá como eje de todas las actividades médicas y administrativas al paciente que acude a solicitar nuestra atención (30).

Finalmente, todos estos profesionales sanitarios deben ser copartícipes del concepto "Decisión Clínica Compartida", en la que hay dos expertos, el profesional sanitario que pone la técnica y el paciente que pone la vida, que juntos elaboran el plan terapéutico personalizado, en un diálogo de búsqueda de las actuaciones más adecuadas.

8. CONCLUSIONES

Desafortunadamente, muchas veces la nutrición queda relegada a un segundo plano en las políticas estratégicas de salud y en nuestras organizaciones no se integra como objetivo prioritario. Se eclipsa el problema por la existencia de otras enfermedades de base. Sin embargo, el problema nutricional es sistémico clínicamente y no es órgano-dependiente.

Con los datos que disponemos en España procedentes del registro NADYA, podemos afirmar que el empleo de la NPD es menor respecto a otros países de similares características socioeconómicas y sanitarias de nuestro entorno. No obstante, a fecha de hoy no se tiene seguridad de cuál sería la tasa ideal de empleo de la NPD.

Debido a esa lógica sistémica y, por lo tanto, a la necesidad de un abordaje multidisciplinar y coordinado, es probable que la nutrición requiera un cambio estratégico general. Es de gran importancia la coordinación del equipo de soporte, con una estructura básica de médico y farmacéutico expertos, enfermería especializada y dietista, así como la importancia de la gestión global del paciente, es decir, aspectos no sólo clínicos, sino de organización y gestión global de un proceso.

En cuanto a la transformación tecnológica en el ámbito de la salud, resaltar que debe basarse en el componente humano. Tecnología y experiencia de paciente han de ir siempre de la mano para lograr mejores resultados y una gran calidad en cuanto a la experiencia y atención de pacientes.

Se recomienda el empleo de NPD en pacientes con enfermedad benigna y fallo intestinal, ya que demuestra beneficios en el estatus nutricional, calidad de vida y supervivencia. Por otro lado, otros estudios sugieren que en pacientes con cáncer avanzado en tratamiento paliativo, con expectativa de vida de más de tres meses y con fallo intestinal, la calidad de vida puede mejorar sensiblemente con la NPD.

Por último, se demuestra que la NPD es una alternativa con un balance de coste-efectividad adecuado en relación con la atención hospitalaria clásica, lo que redunda en la adopción del criterio de eficiencia como elemento de priorización en sanidad.

9. REFERENCIAS

1. ESPEN guidelines on definitions and terminology of clinical nutrition. Clin Nutr. 2017 Feb;36(1):49-64. doi: 10.1016/j.clnu.2016.09.004. Epub 2016 Sep 14.
2. ConT-SEE. Terms, concepts and definitions in clinical artificial nutrition. The ConT-SEEN Project Endocrinología, Diabetes y Nutrición (English ed.), Volume 65, Issue 1, January 2018, Pages 5-16.
3. de Cos Blanco AI, Gómez Candela C. Concepto, Objetivos, Sistemática de trabajo y composición del Grupo Español de Nutrición Artificial Domiciliar y Ambulatoria. (NADYA). En: Manual de nutrición artificial domiciliar y ambulatoria. Procedimientos educativos y terapéuticos. NADYA. Disponible en <https://nadya-senpees.sserver.es/pdf/manualn.pdf>
4. Wendy Everett, Christina Badaracco, Sharon McCauley, «From hospital to home: Why nutrition counts» Health Affairs, 2020. Disponible en <https://www.healthaffairs.org/doi/10.1377/hblog20200117.329745/full/>
5. Plana Vila M et al. The burden of hospital malnutrition in Spain: methods and development of the PREDyCES® study. Nutr Hosp. 2010 Nov-Dec;25(6):1020-4.



6. Caplan GA, Sulaiman NS, Mangin DA, Armanino Ricotta N, Wilson AD, Barclay L. A meta-analysis of Hospital in the home, *Med J Aust*, 2012;197(9):512-9.
7. GLIM criteria for the diagnosis of malnutrition - A consensus report from the global clinical nutrition community. *Clin Nutr*. 2019 Feb;38(1):1-9.
8. León-Sanz M et al. PREDyCES study: The cost of hospital malnutrition in Spain. *Nutrition*. 2015 Sep;31(9):1096-102.
9. A.S.P.E.N. Board of Directors and the Clinical Guidelines Task Force. Guidelines for the use of parenteral and enteral nutrition in adult and pediatric patients. *JPEN* 2002;26:1SA-138SA.
10. Gómez Candela C, de Cos Blanco AI. Selección de pacientes candidatos a Nutrición Artificial Domiciliaria y Ambulatoria. En: Manual de nutrición artificial domiciliaria y ambulatoria. Procedimientos educativos y terapéuticos. NADYA. Disponible en <https://nadya-senpees.sserver.es/pdf/manualn.pdf>
11. Wande-Berghe C, Cuerda-Compes C, Álvarez-Hernández J, Pereira-Cunill JL, Carabaña-Pérez F, Gómez-Candela C, Nutrición parenteral domiciliaria en paciente oncológicos. *Hos Domic* 2017, vol. 1, pp. 65-72.
12. Moreno Villares JM. Composición de las fórmulas de nutrición parenteral. *Nutr Hosp Supl*. 2009;2(1):8-12.
13. Frandsen BR, Joynt Ke, Rebitzer JB, Jha AK. Care fragmentation, quality and costs among chronically ill patients. *AJMC*, 2015;21(5): 355-62.
14. La eSalud y el Hospital Líquido. Disponible en <https://hablandoesa-lud.wordpress.com/2017/01/09/la-esalud-y-el-hospital-liquido/>
15. Los nuevos e-Pacientes y la adaptación de los Profesionales de salud. Disponible en <https://saludconectada.com/1-3-los-nuevos-e-pacientes-la-adaptacion-los-profesionales-salud/?shared=email&msg=fail>
16. RAE. Diccionario de la Lengua Española. In Real Academia Española; 2018. Available from: <http://dle.rae.es/?id=KnbmIsL>
17. Plan de Humanización de la Asistencia Sanitaria 2016-2019: Consejería de Sanidad de Madrid. Disponible en https://www.comunidad.madrid/transparencia/sites/default/files/plan/document/881_232_bvcm017902_0.pdf
18. Cozzaglio L, Balzola F, Cosentino F, DeCicco M, Fellagara P, Gaggiotti G, Gallitelli L, Giacosa A, Orban A, Fadda M, Gavazzi C, Pirovano F, Bozzetti F. Outcome of cancer patients receiving home parenteral nutrition. Italian Society of Parenteral and Enteral Nutrition (S.I.N.P.E.). *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1997;21(6):339-42.
19. Ruggeri E et al. Home artificial nutrition in palliative care cancer patients: Impact on survival and performance status. *Clin Nutr*. 2020 Feb 22. pii: S0261-5614(20)30084-4.
20. Gómez Enterría P, Laborda González L. Preparación, métodos y pautas de administración de la nutrición parenteral domiciliaria. Seguimiento de los pacientes. Educación a pacientes y cuidadores. *Nutr Hosp Supl*. 2009;2(1):18-24.
21. Segura A, Pardo J, Jara C, Zugazabeitia L, Carulla J, de las Peñas R, et al, An epidemiological evaluation of the prevalence of malnutrition in Spanish patients with locally advanced or metastatic cancer. *Clin Nutr*.2005; 24(5):801-14. S
22. Pressoir M, Desne S, Berchery D, Rossignol G, Poiree B, Meslier M, et al, Prevalence, risk factors and clinical implications of malnutrition in French Comprehensive Cancer Centres. *Br J Cancer* 2010;102(6):966e71.
23. C. Gómez Candela et al. Soporte Nutricional en el Paciente Oncológico. Capítulo XIII Nutrición artificial domiciliaria en el paciente oncológico. Disponible en https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/in-fopublico/publicaciones/soporteNutricional/pdf/cap_13.pdf
24. Nutrición parenteral domiciliaria en España 2017. Informe del Grupo de Nutrición Artificial Domiciliaria y Ambulatoria NADYA. Disponible en <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6718855>
25. González Aguilera B et al. Documento de consenso de expertos de Andalucía y Extremadura sobre la nutrición parenteral domiciliaria. *Nutr Hosp* 2017;34(4): 784-91.
26. Wanden-Berghe C, Pereira Cunill JL, Cuerda Compés C, Moreno Villares JM, Pérez de la Cruz A, Burgos Peláez R, et al. Nutrición parenteral domiciliaria en España durante 2014. Informe del Grupo de Nutrición Artificial Domiciliaria y Ambulatoria NADYA. *Nutr Hosp* 2015;32:2380-4.
27. Roskott AM, Groen H, Rings E, Haveman J, Ploeg RJ, Serlie MJ, et al. Cost-effectiveness of intestinal transplantation for adult patients with intestinal failure: A simulation study. *Am J Clin Nutr* 2015;101:79-86.
28. Calvo MV, Sirvent M (coordinadoras). Estándares de práctica del farmacéutico de hospital en el soporte nutricional especializado: desarrollo y criterios de evaluación. *Farm Hosp*. 2009;33 (supl 1):5-80.
29. Curso SEFH de Nutrición Artificial Domiciliaria. Disponible en <http://formacion.sefh.es/dpc/sefh-curso-nutricion/curso-nutricion-modulo10.pdf>
30. Pérez JJ, García J, Tejedor M. Gestión clínica: conceptos y metodología de implantación. *Rev Calidad Asistencial* 2002;17(5):305-11.

AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento o gratitud debe estar siempre presente en nuestras vidas, de ello se nutre nuestra alma. Así lo reflejó el genial Miguel de Cervantes en "El ingenioso hidalgo don Quijote de La Mancha". Cuando Don Quijote deja en libertad a los galeotes que iban a las galeras y ellos se burlaron del mismo, les espetó: "de gente bien nacida es agradecer los beneficios que reciben, y uno de los pecados que más a Dios ofende es la ingratitud". Mi profundo agradecimiento a los miembros de esta Real Academia Nacional de Farmacia por el indescriptible honor que me hacen con este nombramiento y por su amable acogida. Asimismo, quiero expresar mi agradecimiento a la Junta de Gobierno de esta Real Academia por haberme elegido como Académico Correspondiente, y a la Sección

Quinta "Salud Pública, Alimentación y Medio Ambiente" por haberme propuesto; en especial a mi mentor y director de tesis doctoral, el Excmo. Sr. D. Francisco José Sánchez Muniz. Al profesor Sánchez Muniz le agradezco las muchas enseñanzas que me ha brindado, su buen humor y empatía, la importancia del trabajo en equipo, persistir y no rendirse nunca, explorar hasta el infinito y, sobre todo, su amistad y confianza. Quisiera reiterar mi agradecimiento a esta insigne institución por este nombramiento como Académico Correspondiente.

Doy gracias a mi familia, en particular a José Manuel, mi padre, y a María del Carmen, mi madre; también a mi pareja Pilar y a mi hija Gabriela, y a todos los amigos que me han acompañado y a buen seguro me acompañarán en mi camino vital. La familia es la cuna donde la vida comienza, a partir de ahora será un honor para mí formar parte de esta nueva familia académica.

ANEXO I. ABREVIATURAS

DRE, la desnutrición relacionada con la enfermedad; ESPEN, European Society of Parenteral and Enteral Nutrition; HCE, Historia Clínica Electrónica; KPS estado de funcionalidad de Karf-nosky; MNA, mini-nutritional assessment; NAD, nutrición artificial fuera del ámbito hospitalario o domiciliaria; NADYA, Nutrición Artificial Domiciliaria y Ambulatoria; NC, nutrición clínica; NE, nutrición enteral; NED, nutrición parenteral domiciliaria; NP, nutrición parenteral; NPD, nutrición parenteral domiciliaria; NRS, nutritional Risk Screening; SEFH, Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria; SFH, Servicios de Farmacia Hospitalaria; SENPE, Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral; SN, soporte nutricional; SNE. Soporte Nutricional Especializado; TICs, Tecnologías de la Información y Comunicación; UHD, Unidad de Hospitalización a Domicilio.

Si desea citar nuestro artículo:
José Manuel Martínez Sesmero

**Gestión integral de la nutrición artificial domiciliaria:
humanización e innovación al servicio del paciente**

An Real Acad Farm [Internet].

An Real Acad Farm Vol. 86. Nº 4 (2020) · pp. 257-268

DOI: <http://>

LA VEGETACIÓN ANTÁRTICA, CENTINELA DEL CAMBIO CLIMÁTICO

ANTARCTIC VEGETATION, A SENTINEL TO CLIMATE CHANGE

Leopoldo García Sancho

Dpto. de Farmacología, Farmacognosia y Botánica. Facultad de Farmacia, Pza. de Ramón y Cajal s.n., UCM, 28040 Madrid

*corresponding author: sancholg@farm.ucm.es

REVISIÓN

Discurso de ingreso como Académico Correspondiente en la Real Academia Nacional de Farmacia.

RESUMEN

La Antártida es el continente más frío, seco, alto y ventoso; aquí, los líquenes y musgos crecen donde es más cálido, húmedo, bajo y protegido. En general, la productividad vegetal depende estrechamente de la longitud del periodo en el cual el agua líquida está disponible, por ello los vegetales se ven confinados a lugares con microclima excepcionalmente favorable. Es esta fuerte relación entre microclima y disponibilidad de agua líquida y productividad/crecimiento, lo que hace a este ecosistema potencialmente tan útil para la monitorización del cambio climático global, especialmente en lo que se refiere al incremento de temperatura. Incluso un pequeño aumento de temperatura puede suponer un marcado incremento en el área afectada por estos periodos cálidos produciendo alteraciones en las comunidades vegetales. Es cada vez más claro que existen dos Antártidas, la Península y el continente. Se diferencian en el factor que controla la distribución de la biodiversidad vegetal. En la Península Antártica la temperatura sería el factor determinante y en el continente lo sería la disponibilidad de agua líquida. También el stress por radiación parece limitado a la zona continental. Se han llevado a cabo diferentes intentos de usar líquenes como monitores de cambio climático en regiones polares. La prístina Antártida ofrece una oportunidad única de estudiar el efecto del cambio climático a lo largo de gradientes latitudinales que se extienden entre 62° y 87° S. Tanto la diversidad de especies líquénicas, como sus tasas de crecimiento muestran correlaciones significativas con la temperatura y la precipitación anual a través del continente así como con las oscilaciones climáticas de periodo corto sucedidas en la Península Antártica. Las interacciones competitivas parecen ser pequeñas, de modo que cada individuo se desarrolla en equilibrio con las condiciones ambientales y, como resultado, puede indicar las tendencias en la productividad para intervalos temporales discretos dentro de un escenario de cambio climático.

"Es todo aquí tan imponente, tan gigantescas todas las formas que las palabras no alcanzan a describirlo acertadamente. Nosotros cuatro somos los primeros seres humanos a quienes les ha sido dado asombrarse ante estas maravillas de la naturaleza y se nos antoja, a veces, que habrá de pasar largo tiempo antes de que otros pongan el pie en estos remotos parajes" (Diario de Shackleton, 4 de Diciembre de 1908)

ABSTRACT

Antarctica is the coldest, driest, highest and windiest continent; the lichens and mosses grow where it is more warm, wet, low and protected. Overall productivity is strongly influenced by the length of period when water is available and the plants become, therefore, increasingly confined to areas of exceptionally good microclimate. It is this strong link between microclimate, water availability and productivity/growth that makes the system so potentially useful for monitoring global climate change, especially temperature increase. Even a small increase in temperature will markedly alter the areas over which such warm periods occur and bring with it a marked community shift. It is becoming clear that there are two Antarticas, the Peninsula and the main continent. These differ in the controls on biodiversity distribution, there is a probably water unlimited but temperature-determined biodiversity cline in the Peninsula compared to a, water controlled, temperature-independent, fragmented vegetation in the continent. The reverse diel pattern of activity with the presence of very high light stress also seems to be confined to the continent. Several attempts have been made to use lichens as monitors of climate change especially in alpine and polar regions. The pristine Antarctica offers a unique opportunity to study the effects of climate change along a latitudinal gradient that extends between 62° and 87° S. Both lichen species diversity and thallus growth rate seem to show significant correlations to mean annual temperature and precipitation for gradients across the continent as well as to short time climate oscillation in the Antarctic Peninsula. Competition interactions appear to be small so that individual thalli develop in balance with environmental conditions and, as a result, can indicate the trends in productivity for discrete time intervals over long periods of time in a climate warming scenario.

Palabras Clave:

antártida
líquenes
musgos
productividad
diversidad
microclima
cambio climático

Keywords:

antarctica
lichens
mosses
productivity
diversity
microclimate
climate change



1. INTRODUCCIÓN

La Antártida es conocida como el continente más alto, más frío, más seco y más ventoso del mundo. Efectivamente, su altura media supera los 2000 m, debido a que el continente en sí está cubierto por un caparazón de hielo de unos dos kilómetros y medio de espesor. Además, en esta inmensa y elevada meseta helada se ha registrado el record de frío en la superficie de nuestro planeta; -93°C . La precipitación media, naturalmente en forma de nieve, es, en la mayor parte de la Antártida, similar a la del desierto del Sahara. Por último, desde el interior del continente, furiosos vientos catabáticos se desploman hacia la costa, superando con frecuencia los 300 km/h. Estas condiciones extremas, que sugieren ambientes marcianos, parecen incompatibles con la vida y en gran medida, lo son. Afortunadamente, hay épocas y lugares menos hostiles que ofrecen una oportunidad para la supervivencia. Durante el verano antártico la temperatura en las zonas costeras se aproxima o incluso llega a superar el punto de congelación y existen numerosos lugares en la vertiente occidental de la Península Antártica o en islas cercanas, expuestos a los relativamente templados y muy húmedos vientos procedentes del oeste, donde la precipitación llega a superar los 700 mm anuales, lo que supone un ambiente hiperhúmedo para estas latitudes (1).

Pero, independientemente del clima, la vida vegetal en la Antártida sólo es posible en el escaso 0,5 % del continente descubierto de hielo. Para una extensión de 14 millones de kilómetros cuadrados, esto supone que la vida queda restringida a unos 70.000 km², una extensión similar a Andalucía, aunque intensamente fragmentada en un rosario de minúsculas localidades costeras y nunataks que orla el continente. La zona más extensa libre de hielos, pero también la más inhóspita, son los Valles Secos de la región de McMurdo, que alcanzan los 14.000 km² (2).

Así pues, la vida vegetal antártica está condicionada tanto por factores climáticos extremos, como por la acusada fragmentación de hábitat. Los avances recientes en biología molecular nos permiten explorar las relaciones filogeográficas entre poblaciones aisladas y determinar su origen y sus migraciones a través de los avatares climáticos y geológicos ocurridos desde tiempos remotos (3). Por otra parte, las técnicas de ecofisiología, perfeccionadas en las últimas décadas, ofrecen la oportunidad de conocer el funcionamiento vegetal de forma continua, automática y en su ambiente natural, incluso bajo las condiciones más extremas (4).

2. LA FLORA ANTÁRTICA; DIVERSIDAD Y PATRONES DE DISTRIBUCIÓN

A pesar de las restricciones geográficas y climáticas, la vida vegetal (líquenes y musgos) en la Antártida se encuentra hasta en los afloramientos rocosos más meridionales, a 87°S (5). Sin embargo, la mayoría de los vegetales antárticos se concentran en zonas mucho menos extremas y relativamente templadas, fundamentalmente en la región denominada Antártida marítima, que comprende la costa noroccidental de la Península Antártica y las islas cercanas (Fig. 1). Aquí la temperatura media durante el verano llega a superar en dos o tres grados el punto de congelación y llueve con relativa frecuencia. Los inviernos son fríos, naturalmente, pero no tanto como en regiones árticas de similar latitud. El paisaje es, sin embargo, típicamente antártico. La falta de calor en verano impide casi por completo el desarrollo de plantas vasculares y favorece la formación de enormes glaciares que se extienden hasta la costa. En los reducidos espacios que quedan libres de hielo se concentran grandes colonias de focas y pingüinos, las más diversas y abundantes comunidades vegetales de toda la Antártida y unas 20 bases científicas de 12 países, entre ellas las dos españolas situadas en Isla Livingston (Juan Carlos I) e Isla Decepción (Gabriel de Castilla).

A pesar de la relativa templanza de la Antártida marítima, sólo dos especies de plantas vasculares, *Deschampsia antarctica* (Poaceae) y *Colobanthus quitensis* (Caryophyllaceae) han logrado establecerse en este rincón antártico. Por el contrario, hasta 350 de las aproximadamente 400 especies de líquenes antárticos conocidos viven en esta zona, junto a la mayor parte del cerca del centenar de especies de musgos (6, 7) (Fig. 1). Suelo y roca aparecen con frecuencia completamente recubiertos por estos vegetales poiquilohídricos. El húmedo ambiente oceánico les permite mantenerse hidratados y activos durante muchos días al año, lo que explica sus tasas de crecimiento relativamente elevadas a pesar de las bajas temperaturas (8). Cuando penetramos hacia el continente dos factores confluyen para dificultar de forma drástica la capacidad de supervivencia de la vegetación: La sequedad y el frío extremo. Grupos enteros de líquenes, como todos aquellos que forman simbiosis con cianobacterias, están por completo ausentes en la Antártida continental. Aquí, las localidades más ricas no superan el centenar de especies entre líquenes y musgos, aunque lo normal es que no lleguen ni a 50 (9, 10). La biomasa de estas comunidades es hasta 100 veces inferior a la de la Antártida marítima y además están muy localizadas; la mayor parte de los afloramientos rocosos del continente antártico aparecen prácticamente desprovistos de cubierta vegetal.

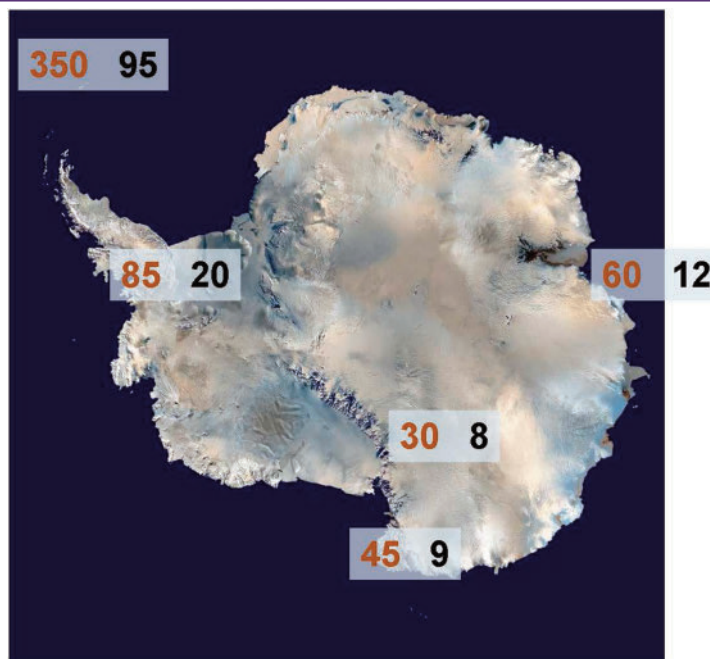


Figura 1: Número de especies de líquenes (rojo) y musgos (negro) en diferentes regiones de la Antártida.

Durante un tiempo se pensó que la flora antártica, especialmente en lo que se refiere a los líquenes, estaba compuesta en su mayor parte (ca. 80 %) por especies endémicas. Hoy sabemos que la situación es más equilibrada. Aproximadamente la mitad de las especies de musgos y líquenes antárticos pueden encontrarse también en el Hemisferio Norte, bien en zonas polares o alpinas (flora bipolar), bien en ambientes diversos no necesariamente ligados al frío (flora cosmopolita). La otra mitad se reparte entre especies de distribución austral (comunes a los extremos continentales e islas del Hemisferio Sur) y especies propiamente antárticas, que no suponen mucho más del 35 % sobre el total. Estas proporciones se mantienen tanto en la Antártida marítima como en la Antártida continental (11).

3. LA VIDA EN EL LÍMITE

El continente antártico, ventoso, seco y muy frío, es sin duda una auténtica frontera para la vida, pero incluso en este ambiente en general inhóspito hay grados y matices. En el inmenso desierto helado se producen a veces sorprendentes concentraciones de especies de líquenes y musgos en ciertos roquedos, con una extensión de tan solo algunos cientos de metros cuadrados. Son los denominados microoasis antárticos (12), un nombre de lo más adecuado, ya que su presencia depende fundamentalmente de la disponibilidad de agua líquida. Pero, ¿cómo obtener agua líquida cuando la temperatura del aire se mantiene varios grados bajo cero, incluso en verano? La respuesta está en la intensa radiación solar, reforzada en ciertas orientaciones por la radiación reflejada desde

el mar helado o la nieve. Las laderas y acantilados costeros con exposición norte son las zonas adecuadas para que se produzcan microoasis. Durante el verano la radiación solar incide directamente durante más de doce horas, lo que da lugar a la lenta fusión de los frentes de nieve y la formación de escorrentías y riachuelos que funcionan durante algunas horas, para congelarse de nuevo cuando quedan sombreados. En estas localidades, musgos y líquenes compiten intensamente por el espacio, imponiéndose los musgos en los lugares con mayor disponibilidad de agua y los líquenes en los más secos (13). Por supuesto, se encuentran todo tipo de situaciones intermedias.

Es interesante señalar que hemos encontrado evidencias de que el tiempo de reactivación metabólica después del largo invierno polar es proporcional a la disponibilidad de agua en cada localidad. De esta forma, los líquenes de los lugares más secos y expuestos alcanzan sus óptimos fotosintéticos solo dos horas después de la rehidratación, tras diez meses de inactividad. Sin embargo, los musgos, que viven en zonas largo tiempo inundadas, necesitan 24 horas de actividad para volver a alcanzar su óptimo fotosintético. Así, los líquenes muestran una buena adaptación a eventos esporádicos de hidratación, a los que responden con rapidez, mientras que los musgos necesitan vivir en condiciones más estables (14).

Sin embargo, el mantenimiento de actividad metabólica en los musgos durante días o semanas les expone a los dañinos efectos de la radiación ultravioleta, especialmente intensa en la Antártida continental, donde todas las primaveras se produce el conocido agujero de ozono. Como cabría esperar, los musgos más expuestos al sol muestran un alto porcentaje de absorción de luz UV, muy su-

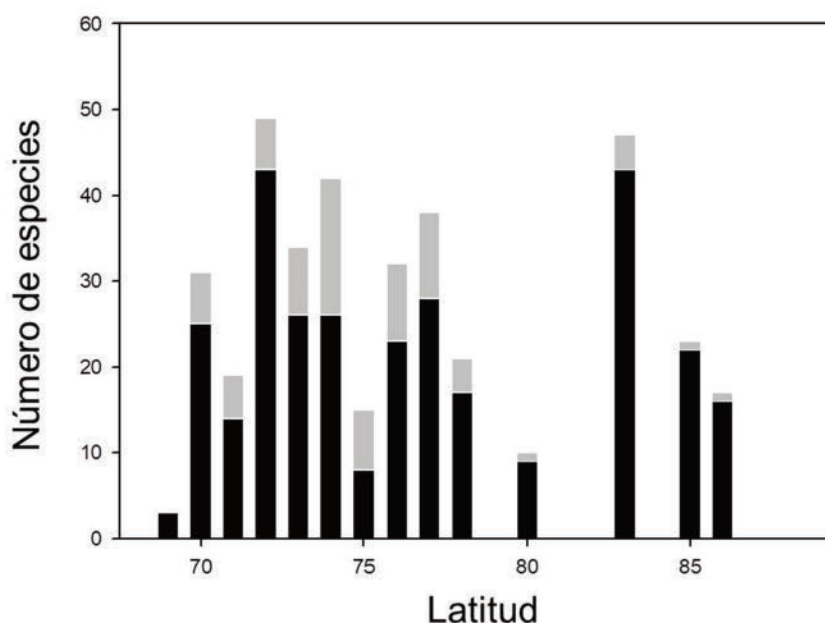


Figura 2: Número de especies encontradas a lo largo de las Montañas Transantárticas, en un gradiente latitudinal desde 69 a 86 °S.

perior a los talos de sombra. Pero cuando individuos de zonas sombreadas se exponen al sol la eficiencia de su escudo UV aumenta hasta alcanzar valores máximos al cabo de una semana. Esta respuesta parece estar claramente inducida por la incidencia directa del sol, lo que supone una activa capacidad de aclimatación de estos organismos al ambiente lumínico (15).

Los microoasis forman un collar de joyas vivas que circunda todo el continente antártico y que penetran hasta latitudes muy altas a través de las Montañas Transantárticas. Hay una región, sin embargo, en la que incluso estas mínimas fuentes de hidratación están ausentes. Se trata de los Valles Secos, la zona más inhóspita de la Antártida, donde la vida retrocede hasta rincones insospechados. La precipitación es aquí inferior a 50mm anuales, similar a la del centro del Sahara, la temperatura nunca supera el punto de congelación y a pesar de ello, la humedad relativa se sitúa alrededor del 25 %. La sequedad es tal, que el hielo de los glaciares que penetran en estos valles se sublima, creando frentes muy netos y estables, colgados a mitad de ladera. Nada parece ser capaz de sobrevivir en este desierto de polvo y rocas esculpidas por el viento. Algunos cadáveres de focas momificadas nos recuerdan que incluso los microorganismos descomponedores escasean (16). Pero la vida, lejos de estar ausente, aparece por doquier, sólo que no se ve a simple vista. Para encontrarla es preciso romper las rocas de granito o arenisca y entonces descubrimos una capa verde a algunos milímetros por debajo de la superficie. Son asociaciones simbióticas de algas, hongos y bacterias (líquenes s.l.) que forman una de las comunidades microbianas más extraordinarias de nuestro planeta (17, 18).

En el interior de las rocas las extremas condiciones ambientales se atemperan, al menos durante los meses de verano. En este microhábitat la temperatura puede superar los 15 °C en un día soleado, ligeras nevadas estivales actúan como fuente de humedad, que en los intersticios rocosos se mantiene durante más tiempo y la estructura cristalina de estas rocas permite el paso de suficiente luz para la fotosíntesis hasta 1cm por debajo de la superficie. Un pequeño invernadero natural en el que de vez en cuando se consigue un ambiente muy adecuado para la actividad biológica.

Los científicos empeñados en la búsqueda de vida en Marte se han inspirado en estos "líquenes" endolíticos para diseñar sus experimentos. Los astrobiólogos que intentan encontrar formas de vida terrestres capaces de resistir la exposición a las condiciones del espacio exterior, utilizan estos organismos extremófilos como objeto preferente para futuros vuelos espaciales. Los biólogos moleculares tratan de descubrir las secuencias genéticas relacionadas con su increíble resistencia a condiciones extremas (19).

En lo más profundo de las Montañas Transantárticas, a sólo unos centenares de kilómetros del Polo Sur, se encuentran las localidades más meridionales con vida vegetal de nuestro planeta (Fig. 2). Aquí la nieve es abundante y las precipitaciones durante el verano ocurren con frecuencia. Los frentes de nieve en lenta fusión van hidratando brevemente las rocas, sobre las que se desarrollan unas 35 especies de líquenes y un musgo (*Schistidium antarctici*) (9). Muchas de ellas tienen una amplia distribución y es posible comparar el comportamiento fotosintético de poblaciones muy distantes. Así (Fig. 3) *Umbilicaria de-*

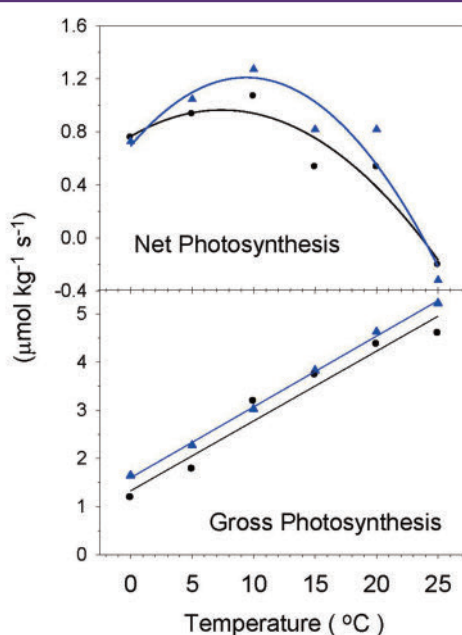


Figura 3: Fotosíntesis neta y fotosíntesis bruta medida en el líquen *Umbilicaria decusata* a diferente temperatura en muestras procedentes de Isla Livingston (63 °S), triángulos, y Mount Kyffin (84 °S), círculos

cussata de Mount Kyffin (83° 45'S) muestra óptimos fotosintéticos a una temperatura similar (5-10 °C) que la población de Isla Livingston (62°40'S), lo que descarta que exista adaptación de la simbiosis líquénica a las condiciones térmicas ambientales y más bien supone que las características microclimáticas de cada localidad atemperan los gradientes climáticos regionales.

4. RELACIÓN ENTRE PRODUCTIVIDAD VEGETAL Y FACTORES CLIMÁTICOS

En la Antártida encontramos gradientes extremos de temperatura en función de la latitud. Hacia los 63 °S, en la Península Antártica y archipiélago Shetland del Sur, la temperatura media anual es de alrededor de -2 °C; en la misma Península Antártica, pero a 67°S, la temperatura media baja a -5,3 °C; aún más al sur, en el borde continental, en la región de Cape Hallett, la media anual es de -14 °C, mientras en los Valles Secos, a 77°S, se desploma hasta -20 °C. En pleno casquete polar, en el Domo Concordia o en el Polo sur, a unos 3000m de altura, la temperatura media llega a los -50 °C, pero aquí ya no hay afloramientos rocosos y por lo tanto, no existe la vida terrestre. Al mismo tiempo, también encontramos marcados contrastes en cuanto a la precipitación, desde los más de 700mm al año en las Shetland del Sur, hasta los menos de 50mm de los Valles Secos. Es de esperar que factores climáticos tan variables ejerzan una poderosa influencia en la vegetación y así sucede. Los sencillos ecosistemas terrestres de la Antártida, en comparación con otros continentes, ofrecen una excelente oportunidad para mostrar la relación entre los parámetros ecológicos y ambientales, que

opera a nivel global. En las regiones más húmedas y cálidas del extremo septentrional de la Península Antártica se reúnen la mayoría de las más de 500 especies de líquenes y musgos conocidas para toda la Antártida. Esta riqueza en especies va disminuyendo con la latitud, hasta alcanzar un mínimo en las Montañas Transantárticas, especialmente en la zona de los Valles Secos. Pero lo más interesante es que al mismo tiempo observamos una disminución en las tasas de crecimiento anual de los líquenes, que van desde los 0,8 mm anuales de aumento en diámetro, hasta los 0,02mm. La correlación entre crecimiento, temperatura y precipitación a lo largo del gradiente latitudinal es casi perfecta (Fig. 4); difícilmente podrá encontrarse otra mejor en alguna parte del mundo (20). Esta correlación nos muestra la extraordinaria sensibilidad de la biodiversidad y al mismo tiempo de la respuesta fisiológica individual ante la variación de los factores ambientales y por tanto, su capacidad de adaptación a los cambios que puedan producirse en el futuro. Para la Península Antártica, calculamos que una variación arriba o debajo de un solo grado centígrado, supone un incremento o disminución de hasta el 10 % sobre la diversidad total. En cuanto a la productividad, hemos constatado que un grado centígrado de diferencia supone un aumento o disminución de hasta un 50% en las tasas de crecimiento anual. Naturalmente, esto depende de cada especie, pues las hay más o menos sensibles a los cambios de temperatura y todavía estamos muy lejos de comprender el comportamiento de la mayoría de ellas (21, 22).

Aunque, a grandes rasgos, sea el macroclima y principalmente la temperatura, lo que regula la diversidad y el crecimiento de los líquenes y musgos, el microclima juega un papel fundamental

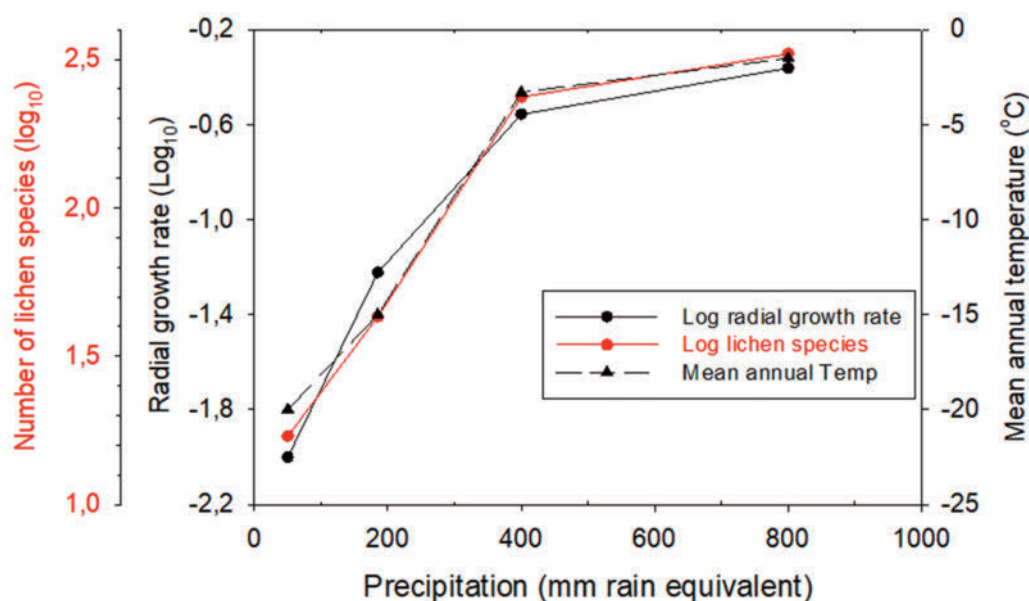


Figura 4: Relación entre el número de especies de líquenes, el crecimiento radial en especies seleccionadas y la temperatura media anual, con respecto a la precipitación en cuatro localidades antárticas.

en el desarrollo y la estructura de las comunidades. Como regla general puede decirse que cuanto más extremo es el clima, más decisivo es el microclima para la supervivencia de los vegetales. Mientras en la Antártida marítima, Península Antártica y archipiélagos, prácticamente cualquier lugar descubierto de hielo y nieve es adecuado para el establecimiento de la vegetación, en la Antártida continental, los líquenes y musgos están restringidos a los lugares en donde se produzca una confluencia favorable de factores que permita su hidratación, aunque sea de forma esporádica. Normalmente, se trata de sitios protegidos del viento, que pueden acumular radiación en verano y tienen cerca una fuente de agua a partir de la nieve o el hielo. Pero que haya nieve en las proximidades no es suficiente. En muchas ocasiones el agua helada se evapora, un proceso denominado "sublimación", sin pasar por la fase líquida. En la Antártida, el delicado equilibrio entre sublimación y fusión resulta crucial para explicar la presencia de vida terrestre. Este balance está controlado por la radiación y la humedad relativa del aire. Por mucho sol que haga en verano, si el aire es demasiado seco no habrá agua líquida suficiente para el establecimiento de líquenes y musgos. El estudio de los factores determinantes de la sublimación o la fusión de la nieve es uno de los aspectos climáticos esenciales desde el punto de vista ecológico y sobre el que aún no existen suficientes datos. Curiosamente, las mayores tasas de sublimación parecen producirse en latitudes no extremadamente altas, entre 70 y 80° S. Más cerca del Polo, el sol está tan bajo en el horizonte que la radiación no alcanza para evaporar la nieve o el hielo, que así, lentamente, se funden sobre las rocas dando una oportunidad a la colonización vegetal (1, 23).

En otras ocasiones el origen de la hidratación resulta todavía menos evidente; no se ve agua por ninguna parte, a pesar de que, a nuestros pies, podamos admirar una abundante colonización brio-liquénica. En este caso, la fuente de hidratación suele encontrarse en el interior del suelo; se trata de la fusión de las capas más superficiales del permafrost, que da lugar a un flujo de agua de abajo a arriba, suficiente para crear pequeños jardines de líquenes y musgos sobre el suelo pedregoso.

La mayor o menor duración de la cubierta nival es otro factor que durante largo tiempo no ha merecido la adecuada consideración. Aunque la nieve sea la principal fuente de agua para la vegetación, una duración excesiva puede limitar el crecimiento vegetal e incluso aniquilar a las especies más sensibles. La mayor o menor permanencia de la nieve depende tanto de la cantidad total de precipitación, como de la temperatura de verano. En los primeros quince años del presente siglo, en las Islas Shetland, se ha observado una ligera tendencia al aumento de la precipitación, al tiempo que se ha medido una significativa reducción de la temperatura durante los meses de verano (Fig. 5). La consecuencia ha sido el aumento de las áreas cubiertas de nieve y la mayor duración de estos neveros a lo largo de la estación favorable, lo que ha tenido efectos dramáticos para varias especies de líquenes (21) (Fig. 6).

Con comunidades tan dependientes de pequeños cambios en las condiciones climáticas, tiene mucho sentido establecer estaciones de monitorización a largo plazo que, como en Isla Livingston

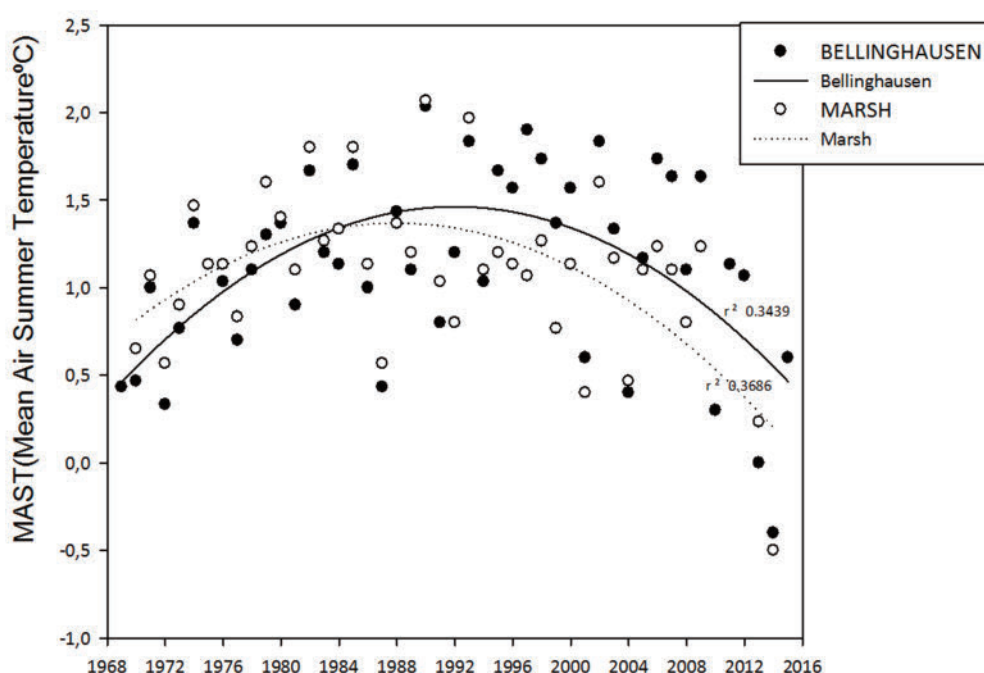


Figura 5: Evolución de la temperatura media del aire en verano (meses de diciembre a febrero) de dos estaciones científicas del área de la Península Antártica durante las últimas décadas.

o en Victoria Land, nos permitan observar cómo responden los distintos componentes de la comunidad a la sutil variación de los factores ambientales y así poder establecer previsiones más ajustadas sobre lo que podemos esperar en el futuro (4).

Pero hay otros factores también relacionados con las condiciones ambientales y que tienen una gran influencia en la productividad anual de la vegetación: singularmente, la disponibilidad de nitrógeno, que como hemos visto, resulta estrechamente dependiente de la temperatura (24). Los alrededores de las colonias de aves son lugares de especial abundancia de nutrientes y aquí encontramos también las especies de líquenes con las mayores tasas de fotosíntesis de la Antártida, como *Ramalina terebrata*, con grandes individuos colgantes como guirnalda en los roquedos costeros. No sabemos hasta qué punto un aumento de temperatura aceleraría las tasas de fijación de nitrógeno y su absorción por la comunidad vegetal, pero es seguro que la disponibilidad de nitrógeno y otros nutrientes aumentará con la temperatura y actuará como un estímulo adicional para el crecimiento y la productividad de los vegetales. Hay que tener en cuenta que en las regiones más templadas de la Antártida la temperatura media anual se encuentra sólo un par de grados por debajo del punto de congelación, por lo que un ligero calentamiento puede dar lugar a multitud de efectos concatenados de resultado final impredecible.

5. LA ANTÁRTIDA Y EL CALENTAMIENTO GLOBAL

Una de las grandes cuestiones de la investigación en biología antártica es hasta qué punto sus especies podrán adaptarse al proceso de calentamiento global. No es algo fácil de responder. Cada una de los centenares de especies vegetales y animales antárticas reaccionará de una forma diferenciada, lo que hace imposible las generalizaciones. Por otro lado, la Antártida está planteando un auténtico reto para los modelos climáticos que prevén diversos escenarios de calentamiento global para distintas latitudes. Normalmente se considera que el aumento de temperatura será mucho más débil en la zona ecuatorial y máximo en las regiones polares. Las tendencias detectadas hasta ahora en el Hemisferio Norte confirman este modelo, pero la Antártida parece haber quedado fuera de cualquier previsión. La Antártida continental muestra una significativa tendencia al calentamiento y a la pérdida de hielo en su región occidental, pero no así en la mucho mayor región oriental, donde, incluso, se ha detectado un aumento en el balance neto de hielo (Navarro et al). En la Antártida marítima, por otra parte, se han medido fuertes oscilaciones, con décadas de marcado calentamiento, seguidas por otras de enfriamiento (Fig. 5), que parecen responder a variaciones naturales en la circulación atmosférica (25).

El efecto más llamativo del calentamiento climático en la Antártida marítima es el acusado retroceso de los frentes glaciares. Pequeñas morrenas y considerables extensiones de suelo y roca han quedado al descubierto durante el pasado siglo, disponibles para la coloniza-

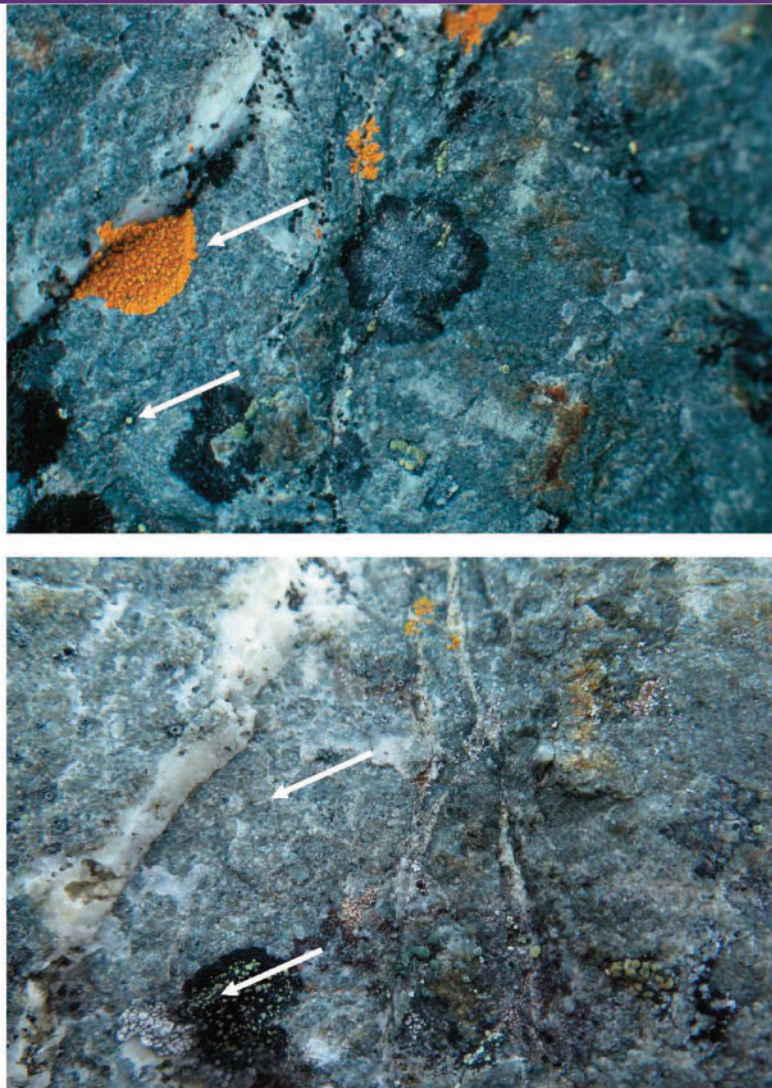


Figura 6: Imágenes de la colonización líquénica sobre un bloque rocoso en una morrena reciente de Isla Livingston en 1991 (imagen superior) y 2015 (imagen inferior). Debido a la acumulación de años fríos y prolongada cubierta nival en verano, algunos talos han desaparecido (flecha superior, talo anaranjado de *Caloplaca*), mientras otros han continuado su crecimiento (flecha inferior, talo de *Rhizocarpon*).

ción vegetal (2, 26). En estos auténticos laboratorios naturales es posible seguir con precisión todo el proceso de colonización e incluso medir la velocidad de crecimiento de las especies pioneras. Dado que la mayoría de estas especies consisten en líquenes cosmopolitas o bipolares los datos sobre su tasa anual de crecimiento en la Antártida pueden compararse con los procedentes de otras localidades del mundo. Los resultados obtenidos han sido, hasta cierto punto, una sorpresa. En esta región de la Antártida los líquenes pioneros muestran una de las más altas tasas de crecimiento de todo el mundo, con valores que oscilan entre 0.5 y 1 mm de incremento anual en diámetro (Fig. 6). Este activo crecimiento incluso se ha acelerado en algunas especies durante los años de mayor calentamiento (21, 27).

Por el contrario, la especie endémica *Himantormia lugubris*, una de las más abundantes en la tundra de la Antártida marítima, muestra unos óptimos de temperatura para la fotosíntesis entre

0 y 5 °C. Con los datos actuales podemos afirmar que si el incremento previsto de unos 3 °C en la temperatura media anual para finales de siglo se hace realidad, supondrá una pérdida neta de carbono para esta especie, debido al aumento relativo de la respiración con respecto a la fotosíntesis. Esto significa que si *Himantormia lugubris* no fuera capaz de aclimatare a las nuevas condiciones más cálidas, comenzaría a desaparecer en tan solo 40 o 50 años. La misma situación podría repetirse en otras especies endémicas tanto de líquenes como de musgos (22).

En cuanto a las dos únicas plantas vasculares que viven en esta zona (*Deschampsia antarctica* y *Colobanthus quitensis*), ya se ha detectado un importante incremento tanto en número de individuos, como en la extensión de sus poblaciones (28). Además, nuevas colonias están apareciendo en varias localidades de la Península Antártica y en las Islas Shetland del Sur. Esta situación claramente ex-



pansiva es hasta ahora la respuesta más evidente de los ecosistemas terrestres de la Antártida marítima al calentamiento global. Ahora la cuestión es cuándo comenzarán a instalarse otras especies, en su mayoría procedentes de Tierra de Fuego o la Patagonia, cuyas semillas son relativamente frecuentes en suelo y turberas antárticas, pero que hasta ahora han sido incapaces de germinar.

El panorama en la Antártida continental es completamente distinto. Aquí el breve periodo de actividad metabólica y la ausencia de la más leve tendencia al calentamiento parecen estar relacionados con las bajas tasas de crecimiento en todos los líquenes estudiados. En los Valles Secos, talos de *Buellia frigida* observados durante 23 años muestran un aumento anual de diámetro de tan solo 0.01 mm (29), es decir, dos órdenes de magnitud por debajo de lo observado en la Antártida marítima. Puesto que estos talos alcanzan con frecuencia un diámetro de 10 cm cabría deducir para ellos una edad de 10.000 años, si la tasa actual de crecimiento se hubiera mantenido durante toda su vida. Nos encontraríamos entonces ante uno de los organismos pluricelulares más longevos del mundo.

6. PASADO Y FUTURO DE LA ANTÁRTIDA

El calentamiento global no es el primer gran cambio al que se enfrenta la Antártida. En realidad, este continente ha experimentado ya uno de los acontecimientos climáticos más dramáticos en la historia de nuestro planeta, aunque de signo contrario. Hace 33 millones de años, cuando se formaban los primeros casquetes glaciares, la Antártida aún se encontraba en gran parte cubierta de bosques, parecidos a los que hoy existen en La Patagonia y Tierra del Fuego. El paulatino enfriamiento se mantuvo, los glaciares se fueron extendiendo y los bosques dejaron paso a una tundra de hierbas y arbustos cuyos últimos restos desaparecieron hace unos 5 millones de años (1). Finalmente, la enorme extensión de glaciares y mar helado de la Antártida empujó a todo el planeta hacia el periodo frío, con hielo también en el Hemisferio Norte, que denominamos Cuaternario. Un auténtico cataclismo para los ecosistemas terrestres antárticos, sin posibilidades de desplazamiento hacia latitudes más cálidas, atrapados entre el hielo y el mar.

Este proceso de extinción masiva y de extrema simplificación de los ecosistemas ha ido acompañado por no menos espectaculares respuestas adaptativas, que, como en el caso de los líquenes endolíticos, muestran hasta donde puede retroceder la vida, obligada por la persistencia de condiciones adversas.

La actividad humana podría invertir esta tendencia al enfriamiento en una escala aún por determinar, pero cuyas implicaciones alcanzarían a todo el planeta. Los modelos de previsión a largo plazo proponen escenarios muy distintos, pero hasta los más conservadores están de acuerdo en vaticinar un calentamiento de

3 °C para el conjunto de la Antártida durante los próximos 100 años, lo que llevaría a una situación similar a la que sucedió hace 10 millones de años, cuando una tundra dominada por plantas leñosas y herbáceas cubría las regiones libres de hielo. Por supuesto, un cambio de esta magnitud supondría también una considerable disminución en la extensión y volumen de los grandes glaciares antárticos, con el consiguiente aumento de la extensión de tierra disponible para la colonización vegetal.

Pero la Antártida y el océano circundante no son entes pasivos en los procesos de cambio global. Muy al contrario, los 14 millones de kilómetros cuadrados de hielo antártico influyen de manera determinante en el balance radiactivo del planeta y la actividad biológica del Océano Antártico es clave para comprender el flujo de CO₂ a escala mundial. Si el incremento previsto en la temperatura coincide con un aumento en la precipitación de nieve en el continente, la fusión de los frentes glaciares puede verse ampliamente compensada por la mayor formación de hielo en la zona de acumulación (30). La ausencia de un calentamiento acusado en el continente antártico, en oposición a lo que sucede en el Ártico, muestra la poderosa capacidad de regulación del clima antártico y puede suponer un factor de amortiguación en el clima global aún no suficientemente evaluado.

La lentitud en el crecimiento de los vegetales antárticos, su longevidad y la parsimonia de los cambios perceptibles en respuesta a la alteración de los factores ambientales, son una excelente base para monitorizar el efecto de las grandes tendencias climáticas en el continente helado.

7. FINANCIACIÓN

Trabajos financiados por los proyectos del Plan Nacional CGL 2006-12179-C02-01, POL2006-08405 CGL, CTM2009-12838-C04-01, CTM2012-38222-C02-0, CTM2015-64728-C2-1-R y PID2019-105469RB-C21 y de la Unión Europea ESA-AO-2000-EXO-BIOPAN-STONE-023 y PRI-PIMBDV-2011-0874. Deseo expresar también mi reconocimiento por el crucial apoyo financiero y logístico para las expediciones en la Antártida continental facilitado por Antarctica New Zealand (NZ), la National Science Foundation (USA) y el Korean Polar Research Institute (South Korea).

8. REFERENCIAS

1. Convey P. Antarctic ecosystems. In: Levin SA (ed) Encyclopedia of Biodiversity, 2nd edn. Waltham, MA: Academic Press, 2013, pp 179-188.
2. Chown SL et al. The changing form of Antarctic biodiversity. Nature 2015; 522, 431-438.



3. Gemma E Collins, Ian D Hogg, Peter Convey Leopoldo G Sancho, Don Cowan, W Berry Lyons, Byron J Adams, Diana H Wall, TG Allan Green. Genetic diversity of soil invertebrates corroborates timing estimates for past collapses of the West Antarctic Ice Sheet. *PNAS* 2020; 117: 22293–22302.
4. Schroeter B, Green TGA, Pannowitz S et al. Fourteen degrees of latitude and a continent apart: comparison of lichen activity over two years at continental and maritime Antarctic sites. *Antarctic Science* 2010; 22: 681–690.
5. Øvstedal, DO & Lewis Smith, RI. Lichens of Antarctica and South Georgia. A Guide to their identification and Ecology. (Cambridge University press, Cambridge, UK, 2001).
6. Olech M. Lichens of King George Island, Antarctica. Institute of Botany of the Jagiellonian University, Cracow 2004, 391 pp.
7. Peat HJ, Clarke A, Convey P. Diversity and biogeography of the Antarctic flora. *Journal of Biogeography* 2007; 34:132–146.
8. Leo Sancho, Asunción de los Ríos, Ana Pintado, Claudia Colesie, José Raggio, Carmen Ascaso, Allan Green. *Himantormia lugubris*, an Antarctic endemic on the edge of the lichen symbiosis. *Symbiosis* 2020 (in press).
9. Green TGA, Sancho LG, Türk R, Seppelt R, Hogg I. High diversity of lichens at 84° S, Queen Maud Mountains, suggests preglacial survival of species in the Ross Sea region, Antarctica. *Polar Biology* 2011; 34:1211–1220.
10. Colesie C, Green TGA, Türk R, Hogg ID Sancho LG, Büdel B. Terrestrial biodiversity trends along the Ross Sea coastline, Antarctica: lack of a latitudinal gradient, controls and potential limits to bioclimatic modeling. *Polar Biology* 2014; 37: 1197–1208.
11. Green TGA, Schroeter B, Sancho LG. Plant Life in Antarctica. In: Pugnaire FI, Valladares F (eds) *Functional Plant Ecology*, 2nd edn. CRC press, Boca Ratón, USA, 2007, pp 389–434.
12. Kappen L. Some aspects of the great success of lichens in Antarctica. *Antarctic Science* 2000; 12: 314–324.
13. Seppelt RD, Tuerk R, Green TGA, Moser G, Pannowitz S, Sancho LG, Schroeter B. Lichen and moss communities of Botany Bay, Granite Harbour, Ross Sea, Antarctica. *Antarctic Science* 2010; 22: 691–702.
14. Pannowitz S, Maysek K, Schlensog M, Seppelt R. Sancho, LG, Türk R, Schroeter B. The photosynthetic response of three common mosses from continental Antarctica. *Antarctic Science* 2005; 17: 341–352.
15. Green TGA, Kulle D, Pannowitz S, Sancho LG & Schroeter B. UV protection in mosses growing in continental Antarctic. *Polar Biology* 2005; 28: 822–827.
16. Cowan DA, Russell NJ, Mamais A, Sheppard DM. Antarctic Dry Valley mineral soils contain unexpectedly high levels of microbial biomass. *Extremophiles* 2002; 6: 431–36.
17. De los Ríos A, Wierzos J, Sancho LG, Green TGA, Ascaso C. Ecology of endolithic lichens colonizing granite in continental Antarctica. *Lichenologist* 2005; 37: 383–395.
18. Pointing SB et al. Highly specialized microbial diversity in hyper-arid polar desert. *PNAS* 2009; 106: 19964–19969.
19. De Vera et al. Limits of Life and the Habitability of Mars: The ESA Space Experiment BIOMEX on the ISS. *Astrobiology* 2019; 19: 145–157.
20. Green TGA., Sancho LG, Pintado A, Schroeter B. Functional and spatial pressures on terrestrial vegetation in Antarctica forced by global warming. *Polar Biology* 2011; 34:1643–1656.
21. Sancho LG, Pintado A, Navarro F et al. Recent warming and cooling in the Antarctic Peninsula Region has rapid and large effects on lichen vegetation. *Sci Rep* 2017; 7: 5689–5697.673.
22. Sancho LG, Pintado A, Green TGA Antarctic studies show lichens to be excellent biomonitors of climate change. *Diversity* 2019; 11,42.
23. Bromwich DH; Guo Z; Bai L; Chen Q. Modeled Antarctic Precipitation. Part I: Spatial and Temporal Variability. *J. Climate* 2004; 17: 427–447.
24. Benavent-González A, Delgado-Baquerizo M, Fernández-Brun L et al. Identity of plant, lichen and moss species connects with microbial abundance and soil functioning in maritime Antarctica. *Plant Soil* (2018) ; 429: 35–52.
25. Turner J et al. Absence of 21st century warming on Antarctic Peninsula consistent with natural variability. *Nature* 2016; 535, 411–415.
26. Cook A, Vaughan D, Luckman, A, Murray T. A new Antarctic Peninsula glacier basin inventory and observed area changes since the 1940s. *Antarctic Science* 2014; 26: 614–624.
27. Sancho LG, Green TGA, Pintado A. Slowest to fastest: Extreme range in lichen growth rate supports their use as an indicator of global change in Antarctica 2007; *Flora* 202: 667– 673.
28. Convey P, Smith RIL. Responses of terrestrial Antarctic ecosystems to climate change. *Plant Ecology* 2006; 18: 1–10.
29. Green T.G.A., Brabyn, L., Beard, C. and Sancho, L.G. (2011) Extremely low lichen growth rates in Taylor Valley, Dry Valleys, continental Antarctica. *Polar Biology* 35: 535–541.
30. Andrew Shepherd et al. (2019) Trends in Antarctic Ice Sheet Elevation and Mass. *Geophysical Research Letters* 46: 8174–8183.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a los miembros de esta Real Academia Nacional de Farmacia por el honor que me hacen con este nombramiento y por su calurosa acogida. Especialmente, quiero reconocer la iniciativa del insigne y admirado Prof. Bartolomé Ribas Ozonas, que desde hace tiempo llevaba animándome, con insistencia y cariño, a que presentara mi candidatura para ser miembro de esta honorable institución. Al mismo tiempo, quiero destacar y reconocer el brillante esfuerzo de la Prof. Mercedes

Salaices Sánchez en su presentación de mi trayectoria científica en el acto de toma de posesión.

Me gustaría expresar mi agradecimiento a una serie de personas que han sido fundamentales en el desarrollo de mi vida profesional a lo largo de estos años. En primer lugar, al Prof. Salvador Rivas-Martínez, Académico de número de esta institución y Catedrático de Botánica de la Universidad Complutense de Madrid, recientemente fallecido, por haberme abierto en su día, hace ya muchos años, las puertas del Departamento de Botánica en la Facultad de Biología de la UCM, donde pude iniciarme y formarme en la investigación y docencia en Botánica. A la Prof. Ana María Crespo de las Casas, supervisora de mi Tesis Doctoral y desde entonces una colega y amiga muy cercana. Mi agradecimiento también a los profesores Joseph Poelt † (Graz, Austria), Ludger Kappen (Kiel, Alemania) y Otto Lange † (Würzburg, Alemania) por todas sus enseñanzas y extraordinario apoyo en mis estancias de investigación fuera de España. Deseo dedicar un reconocimiento especial al Prof.

Allan Green (UK y Hamilton, New Zealand), extraordinario colega, compañero y maestro, que me condujo a las expediciones más ambiciosas en la Antártida continental y que ha compartido conmigo muchos años de trabajo en nuestro laboratorio de la Facultad de Farmacia de la UCM. También quiero expresar mi gratitud a todos los colegas del antiguo Departamento de Biología Vegetal II y ahora Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica, por su infinita comprensión y colaboración para facilitarme las largas ausencias obligadas por las expediciones a lugares tan remotos. Naturalmente, mi más sincero y cariñoso agradecimiento a todos los colegas y amigos que han participado o colaborado con nuestros proyectos de investigación (Fig. 7).

Dejo para el final lo que seguramente es más importante, mi agradecimiento, de corazón, a mi familia; a Teresa, Sofía y Laura y por supuesto, a mi madre, Rosa. Ellas han estado y siempre están ahí. Y también a los amigos y gente querida que me han apoyado en mi trayectoria personal y vital. Gracias.



Figura 7: Colegas que han colaborado en nuestros principales proyectos de investigación en la Antártida: 1. Allan Green (UK), 2. Roman Türk (Austria), 3. Thorsten Lumbsch (USA), 4. Jose Antonio Jiménez de las Heras (UCM), 5. José Raggio (UCM), 6. Felix Grewe (USA), 7. Ana Pintado (UCM), 8. Asunción de los Ríos (CSIC), 9. Roberto Lázaro (CSIC), 10. Isaac Garrido (CSIC), 11. Rolf Gademann (Alemania), 12. Javier Etayo (Aranzadi), 13. Nuria Beltrán (UCM), 14. Almudena Muñoz (UCM), 15. Claudia Colesie (UK), 16. Ulrike Ruprecht (Austria), 17. Ulrik Soechting (Dinamarca).

Si desea citar nuestro artículo:

Leopoldo García Sancho

La vegetación antártica, centinela del cambio climático

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 86. Nº 4 (2020) · pp. 269 - 279

DOI: <http://>

RELACIÓN ENTRE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

RELATIONSHIP BETWEEN THE ROYAL NATIONAL ACADEMY OF PHARMACY AND THE SPANISH SOCIETY OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

Carmen Aragón Rueda

Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (UAM-CSIC).

Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

*corresponding author: caragon@cbm.csic.es

MINI-REVISIÓN

RESUMEN

La relación entre la Real Academia Nacional de Farmacia y la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular ha sido, desde la fundación de la Sociedad, un claro exponente del compromiso mantenido entre un número elevado de personas al pertenecer simultáneamente a ambas, en algunos casos además desempeñando cargos de relevancia y responsabilidad. Como muestra se citan algunas de las personas más representativas.

La relación entre ambas instituciones se ha visto recientemente reforzada y consolidada con la firma el 17 de noviembre de 2020 de un Convenio de Colaboración entre ambas. Este hecho debe estimular a investigadoras e investigadores jóvenes y de gran valía —ya miembros de las dos instituciones— a intervenir en las actividades promovidas por ambas. Estrechar lazos en iniciativas e intereses comunes será sin duda enormemente beneficioso para las dos instituciones.

ABSTRACT

The relationship between the Royal National Academy of Pharmacy and the Spanish Society of Biochemistry and Molecular Biology has been, since the foundation of the Society, a clear exponent of the commitment that is maintained among a large number of people for simultaneously belonging to both, in some cases also occupying positions of relevance and responsibility. Some of the most representative people are cited.

This relationship has recently been strengthened and consolidated with the signing on November 17, 2020 of a Collaboration Agreement between both institutions. This fact should stimulate young and valuable researchers - and members of the two institutions - to participate in the activities promoted by both. Undoubtedly, closing ties in initiatives and common interests will be enormously beneficial for the two institutions

Palabras Clave:

RANF
SEBBM

Keywords:

RANF
SEBBM



1. INTRODUCCIÓN

La Real Academia Nacional de Farmacia (RANF) de España tiene su origen en 1737, año en el que una real cédula de Felipe V aprueba los estatutos del Real Colegio de Profesores Boticarios de Madrid. Entre sus funciones destaca el fomento de la investigación en las Ciencias Farmacéuticas y afines, así como el asesoramiento en estas materias a las instituciones públicas y privadas que lo requieran,

Dos siglos más tarde, en 1963, se funda la Sociedad Española de Bioquímica (acrónimo inicial SEB y más tarde SEBBM correspondiente a Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular).

El germen inicial de la SEBBM tuvo lugar en el Congreso de Santander de 1961. Dicho evento contó con la presencia del premio Nobel Severo Ochoa que junto al gran bioquímico Alberto Sols, el gran impulsor de la futura Sociedad, sentaron las bases para su fundación dos años más tarde. Es de destacar que en ambas reuniones estuvo presente la recientemente desaparecida (noviembre 2019) gran investigadora Margarita Salas, icono de la ciencia española, por aquel entonces doctorando de Alberto Sols.

La contribución de la gran figura de Ochoa junto a Sols y a través de las relaciones internacionales de ambos además de las institucionales del último, fueron clave para el nuevo proyecto propiciando el nacimiento de una sociedad científica vertebradora y difusora a través de sus congresos y reuniones. Sin embargo, al papel primordial e incuestionable que desempeñaron Ochoa y Sols, hay que añadir que contaron con el importante apoyo de relevantes pioneros como, Santiago Grisolia, Carlos Asensio, Julio Rodríguez Villanueva, Manuel Losada, Federico Mayor, Gertrudis de la Fuente entre otros, empeñados en promover en España una sociedad científica inspirada solamente por la excelencia.

Se puede decir que en la actualidad la SEBBM no solo mantiene fielmente los ideales y directrices que se fijaron e impulsaron su creación, sino que, a través de la actividad científica de sus más de 3700 socios, y como generadora de ideas y propuestas al sistema de I + D, mantiene un elevado papel vertebrador científico.

2. RELACIÓN RANF-SEBBM

La relación entre la RANF y la SEBBM ha sido, desde la fundación de la Sociedad, un claro exponente del compromiso mantenido entre un número elevado de personas al pertenecer simultáneamente a ambas. En algunos casos además desempeñando cargos de relevancia y responsabilidad.

Ante la dificultad de mencionar a todas y cada una de las personas citaremos algunas de las más representativas.

Prof. Ángel Santos Ruiz (1912-2005)

Uno de los bioquímicos españoles de gran prestigio que, junto a Severo Ochoa, Alberto Sols y otros llevaron a cabo la renovación de la Bioquímica en España impulsando enormemente su desarrollo.

Licenciado en Farmacia en la Universidad de Madrid y de Medicina en la Universidad de Salamanca, realizó la tesis doctoral bajo la dirección del Dr. Gregorio Marañón en el Instituto de Patología Médica del Hospital Provincial de Madrid.

Realizó una etapa postdoctoral primero en el Departamento de Bioquímica del prestigioso University College de Londres y posteriormente se trasladó a París para continuar su investigación. A su vuelta a España obtuvo en 1940 la primera Cátedra de Química Biológica (más tarde denominada Bioquímica) de la Universidad Española. En 1946 se trasladó con su entonces reducido grupo de investigadores a la Facultad de Farmacia de la Ciudad Universitaria en Madrid. El Prof. Santos llevó a cabo la creación del primer Instituto mixto Universidad-CSIC formado por profesores universitarios, investigadores del CSIC y personal técnico. Con el tiempo se denominó Instituto de Bioquímica. Posteriormente, en otras universidades este modelo ha servido para la creación de numerosos centros mixtos impulsados en muchas ocasiones por discípulos suyos. A título de ejemplo el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa en la Universidad Autónoma de Madrid, creado en 1975 bajo la iniciativa y tutela del premio Nobel Severo Ochoa y en el que uno de los primeros discípulos del Prof. Santos, el Prof. Mayor Zaragoza, junto a otros importantes investigadores del CSIC en el campo de la Bioquímica y la Biología Molecular han tenido un papel determinante.

El Prof. Santos contribuyó en gran medida a la proyección internacional de la Bioquímica española, fomentando y promoviendo entre sus discípulos y colaboradores la asistencia a congresos, reuniones internacionales, estancias de becarios en laboratorios europeos y norteamericanos de referencia. Perteneció a diversas sociedades científicas españolas y extranjeras importantes como la Sociedad Española de Bioquímica (SEB), de la que fue miembro fundacional, y a la Federación Europea de Sociedades de Bioquímica (FEBS), entre otras. Fruto de la actividad desempeñada por la Bioquímica en su país a lo largo de su vida profesional, en 1972 se le nombró Socio de Honor de la SEB debido a "su ejemplar y dilatada labor de la enseñanza de la Bioquímica en España".

Una muestra de la estrecha relación ya existente entre la SEB y la RANF a través de sus miembros, es el hecho que el Prof. Santos fue desde 1956 Académico de la RANF y además desempeñó el cargo de Presidente de dicha Corporación durante 15 años, periodo en el que desplegó una intensa actividad. Como reconocimiento a su labor, el 22 de noviembre de 2012, la RANF conmemoró



con el patrocinio de la Fundación Ramón Areces, el centenario de su nacimiento (Reinosa, Cantabria, el 18 de agosto de 1912). El acto contó con la intervención de numerosos bioquímicos formados bajo su dirección.

Prof. Julio Rodríguez Villanueva (1928 - 2017)

Se doctoró en Farmacia por la Universidad de Madrid y en Bioquímica por la de Cambridge (UK). Fue Profesor de Investigación del CSIC, Catedrático de Microbiología y Rector de la Universidad de Salamanca. En la década de los años sesenta formó y consolidó un grupo de investigación en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del CSIC, para ocupar después en 1966 una cátedra de Microbiología en la Universidad de Salamanca.

Fue un gran impulsor del desarrollo de la Microbiología en España. Su investigación y la de sus discípulos han dado lugar a aportaciones fundamentales en el conocimiento de las características funcionales esenciales de los microorganismos patógenos o de aquellos que puedan ser utilizados en biotecnología. Todo ello realizado y completado desde múltiples aproximaciones y abordajes experimentales. Sus estudios pioneros sobre la pared celular de microorganismos eucarióticos revelaron el importante papel que esta estructura tiene en el efecto patógeno de algunos de ellos y por consiguiente la potencial diana terapéutica que representa.

La escuela de Villanueva o la escuela salmantina de Microbiología, como también se la conoce, está formada en la actualidad por un elevado número de catedráticos y profesores de investigación de gran calidad que en diferentes universidades y centros de investigación de España contribuyen de forma notable al desarrollo de la Microbiología, Bioquímica y Biotecnología. Tuvo una participación muy activa, junto con el resto de implicados ya citados, en la creación de la Sociedad Española de Bioquímica, siendo su Presidente durante el periodo 1968-1972. También presidió la Federación Europea de Sociedades de Bioquímica (FEBS) a la que pertenece la SEBBM.

En 1986 ingresó en la RANF y tras su jubilación como catedrático fue nombrado director de la misma (1998-2000) a la que imprimió un vigor y empuje extraordinarios, lo que le valió un merecido reconocimiento nombrándole Presidente de Honor en 2009. También fue Académico de Número de las Reales Academias de Ciencias y de Doctores.

Desempeñó importantes cargos en el ámbito científico, académico y sanitario. Presidente de la Conferencia de Rectores de Universidades del Estado (CRUE), Miembro del Consejo Rector del Instituto Nacional de Sanidad Carlos III, Vicepresidente del Consejo Científico de la Fundación Ramón Areces, Presidente del Patronato de la Fundación Jiménez Díaz, Presidente de la Fundación "José Casares Gil" de Amigos de la RANF.

La intensa, variada y apasionante actividad desplegada por el Prof. Julio Rodríguez a lo largo de su vida le hizo merecedor de numerosos premios y distinciones. Entre los más destacados, el Premio de Investigación Rey Jaime I, la Gran Cruz de la Orden Civil de Alfonso X El Sabio y el Premio Nacional del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España.

El 12 de abril de 2018, la RANF y la Fundación José Casares Gil de amigos de la RANF celebraron la Sesión Necrológica en memoria del Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Villanueva (1928-2017), Presidente de Honor de la RANF, Académico de Número y Catedrático de Microbiología.

Prof. Manuel Losada Villasante (Carmona, Sevilla 1929)

Se licenció y doctoró en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid, con Premio Extraordinario de Licenciatura y de Doctorado. Amplió su formación realizando varias y sucesivas estancias postdoctorales, en el Instituto Botánico de la Universidad de Munster, Alemania (1954-1955), en los Laboratorios Carlsberg de Copenhague, Dinamarca (1955-1956) y en el Departamento de Fisiología Vegetal de la Universidad de California, Berkeley, USA (1958-1961).

Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla y Profesor de Investigación del CSIC. Fue Director del Instituto de Biología Celular del CSIC, desempeñando diversos cargos de responsabilidad y fundó el Instituto de Fotosíntesis de Sevilla.

Sus importantes contribuciones científicas se han centrado en los mecanismos bioquímicos de transducción de energía (bioenergética), principalmente el estudio de la fotosíntesis y el metabolismo intermediario y su regulación, en relación con la asimilación del nitrato. Sus resultados experimentales se han publicado en numerosas y prestigiosas revistas internacionales.

Pertenece a importantes sociedades científicas internacionales tales como, la Biochemical Society, la British Photobiology Society o la American Society of Plant Physiology.

Su brillante y fecunda carrera científica ha sido reconocida con la concesión de numerosos premios y distinciones entre los que destacan, Premio Nacional del Consejo General de Farmacéuticos (1975), Premio Nacional de Investigación en Biología (1977), Primer Premio de Investigación Jaime I (1989), Premio Príncipe de Asturias de Investigación Científica y Técnica (1995) otorgado por "sus investigaciones sobre la asimilación fotosintética del nitrógeno, clave fundamental para el desarrollo de la vida". Medalla del Consejo Nacional de Colegios Oficiales de Farmacéuticos (1999).

En 1966 fue elegido miembro de número de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. En 1997 se le nombró Socio de Honor de la SEBBM y desde 1999 es Académico de Honor de la RANF.



Prof. Federico Mayor Zaragoza (Barcelona, 1934)

Licenciado y Doctor en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid. El Prof. Santos Ruiz fue el director de su tesis doctoral. Durante los años 1966-67 realizó una estancia postdoctoral en la Universidad de Oxford (Reino Unido) en el laboratorio del Premio Nobel Hans Adolf Krebs, investigando sobre procesos metabólicos y su alteración en situaciones patológicas. En 1963, con 29 años, ganó la cátedra de Bioquímica Estática y Dinámica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, institución de la que poco tiempo después y a pesar de su juventud fue nombrado Rector. En 1972 se trasladó a la Universidad Autónoma de Madrid creando el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias. Son muy numerosos los discípulos que han llegado a Catedráticos en diferentes Universidades públicas españolas, y que a su vez han generado segundas y terceras generaciones de destacados científicos hoy en la Universidad o en el CSIC.

De su actividad investigadora hay que destacar por el gran impacto científico, social y sanitario la dedicada al conocimiento de las bases moleculares de las enfermedades metabólicas hereditarias. Esta idea del Prof. Mayor, pionera en España, comenzó a desarrollarse en Granada y continuó en la Universidad Autónoma de Madrid, siempre bajo la dirección de una de sus doctorandas, la Profesora Magdalena Ugarte.

La consolidación de estas investigaciones dio lugar al Plan Nacional de Prevención de la Subnormalidad Infantil, actualmente implantado en toda la sanidad pública y cuya finalidad es tratar de evitar, mediante diagnóstico precoz, enfermedades metabólicas hereditarias que cursan con grave deterioro mental.

Junto a Severo Ochoa y otros pioneros desempeñó un papel importante en el inicio de la Sociedad Española de Bioquímica en 1963 de la que fue Presidente durante el periodo 1972-1976.

En la actualidad es Presidente de Honor.

En la Universidad Autónoma de Madrid y bajo la iniciativa y tutela del premio Nobel Severo Ochoa, el Profesor Mayor Zaragoza fue cofundador (junto con Eladio Viñuela, David Vázquez, Antonio García Bellido y Margarita Salas) del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO) en 1975. Nació por la fusión de varios institutos del CSIC y del departamento universitario de Bioquímica de la UAM dirigido por el profesor Mayor Zaragoza. Fue su primer director (1975-1978).

Ha desempeñado importantes cargos nacionales e internacionales en el ámbito de la política científica desde los que ha impulsado y promocionado la investigación. Como Ministro de Educación y Ciencia (1981-82), como Presidente del grupo que promovió la creación del European Research Council (ERC, 2003-2005) que destina fondos importantes para el fomento de la investigación básica en Europa, o como Presidente del Consejo Científico de la Fundación Ramón Areces.

Toda esta ingente labor del Profesor Mayor Zaragoza le ha hecho merecedor de ser nombrado Doctor Honoris Causa por numerosas Universidades españolas y extranjeras.

El Prof. Mayor Zaragoza es miembro de varias Reales Academias. Ingresó en la de Farmacia en 1958 como Académico Correspondiente pasando a ser de Número en 1976, desde 2002 es Académico de Número de la de Medicina y es Académico Honorario de la de Bellas Artes de San Fernando desde 1992.

A nivel internacional su figura es principalmente conocida por haber sido elegido en 1987 Director General de la de la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) cargo que desempeñó durante 12 años al haber sido reelegido en 1993. Tras 12 años de estar al frente de la UNESCO regresó a España en 1999 y creó la Fundación para una Cultura de Paz, de la que es actualmente Presidente.

Además de un número elevado de publicaciones científicas, el Prof. Mayor es autor de una serie de libros y poemas que añaden una faceta humanista a las de científico y político.

Prof. María Cascales Angosto (Cartagena, Murcia 1934)

Licenciada en Farmacia por la Universidad de Madrid, realizó su tesis doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid siendo la primera doctoranda del Prof. Federico Mayor Zaragoza. Financiada con una beca de la Fundación Juan March, se trasladó al laboratorio del Prof. Santiago Grisolia en Kansas City (USA) como postdoctoral. Posteriormente y ya como colaboradora científica del CSIC (1971), realizó una estancia en el Courtland Institute of Biochemistry de Londres, con el objetivo de ampliar su formación científica y trabajar sobre temas próximos a su bagaje farmacéutico. En Londres se interesó y especializó en el metabolismo de hepatocitos aislados lo que le llevó a iniciar, a su vuelta a España, una exitosa línea de investigación sobre hepatotoxicidad.

Ha contribuido a la formación de numerosos científicos, siendo su primer doctorando D. José Miguel Ortiz Melón, Catedrático de Bioquímica en la Universidad de Santiago primero y posteriormente en la Universidad de Cantabria donde llegó a desempeñar el cargo de Rector de la Universidad. Al igual que su predecesora, el Prof. Ortiz Melón es miembro de la SEBBM, Académico de número de la RANF y ha sido Editor Científico de la revista Anales.

La Prof. Cascales a desempeñado numerosos cargos y recibido premios y distinciones de los que cabría resaltar algunos de ellos. En los años 1968-1972 fue vocal de la Junta de Gobierno de la SEB. Durante el periodo 1983-1989 fue Directora del Instituto de Bioquímica (CSIC-UCM) anteriormente citado. Ha sido la primera mujer que ingresó como académica de número en la RANF (1987) donde desempeñó con gran responsabilidad los cargos de Tesorera y Vicepresidenta. Premio RANF (1982). Ha representado a la RANF



en la Mesa del Instituto de España. Medalla de Oro al Mérito Doctoral de la Real Academia de Doctores de España (2001), Gran Cruz de la Orden de Alfonso X el Sabio (2005). Actualmente es socio de Honor de la SEBBM (2013) y Académica Supernumeraria de la RANF.

La variada e intensa actividad llevada a cabo por esta bioquímica de excelente formación, trabajadora incansable y de gran determinación es un claro ejemplo, como el de otros que aquí se citan, de la relación existente entre la SEBBM y la RANF.

Prof. Rosario Lagunas Gil (Navalcarnero, Madrid, 1935)

Licenciada en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid, tuvo como director de tesis al Prof. Albareda del Instituto de Edafología (CSIC) de Madrid. Siendo estudiante de doctorado hizo una corta estancia en l'École Polytechnique de Nancy (Francia) y al finalizar la tesis, se unió al grupo del Prof. Alberto Sols en el Instituto de Enzimología (CSIC). Realizó una estancia postdoctoral en el Courtland Institute of Biochemistry (Londres). Al regresar a Madrid formó su grupo de investigación independiente. Sus objetivos abarcan una amplia temática bioquímica y de biología celular (enzimología, metabolismo energético, control metabólico, fisiología microbiana). Es de destacar sus valiosas aportaciones a la bioquímica analítica con la puesta a punto de novedosas técnicas con aplicación al estudio de las vías metabólicas.

Su trayectoria científica como Profesora de Investigación del CSIC (1991) se caracteriza por el rigor y proyección. Algo que logra a pesar de, como ella mismo dice, "mis comienzos no fueron fáciles al equivocarme al elegir la disciplina lo que supuso un retraso de 5 años, teniendo que empezar de nuevo".

Otra característica a destacar es su generosidad y compromiso al desempeñar cargos de responsabilidad. Dirigió el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols con gran dedicación y éxito. Además, fue tesorera y secretaria de la SEBBM. Es académica correspondiente de la RANF.

Prof. Magdalena Ugarte Pérez (Ceuta, 1944)

Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe de la línea de investigación "Bases Moleculares de las Enfermedades Metabólicas Hereditarias" del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM).

Licenciada y Doctora en Farmacia por la Universidad de Granada. Su tesis doctoral fue dirigida por el Prof. Mayor Zaragoza quien tras finalizar el doctorado, le comunicó su idea pionera de investigar sobre las bases moleculares de alteraciones metabólicas hereditarias. Esto suponía todo un reto que ella aceptó sin dudar al carecer de experiencia previa, herramientas o infraestructura para llevarlo a cabo. A la vez comenzaron a implantar las primeras pruebas de detección de algunas de estas patologías, principalmente la fenilketonuria, un tipo de aminoaciduria con graves alteraciones ce-

rebrales. Este proyecto que comenzó en Granada continuó desarrollándose en la Universidad Autónoma de Madrid al trasladarse en 1973 el Prof. Mayor Zaragoza y parte de su equipo, la Doctora Ugarte entre ellos. Gracias a la tenacidad y gran dedicación de la Dra. Ugarte se funda el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares en esta universidad, dando un gran impulso a la detección neonatal al conseguir extenderla a toda la red nacional de Salud Pública. Con la colaboración de bioquímicos, ginecólogos, pediatras y genetistas, la Dra. Ugarte coordinó el grupo de trabajo que elaboró, a finales de los años 70, el primer Plan Nacional de Prevención de la Subnormalidad. Su nutrido grupo ha contribuido al diagnóstico de más de 5000 patologías metabólicas utilizando metodología bioquímica y genómica puntera. Su línea de investigación es un referente nacional e internacional en su campo.

Sus numerosas publicaciones científicas son de un gran carácter traslacional, al servir los resultados obtenidos en prevenir enfermedades y por consiguiente mejorando el bienestar de los pacientes.

Es Miembro del Consejo Nacional de Prevención de la Subnormalidad y Asesora permanente del Real Patronato de Educación y Atención a Personas con Minusvalías. Es Académica Correspondiente de la RANF (1992) y Socio de Honor de la SEBBM (2011).

Su relevante y pionera actividad científica y sanitaria ha sido reconocida a través de numerosos premios y distinciones a destacar, Premio Reina Sofía de Investigación en materia de Prevención de la Subnormalidad (1982). Condecorada con la Encomienda con placa de Alfonso X El Sabio (1982), Premio de la RANF (1998) con el trabajo "Fenilketonuria: 30 años de investigación y prevención", Premio honorífico de la Asociación Española de Laboratorios de Medicamentos Huérfanos y Ultra huérfanos (AELMHU, 2018) a la mejor trayectoria científica en enfermedades raras.

Prof. Joan Guinovart Cirera (Tarragona, 1947)

Licenciado en Ciencias Químicas y en Farmacia (1969) por la Universidad de Barcelona (1969), Doctor por la misma Universidad en 1973, realizó una estancia postdoctoral en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Virginia (1974-1975).

Desde 1978 a 1980 trabajó en el Hospital de Bellvitge (Barcelona) y de 1980 a 1985 fue jefe del servicio de análisis clínicos de la Seguridad Social. Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Barcelona (1986-1990) y de la Universidad de Barcelona (1990-), profesor visitante en el departamento de Bioquímica y Biofísica, Universidad de California San Francisco, UCSF (1992-93).

Su área de investigación se centra en el metabolismo del glucógeno con especial énfasis en el estudio de sus alteraciones en la diabetes e investigación de nuevos agentes antidiabéticos así como en enfermedades neurodegenerativas.

Ha ocupado numerosos cargos directivos de gran responsabilidad involucrándose de forma muy activa. Director del Depar-



tamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Barcelona (1995-2001). Director General del Parque Científico de Barcelona (2001- 2002) y desde el año 2005 dirige el Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona. Ha sido Coordinador del área de biología molecular y celular de la Agencia Nacional de Evaluación y Prospectiva, ANEP (1988-1991). Es Miembro de la Estrategia Nacional de Ciencia y Tecnología, ENCYT (2006 -). Presidente de la SEBBM (1996-2000). Presidente del comité organizador del Congreso Europeo de Bioquímica (FEBS 1996, Barcelona). Miembro del comité ejecutivo de la Federación Europea de Sociedades de Bioquímica, FEBS, (1997-2005). Presidente del comité nacional International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB (2005-). Presidente de la Confederación de Sociedades Científicas de España (COSCE), (2004-). Ha sido editor de la revista SEBBM (1996-) y de la revista IUBMB Life (2006-).

Una trayectoria profesional tan amplia, activa y comprometida le ha merecido algunos premios y distinciones, tales como, el premio NovoNordisk en investigación diabetológica básica de la Sociedad Española de Diabetes (1996), la Medalla de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (1998). Es Miembro de Número de la RANF (2006) y Socio de honor de la SEBBM (2005).

Prof. M^a Teresa Miras Portugal (Carballino, Orense 1948)

Inició sus estudios de la Licenciatura de Farmacia en Santiago de Compostela y finalizó en la Universidad Complutense de Madrid en 1970, con la obtención de Premio Extraordinario y Premio Nacional Fin de Carrera.

Realizó estudios de doctorado en el *Centre de Neurochimie* de la Universidad de Estrasburgo (Francia) obteniendo el Doctorado Sciences en 1974. A su vuelta a Madrid obtuvo el doctorado en Farmacia por la Universidad Complutense.

Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular, en las Universidades de Oviedo, Murcia y desde 1986 es Catedrático del departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Universidad Complutense de Madrid.

Su extenso trabajo investigador ha dado lugar a numerosas publicaciones en revistas internacionales y ha estado centrado principalmente en el área de las Neurociencias, destacando el papel de los nucleótidos de adenosina y sus receptores purinérgicos P2X/ P2Y en la neurotransmisión sináptica, así como la importancia de estos receptores en el desarrollo cerebral, neuroregeneración y neuroprotección.

Ha sido elegida para ocupar puestos de responsabilidad en numerosas sociedades científicas internacionales y nacionales. Miembro del Jurado para el Premio de Jóvenes Científicos de la Comunidad Europea, Jurado del Premio Rey Jaime I y del Príncipe de Asturias, en varias ediciones. Ha organizado numerosos eventos científicos tanto nacionales como internacionales destacando en el ámbito nacional el Congreso anual de la SEBBM en 1997 siendo la Presidenta del comité organizador. Es Socio de Honor SEBBM habiendo

desempeñado el cargo de Secretaria de dicha sociedad en el periodo 1997-2002. Doctor Honoris Causa por la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid.

Es Académica de Número de la Real Academia de Veterinaria y Académica de Número de la RANF. Ha sido editor científico de la revista Anales.

Desde enero de 2007 hasta enero de 2013 fue Presidenta de la RANF, siendo la primera mujer electa como Presidenta de una Real Academia del Instituto de España, cargo que desempeñó con la gran capacidad, empuje y entusiasmo inagotable que la caracterizan.

3. CONCLUSIÓN

La relación de personas que aquí se detalla pone de manifiesto la estrecha relación existente entre la RANF y la SEBBM desde la fundación de la sociedad en los años 60 del pasado siglo. Es de destacar que esta relación se ha visto fortalecida y materializada con la firma reciente (17 de noviembre de 2020) de un Convenio de Colaboración entre ambas instituciones. Este hecho debe estimular a investigadoras e investigadores jóvenes y de gran valía —ya miembros de las dos instituciones- a intervenir en las actividades promovidas por ambas. Estrechar lazos en iniciativas e intereses comunes será sin duda enormemente beneficioso para las dos instituciones.

PARA LEER MÁS

<https://www.sebbm.es/revista/articulo.php?id=203>

<https://www.sebbm.es/revista/articulo.php?id=570>

<https://www.sebbm.es/revista/articulo.php?id=464>

https://www.ranf.com/wp-content/uploads/noticias/2014/homenaje_ranf.pdf

Si desea citar nuestro artículo:

Carmen Aragón Rueda

Relación entre la Real Academia Nacional de Farmacia y la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 86. Nº 4 (2020) · pp. 281 - 286

DOI: <http://>

SESIÓN CIENTÍFICA CELEBRADA EL 26 DE NOVIEMBRE DE 2020 PARA CONMEMORAR LOS PREMIOS NOBEL EN FISIOLÓGIA O MEDICINA Y EN QUÍMICA 2020

SCIENTIFIC SESSION HELD ON NOVEMBER 26, 2020 TO COMMEMORATE THE NOBEL AWARDS IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE AND IN CHEMISTRY 2020

Juan-Ramón Lacadena¹, Pablo Gastaminza Landart², Lluís Montoliu³

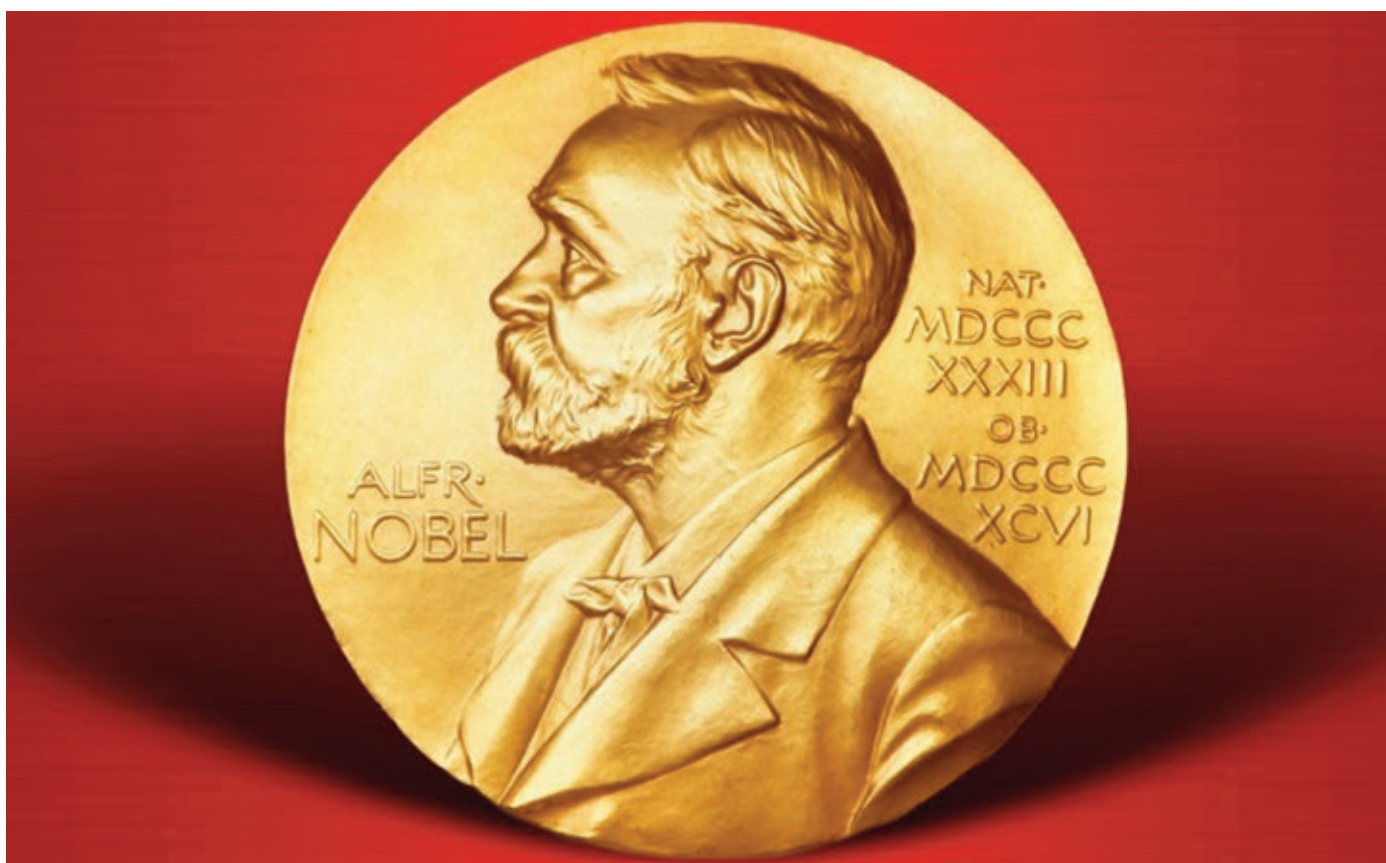
¹Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

²Centro Nacional de Biotecnología. Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

³Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) y Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER-ISCIII)

***corresponding author:** jrlgbucm@bio.ucm.es

REVISIÓN





EL PREMIO NOBEL EN FISIOLOGÍA O MEDICINA 2020

Juan-Ramón Lacadena

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

EL PLANETA DE LOS VIRUS: EL VIRUS VHC RESPONSABLE DE LA HEPATITIS C

Parafraseando el título de una famosa película protagonizada por Charlton Heston ("El planeta de los simios"), hago más las palabras del periodista Juan Ochoa de Eribe que decía, a raíz de la pandemia del coronavirus, que habitamos en el "planeta de los virus" (*El Mundo*, 8 abril 2020, p.18). Se calcula que existen más de 100 millones de tipos diferentes de virus, infectando a 1.750.000 especies distintas, jugando un papel importante en nuestro ecosistema. La inmensa mayoría son inocuos para la humanidad. Hasta 2012 solamente se habían identificado 219 tipos (¿especies?) de virus capaces de infectar al ser humano, descubriéndose 3 ó 4 nuevos tipos cada año. Al menos dos tercios serían capaces de infectar también otros huéspedes no humanos, principalmente mamíferos y en ocasiones aves. Unos 110 tipos de virus son capaces de transmitirse entre personas y solamente 55 tienen capacidad epidémica. Se estima que en los océanos existen 1031 partículas virales (1)

Se ha planteado muchas veces la cuestión de si los virus son organismos vivos o no; para mí sí lo son aunque sean poco más que ácido nucleico (ADN o ARN) y proteínas. No tienen todos los ingredientes que utilizan las células para vivir, pero los utilizan en su propio beneficio (multiplicarse). El virión es la partícula viral inerte cuando está fuera de la célula. Los virus no pueden vivir fuera de una célula.

Aunque parezca algo apocalíptico, las citas que hago a continuación sobre el *ADN egoísta* tienen que hacernos reflexionar. ¿Qué sentido biológico tiene una pandemia como, por ejemplo, la del SARS CoV-2 que estamos padeciendo en la actualidad? ¿Y desde el punto de vista evolutivo?

- "Los virus son malas noticias envueltas en proteínas", decía Peter Medawar, Premio Nobel en Fisiología o Medicina 1960. Las malas noticias pueden venir escritas en dos alfabetos distintos, según que su genoma sea de ADN o de ARN. Son como "caramelos envenenados", me atrevería a decir yo.
- "El ADN ni se preocupa ni conoce. El ADN nada más es. Y nosotros danzamos al son de su música, decía Richard Dawkins ("*El gen egoísta*").
- "El ADN proporciona la música; nuestras células y el ambiente proporcionan la orquesta" (J. Craig Venter).

Según la Organización Mundial de la Salud (consulta web 5/10/2020),

- el virus de la hepatitis C (VHC) se transmite a través de la sangre: la mayoría de las infecciones se producen por exposición a pequeñas cantidades de sangre. Ello puede ocurrir por consumo de drogas inyectables, prácticas de inyección o de atención sanitaria poco seguras, transfusión de sangre y productos sanguíneos sin analizar, y prácticas sexuales que conlleven contacto con sangre,
- 71 millones de personas con infección crónica de VHC, muchas de las cuales sufrirán cirrosis o cáncer de hígado (hepatocarcinoma),
- en 2016 murieron 399.000 personas,
- los antiviricos pueden curar más del 95% de los casos, pero el acceso al diagnóstico y tratamiento es limitado (desequilibrio mundial),
- no hay todavía vacunas contra la hepatitis C.

Clasificación de los virus

Hay varias formas de clasificar los virus. Desde el punto de vista sistemático, el virus de la hepatitis C pertenece al género *Hepavivirus*, familia *Flaviviridae*, filo *Kitrinoviricota*, pero desde una perspectiva genética me parece más adecuado hacer una clasificación en función de su organización genética: material hereditario o genoma (ADN o ARN), tipo de molécula (circular o lineal), tipo de hélice (sencilla o doble) y, finalmente, tipo de huésped al que parasita (bacteria, animal o vegetal), tal como propuso David Baltimore, Premio Nobel en Fisiología o Medicina 1975 "por sus descubrimientos en relación con la interacción entre los virus tumorales y el material genético de la célula". Al final, lo que interesa es cómo se llega al ARN mensajero (ARNm) en la célula para producir la síntesis de las proteínas virales que permitan la reproducción del virus.

El virus de la hepatitis C (VHC), que tiene una cápside icosaédrica, es un virus de ARN monocatenario (mc) de 9,6 Kb perteneciente al grupo IV, según la clasificación de Baltimore: ARNm(+) → ARNm(-) → ARNmensajero → proteínas reguladoras y estructurales → progenie del virus. Por la situación pandémica actual, podemos recordar que también pertenecen al grupo IV los coronavirus. El 5 de octubre de 2020, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska de Estocolmo comunicaba que el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2020 había sido concedido a los doctores Harvey J. Alter, Michael Houghton y Charles M. Rice "por el descubrimiento del virus de la hepatitis C".

Como señala la propia Institución Nobel,

- En la década de los setenta del siglo pasado (1972, 1975, 1978), el Dr. Alter demostró que la hepatitis asociada con las transfusiones de sangre era producida por un virus desconocido "noA, noB" (2, 3, 4, 5)
- Al final de la década de los ochenta, en 1989, el Dr.

Houghton (6, 7) aisló el genoma del virus que denominó "hepatitis C virus" (VHC).

- Finalmente, en 1997, el Dr. Rice proporcionó la evidencia final de que el virus por sí solo podía causar la hepatitis. Para ello generó un ARN variante del VHC que, al inyectarla en el hígado de chimpancés, originaba la presencia de partículas virales en la sangre y producía patologías semejantes a las humanas. Era la prueba definitiva de que el virus justificaba los casos no explicados de hepatitis producidas por la transfusión de sangre (8).

Aquí podemos señalar también que, en 1976, el Dr. Baruch Blumberg había recibido el Premio Nobel en Fisiología o Medicina por su descubrimiento del virus de la hepatitis B, transmisible por la sangre.

REFERENCIAS

1. Venter JC. Proyecto Genoma Océano, "A life decoded. My genome: my life"; 2007 pág. 344).
2. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, Lander JJ, Feinstone SM, Morrow AG, Schmidt PJ. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 1972; 77:691-9.
3. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975; 292: 767-770.
4. Alter HJ, Holland PV, Morrow AG, Purcell RH, Feinstone SM, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975; 2: 838-841.
5. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Popper H. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1989; 1: 459-463.
6. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
7. Kuo G, Choo Q.L, Alter HJ, ... Houghton, M. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-4.
8. Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 1997; 277:570-4.

DE LA HEPATITIS NO-A, NO-B HACIA LA ELIMINACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C

FROM THE DISCOVERY OF NON-A, NON-B HEPATITIS VIRUS TOWARDS HEPATITIS C VIRUS ELIMINATION

Pablo Gastaminza Landart

Centro Nacional de Biotecnología. Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

RESUMEN

El 5 de octubre de 2020, la Asamblea Nobel y el Comité Nobel de Fisiología o Medicina, anunciaron que tres científicos, los Dres. Harvey Alter, Michael Houghton y Charles Rice serían los galardonados con el premio Nobel de Medicina 2020 "por el descubrimiento del virus de la hepatitis C". El virus de la hepatitis C (HCV) es uno de varios virus capaces de causar inflamación crónica del hígado y patologías potencialmente mortales como la cirrosis y carcinoma hepatocelular. Las observaciones del Dr. Harvey Alter en el Centro Clínico de los NIH provocaron el postulado de un virus que era diferente de los virus de la hepatitis A y la hepatitis B conocidos en ese momento. Después de muchos años de frustración tratando de identificar el agente infeccioso responsable del virus asociado a la transfusión no A, no B, utilizando técnicas virológicas convencionales, el Dr. Michael Houghton logró, no solo identificar inequívocamente HCV, sino también generar reactivos esenciales para prevenir la propagación del virus a través de transfusión de lotes de sangre contaminados. Estas herramientas y las herramientas moleculares posteriores que se desarrollaron tras este descubrimiento sugieren que más de 70 millones de personas están actualmente infectadas con HCV en todo el mundo. Tras muchos años de intentos frustrados de aislar y propagar el virus en modelos de cultivo celular para estudiar la virología básica del HCV, el Dr. Charles Rice fue pionero en muchos estudios con el objetivo de caracterizar funciones básicas de las proteínas virales para las que desarrolló, entre otros, sistemas de genética inversa y ensayos funcionales en forma de replicones, una herramienta biológica que fue fundamental para desarrollar las terapias antivirales actuales. Sin embargo, sus experimentos pioneros de genética inversa en el modelo del chimpancé, mediante los cuales rescató viriones infecciosos a partir de material genético viral clonado, aseguraron su presencia entre los premiados. En esta breve revisión, analizamos el contexto en el que se realizaron estas contribuciones fundamentales y cómo se ha impulsado la investigación en el campo hasta el punto en que la OMS sugiere la erradicación del virus utilizando las terapias disponibles actualmente.

ABSTRACT

In October 5 2020, the Nobel Assembly and the Nobel Committee for Physiology or Medicine, announced that three scientists Drs. Harvey Alter, Michael Houghton and Charles Rice were the awarded with the Nobel prize in Medicine 2020 "for the discovery of the hepatitis C virus". Hepatitis C virus (HCV) in one of several viruses capable of causing chronic liver inflammation and life-threatening pathologies like cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Dr. Harvey Alter observations at the NIH Clinical Center prompted the postulate of a virus that was different from the hepatitis A and hepatitis B viruses known at that time. After many years of frustration trying to identify the infectious agent responsible for the non-A, non-B, transfusion-associated virus using conventional virological techniques, Dr. Michael Houghton succeeded not only at unequivocally identifying HCV, but also at generating essential reagents to prevent the spread of the virus through contaminated blood banks. These tools and subsequent molecular tools develop after this discovery suggest that more than 70 million people are currently infected with HCV worldwide. These studies were followed again by many years of frustrated attempts at isolating and propagating the virus in cell culture models to study basic virology on HCV. Dr. Charles Rice pioneered many studies aiming at characterizing basic functions of the viral proteins for which he developed among others, reverse genetics systems and functional assays in the form of replicons, a biological tool that was instrumental to develop the current antiviral therapies. However, its pioneer reverse genetics experiments in the chimpanzee model, by which he rescued infectious virions from cloned viral genetic material, granted his presence among the awardees. In this brief review, we discuss the context in which these seminal contributions were made and how HCV research has been propelled to the point where WHO is suggesting virus eradication using the currently available therapies.

Palabras Clave:

hepatitis C
transfusión
hepatitis viral
genética inversa
replicones
antivirales de acción directa

Keywords:

hepatitis C
transfusion
viral hepatitis,
reverse genetics
replicons
direct-acting antivirals

1. INTRODUCCIÓN

El pasado 5 de octubre de 2020, la Comisión de los Premios Nobel del Instituto Karolinska anunció la concesión del Premio Nobel de Medicina y Fisiología a tres investigadores: el Dr. Harvey Alter, el Dr. Michael Houghton y el Dr. Charles Rice, por las investigaciones que llevaron al descubrimiento del virus de la hepatitis C, el agente etiológico causante de más de 70 millones de infecciones crónicas y de más del 25% de los casos de cirrosis y cáncer de hígado en el mundo. En este artículo se presenta el contexto en el que se llevaron a cabo dichas investigaciones y se explicita cómo sus contribuciones no se circunscriben al mero descubrimiento de este virus, sino también al desarrollo de métodos diagnósticos y terapéuticos que hacen de la eliminación de la pandemia por el virus de la hepatitis C un objetivo viable para las próximas décadas según los planes de la Organización Mundial de la Salud.

2. LAS HEPATITIS VÍRICAS CONSTITUYEN UN IMPORTANTE PROBLEMA BIOMÉDICO A NIVEL MUNDIAL

^oLas hepatitis víricas están causadas por un grupo diverso de virus con genomas y estrategias de replicación muy diferentes que convergen en su capacidad para generar daño e inflamación del hígado por su tropismo hepático. Las hepatitis víricas causan más de 1,25 millones de muertes al año, una cifra comparable a las muertes causadas por tuberculosis y superiores a las causadas por el VIH (WHO, 2017). Sin embargo, mientras que la mortalidad causada por la tuberculosis y el VIH sigue disminuyendo el número de muertes por hepatitis víricas sigue aumentando y se prevé que siga aumentando en los próximos años (1). Este aumento se debe

principalmente a la alta incidencia de patologías derivadas de infecciones crónicas en pacientes portadores del virus de la hepatitis B (*Hepadnaviridae*) y de la hepatitis C (*Flaviviridae*). Dichas complicaciones derivan de una inflamación crónica del hígado (hepatitis) y fibrosis que puede llevar a alteraciones irreversibles de la función hepática como la cirrosis. La cirrosis a su vez está asociada con el desarrollo de carcinoma hepatocelular, una enfermedad con limitadas opciones terapéuticas que, junto con la cirrosis causó la muerte de más 1 millón de personas sólo en 2016 (1). Las hepatitis víricas crónicas constituyen el agente etiológico de alrededor del 50% de los casos totales de cirrosis y cáncer de hígado, por delante del consumo crónico de alcohol (1). Las patologías asociadas con las infecciones por virus de la hepatitis B o C derivan principalmente de una respuesta inmunológica activa, capaz de eliminar hepatocitos infectados, pero incapaz de erradicar la infección crónica del individuo, si bien los determinantes por los que la respuesta inmunológica del hospedador es ineficaz en el caso de la hepatitis B o en el caso de la hepatitis C son diferentes (2), (3).

Además de las infecciones crónicas, existen infecciones víricas que cursan en forma de hepatitis aguda. El virus de la hepatitis B, que causa graves patologías cuando establece infecciones crónicas, es además la primera causa de muerte por hepatitis vírica aguda, siendo responsable del 75% de las muertes por esta causa. El resto de muertes son asignables en su mayoría a la infección aguda por el virus de la hepatitis E (*Hepeviridae*) que constituye el 19% de las infecciones de hepatitis aguda y el virus de la hepatitis A (*Picornaviridae*) que constituye el 4%. El virus de la hepatitis C sólo causa la muerte por infección aguda excepcionalmente y supone el 2% de los casos restantes (1).

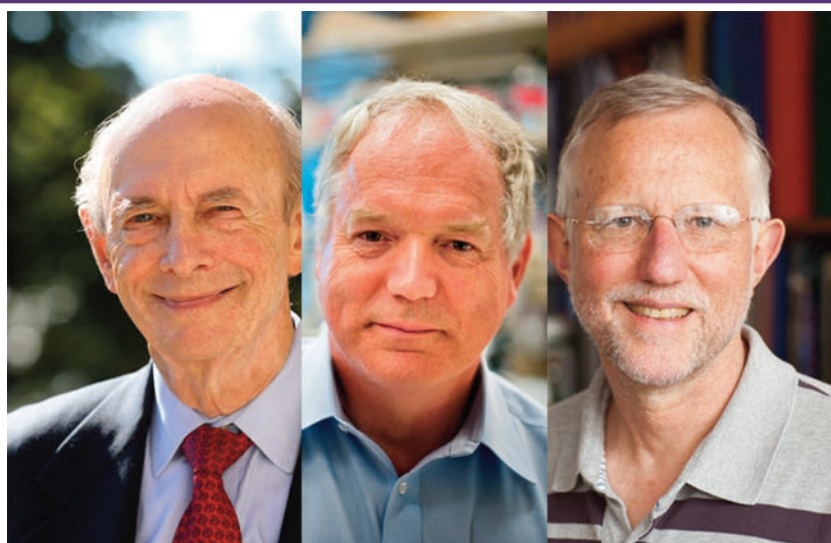


Figura 1: Fotografía de los tres investigadores premiados con el Nobel de Medicina y Fisiología 2020. De izqda. a dcha: Harvey Alter (NIH; EEUU); Michael Houghton (U. Alberta; CAN); Charles Rice (U. Rockefeller; EEUU). Fuente: Karolinska Institutet webpage.

3. BREVE PERSPECTIVA HISTÓRICA SOBRE LAS HEPATITIS INFECCIOSAS

Uno de los signos clínicos más evidentes de la hepatitis es la ictericia, que se manifiesta como consecuencia de la acumulación de bilirrubina en piel y mucosas y es especialmente evidente en la coloración amarillenta del blanco del ojo o esclerótica. El nombre ictericia se recoge en escritos de Plinio el viejo (29-71 A.C.), donde describe que la ictericia podría curarse observando un pájaro de color amarillo (Icteros). Si bien el nombre del signo clínico deriva de Icteros, existen referencias a la ictericia ya en escritos babilonios y chinos allá por el 3400 A.C. Por lo tanto, la ictericia y, probablemente las hepatitis víricas han acompañado al ser humano desde hace mucho tiempo. La primera referencia documentada del potencial infeccioso de la ictericia se infiere de las recomendaciones que el papa Zacarías hizo por carta a San Bonifacio en el año 751. Entre dichas recomendaciones se indicaba no suministrar la Comunión a personas con ictericia u otras dolencias y dejarlos para el final, una vez otras personas hubieran comulgado [revisado en (4)].

A lo largo de los años, el término ictericia epidémica o ictericia de campaña, dada la gran incidencia de este mal entre tropas enviadas a diversas campañas, fue sustituido por el término hepatitis infecciosa, gracias a los estudios realizados en el siglo XVIII, donde se observó que la ictericia coincidía con la "atrofia hepática". A lo largo de los siglos, el término hepatitis infecciosa se fue asentando para describir este mal asociado a brotes esporádicos atribuible en algunos casos a situaciones de insalubridad, sobre todo a fuentes de agua contaminada [revisado en (4)].

A medida que la ciencia médica fue avanzando y que fueron existiendo tratamientos o intervenciones médicas que implicaban la inyección de sustancias o fluidos en personas, comenzaron a aparecer referencias a otro tipo de hepatitis, no atribuibles a las causas anteriormente mencionadas, ni con una epidemiología en forma de brotes esporádicos. Así, el Dr. Lurmen (Brehme, 1885) acuñó el término "hepatitis del suero" tras observar una enorme incidencia de casos de hepatitis en una cohorte de personas inoculadas con linfa de un paciente infectado por Vaccinia, como método de vacunación frente a la viruela, señalando que se sospechaba de dicho paciente como fuente infecciosa de la hepatitis transmitida [revisado en (4)]. Unos años más tarde, el Dr. Stokes (USA, 1920) informaba de una incidencia mayor de lo normal de hepatitis del suero en la Clínica Mayo en una unidad donde se trataba a pacientes aquejados de sífilis con inyecciones de arsénamina (5). Por lo tanto, la idea de que además de una hepatitis infecciosa, existía un segundo tipo de hepatitis, la hepatitis del suero, se fue consolidando.

Durante la segunda guerra mundial, tanto los desplazamientos de tropas a diversas zonas del planeta endémicas para la hepatitis infecciosa, así como la creciente utilización de vacunas, tratamientos inyectables y transfusiones, los casos de hepatitis causaron serios estragos entre las tropas de ambos bandos, promoviendo una intensa investigación experimental en seres humanos en la década de los años cuarenta. Estas investigaciones realizadas en seres humanos, de dudosa calidad ética según los criterios actuales, no hicieron sino confirmar la existencia de agentes infecciosos que provocan hepatitis aguda y autolimitada, pero también agentes infecciosos que provocan un tipo de hepatitis con curso más prolongado y que parecía no ser eliminado con facilidad. [revisado en (4)].

Harvey Alter, un estudioso de la transmisión de la hepatitis por transfusión sanguínea

Una forma común de adquisición de la hepatitis del suero era la transfusión de sangre. En este sentido, el Dr. Harvey Alter, del Clinical Research Center del NIH, estaba implicado en la investigación del origen y agente etiológico responsable del elevado número de casos de hepatitis transmitidas por transfusión. En la década de los 60 ya se acuñaba el término hepatitis A para la hepatitis infecciosa y hepatitis B para la hepatitis del suero. Con el descubrimiento accidental de un antígeno presente en el suero de un individuo aborigen de Australia que reaccionaba con pacientes hemofílicos transfundidos en diversos lugares del mundo por parte del Dr. Alter y el Dr. Blumberg, el denominado antígeno Australiano (6), se sentaron las bases para la identificación de un agente infeccioso transmisible por la sangre, capaz de transmitir la hepatitis del suero. Este hallazgo, por parte del Dr. Blumberg y sus numerosos colaboradores, resultó en el descubrimiento del agente etiológico de la hepatitis B y de un test antigénico capaz de identificar dicho agente en los donantes de sangre (6). Este descubrimiento, por el que el Dr. Blumberg recibió el premio Nobel 1976, permitió estudiar a fondo la hepatitis del suero, transmitida por el virus de la hepatitis B. En este sentido, el Dr. Harvey Alter implementó diversas medidas preventivas para evitar la transmisión de la hepatitis en su centro de transfusiones. Además de emplear test sustitutivos, como la medida de las transaminasas en el plasma de los donantes, implementó los test antigénicos, basados en los hallazgos conjuntos con el Dr. Blumberg para cribar pacientes potencialmente infectados. Esta metodología permitió reducir la tasa de transmisión de hepatitis, pero no eliminarla completamente, siendo la tasa de transmisión aún demasiado elevada para el Dr. Alter (7).



Unos años después, en 1973, el equipo del Dr. Purcell del NIH, pudo identificar la existencia del virus de la hepatitis A, mediante la técnica de inmunomicroscopía electrónica (8), una técnica que también sería empleada para el diagnóstico de pacientes infectados y que el Dr. Alter empleó para el cribado de sus bancos de sangre. La disponibilidad de test serológicos para la detección de la hepatitis infecciosa (virus de la hepatitis A) y de la hepatitis del suero (virus de la hepatitis B) parecía poner fin a las preocupaciones del Dr. Alter, que por fin podría cribar los lotes de sangre para prevenir la transmisión de la hepatitis. No obstante, en 1975, el Dr. Alter publicó la transmisión de, todavía, numerosos casos de hepatitis de sangre de donantes negativos frente a antígenos de HAV o HBV (9). En este trabajo, por lo tanto, se infiere la existencia de un agente infeccioso no-A, no-B capaz de transmitir la hepatitis por transfusión, una noción que quedó demostrada en un estudio posterior mediante inoculación experimental de chimpancés con suero de pacientes con hepatitis no-A, no-B, que desarrollaron la enfermedad y establecieron el primer modelo experimental para este nuevo agente infeccioso. Las observaciones clínicas del Dr. Alter y otros, llevaron a identificar al virus no-A, no-B como un agente infeccioso responsable del desarrollo de hepatitis crónica y de su evolución hacia cirrosis (10).

Tras este éxito, siguieron años de frustración por la incapacidad de aislar el agente infeccioso mediante su propagación en cultivos celulares, algo que sin duda, retrasó la caracterización de lo que luego vendría a denominarse como el virus de la hepatitis C (11). En estos años, el único modelo de infección experimental continuó siendo el del chimpancé, lo que llevó a tener que emplear dichos animales para establecer parámetros tan básicos como el diámetro aproximado (60 nm) (12) o la presencia de una envuelta lipídica de la partícula infecciosa (13).

Michael Houghton: Técnicas moleculares para identificar el agente causante de la hepatitis no-A, no-B

La imposibilidad de aislar el virus causante de la hepatitis no-A, no-B llevó a los investigadores a tomar estrategias alternativas a las de la virología clásica para identificar inequívocamente el agente infeccioso. Una de estas estrategias fue la tomada por el equipo del Dr. Michael Houghton en la empresa Chiron (California, EEUU). El Dr. Houghton era experto en clonaje molecular y expresión de genes en sistemas recombinantes, como así atestigua su trabajo sobre el gen del interferón beta humano, que clonó y expresó de manera recombinante en bacterias (14). El Dr. Houghton estaba implicado en el clonaje y caracterización de los ácidos nucleicos del virus de la hepatitis no-A, no-B. Para ello tomaron diversos abor-

dajes experimentales, como la hibridación con sondas de virus de géneros a los que se sospechaba que pertenecía no-A, no-B como *Flaviviridae* o *Togaviridae*, sin éxito. Su experiencia en la expresión de proteínas recombinantes en bacteria y los trabajos de Shimizu y cols. en los que pudieron demostrar inmunoreactividad en especímenes histológicos de chimpancés infectados con no-A no-B (15), inspiraron la estrategia del equipo del Dr. Houghton para identificar el agente causante de la hepatitis. Esta metodología consistió en la generación de librería de ácidos nucleicos, tanto RNA como DNA, presentes en material ultracentrifugado a partir de plasma de chimpancés infectados con el virus no-A no-B. Estas colecciones de secuencias se clonaron en un fago recombinante ϕ gt11, vector capaz de inducir la expresión de los cDNA presentes en la colección en bacterias. La expresión de antígenos no-A, no-B sería posteriormente detectada mediante anticuerpos de pacientes convalecientes. Este proceso de cribado de miles de secuencias presentes en material infeccioso obtenido de chimpancés produjo numerosos resultados negativos, pero llevó a la identificación de un único clon molecular capaz de expresar antígenos susceptibles de ser reconocidos por los sueros (16). En este sentido, la utilización de un suero de un paciente con una hepatitis particularmente severa pareció ser la clave para la identificación del clon 5-1-1, que codifica el antígeno C100-3 (16).

La secuenciación de dicho clon, así como la de otros clones portadores de la secuencia, permitieron ensamblar un genoma viral de cadena sencilla y polaridad positiva de unas 9,600 nucleótidos de longitud, con un único marco de lectura abierta flanqueado por dos regiones aparentemente no traducidas (16). Este genoma relacionaba filogenéticamente a este agente con la familia *Flaviviridae*, que pasó a fundar un nuevo género de los Hepacivirus, bajo el nombre de virus de la hepatitis C (16).

El descubrimiento de una secuencia codificante de antígenos del agente responsable de la mayor parte de las hepatitis crónicas se presentó como una oportunidad para el Dr. Houghton para poder expresar dichos antígenos de forma recombinante con el objetivo de implementar el diagnóstico serológico de pacientes infectados por el virus de la hepatitis C (17). Esta metodología, publicada por el propio Houghton en colaboración con Dr. Alter, fue empleada para demostrar de manera retrospectiva y prospectiva que muchos pacientes de la hepatitis no-A, no-B eran portadores de anticuerpos que reconocían antígenos del recién descubierto virus de la hepatitis C (17,18). En años posteriores, la implementación de tests basados en antígenos inmunodominantes permitieron una notable reducción de los casos de hepatitis adquirida mediante transfusión (19,20), algo que se reflejó claramente en el número de casos de hepatitis aguda en EEUU. Estos logros en los que los Drs. Alter y Houghton estuvieron implicados, más allá de confirmar la existencia de un nuevo virus capaz de transmitir hepatitis crónica, permitieron un control parcial de su propagación mediante la implementación de tests serológicos de diagnóstico y cribado de los bancos de sangre (19,20).

Charles Rice: virología molecular para la generación de herramientas de estudio del virus

La identificación de este nuevo virus de gran relevancia biomédica atrajo sin duda la atención de numerosos investigadores que deseaban profundizar en las funciones de los diferentes elementos de RNA viral y de sus proteínas. Sin embargo, virólogos de todo el mundo se toparon con el hecho de que este virus no era susceptible de propagación en cultivos, dificultando así el estudio de sus funciones. No obstante, estudios basados en la sobreexpresión de proteínas virales permitieron comenzar a entender algunos de los aspectos fundamentales de la infección por HCV. Entre otros, el Dr. Charles Rice, en la Universidad de Washington (St. Louis, Missouri), un virólogo experto en el estudio de Flavivirus (familia *Flaviviridae*) como el virus de la fiebre amarilla, fue capaz de delinear el mapa de expresión de proteínas del virus descubierto recientemente por M. Houghton y para el que no existían modelos de infección, empleando para ello sistemas de expresión basados en virus Vaccinia o virus Sindbis recombinantes y sueros de pacientes convalecientes (21-25). Estos trabajos permitieron, entre otros, la identificación de dos proteasas virales NS3/4A y NS2, pero no permitían el estudio de elementos del genoma que no estuvieran directamente relacionados con el procesamiento de la poliproteína viral. Para dichos estudios de genética inversa, es decir, estudios donde se estudia el impacto de una mutación introducida experimentalmente en un gen en un determinado fenotipo, Rice disponía de la secuencia, más o menos completa del agente infeccioso, pero carecía de células susceptibles para el rescate de virus infeccioso, ya que el único modelo de infección experimental disponible era el chimpancé. Por ello, el grupo del Dr. Rice se puso manos a la obra para poder clonar la secuencia completa de virus presentes en el suero de chimpancés portadores de la infección crónica y para ello construyeron una serie de clones moleculares, para los que no tuvieron otra alternativa que inocular intrahepáticamente en el hígado de chimpancés no infectados. Así fue como, en 1997, el grupo de Rice y colaboradores publicó el rescate (producción de virus infeccioso a partir de DNA recombinante) de virus del hepatitis C infeccioso a partir de clones moleculares inoculados en forma de ARN transcrito in vitro en el hígado de chimpancés (26). Estos estudios llevaron a la propagación de virus infeccioso y a la transmisión de la patología (hepatitis) a los animales inoculados logrando por primera vez la demostración experimental de los requerimientos estructurales del genoma del virus de la hepatitis C necesarios para iniciar la infección (26). Estudios muy similares fueron llevados a cabo por el grupo del Dr. Jens Bukh (NIH), donde realizó experimentos análogos (27). Posteriormente el equipo del Dr. Bukh fue pionero en los estudios de genética inversa, al introducir mutaciones y delecciones deseadas en

dichos clones moleculares infecciosos, demostrando la relevancia funcional de la proteína p7 del virus de la hepatitis C (28).

Parecía evidente que la utilización de chimpancés para estudios de aspectos fundamentales de la biología de la infección por HCV no permitiría avanzar de una manera razonable y eficaz. Los fracasos a la hora de buscar líneas celulares que permitiesen la replicación de RNAs virales funcionales generados por diferentes grupos se contaban por decenas, ya que ningún grupo de investigación fue capaz de obtener y propagar virus infeccioso a partir de los clones moleculares que sí funcionaban en chimpancés. Esto llevó a grupos como los del Dr. Rice o del Dr. Bartenschlager (Universidad de Heidelberg) a tratar de recapitular aspectos parciales de la infección mediante la eliminación de elementos de RNA que pudieran ser prescindibles para la replicación del RNA viral, como la región correspondiente a las proteínas estructurales, presentes en el virión y la introducción de elementos de RNA que permitieran la selección de genomas y líneas celulares capaces de replicar eficazmente mediante aplicación de una presión selectiva en forma de antibiótico. Así, nacieron los replicones de HCV, elementos autorreplicativos de ARN di-cistrónicos basados en genomas delecionados y en la introducción de un gen de resistencia a neomicina y de un segundo cistron bajo el control traduccional del IRES del virus de la encefalomiocarditis. Estos ARN subgenómicos y las líneas celulares portadoras resultantes constituyeron una auténtica revolución en el campo porque permitían por primera vez disponer de un modelo de cultivo celular para el estudio del virus de la hepatitis C y de la identificación y/o selección de líneas celulares hipersusceptibles (29). Estos trabajos de los equipos alemán y americano fueron publicados en el año 1999 y 2000 respectivamente, cambiando para siempre el estudio del virus de la hepatitis C (30) (31).

Una enorme producción científica basada en éstos y otros replicones similares hicieron avanzar el conocimiento de los aspectos más fundamentales de los determinantes genéticos del genoma del virus, al menos en sus aspectos de replicación de ARN viral y de sus interacciones con el hospedador. Sin embargo, a pesar de la identificación de líneas celulares que sostenían la replicación del RNA viral y la expresión de una replicasa funcional, la propagación de virus infeccioso en cultivo se resistía, con algunas excepciones en cultivos de hepatocitos primarios humanos.

Esta situación cambió con la identificación de una cepa muy particular del virus, la cepa JFH-1 (Japanese Fulminant Hepatitis 1) construida a partir de la secuencia consenso de los virus circulantes en un paciente japonés con hepatitis fulminante. La primera pista de que éste sería una cepa particular vino del hecho que la tasa de replicación del replicón subgenómico JFH-1 era excepcionalmente alta y de que los replicones podían establecerse incluso en líneas celulares no hepáticas, aunque con baja eficiencia



(32). Esto llevó al Dr. Wakita del Metropolitan Institute de Tokio y responsable de la caracterización inicial de los replicones a colaborar con diferentes equipos en el mundo para tratar de producir virus infeccioso gracias a un clon molecular completo de JFH-1. Se tomaron diversas estrategias, tanto la transfección de genomas completos de JFH-1 como de quimeras de la replicasa de JFH-1 con regiones estructurales de otros genotipos (33,34). En el caso del equipo del galardonado Dr. Rice, se empleó una quimera con otro virus del mismo genotipo, logrando el rescate de virus infeccioso tanto en cultivo celular como en modelos de infección con chimpancés (35,36). Otros grupos publicaron simultáneamente este hallazgo, que permitió por primera vez la propagación de HCV en cultivo celular (37). Estos estudios animaron a otros expertos a incrementar la capacidad replicativa de sus clones moleculares hasta forzar su propagación en cultivo celular mediante la introducción de mutaciones adaptativas. Gracias a estos clones moleculares infecciosos, se ha podido profundizar en el estudio tanto de aspectos básicos como más aplicados en el campo de la hepatitis C (38).

Si bien los clones moleculares infecciosos han sido muy importantes para la generación de conocimiento fundamental sobre el virus, los sistemas de replicón puestos a punto por los grupos del Dr. Rice y del Dr. Bartenschlager han sido instrumentales para que en la actualidad se esté considerando la erradicación del virus de la hepatitis C mediante terapias con antivirales de acción directa (39). La identificación de las actividades proteasa y polimerasa en NS3/4A (40) y NS5B respectivamente y la determinación de sus estructuras tridimensionales (41-43) permitió iniciar el camino para el diseño de compuestos antivirales frente a estas dianas virales (44). No obstante, los modelos de replicación en replicones han aportado varias ventajas adicionales. En primer lugar, permitieron validar compuestos seleccionados en ensayos enzimáticos *in vitro*, verificando que fueran efectivos en un sistema celular donde los complejos de replicación podrían no alcanzarse, al encontrarse en complejos de replicación membranosos dentro de la célula (45). En segundo lugar, los replicones permitieron acelerar el estudio de mecanismos de acción y de determinar los perfiles de resistencia a los fármacos. Esto se debe a la posibilidad de imponer una doble presión selectiva de manera experimental: i) sobre el gen marcador presente en el replicón para forzar la selección de replicones funcionales; ii) sobre la diana terapéutica viral, en presencia de cantidades crecientes de compuesto antiviral, de forma que se seleccionan replicones portadores de mutaciones de escape para dicho compuesto. Esto ha permitido determinar la barrera genética a resistencia frente a distintos fármacos, así como las mutaciones asociadas a resistencia, una información de gran relevancia clínica a la hora de diseñar las combinaciones de fármacos para los tratamientos (46).

Además, nuevas generaciones de replicones en los que el marcador del primer cistron de los replicones ha sido sustituido por marcadores fácilmente medibles, como el gen de la luciferasa o de una proteína fluorescente, han permitido cribar colecciones de compuestos sin necesidad de conocer la diana molecular. En este sentido, los inhibidores más potentes en el arsenal terapéutico frente al HCV, han sido descubiertos mediante cribado en un sistema basado en fenotipo, no sesgado a ninguna de las dianas moleculares conocidas (47). Por ejemplo, estudios de perfil genético a resistencia llevaron a identificar a NS5A, una proteína multifuncional sin actividad enzimática conocida, como diana molecular de fármacos como daclatasvir o ledipasvir, esenciales en el tratamiento de la hepatitis C, pero sin un mecanismo molecular plenamente esclarecido a día de hoy (47).

El cambio de paradigma en el tratamiento de la hepatitis C vino dado por la aprobación de un inhibidor de la actividad polimerasa de NS5B, sofosbuvir, en forma de precursor del principio activo que aseguraba un enorme incremento en la eficacia de versiones anteriores de los inhibidores basados en nucleósidos modificados (48). Dicho antiviral de acción directa fue el primero en ser aprobado para su uso en ausencia de interferón en la terapia. La concepción y síntesis del sofosbuvir, la llevó a cabo el Dr. Sofía, lo que le valió junto a los desarrolladores de los replicones subgenómicos de HCV, los Dres. Rice y Bartenschlager el Premio Lasker en 2016 (<http://www.laskerfoundation.org/awards/show/hepatitis-c-replicon-system-and-drug-development/>). Sofosbuvir, en combinación con otros fármacos frente a la proteasa o NS5A anteriormente mencionados, permitió dejar atrás la era de los tratamientos basados en interferón, tratamientos largos, de baja eficacia y plagados de efectos secundarios, y abrir la era de los antivirales de acción directa (DAA), con tasas de éxito cercanas al 100% en todas las poblaciones tratadas con un tratamiento oral de 8-12 semanas (44,45). Este hecho ha llevado a la OMS a elaborar un plan ambicioso de erradicación del virus de la hepatitis C, con el objetivo de reducir la incidencia en un 80% y mortalidad asociada a hepatitis C en un 65% para el año 2030, con un amplio arsenal de antivirales de acción directa como única herramienta terapéutica. En España, se ha elaborado un Plan Estratégico Nacional para la eliminación de la hepatitis C en los que ya se han tratado unos 144.000 pacientes con una tasa de curación del 95% (<https://www.mscbs.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfTransmisibles/-hepatitisC/PlanEstrategicoHEPATITISC/home.htm>).

A pesar de la calidad y cantidad de los DAA disponibles, el éxito de los planes de erradicación de la OMS pasan por la implementación de diversas políticas sanitarias que incluyen el control de calidad de los bancos de sangre así como políticas activas de reducción de daño en individuos adictos a drogas inyectables, entre

otras (49). No obstante, entre los principales desafíos a día de hoy se encuentra el de identificar, diagnosticar y tratar a los más de 30 millones de personas infectadas que no han sido diagnosticadas y que, por lo tanto, desconocen que están infectadas por el virus (49).

4. REFERENCIAS

- Foreman KJ, Marquez N, Dolgert A, Fukutaki K, Fullman N, McGaughey M, et al. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories. *Lancet* 2018; 392(10159):2052-90.
- Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 2006; 1 (1):23-61.
- Wieland SF, Chisari FV. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Virol* 2005; 15: 9369-80.
- Wong DT, Mihm MD, Boyer JL, Jain D. Historical Path of Discovery of Viral Hepatitis. *Harvard Medical Student Review* 2015; 3:18-36.
- Stokes JH. Epidemic infectious jaundice and its relation to the therapy of syphilis. *Archives of Internal Medicine American Medical Association* 1920; 1;26(5):521-43.
- Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA American Medical Association* 1965;191(7):541-6.
- Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, Lander JJ, Feinstone SM, Morrow AG, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med.* 1972 ; 77(5):691-9.
- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* 1973; 182(4116):1026-8.
- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med.* 1975; 292(15):767-70.
- Alter HJ. The dominant role of non-A, non-B in the pathogenesis of post-transfusion hepatitis: a clinical assessment. *Clin Gastroenterol* 1980; 9(1):155-70.
- Houghton M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 2009; 51(5):939-48.
- He LF, Alling D, Popkin T, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH. Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *J Infect Dis.* 1987; 156(4):636-40.
- Feinstone SM, Mihalik KB, Kamimura T, Alter HJ, London WT, Purcell RH. Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infect Immun. American Society for Microbiology Journals* 1983; 41(2):816-21.
- McCullagh KG, Davies JA, Sim IS, Dawson KM, O'Neill GJ, Doel SM, et al. Biological properties of human interferon beta 1 synthesized in recombinant bacteria. *J Interferon Res* 1983;3(1):97-111.
- Shimizu YK, Oomura M, Abe K, Uno M, Yamada E, Ono Y, et al. Production of antibody associated with non-A, non-B hepatitis in a chimpanzee lymphoblastoid cell line established by in vitro transformation with Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci USA. National Academy of Sciences* 1985; 82(7):2138-42.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244(4902):359-62.
- Kuo G, Choo Q, Alter H, Gitnick G, Redeker A, Purcell R, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244(4902):362-4.
- Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989; 321(22):1494-500.
- Chien DY, Choo QL, Tabrizi A, Kuo C, McFarland J, Berger K, et al. Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection using an immunodominant chimeric polyprotein to capture circulating antibodies: reevaluation of the role of HCV in liver disease. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89(21):10011-5.
- Kleinman S, Alter H, Busch M, Holland P, Tegtmeyer G, Nelles M, et al. Increased detection of hepatitis C virus (HCV)-infected blood donors by a multiple-antigen HCV enzyme immunoassay. *Transfusion* 1992; 32(9):805-13.
- Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol. American Society for Microbiology Journals* 1993; 67(3):1385-95.
- Lin C, Lindenbach BD, Prágai BM, McCourt DW, Rice CM. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol* 1994; 68(8):5063-73.
- Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM. Formation and intracellular localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. *J Virol* 1994; 68(10):6147-60.
- Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90(22):10583-7.
- Lin C, Rice CM. The hepatitis C virus NS3 serine proteinase and NS4A cofactor: establishment of a cell-free trans-processing assay. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92(17):7622-6.
- Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice



- CM. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 1997; 277(5325):570–4.
27. Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, Bukh J. Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94(16):8738–43.
28. Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, et al. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100(20):11646–51.
29. Blight KJ, McKeating JA, Rice CM. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2002; 76(24):13001–14.
30. Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999; 285(5424):110–3.
31. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000; 290(5498):1972–4.
32. Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, et al. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *YGA* 2003; 125(6):1808–17.
33. Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, et al. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103(19):7408–13.
34. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005; 11(7):791–6.
35. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005; 309(5734):623–6.
36. Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A, Vanwolleghem T, Syder AJ, McKeating JA, et al. Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103(10):3805–9.
37. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102(26):9294–9.
38. Steinmann E, Pietschmann T. Cell Culture Systems for Hepatitis C Virus. In: Bartenschlager R, editor. *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. pp. 17–48. (Current Topics in Microbiology and Immunology; vol. 369).
39. Kim NG, Kullar R, Khalil H, Saab S. Meeting the WHO hepatitis C virus elimination goal: Review of treatment in paediatrics. *J Viral Hepat*. 2020; 27(8):762–9.
40. Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM. Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol* 1993; 67(5):2832–43.
41. Kim JL, Morgenstern KA, Lin C, Fox T, Dwyer MD, Landro JA, et al. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 1996; 87(2):343–55.
42. Lesburg CA, Cable MB, Ferrari E, Hong Z, Mannarino AF, Weber PC. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol* 1999; 6(10):937–43.
43. Bressanelli S, Tomei L, Roussel A, Incitti I, Vitale RL, Mathieu M, et al. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96(23):13034–9.
44. Lamarre D, Anderson PC, Bailey M, Beaulieu P, Bolger G, Bonneau P, et al. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 2003; 426(6963):186–9.
45. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Micro* 2007; 5(6):453–63.
46. Bartenschlager R. Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(11):911–6.
47. Gao M, Nettles RE, Belema M, Snyder LB, Nguyen VN, Fridell RA, et al. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature* 2010; 465(7294):96–100.
48. Sofia MJ. Beyond sofosbuvir: what opportunity exists for a better nucleoside/nucleotide to treat hepatitis C? *Antiviral Res*. 2014; 107:119–24.
49. Heffernan A, Cooke GS, Nayagam S, Thursz M, Hallett TB. Scaling up prevention and treatment towards the elimination of hepatitis C: a global mathematical model. *Lancet* 2019; 393(10178):1319–29.

EL PREMIO NOBEL EN QUÍMICA 2020

Juan-Ramón Lacadena

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

LA TÉCNICA CRISPR-Cas9: CRÓNICA DE UN PREMIO ANUNCIADO

En el año 2017 publiqué mis reflexiones sobre los aspectos científicos y éticos de la técnica CRISPR-Cas9 y en esa ocasión, como en muchas otras, vaticiné que, antes o después, sería objeto del premio Nobel. Y efectivamente, así fue: El 7 de octubre de 2020, la Real Academia de Ciencias de Suecia concedió el Premio Nobel en Química 2020 a las doctoras Emmanuelle Charpentier y Jennifer A. Doudna "por el desarrollo de un método para la edición genómica". Parafraseando el título de la famosa novela "Crónica de una muerte anunciada" del Premio Nobel Gabriel García Márquez, se hacía realidad la "crónica de un premio anunciado".

Como profesor de Genética, la noticia me ha alegrado mucho, pero me ha dejado un sabor agri dulce porque muchos pensábamos que cuando se diera el Premio Nobel a la técnica CRISPR-Cas9 de edición genómica también se debería incluir al científico español Francisco Juan Martínez Mojica que describió, estudió y bautizó las secuencias CRISPR en los genomas de arqueas y bacterias. CRISPR es el acrónimo de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (repeticiones palindrómicas cortas interespa ciadas regularmente agrupadas) y *Cas* el acrónimo de *CRISPR associated* (asociada a CRISPR).

Por *edición genómica* se entiende un tipo de ingeniería ge nética en la que el ADN es insertado, eliminado o reemplazado en el genoma de un organismo utilizando enzimas del tipo nucleasas (denominadas "tijeras moleculares"). Las nucleasas producen roturas de doble cadena (*DSB*) en lugares precisos del genoma y las dobles roturas del ADN pueden ser reparadas por mecanismos de unión de extremos no homólogos (*NHEJ*) o mediante reparación dirigida por homología (*HDR*), dando lugar a mutaciones controladas (*edición*). La edición genómica se denomina coloquialmente como la técnica de "corta y pega". En la actualidad se dispone especialmente de cua tro tipos de nucleasas: *meganucleasas*, *nucleasas de dedo de zinc* (*ZF nuclease*), *Talen* (*Transcription Activator-Like Effector-based Nu clease*) y el sistema *CRISPR-Cas*.

Con la llegada de la técnica CRISPR-Cas9 puede decirse que se ha popularizado o "democratizado" el "tiro al blanco génico" (*gene target*). En efecto, mientras que la utilización de las meganu cleasas necesitan 4-5 años de trabajo y un costo de 6.000 € para lle var a cabo una investigación de edición, las ZF nucleasas implican un costo 30.000 €, las TALEN implican un tiempo de 3-4 meses y un costo de 10.000 €, con la CRISPR-Cas9 se necesitan solamente 2-3 semanas de trabajo y un coste de 20-30 €.

Una breve historia de CRISPR-Cas9

Aunque la primera descripción de la existencia de las se cuencias CRISPR en el genoma de las bacterias se hizo en 1987 por un grupo japonés, sin embargo se debe principalmente a los trabajos del investigador español Francisco Juan Martínez Mojica (Francis Mo jica) (3, 4, 5) en los años 1993, 2000 y 2005 el estudio de unas se cuencias de ADN repetidas (las secuencias CRISPR) descubiertas en bacterias y en arqueas —que posteriormente se descubrió su relación con el sistema inmunitario de la bacteria para defenderse de los ata ques de los virus que las atacan— se han convertido en una de las herramientas biotecnológicas más eficaces para modificar el genoma (edición genómica) de cualquier clase de organismo. Sin embargo, fueron Emmanuelle Charpentier y Jennifer A. Doudna quienes se dieron cuenta que este sistema ancestral de defensa de las bacterias contra la infección por virus podía convertirse en una herramienta para la modificación dirigida del material genético de otros seres vivos.

La característica más relevante que diferencia a los métodos de corrección del ADN por transgénesis es que el transgén se integre al azar en el genoma o que se produzca el reemplazamiento del gen original. Por otro lado, una vez producida la doble rotura en la mo lécula de ADN puede haber dos rutas para fijar la rotura de la doble hélice: la *NHEJ* (unión de extremos no homólogos) que produce la disrupción génica (*INDEL*, inserciones y/o deleciones) y la *HDR* (re paración dirigida por homología) que da lugar a la reparación génica y a la edición.

El sistema CRISPR-Cas9 consta de dos elementos: una pe queña molécula de ARN (la parte CRISPR) que contiene una secu encia complementaria con la secuencia diana contra la que se dirige en el ADN, y una endonucleasa (denominada Cas9) que es una pro teína con actividad enzimática capaz de cortar el ADN y hacerlo so lamente donde le indique la pequeña molécula de ARN antes mencionada. Al producir la doble rotura en la molécula de ADN en tran en acción otras enzimas existentes en las células que reparan el daño producido, pero que pueden generar errores al insertar o eli minar algunos nucleótidos en el lugar del corte; es decir, se genera una mutación en el gen afectado por el corte (*NHEJ*). Sin embargo, si se añade un tercer elemento al sistema CRISPR-Cas9 consistente en una molécula de ADN que tenga secuencias complementarias a la zona donde se producirá el corte y, además, se incorporan en esta secuencia algunos cambios específicos que no estuvieran en el ge noma original, el sistema tenderá a utilizar esta molécula de ADN como molde para restaurar el corte cambiando así el genoma; es decir, editándolo (*edición genómica*). Como si de un procesador de textos se tratara, el sistema CRISPR-Cas9 y la molécula de ADN consiguen localizar un error y corregirlo en un gen o, viceversa, instaurar un error donde antes no lo había, reproduciendo así en un modelo animal experimental aquella mutación detectada en un paciente



afectado por una enfermedad. En otras palabras, somos capaces de reproducir en el genoma de los animales de experimentación las mismas mutaciones observadas en los pacientes.

En una revisión del tema, Lander (8) analizaba la contribución de diversos investigadores al desarrollo de los fundamentos y aplicaciones de la técnica CRISPR-Cas9. Los 12 “héroes CRISPR” — como él los llama— son, por orden de aparición en escena:

- Descubrimiento de CRISPR: Francisco Juan Martínez Mojica (1993)
- CRISPR es un sistema inmune adaptativo: F.J.M. Mojica (2005), Gilles Vergnaud (2005), Alexander Bolotin (2005)
- Evidencia experimental de que CRISPR confiere inmunidad adaptativa y utiliza una nucleasa: Philippe Horvath (2007)
- Programando CRISPR: John van der Oost (2008)
- Dianas CRISPR en el ADN: Luciano Marrafini (2008)
- Cas9 es guiada por crRNAs y crea dobles roturas en el ADN: Sylvain Moineau (2008)
- Reconstituyendo CRISPR en un organismo distante: Virginijus Siksnys (2011)
- Estudiando CRISPR in vitro: V. Siksnys (2012), Emmanuelle Charpentier (2012), Jennifer A. Doudna (2012)
- Edición genómica en células de mamíferos: Feng Zhang (2012, 2013), George Church (2013)

De los doce investigadores citados, hay cinco especialmente cualificados para ser merecedores del galardón Nobel que, por orden de aparición en escena —como se dice en los programas de representaciones teatrales— son los doctores Mojica, Charpentier, Doudna, Zhang y Church. Como las normas de concesión de los galardones dicen que no sean más de tres personas (a no ser que se trate de alguna organización), la Real Academia de Ciencias de Suecia, que otorga el Premio Nobel en Química, se vio en la necesidad de aplicar un juicio salomónico, a mi juicio equivocado, premiando solamente a Emmanuelle Charpentier y a Jennifer A. Doudna. En mi opinión, sin los descubrimientos básicos de la secuencia CRISPR que hizo el Dr. Mojica, las galardonadas con el Premio Nobel no hubieran podido desarrollar su técnica premiada y, por tanto, el Dr. Mojica debería haberles acompañado en el galardón. En la historia de los Premios Nobel, hay casos similares en los que se premiaba también la investigación básica que, muchos años después, servía de base a los trabajos de los premiados. En elegantes palabras del excluido Dr. Mojica, “han premiado a las personas que desarrollan la herramienta. No a quien sentó las bases [él mismo] ni a quienes primero la aplicaron [George Church y Feng Zhang]”.

Un comentario final: la Genética y los Premios Nobel

Una vez más, investigaciones genéticas —en este caso, año 2020, las llevadas a cabo por los Dres. Houghton y Rice con el virus de la hepatitis C y las de las Dras. Charpentier y Doudna con la técnica

CRISPR-Cas9— han sido galardonadas con el Premio Nobel. Utilizando palabras similares a las que usé en anteriores ocasiones semejantes a ésta, puedo señalar globalmente que investigaciones genéticas han sido galardonadas con el Premio Nobel en 56 ocasiones, correspondiendo el premio a 110 científicos del campo de la Genética o ciencias afines. De los 56 premios considerados, 42 pertenecen al ámbito de la Fisiología o Medicina, 13 a la Química y 1 de la Paz. De los 110 científicos galardonados, 83 corresponden a premios de Fisiología o Medicina, 26 de Química y 1 de la Paz. Sólo hay 10 mujeres entre los galardonados.

Me siento orgulloso de pensar que en los veinte años que van transcurridos del siglo XXI se ha premiado la investigación genética en 22 ocasiones, a saber: 2001, 2002, 2004, 2006, 2006, 2007, 2008, 2008, 2009, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2013, 2016, 2017, 2018, 2018, 2019, 2020, 2020.

REFERENCIAS

1. Lacadena JR. Edición genómica: Ciencia y Ética. Revista Iberoamericana de Bioética (online), Genética y Humanismo 2017; 3: 1-14. Basado en Montoliu L. Las herramientas CRISPR: Un regalo inesperado de las bacterias que ha revolucionado la biotecnología animal. <http://www.comunicabiotec.org> 2015 y en Serrugía D, Montoliu L. The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. *Transgenic Res* 2014; 23:707-716.
2. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 1987; 169:5429-33.
3. Mojica FJM, Juez G, Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified *PatI* sites. *Mol Microbiol* 1993; 9:613-21.
4. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* 2000; 36:244-6.
5. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 2005; 60:174-84.
6. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337:816-21.
7. Montoliu L. Las herramientas CRISPR: Un regalo inesperado de las bacterias que ha revolucionado la biotecnología animal. Recuperado de <http://www.comunicabiotec.org> 2015.
8. Lander ES. The Heroes of CRISPR. *Cell* 2016; 164:18-28.

PREMIO NOBEL DE QUÍMICA 2020: UN PREMIO QUE SURGIÓ EN ESPAÑA Y QUE PASÓ DE LARGO

NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2020: A PRIZE THAT AROSE IN SPAIN AND PASSED BY

Lluís Montoliu José

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) y Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER-ISCIII)

RESUMEN

Las investigadoras Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna han recibido el Premio Nobel de Química del año 2020 por "el desarrollo de un método de edición genética", tal y como proclama la escueta pero suficiente justificación aportada por la Academia Sueca de Ciencias, responsable de la selección y elección de los premiados en esta categoría. La palabra CRISPR (acrónimo en inglés de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) que corresponde, en español, a las repeticiones cortas palindrómicas agrupadas y regularmente espaciadas, descritas por el microbiólogo español de la Universidad de Alicante, Francisco Juan Martínez Mojica, no aparece en la frase resaltada del galardón pero, inmediatamente, el mundo entero supo que este premio Nobel de Química se lo llevaban las "CRISPR", las famosas herramientas de edición genética, descritas inicialmente por Mojica como elementos de un complejo y eficaz sistema de defensa en procariotas y que, gracias al talento y la visión de estas dos investigadoras, fueron propuestas para ser utilizadas, fuera de contexto, para la edición de cualquier gen de cualquier ser vivo. En esta revisión señalaré los puntos clave que permitieron a Charpentier y Doudna obtener, merecidamente, este premio y, por supuesto, subrayaré el papel que han jugado muchos otros investigadores, como el propio Mojica.

ABSTRACT

Two researchers, Emmanuelle Charpentier and Jennifer Doudna, have received the 2020 Nobel Prize in Chemistry for "the development of a genetic editing method", as proclaimed by the brief but sufficient justification provided by the Swedish Academy of Sciences, responsible for the selection and election of the winners in this category. The word CRISPR (acronym for Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), described by the Spanish microbiologist at the University of Alicante, Francisco Juan Martínez Mojica, does not appear in the highlighted phrase of the award but, immediately, the whole world knew that this Nobel Prize in Chemistry was won by the "CRISPR", the famous gene editing tools, initially described by Mojica as elements of a complex and effective defense system in prokaryotes. And, thanks to the talent and vision of these two researchers, CRISPR were proposed to be used, out of context, for editing any gene of any living organism. In this review I will point out the key points that allowed Charpentier and Doudna to deserve this award and of course I will underline the role that many other researchers have played, including that of Mojica himself.

Palabras Clave:

CRISPR
edición genética
CRISPR-Cas
terapia génica
nucleasas

Keywords:

CRISPR
genome editing
CRISPR-Cas
gene therapy
nucleases



1. INTRODUCCIÓN

Emmanuelle Charpentier, microbióloga francesa que trabajó desde diversos laboratorios hasta recabar como directora de un centro Max-Planck en Berlín (Alemania), y Jennifer Doudna, bioquímica norteamericana, de la Universidad de California en Berkeley, no se conocían personalmente a principios del año 2011. En marzo de ese año tuvo lugar una reunión internacional sobre "Regulación por ARN en Bacterias" en San Juan, Puerto Rico (EE.UU.), y allí fue donde coincidieron estas dos investigadoras por vez primera. Charpentier, más joven que Doudna, que ya era una investigadora senior, con prestigio y reconocimiento, fue quien se acercó a proponer una colaboración científica para descifrar el mecanismo de acción de uno de estos sistemas CRISPR-Cas (Cas se refiere al acrónimo en inglés CRISPR-associated protein), en el que las dos habían estado investigando, desde un punto de vista de microbiología molecular (Emmanuelle Charpentier) y desde un punto de vista de bioquímica estructural (Jennifer Doudna). Quince meses después el resultado de esa colaboración aparecía publicado en la revista *Science* (1), en el primer y único artículo científico en el que estas dos investigadoras colaboraron como co-titulares de la investigación. El artículo que las llevó, ocho años y unos meses después, a conseguir el Premio Nobel de Química.

El artículo de Charpentier y Doudna (1) describía la simplicidad estructural y funcional del mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas9 de la bacteria *Streptococcus pyogenes*, patógena para los seres humanos, causa frecuente de otitis y laringitis. En el citado estudio, publicado en el mes de junio de 2012, las dos investigadoras galardonadas, junto a sus colaboradores, describieron que la nucleasa Cas9 cortaba, in vitro, guiada por una molécula de ARN (crRNA), descrita por el laboratorio de John van der Oost (2), y que, a su vez, se apareaba con otro ARN de pequeño tamaño (tracrARN) que era quien atenazaba a la proteína Cas9. Este último ARN había sido descrito un año antes por el laboratorio de Emmanuelle Charpentier (3). El artículo seminal de las dos investigadoras (1) aportó un detalle especial, que muy probablemente contribuyó al éxito inmediato y a la expansión internacional de estas herramientas. Charpentier y Doudna optaron por fusionar las dos moléculas de ARN en una sola, a través de una secuencia de unión (linker) y el resultado fue el denominado sgARN (guía sintética de ARN) o, simplemente, gARN (guía de ARN) que convertía al sistema CRISPR-Cas9 en binario (1). Solo dos componentes eran necesarios para trasladar los posibles beneficios de las nuevas herramientas CRISPR-Cas9 a cualquier entorno: la nucleasa Cas9 y la guía de ARN (sgARN). El artículo de Charpentier y Doudna terminaba con una frase premonitrice del éxito que acom-

pañaría al nuevo método que lanzaban en 2012: "Proponemos una metodología alternativa basada en la proteína Cas9 programada por ARN que puede aportar un potencial considerable para las aplicaciones de inactivación y edición génica". No se equivocaban. En efecto, ocho años más tarde ese artículo las llevó al más alto reconocimiento que puede recibir un científico: el Premio Nobel de Química.

Es relevante indicar que el celebrado artículo de 2012 fue, en realidad, la única ocasión que colaboraron experimentalmente Charpentier y Doudna, en igualdad de condiciones. Dos años más tarde Charpentier colaboró en un artículo de biología estructural del laboratorio de Doudna, que determinaba cómo la proteína Cas9 cambiaba de conformación al interaccionar con las moléculas de ARN (4). Posteriormente aparecieron juntas en dos de las primeras revisiones que se publicaron sobre el tema (5, 6), y en una obra colectiva adicional de posicionamiento sobre el impacto de la edición genética (7), pero lo cierto es que se trata en esta ocasión de un Premio Nobel basado en un único trabajo experimental, una única publicación (1), que obviamente ha tenido un impacto enorme en biología, biotecnología y biomedicina. De ahí se desprende la justificación del galardón conseguido conjuntamente por estas dos investigadoras, la primera vez que se otorga un Premio Nobel a dos investigadoras.

Todo lo anterior es cierto. Pero no es menos cierto que Charpentier y Doudna propusieron, pero no demostraron, que los sistemas CRISPR-Cas9 de procariotas podrían ser utilizados como herramientas de edición genética. Este honor les corresponde, conjuntamente, a los laboratorios de Feng Zhang (Instituto BROAD, del MIT) y de George Church (Universidad de Harvard) quienes publicaron sendos manuscritos en enero de 2013 precisamente llevando a la práctica la propuesta de las investigadoras. En efecto, en dos publicaciones que aparecieron en la revista *Science* a principios de 2013 estos dos investigadores de Boston compartieron con el mundo el éxito que habían tenido editando células de ratón y células humanas (8, 9). Fue entonces cuando empezó la revolución CRISPR, cuando el resto del mundo empezó a descubrir las poderosas herramientas CRISPR, para editar cualquier gen de cualquier organismo (10).

Sin embargo, junto a Charpentier, Doudna, Zhang y Church, siguen faltando muchos investigadores. Siguen faltando todos aquellos microbiólogos moleculares que, durante más de veinte años, antes que se descubriera la potencial aplicación de los sistemas CRISPR-Cas como herramientas de edición genética, se entretuvieron a describir este peculiar, fascinante, complejo y muy eficaz sistema de defensa que usan los procariotas para defenderse de moléculas de ADN invasoras, sean virus o plásmidos (11).

2. EL ORIGEN PROCARIOTA DE LOS SISTEMAS CRISPR-CAS

Realmente la historia de este Premio Nobel de Química 2020 se remonta al año 1987. Fue entonces cuando un equipo de microbiólogos japoneses se percató de la existencia de unas curiosas repeticiones en el genoma de la proteobacteria *Escherichia coli*, espaciadas por secuencias diversas (12). Cuatro años más tarde otros microbiólogos holandeses también las reportaron en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis*, las micobacterias que causan la tuberculosis en personas y en animales (13). Pero no fue hasta 1993 cuando apareció el primer trabajo publicado de un microbiólogo español, Francisco Juan Martínez Mojica, también conocido como Francis Mojica, quien, desde la Universidad de Alicante, junto a su grupo de investigación, localizó estas mismas repeticiones y espaciadores en el genoma de otro procariota, de la arquea *Haloferax mediterranei*, microorganismo habitual de las salinas, aislado anteriormente por su laboratorio en las Salinas de Santa Pola (Alicante). En esta primera publicación, Mojica describía repeticiones similares a las reportadas por los equipos japoneses y holandeses, pero esta vez en una arquea (14).

A diferencia de los microbiólogos japoneses y holandeses, Mojica se dio cuenta de la relevancia de que tres procariotas muy alejados evolutivamente, y con hábitats tan dispares (intestinos, pulmones y salinas, respectivamente), compartieran un patrón de repeticiones de secuencias en su ADN, en sus genomas. Descartada por físicamente improbable la transmisión horizontal tan solo quedaba suponer una evolución convergente en tres linajes, posible pero altamente improbable. O asumir que aquella insólita organización de un fragmento del ADN de todos estos microorganismos respondiera a que lo habían heredado de un ancestro común. Sin embargo, la consulta del árbol filogenético de los procariotas sugiere que el ancestro común más próximo de las tres especies era verdaderamente las primeras células que aparecieron en nuestro planeta, probablemente hace más de 3.500 millones de años. Y, de todo ello se deducía que una peculiar estructura genómica que se había mantenido tanto tiempo tenía que ser necesariamente funcionalmente relevante para estos seres vivos. Y por todo ello Francis Mojica decidió dedicar su carrera profesional a investigar cuál podría ser la función de estas repeticiones de secuencias de ADN (15).

La primera idea de Mojica fue pensar que estas repeticiones podrían tener algo que ver con la replicación y la partición de replicones en la arquea *Haloferax mediterranei* (16), algo que después se comprobó que no era una hipótesis correcta, aunque esta publicación recoge las primeras evidencias de que estas secuencias repetitivas eran activas, se transcribían a ARN. Mojica siguió recopilando la presencia de estos elementos repetidos en el genoma de muchos procariotas cuya secuencia se empezaba a conocer y publicó

el primer listado de secuencias repetidas de diversos microorganismos, en el que incluía algunos elementos descritos en el genoma de las mitocondrias de leguminosas (relacionado con el origen procariota de estos orgánulos subcelulares) (17). Hasta entonces, cada grupo que reportaba secuencias repetidas de estas características las denominaba de una forma distinta. Pero en noviembre de 2001 Francis Mojica le propuso a Ruud Jansen una palabra: CRISPR (acrónimo en inglés de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) que inmediatamente hizo fortuna y se usó por primera vez en un artículo de Jansen en el que describía la existencia de genes colindantes a las repeticiones, que intuía debían estar relacionados, y que, por ello, las proteínas codificadas se nombraron como Cas (acrónimo en inglés de *CRISPR associated protein*) (18).

La contribución esencial de Mojica para descifrar el significado de las repeticiones CRISPR y de los espaciadores con secuencias únicas que había entre aquellas no tardaría en llegar. En verano de 2003 Mojica se percató de que algunos espaciadores eran fragmentos de genomas de virus que infectan a bacterias (bacteriófagos). Y que, cuando esto sucedía, la bacteria que portaba ese fragmento del virus era resistente a la infección por ese mismo virus. Había encontrado la razón de ser de los sistemas CRISPR. Se trataba de un sistema inmunitario de los procariotas de base genética, de defensa contra los virus, que se podía transmitir entre generaciones y que era adaptativo, pues al ir añadiendo fragmentos de nuevos virus podía conferirles resistencia a las bacterias y arqueas a todos esos nuevos invasores. Le costó casi tres años encontrar una revista que publicara estos resultados sorprendentes, que la comunidad científica recibió con escepticismo e incredulidad, pero finalmente aparecieron publicados en 2005 en la revista *Journal of Molecular Evolution* (19), convirtiéndose, años después, en su pasaporte para ser nominado también a los Premios Nobel, tal era la relevancia de su descubrimiento.

La explicación propuesta por Mojica para dar sentido funcional a los sistemas CRISPR fue confirmada experimentalmente dos años después, por dos investigadores Rodolphe Barrangou y Philippe Horvath, y sus colaboradores, quienes pudieron llevar a la práctica los experimentos que Mojica hubiera deseado hacer, confirmando que al añadir una nueva repetición CRISPR con un espaciador derivado de un virus la bacteria se volvía resistente al mismo, y al eliminar ese mismo espaciador se tornaba sensible a la infección (20).

Las contribuciones esenciales de Mojica al universo CRISPR todavía tuvieron otra aportación fundamental al ponerle nombre a la secuencia que aparecía conservada justo al lado de la secuencia de reconocimiento del fragmento del genoma del virus, que Mojica denominó como motivo adyacente al protoespaciador, o PAM (acrónimo en inglés de *Protospacer Adjacent Motif*). Ese era el truco ge-



nético que usaban las bacterias para diferenciar el ADN del virus, contra el que debían atacar, del fragmento del ADN del virus insertado en el genoma de la bacteria entre las repeticiones CRISPR, que no debían atacar (21). La existencia de estas señales presentes directamente en el genoma de los virus, adyacentes a la secuencia de reconocimiento, ya había sido intuida por otros investigadores (22), que eran diversas según qué bacteria o arquea, o qué nucleasa Cas se tratara. Y esta es la razón biológica por la que a la hora de diseñar las guías de ARN para dirigir los sistemas CRISPR-Cas a nuestro gen favorito debamos escoger no cualquier secuencia al azar sino solamente aquellas adyacentes a la señal PAM que requiere la nucleasa que vayamos a utilizar, una labor bioinformática de la que se encargan la mayoría de programas que diseñan guías de ARN para dirigir las nucleasas Cas a los genes de elección (23, 24).

Las aportaciones de Mojica al campo de las CRISPR vinieron acompañadas de otros hallazgos, igualmente relevantes. El investigador Luciano Marraffini, de origen argentino pero afincado en EE.UU., demostró en 2008 que los sistemas CRISPR-Cas no solo iban dirigidos contra el genoma de los virus sino también contra plásmidos (25). El grupo de John van der Oost descubrió las pequeñas moléculas de ARN (crARN) que dirigían a las nucleasas a la secuencia que debía ser cortada (2). El mecanismo de actuación se fue descubriendo paulatinamente, con contribuciones importantes de la propia Jennifer Doudna, que describió la actividad ADNasa en las nucleasas Cas asociadas a CRISPR (26) y el procesamiento del ARN transcrito de las agrupaciones CRISPR en fragmentos de menor tamaño (27). Sin embargo, probablemente el trabajo fundamental que dio la pista del mecanismo de acción de los sistemas CRISPR-Cas en procariotas surgió en 2010 del laboratorio del investigador canadiense Sylvain Moineau, quienes demostraron, por vez primera, que el mecanismo de defensa que aplicaban las bacterias para inactivar los virus y plásmidos invasores mediante los sistemas CRISPR-Cas estaba basado en el corte de sus ADNs, derivado de la actividad Cas de las nucleasas asociadas (28). El mecanismo de acción se completó con el trabajo de Emmanuelle Charpentier, quien en 2011 describió la otra molécula de ARN necesaria para que la guía de ARN acabara interaccionando con la endonucleasa Cas, que denominó tracrARN (3). El colofón final de todos estos más de veinte años de investigación básica sobre los sistemas CRISPR-Cas lo puso el artículo conjunto de las premiadas Charpentier y Doudna (1), aparecido en verano de 2012, por el que recibieron el Premio Nobel de Química del año 2020.

Son muchos pues los investigadores que, capitaneados por Francis Mojica, participaron en la exploración y búsqueda de explicaciones funcionales para el sistema CRISPR-Cas, antes que Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna (11). Y muchos más los que comprobaron y usaron profusamente su propuesta de convertir este

sistema de defensa en una eficaz herramienta de edición genética (10, 11). Por ello el premio, merecido, que recibieron estas investigadoras llegó acompañado de decepciones, al ver que el comité de selección de la Academia Sueca de Ciencias había desestimado compartir el galardón con alguno de los otros investigadores mencionados, probablemente ante la difícil disyuntiva de tener que optar por uno frente a los demás. Y, con ello, España vio pasar de largo la oportunidad soñada de que Francis Mojica fuera el tercer científico español galardonado con un Premio Nobel, tras Santiago Ramón y Cajal (1906) y Severo Ochoa Albornoz (1959).

Mención especial merece un microbiólogo lituano, Virginijus Siksnys, de la Universidad de Vilnius, que, con su grupo, hizo también aportaciones fundamentales. En 2011 logró transferir con éxito un sistema CRISPR-Cas desde la bacteria gram-positiva *Streptococcus thermophilus* a *Escherichia coli*, una bacteria gram-negativa y evolutivamente muy alejada de la primera (29). La magnitud del experimento quedó eclipsada probablemente al tratarse del intercambio de secuencias entre dos microorganismos, sin reparar que estos tenían una distancia evolutiva enorme, de centenares de millones de años, tantos como los que separan un eucariota unicelular como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de nosotros. Siksnys también se percató del posible uso de los sistemas CRISPR-Cas de procariotas como posibles herramientas de edición genética y así lo plasmó tras realizar un estudio in vitro (30) análogo al realizado por las investigadoras Charpentier y Doudna. Sin embargo, Siksnys usó el sistema CRISPR-Cas de *Streptococcus thermophilus* y las investigadoras usaron el sistema CRISPR-Cas de *Streptococcus pyogenes*, del que conocían todos sus componentes, incluido el tracrARN, que desconocía y no utilizó el trabajo del investigador lituano (30). Este trabajo, que se envió a publicar antes del de las investigadoras, finalmente acabó publicado en la revista PNAS, en su número de septiembre de 2012 (30), tres meses después del artículo seminal de Charpentier y Doudna en la revista *Science* (1). Ambos trabajos describían el mecanismo de acción de sendos sistemas CRISPR-Cas en dos especies distintas del género *Streptococcus*. Ambos artículos predecían que el corte de secuencias específicas de ADN guiado por pequeñas moléculas de ARN podría tener utilidad en un sistema de edición genética universal, pero solo el trabajo de las dos investigadoras incluía la totalidad de los elementos de los sistemas CRISPR-Cas: la proteína Cas9, el crARN y el tracrARN. Esta última molécula faltaba en la receta metodológica de Siksnys. Sin embargo, creo que es necesario acreditar que fueron tres, por lo menos, los investigadores que, a lo largo de 2012, se percataron del uso de los sistemas CRISPR-Cas como herramientas de edición genética: Emmanuelle Charpentier, Jennifer Doudna y Virginijus Siksnys (11, 15).

3. LAS HERRAMIENTAS CRISPR-CAS DE EDICIÓN GENÉTICA: APLICACIONES, VENTAJAS Y LIMITACIONES

El escueto mensaje que anunciaba el Premio Nobel concedido a Charpentier y Doudna refería que la motivación de tan alta distinción se justificaba por el desarrollo de “un” método de edición genética. La elección del artículo indeterminado “un” y no su correspondiente determinado “el” por parte de la Academia de Ciencias Sueca no era baladí. Implícito en ese mensaje se trasladaba la información de que el sistema CRISPR-Cas por el que las dos investigadoras iban a recibir el Premio Nobel no era el único sistema de edición genética que la comunidad científica conocía. En efecto, por lo menos tres sistemas análogos adicionales, totalmente diferentes en su modo de acción, habían aparecido descritos antes que las herramientas CRISPR-Cas. En primer lugar, las meganucleasas de levaduras, descritas en 1995, seguidas de las nucleasas asociadas a dominios proteicos de dedos de cinc (ZFN, acrónimo en inglés de *Zinc-finger nucleases*), que aparecieron en 2001, y finalmente las TALEN (acrónimo en inglés de *Transcription activator-like effector nuclease*) cuyo uso se popularizó a partir de 2011 (10, 31, 32). Sin embargo la irrupción de las herramientas CRISPR-Cas en 2013, tras las primeras demostraciones funcionales por parte de Zhang (8) y Church (9), seguidas de muchos otros investigadores como la propia Jennifer Doudna (33), y el laboratorio de Rudolf Jaenisch, que demostró el uso de las CRISPR para la edición de ratones (34), y muchos otros investigadores (10, 11), rápidamente demostró su versatilidad, asequibilidad y facilidad de uso, propiedades que llevaron a las herramientas CRISPR-Cas de edición genética a desbancar a todas las anteriores. En apenas ocho años ya se han publicado 22.000 artículos científicos que usan estas herramientas CRISPR-Cas, unos 6.000 solamente en el último año contabilizado, 2020. Las anteriores herramientas se siguen utilizando, y en algunos casos han permitido resolver barreras insalvables que no habían podido superar las herramientas CRISPR, como la edición del ADN mitocondrial. Recientemente, David Liu, investigador del Instituto BROAD-MIT, ha conseguido editar el genoma de mitocondrias a través de una estrategia parecida a los editores de bases, combinando la actividad citidina deaminasa con TALEN lo cual permite llevar el complejo al interior de la mitocondria y editar específicamente su genoma (35).

Todas las herramientas de edición genética, en sus diferentes versiones, realizan esencialmente la misma función: cortar el ADN en secuencias específicas. Dicho corte dispara los mecanismos endógenos de reparación. Las dos rutas más importantes para restaurar la continuidad física del cromosoma son la unión de extremos no homólogos, que ocurre en todas las células, estén dividiéndose o no; y por otro lado la reparación dirigida por homología, en la

que se puede aportar al sistema un molde (un oligonucleótido de ADN de cadena sencilla, o un fragmento bicatenario de ADN) con homología a derecha e izquierda del corte realizado y con la posibilidad de insertar secuencias de novo, que no existían en el genoma original. Esta segunda ruta de reparación solamente opera en células que están en división. La resolución del primero de los mecanismos progresa al azar, añadiendo (insertando) y eliminando (delecionando) nucleótidos hasta que se logra alguna microhomología que permita reconstituir la continuidad física del cromosoma. Normalmente el resultado de la reparación mediante unión de extremos no homólogos es la inactivación génica, y el resultado de la reparación dirigida por homología la edición génica (5, 6, 10, 15).

Las aplicaciones de las herramientas CRISPR-Cas en biología, biotecnología y biomedicina son muy numerosas. El límite de las mismas está en la imaginación de los investigadores (15). Con ellas se pueden generar deleciones, inserciones, substituciones, inversiones, duplicaciones, traslocaciones y cualquier otro reordenamiento cromosómico que deseemos modelar en células en cultivo o en organismos vivos. La obtención de nucleasas Cas9 con los centros activos de corte de ADN mutados, en una de las cadenas, las llamadas “nicasas”, son en las dos cadenas, las llamadas Cas9 “muertas” o dCas9 (del inglés *dead Cas9*) ha abierto igualmente un campo inmenso a las modificaciones epigenéticas, al combinarlas con dominios activadores o supresores de la transcripción, o a la modificación directa de las secuencias de ADN, combinando las Cas9 modificadas con actividades químicas deaminasas, capaces de cambiar las bases nitrogenadas, de citosinas a timinas, o de adeninas a guaninas, sin necesidad de cortar el ADN, que son las variantes denominadas editores de bases. O incluso combinando las dCas9 o las nicasas con dominios de transposasas o transcriptasas reversas, para unas nucleasas Cas9 inactivadas pero con propiedades excepcionales y potencialmente muy interesantes para aplicaciones biotecnológicas o biomédicas (36, 37).

En biología, las aplicaciones de las herramientas CRISPR han permitido analizar funcionalmente el genoma no codificante, que representa la mayoría del genoma en mamíferos (alrededor del 98%), y está lleno de secuencias repetidas, elementos móviles (transposones y retrotransposones) y también de secuencias de ADN reguladoras. La presencia de repeticiones inhabilita el uso de estrategias tradicionales, basadas en recombinación homóloga, como las que les permitieron a Evans, Capecchi y Smithies desarrollar la técnica de inactivación dirigida de genes en células pluripotentes embrionales de ratón, por la que recibieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2007 (38). Sin embargo, las herramientas CRISPR-Cas apenas necesitan veinte ribonucleótidos para aparearse con los nucleótidos complementarios del gen deseado y promover el corte a través de la endonucleasa Cas9. Y si se combinan dos com-



plejos CRISPR-Cas9 para que actúen en cis se puede fomentar la delección de las secuencias que hay entre medio, siendo posible la eliminación específica de elementos reguladores, y el estudio de sus consecuencias en la expresión génica y el fenotipo del animal. Este tipo de estrategias ya ha sido aplicado con gran éxito en el estudio de los elementos reguladores del locus de la tirosinasa del genoma de ratón (39, 40, 41).

La posibilidad de inactivar múltiples genes es otra de las versatilidades de las herramientas CRISPR. Recientemente unos investigadores australianos consiguieron diseñar antídotos más efectivos contra el veneno de una medusa extremadamente venenosa, llamada avispa de mar, capaz de matar a una persona en 10 minutos al entrar en contacto con sus tentáculos. Expusieron su veneno a células humanas a las que previamente les habían transducido una biblioteca de lentivirus portadores de Cas9 y de guías ARN contra la práctica totalidad de los genes humanos (>18.000), de tal manera que cada célula tenía un gen inactivado. El veneno mató la mayoría de las células exceptuando aquellas en las que el sistema CRISPR había inactivado la ruta de entrada del veneno, lo cual posibilitó descubrir posibles antídotos (42).

Las aplicaciones de las CRISPR en investigación biomédica también han permitido generar los llamados ratones "avatar", en los que con el uso de estas herramientas de edición genética se puede reproducir exactamente la misma mutación encontrada en un paciente de una enfermedad congénita en el gen homólogo del genoma de ratón (15). Este nombre refiere a la película de ciencia ficción que con el mismo nombre dirigió James Cameron en 2009, en la que unos seres azules estaban de alguna manera conectados con las personas. El nombre avatar aprovecha la metáfora de esta conexión y con estos modelos animales se puede validar la seguridad y eficacia de tratamientos experimentales antes de exponerlos directamente a los pacientes.

En biotecnología animal las herramientas CRISPR se han utilizado ya con éxito en diversas intervenciones sobre genomas de animales de granja, para dotarles de características beneficiosas. La eliminación de un dominio del receptor CD163, que es el que usa el virus porcino del síndrome respiratorio y reproductor para entrar en las células y causar estragos en las granjas de cerdos, produce animales que ya no son infectables por este peligroso virus, que cada año provoca pérdidas millonarias en el sector (43). Una estrategia CRISPR también se usó para eliminar los retrovirus porcinos (PERV) que representan un peligro potencial en aplicaciones de xenotrasplantes. Primero en células porcinas (44) y luego directamente en animales (45) el uso de las herramientas CRISPR permitió generar cerdos carentes de PERV activos, eliminadas las 62 copias que contenían insertadas en su genoma, y, por lo tanto, más seguros para su utilización posterior en el desarrollo de xenotrasplantes.

En biotecnología vegetal la aplicación de tecnologías CRISPR ha permitido, por ejemplo, reproducir la domesticación del tomate, llevada a cabo tras siglos de mejora genética tradicional desde su variante silvestre a la especie actual, mediante la inactivación sistemática de apenas seis genes que permiten, entre otras funciones, aumentar el tamaño y el número de frutos por planta (46). En España, el investigador Francisco Barro (Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba) aplicó las herramientas CRISPR para inactivar la mayor parte de genes de las gliadinas del trigo, principal componente del gluten, y así producir un cereal con bajo contenido en gluten cuya harina y pan resultantes pueden ser consumidos por personas con celiaquía (47). También las CRISPR se han aplicado en líneas de maíz para incorporar la mutación en el gen *waxy*, lo cual produce un cereal con un mayor contenido en amilopectina, de gran valor agroeconómico e industrial (48).

Otro de los campos que ha generado grandes expectativas con la aparición de las herramientas CRISPR es el control de las enfermedades infecciosas diseminadas por insectos, mayoritariamente mosquitos, tales como la fiebre amarilla, el dengue, el virus Zika, el chikunguya, o la malaria. Las estrategias CRISPR permiten forzar una herencia supramendeliana, gracias a desarrollos de impulso génico (en inglés *gene drive*) en los que el alelo modificado codifica para su propia modificación, lo cual garantiza que ambos alelos serán modificados a pesar de que solamente se hereda un alelo modificado de uno de los progenitores. Estas alteraciones en la distribución de alelos, mediadas por CRISPR, con objeto de interferir en el ciclo vital del mosquito, ya han sido exploradas experimentalmente en mosquitos que transmiten el plasmodio, causante de la malaria (49).

Más allá de las aplicaciones CRISPR en biología y biotecnología existen grandes esperanzas para poder aplicar estas técnicas en la clínica, con un objetivo biomédico, para curar o aliviar enfermedades de base genética que son incurables hoy en día. Naturalmente la posibilidad de usar CRISPR en personas exige una seguridad y eficacia que no necesitamos en modelos animales o vegetales, y que igualmente podemos gestionar adecuadamente en todos los seres vivos, menos en seres humanos, fundamentalmente por motivos éticos. Y es precisamente en las aplicaciones biomédicas donde se ponen de manifiesto, de forma más evidente, las limitaciones actuales de la tecnología CRISPR de edición genética, que son de dos tipos: la alteración no deseada de secuencias genómicas similares a las planeadas (en inglés los efectos *off-target*), y el mosaicismo (50, 51, 52). La primera limitación no es tan importante como parece, pues existen múltiples programas bioinformáticos que nos permiten seleccionar, cada vez mejor, guías de ARN más específicas y, además, aparecen nuevas endonucleasas recombinantes con mayor especificidad (23, 24). La segunda limitación es la fuente



de mayor incertidumbre en edición genética, pues al intentar unir un corte de doble cadena de ADN los sistemas de reparación endógenos cometen errores, nunca se acuerdan de lo que han hecho con la molécula anterior y, por ello, generan una diversidad alélica y genética que aparece sistemáticamente en todo experimento de edición genética con CRISPR (39, 40). En plantas y en animales podemos segregar los alelos no deseados y las mutaciones inesperadas en otras partes del genoma mediante meiosis, mediante cruces, seleccionando entre la progenie resultante aquellas plantas o animales que porten solamente los alelos editados de interés. Pero obviamente este protocolo no lo podemos aplicar en seres humanos. Sería imprudente y éticamente inaceptable. Por ello hay que recomendar mucha cautela a la hora de aplicar estas tecnologías sobre seres humanos y, ante todo, fomentar el uso responsable de las técnicas de edición genética (53, 54, 55). Naturalmente existen también limitaciones de tipo legal que impiden, por ejemplo en España, modificar el genoma de la descendencia, al ser nuestro país signatario del Convenio de Asturias de 1997.

Desafortunadamente, el investigador chino He Jiankui, anunció en noviembre de 2018 que había editado embriones humanos con objeto de inactivar el gen que codifica el receptor CCR5, que es el que usa el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH, causante del SIDA) para entrar en los linfocitos. El irresponsable experimento se completó y los embriones humanos editados dieron lugar tres niñas, dos gemelas y otra niña, que tenían las mismas deficiencias y alteraciones inesperadas observadas en otras especies, como el ratón: mutaciones no deseadas y mosaicismos, sin posibilidad ética de gestionar esta irresponsabilidad adecuadamente. A finales de 2019, este investigador y sus colaboradores más cercanos fueron condenados a cárcel, al pago de una fuerte suma de dinero e inhabilitados de por vida, apenas un año después de conocerse el experimento. Este desafortunado experimento ilustra que no por el hecho de poder aplicar las herramientas CRISPR en muchos proyectos lo tenemos que hacer, que debemos recapacitar y, a falta de regulación específica, evitar el uso de estas herramientas en embriones humanos mientras no controlemos los resultados de la edición genética (15).

Para completar esta revisión, con motivo del Premio Nobel de Química 2020, otorgado a Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, es importante mencionar los, todavía escasos, pero incontestables éxitos que la tecnología CRISPR ha obtenido en biomedicina, en la clínica. En la actualidad (diciembre de 2020) existen más de 43 ensayos clínicos en marcha que usan las herramientas CRISPR con finalidad terapéutica y están en diferentes fases del proceso. Son fundamentalmente ensayos ex vivo, exceptuando un par in vivo. De estos últimos destaca el que se lleva a cabo en diversos hospitales de Europa y Norteamérica, encaminado a eliminar una mutación

crítica en un intrón del gen CEP290, causante de la Amaurosis Congénita de Leber de tipo 10. En este caso los pacientes, cuya degeneración progresiva de retina es irreversible, reciben una inyección intraocular y subretinal de los reactivos CRISPR-Cas incorporados en vectores virales adenoasociados (56).

En relación a los ensayos clínicos de terapia génica ex vivo hay que mencionar dos tipos de aproximaciones. En primer lugar el uso de las herramientas CRISPR de edición genética en pacientes con cáncer agresivo y refractario, resistentes a quimioterapia y radioterapia, como son el mieloma, el sarcoma y el melanoma. Recientemente hemos conocido unos resultados preliminares de una fase 1 (para evaluar seguridad) de unos pacientes a quienes se les extrajeron linfocitos que, una vez en el laboratorio, se les aplicó la tecnología CRISPR para inactivar el gen PD1 y el gen del receptor de células T, y antes de retornarlos al paciente se les añadió un nuevo receptor quimérico de células T dirigido contra antígenos de membrana de las células cancerosas (57). Y, el mayor éxito de todos, la terapia que acabamos de conocer para enfermos de anemia falciforme y beta talasemias, enfermedades graves de la sangre que requieren transfusiones constantes y comprometen la vida de los afectados. En estos casos el gen de la beta-globina está mutado pero se reactiva la copia fetal de la gamma-globina, intacta, que reemplaza la beta-globina mutada, gracias a reducir significativamente la expresión del gen del represor *BCL11*, que mantiene la copia fetal inactiva en adultos, mediante el uso de una estrategia CRISPR que permite eliminar el potenciador transcripcional del gen *BCL11* (58). El gen no se puede eliminar por completo pues es necesario para el desarrollo y la diferenciación de otros tipos celulares del sistema hematopoyético. En la mayoría de estos casos se utilizan virus adenoasociados (AAV) para vehicular los reactivos CRISPR-Cas a la célula o tejido diana, sin embargo existe también la posibilidad de usar nanopartículas para dirigir las herramientas CRISPR y todos sus componentes al lugar adecuado del cuerpo mediante nanotecnología (59).

4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El Premio Nobel de Química 2020, otorgado merecidamente a Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, reconoció la visión que tuvieron al plantear, en junio de 2012, que un sistema de defensa antiviral bacteriano pudiera convertirse en una eficaz y precisa herramienta de edición genética, como así ha sido. Este galardón deja fuera a muchos otros investigadores que contribuyeron significativamente a establecer la tecnología CRISPR o que, mediante la investigación básica, sentaron las bases del origen y la función de los sistemas CRISPR en procariotas, como el microbiólogo español Francis Mojica.



Son muchas las aplicaciones de la tecnología CRISPR en biología, biotecnología y biomedicina, y muchos más los usos que veremos de este revolucionario método en un futuro próximo. Estos métodos han cambiado cómo se hacen los experimentos de modificación genética en los laboratorios de biología molecular de todo el mundo. Y, gracias a su facilidad y asequibilidad, permiten avanzar a un gran número de laboratorios de muchos países que tradicionalmente se quedaban atrás con otras tecnologías que requerían equipamientos más sofisticados. También es oportuno resaltar la capacidad de adaptación de los métodos CRISPR, que pueden aplicarse para cualquier objetivo que persiga detectar, marcar o alterar cualquier material genético, sea ADN o ARN. Quizás la mejor prueba de la versatilidad de las herramientas CRISPR la tenemos en cómo han surgido aplicaciones relativas a la pandemia COVID-19, causada por el coronavirus SARS-CoV-2, tanto para diagnosticar la presencia del virus mediante métodos alternativos, basados en CRISPR (60, 61), el último de ellos desarrollado por el laboratorio de Jennifer Doudna (62), como para usar estas mismas herramientas como verdaderos antivirales, con variantes específicas de nucleasas Cas, como la Cas13d, capaz de cortar específicamente ARN y con ello degradar el genoma del coronavirus y de otros virus con genoma de ARN como el de la gripe (63).

5. REFERENCIAS

1. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337:816-21.
2. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 2008; 321:960-4.
3. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pizada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 2011; 471:602-7.
4. Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, Anders C, Hauer M, Zhou K, Lin S, Kaplan M, Iavarone AT, Charpentier E, Nogales E, Doudna JA. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science* 2014; 343:1247997.
5. Charpentier E, Doudna JA. Biotechnology: Rewriting a genome. *Nature* 2013; 495:50-1.
6. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014; 346:1258096.
7. Bosley KS, Botchan M, Bredenoord AL, Carroll D, Charo RA, Charpentier E, Cohen R, Corn J, Doudna J, Feng G, Greely HT, Isasi R, Ji W, Kim JS, Knoppers B, Lanphier E, Li J, Lovell-Badge R, Martin GS, Moreno J, Nalini L, Pera M, Perry AC, Venter JC, Zhang F, Zhou Q. CRISPR germline engineering--the community speaks. *Nat Biotechnol.* 2015; 33:478-86.
8. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; 339:819-23.
9. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013; 339:823-6.
10. Seruggia D, Montoliu L. The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. *Transgenic Res.* 2014; 23:707-16.
11. Mojica FJM, Montoliu L. On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends Microbiol.* 2016; 24:811-20.
12. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987; 169:5429-33.
13. Hermans PW, van Soolingen D, Bik EM, de Haas PE, Dale JW, van Embden JD. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect Immun.* 1991; 59:2695-705.
14. Mojica FJ, Juez G, Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol.* 1993; 9:613-21.
15. Montoliu L. Editando genes: recorta, pega y coloreas. Las maravillosas herramientas CRISPR. 2ª edición, NextDoor Publishers, Pamplona, 2020.
16. Mojica FJ, Ferrer C, Juez G, Rodríguez-Valera F. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol Microbiol.* 1995; 17:85-93.
17. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol.* 2000; 36:244-6.
18. Jansen R, Embden JD, Gastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 2002; 43:1565-75.
19. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol.* 2005; 60:174-82.
20. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007; 315:1709-12.
21. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence

- system. *Microbiology* 2009; 155:733-40.
22. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 2005; 151:2551-61.
23. Oliveros JC, Franch M, Tabas-Madrid D, San-León D, Montoliu L, Cubas P, Pazos F. Breaking-Cas-interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44:W267-71.
24. Torres-Perez R, Garcia-Martin JA, Montoliu L, Oliveros JC, Pazos F. We-Review: CRISPR Tools-Live Repository of Computational Tools for Assisting CRISPR/Cas Experiments. *Bioengineering (Basel)* 2019; 6:63.
25. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* 2008; 322:1843-5.
26. Wiedenheft B, Zhou K, Jinek M, Coyle SM, Ma W, Doudna JA. Structural basis for DNase activity of a conserved protein implicated in CRISPR-mediated genome defense. *Structure* 2009; 17:904-12.
27. Haurwitz RE, Jinek M, Wiedenheft B, Zhou K, Doudna JA. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science* 2010; 329:1355-8.
28. Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 2010; 468:67-71.
29. Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39:9275-82.
30. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109:E2579-86.
31. Josa S, Seruggia D, Fernández A, Montoliu L. Concepts and tools for gene editing. *Reprod Fertil Dev.* 2016; 29:1-7.
32. Fernández A, Josa S, Montoliu L. A history of genome editing in mammals. *Mamm. Genome.* 2017; 28:237-46.
33. Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2013; 2:e00471.
34. Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 2013; 153:910-8.
35. Mok BY, de Moraes MH, Zeng J, Bosch DE, Kotrys AV, Raguram A, Hsu F, Radey MC, Peterson SB, Mootha VK, Mougous JD, Liu DR. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. *Nature* 2020; 583:631-37.
36. Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature* 2020; 578:229-36.
37. Anzalone AV, Koblan LW, Liu DR. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol.* 2020; 38:824-44.
38. Montoliu L. La modificación genética dirigida en ratones es premiada con el Nobel de Fisiología o Medicina de 2007. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 2008; 4:81-99.
39. Seruggia D, Fernández A, Cantero M, Pelczar P, Montoliu L. Functional validation of mouse tyrosinase non-coding regulatory DNA elements by CRISPR-Cas9-mediated mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43:4855-67.
40. Seruggia D, Fernández A, Cantero M, Fernández-Mián A, Gomez-Skarmeta JL, Pelczar P, Montoliu L. Boundary sequences flanking the mouse tyrosinase locus ensure faithful pattern of gene expression. *Sci Rep.* 2020; 10:15494.
41. Seruggia D, Josa S, Fernández A, Montoliu L. The structure and function of the mouse tyrosinase locus. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2020 Oct 23. doi: 10.1111/pcmr.12942.
42. Lau MT, Manion J, Littleboy JB, Oyston L, Khuong TM, Wang QP, Nguyen DT, Hesselton D, Seymour JE, Neely GG. Molecular dissection of box jellyfish venom cytotoxicity highlights an effective venom antidote. *Nat Commun.* 2019; 10:1655.
43. Burkard C, Opriessnig T, Mileham AJ, Stadejek T, Ait-Ali T, Lillico SG, Whitelaw CBA, Archibald AL. Pigs Lacking the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain 5 of CD163 Are Resistant to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 Infection. *J Virol.* 2018; 92:e00415-18.
44. Yang L, Güell M, Niu D, George H, Lesha E, Grishin D, Aach J, Shrock E, Xu W, Poci J, Cortazio R, Wilkinson RA, Fishman JA, Church G. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science* 2015; 350:1101-4.
45. Niu D, Wei HJ, Lin L, George H, Wang T, Lee IH, Zhao HY, Wang Y, Kan Y, Shrock E, Lesha E, Wang G, Luo Y, Qing Y, Jiao D, Zhao H, Zhou X, Wang S, Wei H, Güell M, Church GM, Yang L. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science* 2017; 357:1303-7.
46. Zsögön A, Čermák T, Naves ER, Notini MM, Edel KH, Weinl S, Freschi L, Voytas DF, Kudla J, Peres LEP. De novo domestication of wild tomato using genome editing. *Nat Biotechnol.* 2018 Oct 1. doi: 10.1038/nbt.4272.
47. Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Giménez MJ, Sousa C, Voytas DF, Barro F. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J.* 2018; 16:902-10.
48. Gao H, Gadlage MJ, Lafitte HR, Lenderts B, Yang M, Schroder M, Farrell J, Snopek K, Peterson D, Feigenbutz L, Jones S, St Clair G, Rahe M, Sanyour-Doyel N, Peng C, Wang L, Young JK, Beatty M, Dahlke B, Hazebroek J, Greene TW, Cigan AM, Chilcoat ND, Meeley RB. Superior field performance of waxy corn engineered using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol.* 2020; 38:579-81.



49. Kyrou K, Hammond AM, Galizi R, Kranjc N, Burt A, Beaghton AK, Nolan T, Crisanti A. A CRISPR-Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Nat Biotechnol.* 2018; 36:1062-6.
50. Harms DW, Quadros RM, Seruggia D, Ohtsuka M, Takahashi G, Montoliu L, Gurumurthy CB. Mouse Genome Editing Using the CRISPR/Cas System. *Curr Protoc Hum Genet.* 2014 Oct 1;83:15.7.1-27.
51. Muñoz-Santos D, Montoliu L, Fernández A. Generation of Genetically Modified Mice Using CRISPR/Cas9. *Methods Mol Biol.* 2020; 2110:129-38.
52. Fernández A, Morín M, Muñoz-Santos D, Josa S, Montero A, Rubio-Fernández M, Cantero M, Fernández J, Del Hierro MJ, Castrillo M, Moreno-Pelayo MÁ, Montoliu L. Simple Protocol for Generating and Genotyping Genome-Edited Mice With CRISPR-Cas9 Reagents. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2020 Mar;10(1):e69.
53. Chneiweiss H, Hirsch F, Montoliu L, Müller AM, Fenet S, Abecassis M, Merchant J, Baertschi B, Botbol-Baum M, Houghton JA, Kritikos M, Mifsud J, Bartnik E, Rath J, Druml C, Friedrich B, Carvalho AS, Lanzerath D, Saint-Raymond A. Fostering responsible research with genome editing technologies: a European perspective. *Transgenic Res.* 2017; 26:709-13.
54. Montoliu L, Merchant J, Hirsch F, Abecassis M, Jouannet P, Baertschi B, Sarrauste de Menthère C, Chneiweiss H. ARRIGE Arrives: Toward the Responsible Use of Genome Editing. *CRISPR J.* 2018; 1:128-9.
55. Hirsch F, Lemaitre C, Chneiweiss H, Montoliu L. Genome Editing: Promoting Responsible Research. *Pharmaceut Med.* 2019; 33:187-91.
56. Maeder ML, Stefanidakis M, Wilson CJ, Baral R, Barrera LA, Bounoutas GS, Bumcrot D, Chao H, Ciulla DM, DaSilva JA, Dass A, Dhanapal V, Fennell TJ, Friedland AE, Giannoukos G, Gloskowski SW, Glucksmann A, Gotta GM, Jayaram H, Haskett SJ, Hopkins B, Horng JE, Joshi S, Marco E, Mepani R, Reyon D, Ta T, Tabbaa DG, Samuelsson SJ, Shen S, Skor MN, Stetkiewicz P, Wang T, Yudkoff C, Myer VE, Albright CF, Jiang H. Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nat Med.* 2019; 25:229-33.
57. Stadtmayer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, Mangan PA, Kulikovskaya I, Gupta M, Chen F, Tian L, Gonzalez VE, Xu J, Jung IY, Melenhorst JJ, Plesa G, Shea J, Matlawski T, Cervini A, Gaymon AL, Desjardins S, Lamontagne A, Salas-Mckee J, Fesnak A, Siegel DL, Levine BL, Jadowsky JK, Young RM, Chew A, Hwang WT, Hexner EO, Carreno BM, Nobles CL, Bushman FD, Parker KR, Qi Y, Satpathy AT, Chang HY, Zhao Y, Lacey SF, June CH. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science* 2020; 367:eaba7365.
58. Haydar Frangoul, M.D., David Altshuler, M.D., Ph.D., M. Domenica Cappellini, M.D., Yi-Shan Chen, Ph.D., Jennifer Domm, M.D., Brenda K. Eustace, Ph.D., Juergen Foell, M.D., Josu de la Fuente, M.D., Ph.D., Stephan Grupp, M.D., Ph.D., Rupert Handgretinger, M.D., Tony W. Ho, M.D., Antonis Kattamis, M.D., Andrew Kernysky, Ph.D., Julie Lekstrom-Himes, M.D., Amanda M. Li, M.D., Franco Locatelli, M.D., Markus Y. Mapara, M.D., Ph.D., Mariane de Montalembert, M.D., Damiano Rondelli, M.D., Akshay Sharma, M.B., B.S., Sujit Sheth, M.D., Sandeep Soni, M.D., Martin H. Steinberg, M.D., Donna Wall, M.D., Angela Yen, Ph.D., and Selim Corbacioglu, M.D. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *New England Journal of Medicine*, December 5, 2020, DOI: 10.1056/NEJMoa2031054
60. Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, Miao X, Streithorst JA, Granados A, Sotomayor-Gonzalez A, Zorn K, Gopez A, Hsu E, Gu W, Miller S, Pan CY, Guevara H, Wadford DA, Chen JS, Chiu CY. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol.* 2020; 38:870-4.
61. Joung J, Latha A, Saito M, Kim NG, Woolley AE, Segel M, Barretto RPJ, Ranu A, Macrae RK, Faure G, Ioannidi EI, Krajeski RN, Bruneau R, Huang MW, Yu XG, Li JZ, Walker BD, Hung DT, Greninger AL, Jerome KR, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F. Detection of SARS-CoV-2 with SHERLOCK One-Pot Testing. *N Engl J Med.* 2020; 383:1492-4.
62. Fozouni P, Son S, Díaz de León Derby M, Knott GJ, Gray CN, D'Ambrosio MV, Zhao C, Switz NA, Kumar GR, Stephens SI, Boehm D, Tsou CL, Shu J, Bhuiya A, Armstrong M, Harris AR, Chen PY, Osterloh JM, Meyer-Franke A, Joehnk B, Walcott K, Sil A, Langelier C, Pollard KS, Crawford ED, Puschnik AS, Phelps M, Kistler A, DeRisi JL, Doudna JA, Fletcher DA, Ott M. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy. *Cell* 2020; S0092-8674(20)31623-8. doi: 10.1016/j.cell.2020.12.001.
63. Abbott TR, Dhamdhare G, Liu Y, Lin X, Goudy L, Zeng L, Chemparathy A, Chmura S, Heaton NS, Debs R, Pande T, Endy D, La Russa MF, Lewis DB, Qi LS. Development of CRISPR as an Antiviral Strategy to Combat SARS-CoV-2 and Influenza. *Cell* 2020; 181:865-76.

Agradecimientos

Quiero agradecer y dedicar este artículo a Francisco Juan Martínez Mojica, por todo su trabajo de investigación básica llevado a cabo desde la Universidad de Alicante, que permitió avanzar a otros muchos investigadores y posibilitó la aparición de estas herramientas CRISPR de edición genética que hoy todos disfrutamos.

Si desea citar nuestro artículo:

Juan Ramón Lacadena, Pablo Gastaminza, Lluís Montoliu

Sesión científica celebrada el 26 de noviembre de 2020 para conmemorar los premios Nobel en fisiología o medicina y en química 2020

An. Real Acad. Farm. [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 86. Nº 4 (2020) : pp. 287 - 310

DOI: http://

