

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

VOLUMEN 87. NÚMERO 1 (2021) · ENERO-MARZO
ACCESO ABIERTO





ANALES

RANF

REAL ACADEMIA
NACIONAL DE FARMACIA

REVISTA CIENTÍFICA

AÑO 2021 · NÚMERO 01

DOI:

DEPÓSITO LEGAL: M. 3.869-1958

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

VOLUMEN 87. NÚMERO 1 (2021) · ENERO - MARZO

SUMARIO

EDITORIAL

COMIENZA 2021. EL AÑO DE LOS RETOS
ANTONIO L. DOADRIO VILLAREJO

ARTÍCULO. FIGURAS DE LA CIENCIA

VINCULACIÓN DEL VIRÓLOGO PROFESOR ADOLFO GARCÍA SASTRE
CON LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y CON LA
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
J. ANTONIO CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO Y MARIANO ESTEBAN RODRÍGUEZ

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

EL TRATAMIENTO CON SOFOSBUVIR MEJORA LA RESISTENCIA A LA
INSULINA INDUCIDA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C
ESTHER REY, PATRICIA MARAÑÓN Y ÁGUEDA GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ

PERFILES DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS EN CEPAS
DEL GENERO *BACILLUS* AISLADAS DE AMBIENTES
ACUÁTICOS EXTREMOS DEL ECUADOR
MARCO GONZÁLEZ, FRANCISCO VITERI, LUIS VILLACIS,
SANDRA ESCOBAR, LILIANA ARAUJO, ANA GONZÁLEZ,
GERADO MEDINA, JUDITH ARAQUE Y FELIX ANDUEZA

REVISIONES

SISTEMAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA DE OPIOIDES:
ANALGESIA Y DEPENDENCIA
ALEXANDRE PÉREZ-LÓPEZ, A, LAURA GÓMEZ-LÁZARO,
A, CRISTINA MARTÍN-SABROSO, JUAN APARICIO-BLANCO

DETERGENTES: DE LOS PRINCIPIOS FÍSICOS A LAS APLICACIONES
BIOFARMACÉUTICAS (O POR QUÉ PREVENIMOS
LA COVID-19 CON AGUA Y JABÓN
FÉLIX M. GOÑI Y ALICIA ALONSO

PRODUCTOS NATURALES: DE LA MEDICINA TRADICIONAL A CABEZAS DE
SERIE PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS DEL SIGLO XXI
BEATRIZ DE LAS HERAS POLO

OTROS ARTÍCULOS

OFICINA DE FARMACIA. ATENCIÓN FARMACÉUTICA.
SERVICIO PERSONALIZADO DE DOSIFICACIÓN
TERESA GIL ALEGRE



imagen de cubierta y portada: www.pixabay.com.
Vista del lago craterico volcánico "Quilotoa"



**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.

Revistas editada por:

REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA
Calle de la Farmacia, 9-11 (Madrid)
Teléfonos: 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

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

Consejo Editorial

Tamargo Menéndez, Juan

Mayor Zaragoza, Federico

Rodríguez Artalejo, Antonio

Puerto Sarmiento, Javier

García Sacristán, Albino

Vilas Sánchez, Vicente

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

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

Gómez-Serranillos Cuadrado, M^a Pilar

González Bueno, Antonio I.

Comité Científico Internacional

Prof. Aquiles Arancibia Orrego (Chile)

Prof. Lucette Bardet (Francia)

Kazuhiro Imai (Japón)

Fernando Quevedo Ganoza (Perú)

Vicenzo Tortorella (Italia)

Bernard Portha (Francia)

Joaquim Alexandre Ribeiro (Portugal)

Herbert Zimmermann (Alemania)

Adolfo Pérez Miravete (Méjico)

Carl - Göran Eden (Suecia)

ÍNDICE

EDITORIAL

p. 07

COMIENZA 2021. EL AÑO DE LOS RETOS

ANTONIO L. DOADRIO VILLAREJO

ARTÍCULO. FIGURAS DE LA CIENCIA

p. 09

VINCULACIÓN DEL VIRÓLOGO PROFESOR ADOLFO GARCÍA SASTRE

CON LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y CON LA

REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

J. ANTONIO CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO Y MARIANO ESTEBAN RODRÍGUEZ

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

p. 15

EL TRATAMIENTO CON SOFOSBUVIR MEJORA LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

ESTHER REY, PATRICIA MARAÑÓN Y ÁGUEDA GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ

p. 27

PERFILES DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS EN CEPAS DEL GENERO *BACILLUS* AISLADAS DE AMBIENTES

ACUÁTICOS EXTREMOS DEL ECUADOR

MARCO GONZÁLEZ, FRANCISCO VITERI, LUIS VILLACIS, SANDRA ESCOBAR, LILIANA ARAUJO, ANA GONZÁLEZ,

GERADO MEDINA, JUDITH ARAQUE Y FELIX ANDUEZA

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

p. 35

SISTEMAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA DE OPIOIDES: ANALGESIA Y DEPENDENCIA

ALEXANDRE PÉREZ-LÓPEZ, A, LAURA GÓMEZ-LÁZARO, A, CRISTINA MARTÍN-SABROSO, JUAN APARICIO-BLANCO

p. 53

DETERGENTES: DE LOS PRINCIPIOS FÍSICOS A LAS APLICACIONES BIOFARMACÉUTICAS (O POR QUÉ PREVENIMOS

LA COVID-19 CON AGUA Y JABÓN

FÉLIX M. GOÑI Y ALICIA ALONSO

p. 97

PRODUCTOS NATURALES: DE LA MEDICINA TRADICIONAL A CABEZAS DE SERIE PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS DEL SIGLO XXI

BEATRIZ DE LAS HERAS POLO

OTROS ARTÍCULOS

p. 105

OFICINA DE FARMACIA. ATENCIÓN FARMACÉUTICA. SERVICIO PERSONALIZADO DE DOSIFICACIÓN

TERESA GIL ALEGRE

2021. EL AÑO DE LOS RETOS

2021. YEAR OF CHALLENGES

Antonio Luis Doadrio Villarejo

Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia

*corresponding author: anales@ranf.com

EDITORIAL

Hoy cerramos el curso académico 2020 y abrimos el 2021 de la RANF.

No hace falta decir que el curso 2020 ha sido atípico, condicionado por la pandemia COVID-19. Todos deseamos un año 2021 mejor, como es habitual al comenzar un nuevo año, pero la pandemia ha entrado en una tercera ola en España lo que, sumado a la tormenta de nieve de la semana pasada, que tiene aislados a numerosas poblaciones y que provoca grandes dificultades en la Capital, no parece augurar nada bueno.

Hay mucha desolación, preocupación e incluso ansiedad provocada por una pandemia de un virus letal y que, en los casos de pacientes recuperados, deja secuelas que pueden ser de por vida. Hay verdadera obsesión, en la mayoría de la población, a contagiarse.

Se ha perdido la alegría, el contacto social que tanto identifica a nuestro país. No podemos besar, abrazar, ni tan quisiera dar la mano, lo que para nosotros ha sido vital desde que nacemos. Nuestras costumbres, se han paralizado o disminuido. Los bares y restaurantes, a los que somos muy aficionados y vitales para nuestros encuentros sociales, se encuentran al 30% de su capacidad o cerrados. No nos dejan reunarnos a más de 6 personas en nuestro domicilio y en las mesas de los restaurantes no más de 4. Ni siquiera podemos estar en una barra del bar tomando el tradicional aperitivo. Familias en la lejanía, amigos que no vemos, cafeterías a las que no podemos acceder en nuestra Facultad y que antes eran lugar de cita obligada con los colegas para tomar un café y comentar como iba nuestra investigación. No podemos asistir al fútbol ni a los toros. Ver el salón de actos de nuestra Academia vacío, el concierto de Navidad, marcha Radetzky incluida, sin público, resulta muy desolador. Y así, un largo etc.

Pero, hay esperanza. Y no solo me refiero a las vacunas que están llegando y que tardaran en surtir el efecto deseado, pues somos muchos a vacunar en todo el Mundo, para llegar a la llamada "inmunidad de rebaño". Me refiero a los profesionales sanitarios, cuerpos de seguridad de Estado, UME, protección civil

y a todos aquellos que han prestado un servicio impagable a la sociedad en todo momento, en especial en los momentos más duros de marzo a mayo del año pasado. Esta Real Academia, ha concedido al CGCOF su medalla en reconocimiento al trabajo y sacrificio realizado durante esos duros momentos y que, algunos farmacéuticos han pagado con sus propias vidas. También, hemos concedido una placa a COFARES, la distribuidora de medicamentos más importante de España que, no ha dejado desatendida a ninguna farmacia durante los momentos más duros de la crisis, llegando hasta el pueblo más recóndito.

Asimismo, me refiero a esos héroes anónimos que, durante la grave situación creada por la reciente borrasca, han ofrecido sus coches 4×4 para llevar personalmente a los enfermos a los hospitales y para cualquier otra situación de emergencia, siendo un ejemplo de solidaridad humana. Lástima, eso sí, de que se vea empañada una acción tan altruista por un grupo que, aunque minoritario, de bárbaros sean capaces de vandalizar a esos coches en actos tan repudiables.

He visto también a tractoristas remolcando con sus tractores a camiones atrapados por la intensa nevada, rescates que parecían imposibles y que, a riesgo de sus propias vidas, han realizado ciudadanos tan ejemplares.

Todo ello, nos debe hacer felices, porque de esta manera, ayudándonos y dando cariño, podemos salir de cualquier crisis y aliviarnos de la plaga que estamos sufriendo.

Al margen de la pandemia, nuestra Academia ha sufrido la pérdida de 10 compañeros académicos, 4 de número y 6 correspondientes, en uno de los peores años de nuestra historia reciente.

También se ha visto afectada por las restricciones impuestas por el Gobierno de España ante la crisis creada por la pandemia. Hemos tenido que cerrar nuestra sede y trabajar desde nuestros domicilios, tanto el personal administrativo como la Junta de Gobierno. A pesar de todo, hemos mantenido el pulso de la Academia, como explicará el académico secretario en su intervención. En cierto modo, las reuniones por videoconferencia



han facilitado encuentros con la administración del Estado. Así, la RANF ha desarrollado una intensa actividad durante los momentos de mayor crisis. En abril del año pasado, escribí una carta dirigida al Ministro de Sanidad, Salvador Illa, con copia a la Casa Real y al Ministro de Ciencia e Innovación, Pedro Duque, del que dependemos administrativamente y con la autorización de nuestra Junta de Gobierno, en la que se defendía el elevadísimo grado de implicación de la profesión farmacéutica en todas las acciones sanitarias impactadas por la pandemia y le ofrecíamos nuestro apoyo y colaboración. Fruto de ello, fui convocado por el Ministro de Sanidad a una reunión telemática, donde quería saber la situación actual y futura de los farmacéuticos españoles y las posibilidades de colaboración que le ofreció esta Academia. La videoconferencia se celebró el 27 de mayo, con la presencia del propio ministro y de ellos directores generales de ordenación profesional, Agencia Española de Medicamentos y productos Sanitarios y de Salud Pública. En esa reunión, de la que tuvo conocimiento la Casa Real y de la que fue felicitada por el Rey de España, se abordó el constituir una mesa de trabajo para avanzar en la desescalada de la COVID19. Esta mesa, se reunió posteriormente el 15 de junio, con la asistencia de la directora de la Agencia Española del Medicamento, M^a Jesús Lamas Díaz y los directores generales de la Cartera Común de Servicios del SNS y Farmacia, Patricia Lacruz Gimeno y de Ordenación Territorial, Rodrigo Gutiérrez concluyendo con el compromiso de que un miembro de nuestra Academia, M^a José Alonso Fernández, entrase dentro de las mesas de trabajo de la Agencia Española del Medicamento.

Por otro lado, hemos firmado convenios de colaboración muy interesantes durante el curso pasado, de los que dará cuenta el Académico Secretario. No obstante, quisiera destacar el firmado con el Instituto de Salud Carlos III que, junto a la colaboración con el Ministerio de Sanidad, esencialmente con la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, supone un hito inédito en esta Academia en el ámbito sanitario al máximo nivel de la administración del Estado. Los convenios firmados con los máximos representantes de la profesión farmacéutica, los de la industria farmacéutica (FARMA INDUSTRIA, GSK), Fundación Otimes y las estrechas colaboraciones que mantenemos con la farmacia hospitalaria, distribución farmacéutica (COFARES), sanidad privada (ASISA), farmacia militar y otras, van cumpliendo el objetivo marcado en mi discurso de inauguración del curso 2020, abriendo esta Institución a la familia farmacéutica y a la sociedad en general. Tenemos así, nuevos patrocinadores para nuestro concurso científico y la creación de nuevas cátedras que financiaran nuestras actividades. La cátedra dedicada a nuestro compañero Juan Manuel Reol Tejada, ha sido una de las más queridas para nosotros, por lo que sentimentalmente representa.

Tenemos que ser el pegamento aglutinante, junto al Consejo General de Colegios farmacéuticos de España, en esta vía de unidad entre los distintos estamentos farmacéuticos, porque será en beneficio de la sociedad a la que servimos. Agradezco a su presidente Jesús Aguilar la labor que está haciendo en este sentido, así como su liderazgo en este proceso.

En base a ello, el 22 de diciembre, se constituyó en la sede del CGCOF, la mesa de la profesión farmacéutica, de la que formarán parte, además del propio CGCOF y nuestra Institución, la Conferencia de Decanos de Farmacia, la Federación Española de Estudiantes de Farmacia, la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH), la Sociedad Española de Farmacéuticos de Atención Primaria (SEFAP), la Sociedad Española de Farmacia Clínica, Familiar y Comunitaria (SEFAC), la Sociedad Española de Farmacia Rural (SEFAR), Fundación Pharmaceutical Care, la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), la Asociación Española de Laboratorio Clínico (AEFA), la Federación Empresarial de Farmacéuticos Españoles (FEFE) y la Federación de Distribuidores Farmacéuticos (FEDIFAR).

De esta manera, la crisis de la COVID-19, nos da la oportunidad a los farmacéuticos españoles de trabajar unidos para construir un brillante futuro.

Asimismo, fui invitado como presidente de la RANF, a participar como jurado en los premios Panorama del medicamento 2020.

Hemos realizado las reuniones de la mesa del Instituto de España con regularidad, presenciales y telemáticas, manteniendo una relación muy fluida con el Ministerio de Ciencia e Innovación, a través, sobre todo, del subsecretario Pablo Martín, fruto de la cual ha sido el incremento de nuestras subvenciones en un 10% dentro de los presupuestos de este año y, sobre todo, el reconocimiento por parte del ministerio de la importante labor que realizan las RRAA del IE, construyendo una sólida relación entre éstas y la administración del Gobierno de España, lo que está llevando a una mayor difusión de nuestras actividades dentro de la web del Ministerio de Ciencia e Innovación. El objetivo, es contribuir a una transmisión de nuestra labor a la sociedad civil.

Igualmente, el 10 de noviembre asistí, en representación de la Academia, al coloquio "Ciencia e innovación con perspectiva de género", invitado por la secretaria del ministro de Ciencia e Innovación y que fue presidida por el propio ministro, Pedro Duque, así como a la inauguración del curso de las RRAA del IE, en la sede de la RAE, presidida por el Rey de España Felipe VI.

He dicho.

VINCULACIÓN DEL VIRÓLOGO PROFESOR ADOLFO GARCÍA SASTRE CON LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y CON LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

RELATIONSHIP OF THE VIROLOGIST PROFESSOR ADOLFO GARCÍA SASTRE WITH THE UNIVERSITY OF SALAMANCA AND THE ROYAL NATIONAL ACADEMY OF PHARMACY

José Antonio Cabezas Fernández del Campo¹, Mariano Esteban Rodríguez²

¹Catedrático Emérito de Bioquímica y Biología Molecular. Ex-Vicerrector de Investigación de la Universidad de Salamanca

²Profesor Ad Honorem del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Académico y Ex-Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España

corresponding author: jacabezasfde@movistar.es

ARTÍCULO sobre FIGURAS DE LA CIENCIA

RESUMEN

Se detallan y comentan algunos datos biográficos relativos al virólogo Profesor Adolfo García Sastre correspondientes a su etapa como estudiante en la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, durante los cursos finales de su Licenciatura (años 1981-1986), así como a los siguientes en que realizó su Tesis de Licenciatura (Tesina) en 1986, y Doctorado (1986-1990), en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de dicha Facultad (Director: Prof. J.A. Cabezas); habiendo obtenido en ambas las máximas calificaciones y el Premio Extraordinario en la de Doctorado. También se resumen las líneas de investigación que cultivó en Salamanca hasta 1991 en colaboración con el director de ambas Tesis (el Profesor Titular Enrique Villar), el Profesor J.A. Cabezas y, a veces, otros. Los resultados obtenidos, así como los derivados de su breve etapa inmediata en el Instituto Pasteur de París, en coordinación con el Departamento salmantino, fueron publicados en revistas de Virología o de Bioquímica de gran prestigio y presentados en congresos nacionales e internacionales. Posteriormente, en su etapa americana en el *Mount Sinai* de Nueva York, entró en contacto con el Profesor Mariano Esteban, entonces trabajando en el *Downstate Medical Center de New York*, SUNY, y ambos, conjuntamente con el grupo del *New York University* (NYU) dirigido por Ruth Nussenzweig y Fidel Zavala, llevaron a cabo experimentos seminales de inmunología que abrieron las bases a la combinación de vacunas en protocolos *prime/boost* y activación de linfocitos TCD8+ con resultado de alta eficacia frente a patógenos. Estos protocolos están siendo implementados en numerosos ensayos preclínicos y clínicos. La contribución del Prof. García Sastre a la ciencia está actualmente en fase exponencial, abriendo nuevos horizontes en el entendimiento de la biología molecular de virus emergentes, su patología, interacción virus-hospedador y desarrollando nuevos procedimientos de control viral.

ABSTRACT

We give some biographical details of the virologist Professor Adolfo Garcia Sastre, as a Graduate student (1981-1986) in the Biology School of University of Salamanca and during his PhD Thesis (1986-1990) in the Department of Biochemistry and Molecular Biology (Chairman Prof J.A. Cabezas), under the supervision of Prof. Enrique Villar and obtaining the highest academic marks. The research lines that he established in collaboration with his Thesis director, with Prof. J.A Cabezas and others, as well as his results during his stay at the Pasteur Institute in Paris, are also highlighted. His findings in this period were published in prestigious Virology and Biochemistry journals and presented at national and international meetings. Thereafter, when he moved to Mount Sinai in New York, he met Prof Mariano Esteban, then working at Downstate Medical Center in New York, SUNY, and both, in collaboration with the group of Prof. Ruth Nussenzweig and Fidel Zavala at New York University, set up seminal immunological studies that are the basis for combined vaccination approaches, prime/boost and activation of CD8+ T cells, now widely used in preclinical and clinical studies. The scientific research contributions of Prof. García Sastre are growing at an exponential rate, opening new horizons in understanding the molecular biology of emerging viruses, their pathology, virus-host cell interactions and strategies of virus control.

Palabras Clave:

Adolfo García Sastre
Universidad de Salamanca
Real Academia Nacional de Farmacia

Keywords:

Adolfo García Sastre
University of Salamanca
Royal National Academy of Pharmacy



1. ANTECEDENTES. EL ALUMNO Y DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA ADOLFO GARCÍA SASTRE

Es sabido que para luchar contra enfermedades producidas por virus se han venido empleando, ya desde hace años, con gran eficacia, vacunas antivirales. Mediante ellas se logra combatir a los virus y evitar su propagación, causante de nuevas víctimas. Además, se ha buscado la curación de los enfermos usando fármacos adecuados. Pero en casos como el de la actual pandemia que estamos padeciendo, provocada por el virus SARS-CoV-2, los éxitos con tratamientos que intentan ser curativos han sido, hasta la fecha, muy limitados, principalmente por las peligrosas características de un virus de reciente aparición. Afortunadamente, se dispone de varias vacunas eficaces, producidas por diversas empresas farmacéuticas de distintos países y pronto llegarán otras que se están ya ensayando preliminarmente también en centros de investigación como el CSIC en España.

La publicación en el mes de enero último, en la prestigiosa revista *Science*, de un artículo del que es coautor el actual Profesor universitario en Nueva York Adolfo García Sastre, relativo a trabajos en los que él participa sobre un futuro medicamento que ha dado en los ensayos experimentales resultados muy esperanzadores en la lucha contra este virus, ha despertado un enorme y justificado interés mundial.

¿Qué vinculación existe entre el Prof. García Sastre y la Universidad de Salamanca?

Veamos abreviadamente algunos datos (1):

En 1981, el joven Adolfo inició su formación científica en la prestigiosa Facultad de Biología salmantina, cursando los cinco años de la Licenciatura (1981-1986) con altas calificaciones. Mostró predilección por las asignaturas de Bioquímica I (o Estructural), Bioquímica II (o Metabólica) y Biología Molecular, enseñadas en dicha Facultad por la cátedra de Bioquímica; también encargada de la enseñanza de la Biología Molecular.

Esta cátedra (que puede considerarse como la primera estrictamente de este nombre en la ocho veces centenaria Universidad salmantina) fue dotada en 1968 por la acertada política de potenciación de la Ciencia desarrollada por el Ministro Don Manuel Lora Tamayo, Químico y Farmacéutico, quién en la década de 1960 creó numerosas Secciones de Ciencias Biológicas (enseguida convertidas en Facultades de Biología). Por orden ministerial de 24-IV-1969 la ocupó, por concurso de traslado, el ya Catedrático (desde hacía casi 10 años) de Bioquímica Estática y Dinámica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela, Prof. José A. Cabezas Fernández del Campo (2).

Ya en el último año de carrera, García Sastre comenzó su aprendizaje investigador bajo la dirección del entonces Profesor Ti-

tular (luego Catedrático) Don Enrique Villar Ledesma, quién le guió en la realización de la Tesis de Licenciatura ("Tesina"), presentada con el título de: "Estudios sobre la sialidasa de tres cepas del virus de la enfermedad de Newcastle" en octubre de 1986, obteniendo la más alta calificación.

Posteriormente, el Prof. Villar, encargado de la supervisión cotidiana, y uno de los autores (JAC), efectuamos la grata tarea de la dirección de la Tesis Doctoral de García Sastre que, defendida por él en 1990, con el título de: "Estudios sobre las proteínas de la membrana del virus de la enfermedad de Newcastle y del virus de la gripe C", obtuvo la máxima calificación y después el muy prestigioso Premio Extraordinario de Doctorado.

2. INVESTIGACIÓN REALIZADA EN SALAMANCA POR EL DR. ADOLFO GARCÍA SASTRE

Desde su vinculación a la cátedra de Bioquímica del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca siendo estudiante del quinto y último año de carrera, en el curso 1985/86, Adolfo colaboró en los proyectos de investigación que en él sucesivamente se fueron realizando, centrados mayoritariamente en estudios experimentales relativos a los virus de la gripe y de la enfermedad de Newcastle, sobre todo en lo concerniente a sus enzimas sialidasa (neuraminidasa) y *O*-acetilesterasa.

Además, en octubre de 1990, en coincidencia con su reciente doctorado, se intensificó la colaboración iniciada por J. A. Cabezas en 1979 con el Director de la *Unité d'Ecologie Virale* del Instituto Pasteur de Paris (Prof. Claude Hannoun). Esto facilitó que el nuevo Doctor se desplazara a este Instituto para ampliar su formación durante un breve periodo de tiempo, siendo esta su primera permanencia en un centro extranjero.

El resultado obtenido por el Dr. García Sastre con sus colaboradores Cabezas y Villar, y en ocasiones los franceses Hannoun, Fizon y Manuguerra, fueron 15 publicaciones, además de algunas otras en colaboración con otros investigadores. Las revistas en que aparecieron fueron principalmente las siguientes: *Research in Virology* (3), *Intervirology* (4), *Virus Research* (5), *Enzyme* (6), *Clinica Chimica Acta* (7), *Biochimica Biophysica Acta* (8), *The Biochemical Journal* (9), *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* (10), así como dos capítulos en el libro titulado *Sialic Acids* (11).

Además, parte de estos resultados fueron presentados en congresos o simposios internacionales o nacionales como los siguientes: El 17º de la Federación Europea de Sociedades de Bioquímica (FEBS), en Berlín (1986); el XIV de la Sociedad Española de Bioquímica (SEB), en Málaga (1987); el III Luso-Español de Bioquímica, en Santiago de Compostela (1988); el X sobre Glico-



conjugados, en Jerusalén (1989); el 7º sobre enfermedades lisosómicas, en Ittingen (Alemania), en 1989; el II Congreso Nacional de Virología, en Valladolid (1990); el XI sobre Glicoconjugados, en Toronto (1991).

Estos logros en investigación alcanzados en la Universidad de Salamanca fueron precedidos por un intenso esfuerzo realizado en esta ciudad, siguiendo la conocida sentencia que dice: "A aprender a Salamanca". Aunque esto solo da resultado si hay capacidad intelectual en el aprendiz, pues en caso contrario también otra sentencia señala que: "*Quod Natura non dat Salmantica non prestat*". D. Adolfo, "burgalés de pro", ha conseguido estos éxitos iniciales en la capital del Tormes, acompañado por otra bióloga, que es su esposa, la bejarana Dña. Ana Fernández Sesma.

3. OPINIÓN DEL PROFESOR ADOLFO GARCÍA SASTRE SOBRE SU ETAPA SALMANTINA

Nadie mejor que el propio interesado para comentar brevemente lo que ha significado en su trayectoria profesional la etapa salmantina de su juventud. Así lo expone en una entrevista publicada en el periódico de Salamanca *LA GACETA*, el 8 de enero de 2019:

"Durante mis años en Salamanca tuve la suerte de contar con grandes mentores científicos que en todo momento me apoyaron y me enseñaron cómo planear experimentos que resulten en avances científicos. Me refiero sobre todo a mi director de tesis, Enrique Villar, que en ese momento se acababa de incorporar al Departamento de Bioquímica como Profesor Titular. Enrique no sólo fue un gran mentor para mí, también un gran amigo. Todos los que le conocimos lamentamos profundamente su pérdida, cuando repentinamente falleció a los 64 años en 2017. Tanto Enrique como el entonces director del Departamento, el Profesor José Antonio Cabezas, al cual nos referíamos todos con respeto y reverencia simplemente como Don José, me dieron la ayuda, apoyo y confianza necesaria para mi carrera posterior como investigador independiente. A esto hay que añadir el apoyo de mis padres, de mis amigos de entonces y de mi mujer, en aquella época mi novia, que en todo momento me animaron a seguir mi formación de investigador, a pesar de las pocas salidas laborales que existían".

También señala: "Salamanca es conocida en EE. UU. por ser una de las tres primeras Universidades de Europa". Y añade: "Debe fomentarse la cooperación investigadora entre laboratorios de España y el extranjero" (12).

Finalmente, en otra entrevista, del 21 de junio de 2013 (aunque publicada el 3 de febrero de 2019 en el periódico granadino *EL IMPARCIAL*), titulada: "Un español en Nueva York, a la cabeza de la investigación de la gripe", a la pregunta de "¿Qué

recuerdo guarda de España?", contesta: "En España fue donde me familiaricé con las técnicas de investigación, ya que fue aquí donde hice mi Tesis. No pierdo de vista que, aunque he tenido más formación en Estados Unidos, mi primer contacto con lo que soy ahora se encuentra en Salamanca; así que creo que, de no haber sido por eso, no podría haber conseguido lo que vino después. Me hice con una beca del Gobierno para pasar dos años en Estados Unidos, donde busqué mi propia financiación para quedarme. Tengo presente que la razón por la que tengo mi laboratorio en Nueva York es porque hice mi Tesis en Salamanca" (13).

4. ADOLFO GARCÍA SASTRE: UN GRAN CIENTÍFICO Y VIRÓLOGO ESPAÑOL EN NUEVA YORK

El segundo autor (ME) conoció a Adolfo poco tiempo después de su incorporación al laboratorio de virus de la gripe que dirigía y aún dirige Peter Palese en el *Mount Sinai* de Nueva York. Ya conocía a Peter desde la década de los años 1970 por su trabajo con el virus de la gripe, mucho antes de que se incorporara como Chairman en el *Mount Sinai*, al que se incorporaría Adolfo en el año 1991 como investigador postdoctoral. Indica ME: A Adolfo le conocí en el ciclo de conferencias sobre Ciencia y Desarrollo Científico que yo coordinaba en el Spanish Institute de Nueva York en 684 Park Avenue, y dentro del cual, durante los días 23 al 2 de mayo de 1991, varios investigadores españoles, Mariano Barbacid, Joan Massagué, Angel Pellicer y yo mismo presentamos las investigaciones más punteras sobre las bases moleculares del cáncer, proliferación celular, terapia genética y el VIH/SIDA. En esa época nos encontrábamos en Nueva York un reducido grupo de científicos españoles, y teníamos por costumbre conocer a los científicos recién llegados por si les podíamos ayudar. Ya unos años antes, en 1980, habíamos creado en Nueva York la primera asociación de Licenciados y Doctores Españoles en EE.UU, llamada ALDEEU, que integraba a todos los profesionales españoles en sus distintas áreas del conocimiento, como literatura, humanidades, medicina, ciencias de la vida, etc. Yo me había trasladado a USA, primero a la *Rutgers Medical School* en New Jersey en 1974, después de 4 años en Londres en el *National Institute for Medical Research*, seguido de mi incorporación como jefe de grupo en el *Downstate Medical Center de New York* (SUNY) en 1979. Por ello, ya era un científico español experimentado en lidiar con los problemas que normalmente surgen a todos los recién llegados. Y no es que Adolfo necesitara de nosotros, pues como buen castellano, de Burgos, está acostumbrado a lidiar con todas las situaciones, por difíciles que se pongan. De ese lado burgalés también es mi familia, de padre y madre, aunque nací en un pueblo vallisoletano (Villalón de Campos). Pero no voy a hablar de mí sino de Adolfo y la experiencia que tuve con él mientras vivía en Nueva York y posteriormente desde mi regreso a España.



La relación profesional con Adolfo se inició por la complementariedad del trabajo que ambos estábamos haciendo en nuestros respectivos laboratorios, mi grupo con la biología de poxvirus, su uso como vacunas y acción de los interferones, y Adolfo sobre el virus de la gripe. Adolfo había iniciado sus experimentos de genética reversa con el virus de la gripe, con la doble finalidad de entender los procesos de patogenia del virus, interacción con la célula y utilizar esos conocimientos en la elaboración de vacunas con el vector viral como vehículo transportador de antígenos de otros patógenos. Nosotros teníamos un interés semejante, así que ambos proyectos confluyeron entre sí. El lugar de confluencia fue el laboratorio de Ruth Nussenzweig del *New York University Medical Center* (NYU), junto con el investigador chileno Fidel Zavala. Este era un grupo líder en malaria y había desarrollado procedimientos de vacunación utilizando esporozoitos inactivados y además habían identificado a la proteína CS (circunsporozoito) como activador de respuesta inmune protectora. Además habían identificado un epítipo en la CS como responsable de la inducción de linfocitos T CD8+. Debido a la naturaleza hispana, surge junto con Fidel una colaboración entre los distintos laboratorios, *NYU*, *Mount Sinai* y *SUNY*, para utilizar las tecnologías en vacunas que Adolfo y la que nosotros habíamos desarrollado. Así y después de varias reuniones decidimos ir adelante y desarrollar vectores virales como candidatos vacunales frente a malaria. Mi laboratorio, junto con los investigadores Dolores Rodríguez y Juan Rodríguez, generó por recombinación homóloga un vector vacunal del virus vaccinia atenuado que expresaba la proteína CS completa de *Plasmodium yoelii*, mientras que Adolfo generó mediante genética reversa el recombinante del virus de la gripe que expresaba el dominio CS específico de células T CD8+ localizado en la parte más inmunogénica de la proteína hemaglutinina del virus gripal. El siguiente paso, que se realizó en NYU, era llevar a cabo los experimentos de inmunogenicidad y eficacia en un modelo murino de malaria. Al ser dos vectores distintos, nos hicimos varias preguntas, como en que medida cada uno de estos vectores ejerce un efecto protector, naturaleza de su respuesta inmunológica, ruta de administración, orden de inoculación, si es mejor utilizar el virus gripal primero y el vector de vaccinia segundo, o al revés, y que papel ejercen las células T CD8+ en la protección. Todas estas preguntas fueron gradualmente respondidas en una serie de trabajos que fuimos realizando en colaboración entre los tres laboratorios. Lo más interesante, científicamente hablando, es que demostramos que tanto la vacuna de gripe como la de vaccinia producían una mayor respuesta inmune y eficacia frente a malaria cuando se combinaban ambas, siendo muy llamativo que el orden de inmunización era también muy importante, de tal forma que este efecto era superior cuando se utilizaba al virus gripal con el epítipo CS-CD8+ como primera inmunización (efecto *priming*) seguido al cabo de

unas semanas por el segundo vector, *virus vaccinia* expresando toda la proteína CS. Además, el efecto protector era mediado por los linfocitos T CD8+. Este fenómeno sinérgico llamado *prime/boost* quedó bien asentado en los trabajos que se publicaron sucesivamente (14, 15). El siguiente paso fue extender estos estudios también hacia la activación del otro brazo del sistema inmune, las células B productoras de anticuerpos. Se sabía que la respuesta humoral y celular era importante para el control de malaria, así que Adolfo generó también otro vector del virus gripal expresando dos epítipos de la proteína CS, uno CD8+ en la proteína hemaglutinina y otro para activación de células B en la proteína neuraminidasa del virus gripal, que sirvió para determinar hasta que punto la colaboración entre la producción de anticuerpos neutralizantes y de linfocitos T citotóxicos contribuye mejor a la inmunogenicidad y eficacia frente a malaria. En una serie de experimentos se determinó que la incorporación de epítipos activadores de células B junto con activadores de células T contribuye mejor al control de malaria murina, cuando se administraba la combinación en *prime/boost*, primero con vectores de gripe (*priming*) seguido posteriormente de vectores de vaccinia (*boost*) (16). Estos resultados demostraron que para el control de patógenos es necesario activar tanto una respuesta humoral de anticuerpos neutralizantes como una celular de linfocitos T citotóxicos. Se estableció el concepto de que la combinación de dos vectores virales atenuados era un buen sistema para activar mejor respuestas inmunes B y T, y que dos dosis de vacunación en forma heteróloga son preferibles a dos dosis del vector homólogo. Estos estudios abrieron también la puerta al desarrollo de nuevas tecnologías de medida de activación de linfocitos T CD8+ por ELISPOT, tecnología actualmente muy utilizada por todos los grupos que evalúan respuestas celulares T. Además, con la finalidad de que estos protocolos de combinación de vacunas tuvieran una mayor aplicabilidad, se generaron vectores más adecuados para uso humano, como el vector "*cold adapted*" del virus gripal y el vector muy atenuado de poxvirus, el virus vaccinia modificado de Ankara (MVA), expresando bien epítipos de CS (gripe) o la proteína completa CS de malaria (17, 20). Hay que considerar que la malaria sigue produciendo un gran número de muertes anuales, alrededor de 400.000 en 2019, por lo que una vacuna es absolutamente necesaria. Hubiera sido deseable haber trasladado estos experimentos a ensayos con macacos y posteriormente a ensayos clínicos en humanos, pero la investigación que realizábamos entonces iba más dirigida hacia la básica, la del conocimiento.

La experimentación que habíamos implementado con Adolfo para la malaria, la pudimos extender a la pandemia causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), otra gran enfermedad, el Sida, que sigue produciendo un gran número de fallecimientos, unos 700.000 en 2019. Para ello, Adolfo generó un



vector de gripe semejante al usado para malaria pero ahora expresando un epítipo específico de la proteína Env del VIH en la hemaglutinina, mientras que nuestro grupo (ya trasladado al Centro Nacional de Biotecnología en Madrid) generó un vector de MVA expresando la proteína Env completa del VIH. Demostramos en modelo murino que la combinación en *prime/boost* del recombinante gripal seguido semanas después por el vector MVA era el protocolo más eficaz para inducir una potente respuesta celular frente al VIH tanto sistémica como en nódulos linfáticos (18, 19).

Otro de los intereses de la investigación de Adolfo era y sigue siendo el entender las bases moleculares durante la relación entre virus-hospedador y en qué medida el virus escapa a la acción de los interferones, moléculas claves como primer sistema de defensa del organismo. Este área también formó parte de la colaboración entre ambos laboratorios (21).

Adolfo tiene un CV impresionante con más de 600 publicaciones en las mejores revistas de la especialidad en virología y ciencias de la vida, sobre biología molecular de los virus, ciclo de replicación, patogenicidad y virulencia, mecanismos de evasión, tanto de los virus de la gripe como de otros virus importantes en salud humana, como Ebola, Dengue, Zika, HIV y recientemente sobre el SARS-CoV-2/COVID-19, con aportaciones seminales en el entendimiento y control de estos virus emergentes. Fundamentalmente sobre los virus que producen epidemias y pandemias como el virus de la gripe del año 1918, con la resurrección de este virus pandémico a partir de secuencias genéticas obtenidas de tejidos respiratorios de pacientes que murieron de gripe ese año, y que fue publicado en *Science*, siendo considerado por la revista *Lancet* uno de los descubrimientos más importantes del año 2017. Fue precisamente sobre el virus de la gripe del 1918, que sirvió como tema para su toma de posesión el 16 de mayo de 2017 como Académico de la Real Academia Nacional de Farmacia (RANF), siendo yo Presidente, con el título "Los virus de la gripe: 1918-2017". Esta investigación sobre el virus de la gripe le ha permitido abordar el desarrollo potencial de una vacuna universal tanto frente a las cepas homólogas como heterólogas del virus de la gripe, con la finalidad de evitar la producción de vacunas cada año y que la vacuna tenga una amplia especificidad y neutralización frente a las nuevas cepas del virus que surgen anualmente. Con esa finalidad, ya está llevando a cabo estudios clínicos con candidatos vacunales desarrollados por su grupo y determinando si producen protección contra distintas cepas. Con la aparición de la pandemia SARS-CoV-2, el grupo de Adolfo está llevando a cabo una intensa y productiva actividad sobre la virulencia del SARS-CoV-2, estableciendo modelos animales para su seguimiento y generando candidatos vacunales frente a la COVID-19. Además, recientemente Adolfo, con otros coautores, ha publicado sus resultados, muy prometedores, relativos

a un medicamento (Aplidina® de la empresa española Pharmamar) del tipo no vacunal que sería muy eficaz para combatir este virus (22).

Adolfo es un referente de la virología mundial. Ocupa el cargo de catedrático de medicina y microbiología y director del *Global Health & Emerging Pathogens Institute del Icahn School of Medicine en Mount Sinai* en Nueva York. Dirige el Centro de Investigación de la Patogénesis de la Gripe. Ha obtenido numerosos premios y distinciones, organizado numerosos cursos y congresos internacionales, es inventor de múltiples patentes y miembro del consejo editorial de revistas de alto impacto de la especialidad. En 2018 fue nombrado Doctor Honoris Causa por la Universidad de Burgos. Su CV seguirá creciendo de forma exponencial como lo viene acreditando año tras año. Es un honor para España y para la RANF tener entre sus ciudadanos y miembros al profesor Adolfo García Sastre, eminente científico y virólogo.

5. REFERENCIAS

1. Cabezas, J. A. (2017). Reflexiones acerca de la etapa salmantina del nuevo Académico de la Real Academia Nacional de Farmacia. Sesión del 16 de mayo de 2017.
2. Cabezas, J. A. (2012). Origen del Departamento de Bioquímica y Biología molecular de la Universidad de Salamanca. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 78/4, 366-400.
3. Fiszon, B., Hannoun, C., García-Sastre, A., Villar, E. & Cabezas, J. A. (1989). Comparison of biological and physical properties of human and animal (H1N1) Influenza Virus. *Research in Virology* 140, 395-404.
4. Cabezas, J. A., Villar, V., García-Sastre, A., Manuguerra, J. C. & Hannoun, C. (1991). New data on Influenza type C confirm its peculiarities as a new genus. *Intervirology* 32, 326-326.
5. Muñoz, I., García-Sastre, A., Villar, E., Manuguerra, J. C. Hannoun, C. & Cabezas, J. A. (1992). Increased Influenza A Virus sialidase activity with N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid-containing substrates on influenza C virus O-acetyltransferase action. *Virus Research* 25, 145-153.
6. García-Sastre, A., Villar, V., Hannoun, C. & Cabezas, J. A. (1990). Neuraminidase activity from rimantadine-resistant and-sensitive Influenza A variants. *Enzyme* 43, 207-211.
7. Risueño, J. C., Gómez Alonso, A., García Criado, F. J. García-Sastre, A., Corral, A. Cabezas, J. A. (1992). Effect of anaesthesia and acute intestinal ischemia on serum N-acetylhexosaminidase activity in rabbit as biological model. *Clinica Chimica Acta* 206, 127-131.
8. García-Sastre, A., Cabezas, J. A. & Villar, V. (1989). Proteins in Newcastle Disease Virus envelope: interaction between the outer hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein and the inner non-glycosylated matrix protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 999, 171-195.



9. García-Sastre, A., Villar, E., Manuguerra, J. C., Hannoun, C., Cabezas, J. A. (1991). Influenza C Virus O-Acetyltransferase: its activity on several O-acetyl-containing compounds. *The Biochemical Journal* 273, 435-441.
10. García-Sastre, A., Cobaleda, C., Cabezas, J. A. & Villar, E. (1991). On the inhibition mechanism of the sialidase activity of Newcastle Disease Virus. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 372, 923-927.
11. García Sastre, A., Cabezas, J.A. & Villar, E. (1988). Sialic Acids. (Kieker Verlag). (a) Comparative studies on the sialidase from two strains of the Newcastle Disease Virus. Pag. 148-149. (b) Comparison between the activity of influenza Virus sialidase from human pigs and ducks. Pag. 146-147.
12. Baz, B. (2019). "A pesar de las escasas salidas profesionales me empuñé en ser investigador". *Periódico de Salamanca LA GACETA*, 9 de enero de 2019, 14-15.
13. Periódico de Granada EL IMPARCIAL (2019). Un español en Nueva York, a la cabeza de la investigación mundial de la gripe. Entrevista (21 de junio de 2013) publicada el 3 de febrero de 2019.
14. Li, S., Rodrigues, M., Rodríguez, D., Rodríguez, J.R., Esteban, M., Palese, P., Nussenzweig, R.S., Zavala, F. (1993). Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8 + T-cell-mediated protective immunity against malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5214-5218.
15. Rodrigues, M., Li, S., Rodríguez, D., Rodríguez, J.R., Bacik, I., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., García-Sastre, A., Esteban, M., Palese, P., Nussenzweig, R.S., Zavala, F. (1994). Influenza and vaccinia viruses expressing malaria CD8 + T and B cell epitopes: Comparison of their immunogenicity and capacity to induce protective immunity. *J. Immunol.* 153, 4636-4648.
16. Murata, K., García-Sastre, A., Tsuji, M., Rodrigues, M., Rodríguez, D., Rodríguez, J.-R., Nussenzweig, R., Palese, P., Esteban, M., Zavala, F. (1996). Characterization of the in vivo primary and secondary CD8 + T cell responses induced by recombinant influenza and vaccinia viruses. *Cell Immunol.* 173, 96-107.
17. Miyahira, Y., García-Sastre, A., Rodríguez, D., Rodríguez, J.R., Tsuji, M., Palese, P., Esteban, M., Zavala, F., Nussenzweig, R.S. (1998). Recombinant viruses expressing a human malaria antigen elicit a protective immune response in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 3954-3959.
18. Gonzalo, R.M., Rodríguez, D., Rodríguez, J.R., García-Sastre, A., Palese, P., Esteban, M. (1999). Enhanced CD8 T cell response to HIV-1 env by combined immunization with influenza and vaccinia virus recombinants. *Vaccine* 17, 887-892.
19. Gherardi, M.M., Nájera, J.L., Pérez-Jiménez, E., Guerra, S., García-Sastre, A., Esteban, M. (2003). Prime/boost immunization schedules based on influenza and vaccinia virus (VV) vectors (MVA and WR) potentiate cellular immune responses against HIV-env protein systemically and in the genito-rectal draining lymph nodes. *J. Virol.* 77, 7048-7057.
20. González-Aseguinolaza, G., Nakaya, Y., Molano, A., Dy, E., Esteban, M., Rodríguez, D., Rodríguez, J.R., Palese, P., García-Sastre, A., Nussenzweig, R.S. (2003). Induction of protective immunity against malaria by prime/boost immunization with recombinant cold-adapted influenza and modified vaccinia virus Ankara viruses expressing a CD8 + T cell epitope derived from the circumsporozoite protein of *Plasmodium yoelii*. *J. Virol.* 77, 11859-11866.
21. Yángüez, E., García-Culebras, A., Frau, A., Llompart, C., Knobloch, K.-P., Gutierrez-Erlandsson, S., García-Sastre, A., Esteban, M., Nieto A., Guerra, S. (2013). ISG15 regulates peritoneal macrophages functionality against viral infection. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003632. doi: 10.1371.
22. White, K.M., Rosales, R., Yildiz, S., Kehrer, T., Miorin, L., Moreno, E., Jangra, S., Uccellini, M.B., Rathnasinghe, R., Coughlan, L., Martínez-Romero, C., Batra, J., Rojc, A., Bouhaddou, M., Fabius, J.M., Obernier, K., DeJozes, M., Guillén, M.J., Losada, A., Avilés, P., Schotsaert, M., Zwaka, T., Vignuzzi, M., Shokat, K.M., Krogan, N.J., García-Sastre, A. (2021). Plitidepsin has potent preclinical efficacy against SARS-CoV-2 by targeting the host protein eEF1A. *Science* 26;371(6532):926-931.

Si desea citar nuestro artículo:

**Vinculación del virólogo profesor Adolfo García Sastre con la
Universidad de Salamanca y con la Real Academia
Nacional de Farmacia**

José Antonio Cabezas Fernández del Campo, Mariano Esteban Rodríguez

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 87. Nº 1 (2021) · pp. 09 - 14

DOI: <http://>

EL TRATAMIENTO CON SOFOSBUVIR MEJORA LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

SOFOSBUVIR TREATMENT IMPROVES HEPATITIS C VIRUS-INDUCED INSULIN RESISTANCE

Esther Rey, Patricia Maraño, Águeda González-Rodríguez

Unidad de Investigación, del Hospital Universitario Santa Cristina dentro del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario de La Princesa.

*corresponding author: aguedagr.phd@gmail.com

ARTÍCULO

RESUMEN

La infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) está asociada con la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2. El objetivo general de este estudio fue evaluar los efectos del sofosbuvir sobre la resistencia a la insulina inducida por el VHC. Para ello, se realizó un estudio clínico que incluyó 42 pacientes con VHC resistentes a la insulina, que fueron tratados con diferentes regímenes antivirales basados en sofosbuvir. Asimismo, se utilizó una línea de hepatocitos humanos que expresan un replicón del VHC de manera estable para determinar los mecanismos moleculares implicados en la acción de la insulina regulada por sofosbuvir. Todos los pacientes alcanzaron una respuesta virológica sostenida después del tratamiento con sofosbuvir y se observó una reducción significativa en los marcadores de daño hepático, así como en el estadio de fibrosis. El índice de resistencia a la insulina (HOMA) mejoró significativamente a lo largo del estudio. A nivel molecular, el tratamiento con sofosbuvir mejoró la activación de la cascada de señalización de la insulina tras la estimulación con dicha hormona en los hepatocitos con VHC, y, en consecuencia, revirtió la expresión elevada de genes gluconeogénicos, el aumento de la producción de glucosa y la deficiencia de la síntesis de glucógeno en estas células. En conclusión, estos resultados sugieren que el sofosbuvir mejora la respuesta deficiente a la insulina originada por la infección del VHC, proporcionando novedosas evidencias en cuanto a los mecanismos moleculares implicados en la sensibilización a la insulina inducida por este tratamiento.

ABSTRACT

Chronic hepatitis C virus (HCV) infection is associated with insulin resistance and type 2 diabetes. The overall aim of this study was to evaluate the effects of sofosbuvir (SOF) on HCV-induced insulin resistance. Clinical parameters were recorded and insulin resistance index (HOMA) calculated from 42 insulin-resistant HCV-patients who underwent SOF-based regimens, at baseline, at the end of treatment (EoT), and at one year after the EoT. Likewise, Huh7 cells expressing full-length HCV replicons were used to elucidate the molecular mechanisms involved in insulin action regulated by SOF. All patients reached a sustained virological response after SOF treatment and, as expected, a significant reduction in liver damage markers and fibrosis stage was observed at the EoT that remained one year later. HOMA significantly improved throughout the study time period. Besides, an increase of total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B levels were maintained over time after the EoT. At the molecular level, SOF treatment improved the activation of the insulin signalling cascade after stimulation with the hormone in HCV-hepatocytes and, accordingly, reversed the elevated expression of gluconeogenic genes, the increased glucose production and the impairment of glycogen synthesis induced by HCV. Furthermore, SOF challenge induced an increase of insulin receptor substrate 1 (IRS1) content parallel to a reduction in its serine phosphorylation in HCV-hepatocytes. These results provide novel evidence about the molecular mechanisms involved in the hepatic insulin sensitization induced by SOF treatment involving the recovery of IRS1 protein levels as a hallmark of SOF effects.

Palabras Clave:

Virus de la hepatitis C
Agentes antivirales de acción directa
Sofosbuvir
Resistencia a la insulina
Hepatocitos

Keywords:

Hepatitis C virus
Direct-acting antiviral agents
Sofosbuvir
Insulin resistance
Hepatocytes



1. INTRODUCCIÓN

La infección por el virus de la Hepatitis C (VHC) supone un importante problema de salud pública con 170 millones de personas infectadas de manera crónica en todo el mundo (1). De hecho, la infección por el VHC se ha convertido en la principal causa de enfermedad hepática crónica relacionada con el desarrollo de otras enfermedades hepáticas tales como la fibrosis, cirrosis o carcinoma hepatocelular (CHC), y ha sido la principal causa de trasplante hepático durante los últimos veinte años (2).

Curiosamente, la infección crónica por el VHC está asociada con la resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 (3, 4). De hecho, la prevalencia de resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 es significativamente mayor en los pacientes infectados por el VHC en comparación con individuos no infectados o que padecen otras enfermedades hepáticas crónicas (5, 6). Además, varios estudios han demostrado que la resistencia a la insulina hepática asociada al VHC puede afectar negativamente la respuesta al tratamiento con interferón (7-9).

A nivel experimental, existen evidencias que indican que el VHC interfiere de manera directa en la ruta de señalización de la insulina. De hecho, se ha detectado una reducción en la expresión hepática de mediadores clave en el inicio de esta cascada de señalización, como es el caso de los sustratos del receptor de insulina (IRS), IRS1 e IRS2, en pacientes con infección crónica por VHC, en ratones transgénicos que expresan VHC, así como en un modelo celular experimental de infección por VHC (10, 11). Los mecanismos moleculares implicados en la deficiente expresión de IRS1 e IRS2 son múltiples, como la inducción de supresores de la señalización de citocinas (SOCS) (11-13) o la activación de diferentes quinasas que promueven la fosforilación de residuos de serina de IRS1, inhibiendo la fosforilación en residuos tirosina, imprescindible para la activación del mismo, y promoviendo su degradación (14). Asimismo, el VHC induce la expresión de moduladores negativos de la vía de señalización de la insulina como la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) y la proteína fosfatasa 2A (PP2A) (15). En conjunto, todos estos mecanismos impiden que la activación de AKT, un efector clave en la acción de la insulina en el hígado, que conduce a la resistencia a la insulina (10, 14).

En los últimos años, el descubrimiento de tratamientos antivirales basados en los nuevos y altamente eficaces agentes antivirales directos se ha convertido en un avance revolucionario en el tratamiento de la infección por VHC. En comparación con el tratamiento estándar utilizado anteriormente (terapia con interferón pegilado más ribavirina), los tratamientos basados en estos nuevos antivirales muestran una actividad pangenotípica, una mayor tole-

rabilidad y mínimos efectos adversos asociados a la medicación, y logran una mayor respuesta viral sostenida, casi del 100%, con tratamientos más cortos y sencillos en pacientes infectados por el VHC (16-18). Entre ellos, sofosbuvir (SOF), un nucleótido análogo del inhibidor de la polimerasa NS5B del VHC, fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) para el tratamiento de la infección crónica por VHC en combinación con otros agentes antivirales en diciembre de 2013 (19, 20). Curiosamente, la terapia antiviral con agentes antivirales directos, incluido el sofosbuvir, parece mejorar notablemente la sensibilidad a la insulina periférica en pacientes infectados por VHC (21); sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en la relación entre la erradicación del VHC y la recuperación en la respuesta a la insulina inducida por estos antivirales.

Por todo lo anterior, el principal objetivo de este estudio fue determinar los efectos del sofosbuvir sobre la resistencia a la insulina inducida por el VHC, tanto en pacientes tratados con regímenes basados en este antiviral como en hepatocitos que expresan un replicón completo de VHC tratados *in vitro* con dicho antiviral.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Estudio clínico

El estudio clínico se realizó de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y la Conferencia Internacional de Armonización de Buenas Prácticas Clínicas. La inclusión de los pacientes en el estudio así como la obtención de las muestras biológicas de los mismos se llevó a cabo tras la firma de un consentimiento informado específico aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla, España). Los datos personales y el material biológico de todos los pacientes se tratarán con confidencialidad y seguridad, de acuerdo con la normativa basada en la Ley 15/1999 y en la Ley 14/2007 sobre Investigación Biomédica.

Este estudio retrospectivo incluyó 42 pacientes con enfermedad hepática crónica asociada a VHC reclutados de manera aleatoria y consecutiva en el Servicio de Digestivo del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla, España) entre enero de 2015 y febrero de 2017. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: mayores de 18 años de edad, presencia de resistencia a la insulina (índice de resistencia a la insulina, HOMA > 2,5) al inicio del estudio, y tratamiento antiviral completado. Se incluyeron pacientes con cualquier estadio de fibrosis hepática (de F0 a F4), independientemente del genotipo viral.

Los pacientes fueron tratados con diferentes regímenes antivirales basados en sofosbuvir (SOF) según la elección del médico y recibieron SOF/daclatasvir (DAC)/ribavirina (RVB) (n=7),



SOF/Ledipasvir (LED)/RBV (n=12); SOF/DAC (n=5); SOF/LED (n=16) o SOF/Simeprevir (SIM) (n=2). La duración del tratamiento osciló entre 12 semanas (n=35) y 24 semanas (n=7).

La presencia de fibrosis hepática se evaluó mediante elastografía transitoria no invasiva (Fibroscan® 402, Echosens, París, Francia) y los pacientes se estratificaron siguiendo la siguiente escala: F0-F1, < 7 kPa, ausencia de fibrosis o fibrosis leve; F2, 7-9,4 kPa, fibrosis moderada; F3, 9,5-13 kPa, fibrosis avanzada; F4, > 13 kPa, cirrosis.

Los parámetros demográficos, antropométricos, virológicos y bioquímicos se registraron de la siguiente manera: edad, sexo, índice de masa corporal (IMC), cuantificación de ARN del VHC, genotipo del VHC, historia previa del tratamiento antiviral, y pruebas generales de laboratorio (aspartato aminotransferasa -AST-, alanina aminotransferasa -ALT-, gammaglutamiltransferasa -GGT-, fosfatasa alcalina -ALP-, albúmina, bilirrubina, creatinina, glucosa, insulina, hemoglobina glicosilada -HbA1c-, colesterol total, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad -LDL-, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad -HDL-, apolipoproteína B -ApoB- y triglicéridos -TG-). El índice de resistencia a la insulina HOMA se calculó aplicando la siguiente fórmula: $\text{insulina en ayunas } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glucosa en ayunas } (\text{mg/dL}) / 405$. El índice de fibrosis FIB4, método no invasivo que predice la presencia de fibrosis hepática, se calculó aplicando la siguiente fórmula: $\text{edad (años)} \times \text{AST (U/L)} / [\text{plaquetas } (10^9/\text{L}) \times \text{ALT/2 (U/L)}]$.

Para el análisis de estas variables virológicas, bioquímicas y metabólicas se recogieron muestras de sangre al inicio del estudio (basal, B), al final del tratamiento (FdT) y un año después del final del tratamiento (final del seguimiento, FdS).

2.2. Cultivo celular

Para el estudio experimental, se utilizó la línea celular de hepatoma humano Huh7. Las células Huh7 y sus derivados se cultivaron en medio DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco) enriquecido (suero fetal bovino 10%, L-glutamina 2 mM y antibióticos: gentamicina 50 $\mu\text{g/mL}$, penicilina 100 U/mL y 100 estreptomycin $\mu\text{g/mL}$), a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5%. Las células Huh7 que expresan un replicón completo de VHC de genotipo 1b (Con1; número de acceso a la base de datos EMBL AJ238799) se establecieron como se ha descrito previamente (22). Brevemente, las construcciones pl389/Core-3'/5.1 y pl377/NS3-3' se linealizaron con Scal y se usaron como secuencia molde para la síntesis de ARN utilizando la polimerasa ARN T7 (Promega, Madison, WI). Para la transfección mediante electroporación de 10^7 células Huh7 se utilizaron 20 μg del ARN sintetizado, y 24 horas más tarde se realizó la selección antibiótica de las células transfectadas añadiendo gentamicina B1 (500 $\mu\text{g/mL}$, G418). Durante 4 semanas tras la trans-

fección, el medio de cultivo suplementado con gentamicina B1 se reemplazó 2 veces por semana, y, finalmente, se aislaron las colonias resistentes que son las que expresan un replicón completo de VHC.

2.3. Tratamiento de las células con el fármaco antiviral

El sofosbuvir (SOF, proporcionado amablemente por Gilead Science Inc., EE. UU.) se reconstituyó en DMSO a una concentración de 10 mM. Las células portadoras del replicón del VHC se trataron con sofosbuvir a 10 μM durante 9 días en ausencia de G418 para evitar la muerte de las células una vez eliminado el replicón. Cada 3 días el medio de cultivo se sustituyó por medio fresco que contenía sofosbuvir o vehículo (DMSO).

2.4. Análisis de la activación de la cascada de señalización de insulina

Para evaluar los efectos de sofosbuvir sobre la señalización de la insulina, se retiró el suero del medio a las células portadoras del replicón del VHC tratadas con sofosbuvir o DMSO antes de la estimulación con insulina (1 o 10 nM, 10 minutos).

2.5. Análisis de proteínas por inmunofluorescencia

Las células se cultivaron sobre un cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro. Al final del experimento, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se permeabilizaron con NP-40 al 0,1% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se bloquearon con TNB (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M, reactivo de bloqueo al 0,5% - Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania-) durante 30 minutos a 37°C y se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios diluidos en TNB durante 1 hora a 37°C: anti-VHC core (clon C7-50, Affinity BioReagents, Goleen, CO) o anti-VHC NS5A (Virostat, Portland, ME). Después de lavar con NP-40 al 0,1% en PBS, las células se incubaron con el anticuerpo secundario IgG de cabra anti-ratón Alexa 488 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) durante 20 minutos a 37°C, se contratiñeron con DAPI (Pierce, Rockford, IL) y se montaron en el medio de montaje DakoCytomation (DAKO A / S, Glostrup, Dinamarca). Las preparaciones se examinaron con un microscopio confocal Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania).

2.6. Preparación de extractos de proteínas para inmunoprecipitación

Al final del experimento, las células se lisaron con tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, Triton X-100 al 1%, SDS al 0,2%, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM y 5 $\mu\text{g/mL}$ de leupeptina) durante 10



minutos en hielo para obtener los lisados celulares totales. Después de la determinación del contenido de proteína con el reactivo de Bradford, se inmunoprecipitó una cantidad igual de proteína (500 µg) con anticuerpo anti-IRS1 (sc-8038, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Alemania). Los complejos inmunes se recogieron en perlas de sefaroza (GE17-0120-01, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), se calentaron a 95°C durante 5 minutos en tampón de carga Laemmli (Tris 100 mM pH 7,6, glicerol al 10% (v/v), SDS al 6% (p/v), azul de bromofenol al 0,2% (p/v), β mercaptoetanol 2 mM) y se sometieron al análisis de proteínas por Western blot.

2.7. Preparación de extractos de proteínas totales

Al final del experimento, después de lavar con PBS, las células se lisaron en la placa con 100 µL de tampón de carga Laemmli, se calentaron a 95°C durante 5 minutos y se sometieron al análisis de proteínas por Western blot.

2.8. Análisis de proteínas por Western blot

Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, EE.UU.) que se incubaron en solución de bloqueo (leche desnatada al 5% en solución salina tamponada con Tris-TBS- o BSA al 3% en TBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con los correspondientes anticuerpos primarios diluidos en TBS-T (0,1% Tween-20 en TBS) con leche desnatada o BSA al 1%: anti-VHC core (clon C7-50) de Affinity BioReagents; anti-HCV NS5A de Virostat; anti-IRS1 (06-248) de Merk-Millipore (Darmstadt, Alemania); anti-p53 (sc-126), anti-pTyr1146 IR (sc-81499), anti-IR (sc-711), anti-fosfoserina (4A3, sc-81516), anti-pSer473 AKT (sc-7985-R) y anti-AKT (sc-5298) de Santa Cruz Biotechnology; anti-pSer256 FoxO1 (9461) y anti-pSer9 GSK3β (9336) de Cell Signaling Technology (Boston, MA, EE.UU.); anti-βactina (A-5441) de Sigma-Aldrich Inc. (Madrid, España).

Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces en TBS-T y se incubaron con IgG de cabra anti-ratón o anti-conejo marcada con peroxidasa (Pierce, Rockford, IL) diluida en TBS-T durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados en TBS-T, se visualizó el anticuerpo unido a la membrana con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce). El análisis densitométrico de las bandas de proteína se realizó utilizando el software ImageJ Biological Image Analysis (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.). Los resultados de la cuantificación de los blots de todos los experimentos se expresaron en porcentaje de estimulación con insulina en relación con la condición de DMSO (100%), o en veces de cambio en relación a la condición DMSO (1).

2.9. Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

El ARN total se extrajo con Reactivo TRI (Vibro, Sevilla, España). Seguidamente, el ADNc se obtuvo a partir de 1 µg de ARN mediante transcripción inversa (kit del sistema de transcripción inversa, Promega Inc., Madison, WI, EE. UU.). La RT-qPCR se llevó a cabo en un sistema detector de secuencias de PCR en tiempo real StepOnePlus™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Madrid, España) utilizando un kit SYBR Green (Promega Inc.) y cebadores aleatorios d(N)6 que se compraron a Metabion (Planegg, Alemania): 5'-TACGCTCTTCCCCATCTG-3' y 5'-TCCCTGGTCCAGTCTCACA-3' para glucosa 6 fosfatasa, 5'-CCAGGCAGTGAGGGAGTTTCT-3' y 5'-ACTGTGTCTCTTTGCTCTTGG-3' para fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, 5'-CACCTGCTGGAAACCACACTT-3' y 5'-AAGGTGAACCGGGACAGAGA-3' para PTP1B, 5'-AAGACATTATGACACGCCAAA-3' y 5'-GTTCTAGCTGTGGTGGGTATGG-3' para PTEN, 5'-GAGCACTTGATCGCCTACAAGA-3' y 5'-ACCACGGTCATCTGATCTGA-3' para PP2A. El gen 36B4 se utilizó como gen constitutivo normalizador. Los resultados se expresaron en veces de cambio en relación a la condición DMSO (1).

2.10. Análisis del contenido celular de glucógeno

Después retirar el suero del medio durante la noche, las células se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron con 200 µL de H₂O y se incubaron en hielo durante 10 minutos. A continuación, las muestras se hirvieron a 100°C durante 10 minutos para inactivar las enzimas y se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos más. El contenido de glucógeno en los sobrenadantes se midió con el kit de glucógeno Glycogen Assay Kit II (ab169558, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Los resultados se expresaron en µg de glucógeno normalizados por la proteína total (mg de proteína).

2.11. Tinción de PAS (Periodic acid-Schiff)

Las células se cultivaron sobre un cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro. Tras retirar el suero del medio durante la noche, las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Para la tinción de PAS se añadió una solución de ácido peryódico al 0.5% (Sigma-Aldrich Inc. Madrid, España) durante 5 minutos y, a continuación, se tiñeron con el reactivo de Schiff (Sigma-Aldrich Inc. Madrid, España) durante 15 minutos. Por último, se realizó la contratinción con hematoxilina durante 2 minutos y se montaron con el medio de montaje Permount (Thermo Fisher Scientific Inc.). Las preparaciones se examinaron con un microscopio óptico Nikon Eclipse E400 (Nikon, Japón). El análisis de las imágenes se realizó utilizando el software ImageJ Biological Image Analysis (NIH). Los resultados de la cuantificación de las imágenes de todos los experimentos se expresaron en unidades arbitrarias (u.a.).

2.12. Ensayo de producción de glucosa

Las células se incubaron durante la noche en DMEM sin suero y sin glucosa suplementado con piruvato de sodio 2 mM. Luego, se recogió el medio de cultivo y se midió el contenido de glucosa usando el kit de detección colorimétrica de glucosa. (Ref.15880712, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.). Los resultados se expresaron en mg/dL de glucosa normalizados por la proteína total (mg de proteína).

2.13. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para verificar la normalidad de la distribución de datos. Los datos obtenidos del estudio clínico se presentaron como media \pm desviación estándar (SD). Las características basales de los pacientes se presentaron como frecuencia y porcentaje. Las variables se compararon entre los grupos de pacientes (basal -B-, final del tratamiento -FdT- y final del seguimiento -FdS-) mediante el test de Wilcoxon de pares equiparados. Los datos experimentales obtenidos del estudio in vitro se presentaron como media \pm error estándar de la media (SEM) y se compararon utilizando el test t para datos no apareados. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software IBM SPSS Statistics 24.0 (SPSS Inc., IBM, Armonk, NY, EE. UU.) y el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.) con contraste bilateral, considerando estadísticamente significativo un p valor $< 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Características demográficas y basales de los pacientes

La población de estudio incluyó a 42 pacientes resistentes a la insulina (índice de resistencia a la insulina, HOMA > 2.5) antes de comenzar el tratamiento antiviral (29 hombres (69%), media

Tabla 1. Características demográficas, antropométricas, virológicas y bioquímicas de la población de estudio. Los datos se muestran como media \pm SD.

	Pacientes (n=42)
Edad (años)	53.5 \pm 9.8
Sexo (hombre/mujer)	29/13 (69% / 31%)
IMC (kg/m ²)	28.5 \pm 4.5
Hemoglobina (g/L)	144.7 \pm 17.4
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	150 \pm 77.3
Albúmina (g/dL)	3.9 \pm 0.6
INR	1.1 \pm 0.2
Creatinina (mg/L)	0.8 \pm 0.2
Carga viral (log ₁₀ IU/mL)	6.2 \pm 0.7
Estadio de fibrosis (Fibroscan):	F0- F1 5 (11.9%)
F2 7	(16.7%)
F3 8	(19%)
F4 22	(52.4%)

IMC, índice de masa corporal; INR, índice internacional normalizado.

de edad 53.5 años). El índice de masa corporal (IMC) medio fue de 28.5 kg/m². El examen mediante elastografía transitoria (TE) reveló solo 5 pacientes con F0-F1 y 7 pacientes con fibrosis moderada (F2), mientras que 30 pacientes tenían fibrosis avanzada o cirrosis (8 casos con F3 y 22 casos con F4) (Tabla 1).

Los pacientes fueron tratados según la elección del médico con regímenes terapéuticos basados en sofosbuvir (SOF). Los antivirales de acción directa utilizados para el tratamiento fueron: SOF / LED (\pm RBV) 66.7% (n=28/42), SOF / DAC (\pm RBV) 28.6% (n=12/42) y SOF / SIM (\pm RBV) 4.7 % (n=2/42). Al final del tratamiento, el 100% de los pacientes eliminó el ARN del VHC, con-

Tabla 2. Los regímenes antivirales basados en sofosbuvir producen una disminución significativa de la concentración sérica de marcadores de daño hepático en los pacientes con VHC.

	B	FdT	FdS
ALT (IU/L)	80.82 \pm 47.47	23.84 \pm 20.49 p<0.0001	21.03 \pm 7.937 p<0.0001
AST (IU/L)	68.57 \pm 37.62	26.72 \pm 16.46 p<0.0001	23.26 \pm 7.550 p<0.0001
GGT (IU/L)	127.9 \pm 104.2	41.49 \pm 50.57 p<0.0001	40.71 \pm 45.29 p<0.0001
Bilirrubina (mg/L)	0.7834 \pm 0.3853	0.7063 \pm 0.4055 p=0.0379	0.5745 \pm 0.3588 p<0.0001
FIB4	3.79 \pm 2.719	2.234 \pm 1.45 p<0.0001	2.171 \pm 1.406 p<0.0001

Los datos se muestran como media \pm SD. B: basal; FdT: fin del tratamiento; FdS: final del seguimiento.

Tabla 3. Los regímenes antivirales basados en sofosbuvir mejoran el estado de resistencia a la insulina de los pacientes con VHC.

	B	FdT	FdS
Glucosa (mg/dl)	111.1 ± 31.83	105.6 ± 32.08 $p=0.0687$	103.9 ± 33.92 $p=0.0156$
Insulina (μU/L)	20.55 ± 10.88	21.54 ± 16.84 $p=0.1113$	16.96 ± 10.63 $p=0.0002$
HOMA	5.566 ± 2.376	4.843 ± 3.358 $p=0.0048$	4.226 ± 2.524 $p<0.0001$
HbA1c (%)	5.765 ± 1.269	5.741 ± 0.9072 $p=0.2091$	5.724 ± 0.9970 $p=0.3762$

Los datos se muestran como media ± SD. B: basal; FdT: fin del tratamiento; FdS: final del seguimiento.

siguiendo una respuesta virológica sostenida en todos los pacientes. Como era de esperar, se detectó una disminución significativa de los marcadores séricos de daño hepático, como ALT, AST, GGT y bilirrubina total en los pacientes al final del tratamiento que se mantuvo un año después (Tabla 2). Además, el índice predictivo de fibrosis hepática FIB4 se redujo a lo largo de todo el estudio ($p<0.0001$) (Tabla 2).

3.2. Cambios en la resistencia a la insulina sistémica y el metabolismo de la glucosa

Los datos sobre los cambios en los niveles de glucosa e insulina en suero de los pacientes incluidos en el estudio se muestran en la Tabla 3. La glucosa en ayunas fue menor al final del tratamiento con respecto a los valores basales ($p=0.0687$), alcanzando una disminución significativa en la visita de seguimiento al año ($p=0.0156$). No se observaron cambios en los niveles de insulina tras el tratamiento ($p=0.1113$); sin embargo, se logró una diferencia estadísticamente significativa respecto al nivel basal un año después del final del tratamiento ($p<0.001$). Además, se observó una bajada significativa en el índice de resistencia a la insulina HOMA desde el final del tratamiento ($p=0.0048$), siendo más pronunciada un año después ($p<0.001$), en comparación con los datos iniciales. En cuanto a los niveles de HbA1c, no hubo diferencia a lo largo del estudio.

3.3. Variaciones en marcadores lipídicos

A continuación, se analizó el perfil lipídico de la población de estudio, encontrando un aumento significativo en el contenido de colesterol total, LDL y ApoB mantenido en el tiempo después del tratamiento ($p<0.005$), mientras que no se observaron diferencias en los valores de TG y HDL (Tabla 4).

3.4. El tratamiento con sofosbuvir consigue la eliminación del VHC en hepatocitos que expresan un replicón del VHC de manera estable

Con el fin de explorar los posibles mecanismos moleculares implicados en los efectos de sofosbuvir sobre la mejora de la resistencia a la insulina observada en los pacientes, realizamos un modelo experimental in vitro: células Huh7 que expresan un replicón del VHC de manera estable tratadas con sofosbuvir para la eliminación del virus y, posteriormente, estimuladas con diferentes dosis de insulina.

Tras 9 días de tratamiento con sofosbuvir (10 μM), no se detectó la expresión de las proteínas virales core y NS5A ni por inmunofluorescencia (Figura 1A) ni por análisis por *Western blot* (Figura 1B) en los hepatocitos que expresan un replicón del VHC en comparación con los que recibieron el vehículo (DMSO), lo que indica que mediante este protocolo de tratamiento con sofosbuvir se consigue la eliminación del VHC de manera eficaz.

Tabla 4. Los regímenes antivirales basados en sofosbuvir modifican el perfil lipídico de los pacientes con VHC.

	B	FdT	FdS
Colesterol total (mg/dl)	155 ± 37.95	182 ± 38.77 $p<0.0001$	174.9 ± 35.73 $p=0.0012$
LDL (mg/dl)	86.45 ± 32.50	110.9 ± 36.03 $p<0.0001$	105.8 ± 30.98 $p=0.0049$
ApoB (mg/dl)	82.13 ± 24.16	98.56 ± 28.58 $p<0.0001$	102.8 ± 32.63 $p=0.0001$
HDL (mg/dl)	47.83 ± 17.85	49.39 ± 17.11 $p=0.7258$	51.16 ± 14.21 $p=0.4116$
TG (mg/dl)	116.8 ± 60.21	106.2 ± 56.93 $p=0.1399$	111.3 ± 60.51 $p=0.6363$

Los datos se muestran como media ± SD. B: basal; FdT: fin del tratamiento; FdS: final del seguimiento.

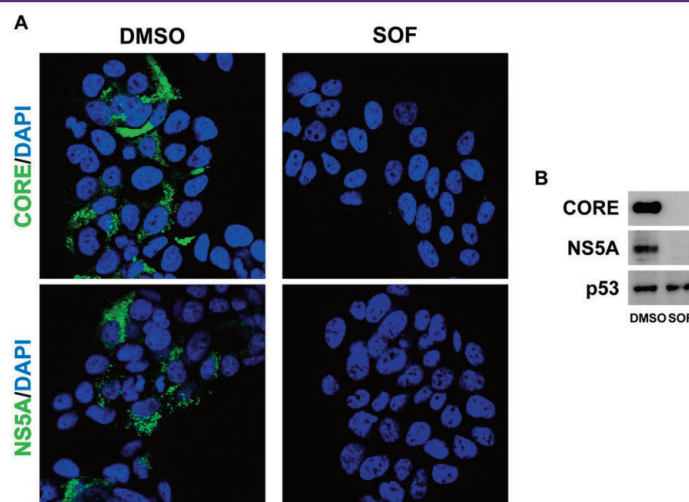


Figura 1. La eliminación del VHC se consigue tras el tratamiento con sofosbuvir en hepatocitos que expresan replicones del virus. Análisis por inmunofluorescencia (A) y Western blot (B) de la expresión de las proteínas virales core y NS5A de las células Huh7 con VHC que fueron tratadas durante 9 días con vehículo (DMSO) o sofosbuvir (SOF). p53 se utilizó como control de carga. (n=3 experimentos independientes realizados por duplicado).

3.5. Efectos del sofosbuvir sobre la respuesta deficiente a la insulina inducida por el VHC

A continuación, las células tratadas con DMSO o sofosbuvir se incubaron con insulina (1 o 10 nM) durante 10 minutos. Como se muestra en la Figura 2, se observa un ligero aumento de la fosforilación en tirosina del receptor de la insulina (IR) tras la inducción con insulina a 10 nM en los hepatocitos con VHC tratados con sofosbuvir en comparación con aquellos tratados con DMSO. Además, la fosforilación de AKT en respuesta a todas las dosis de insulina mejoró considerablemente en las células con VHC tratadas con el antiviral.

Con respecto a los sustratos de AKT, el tratamiento con sofosbuvir supuso un aumento en la fosforilación tanto de FoxO1 como de GSK3 β tras la estimulación con insulina (Figura 3).

Está ampliamente establecido que AKT fosforila al factor de transcripción FoxO1, impidiendo así su entrada en el núcleo y, en consecuencia, la transcripción de genes gluconeogénicos como glucosa 6 fosfatasa (G6PC) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PCK1) (23). Así que la modulación negativa de la señalización de insulina mediada por AKT que induce el VHC tiene como resultado la regulación positiva de G6PC y PCK1, lo que desencadena en un aumento en la producción de glucosa hepática; estos eventos provocados por el virus se revirtieron tras el tratamiento con sofosbuvir (Figura 4A y 4B).

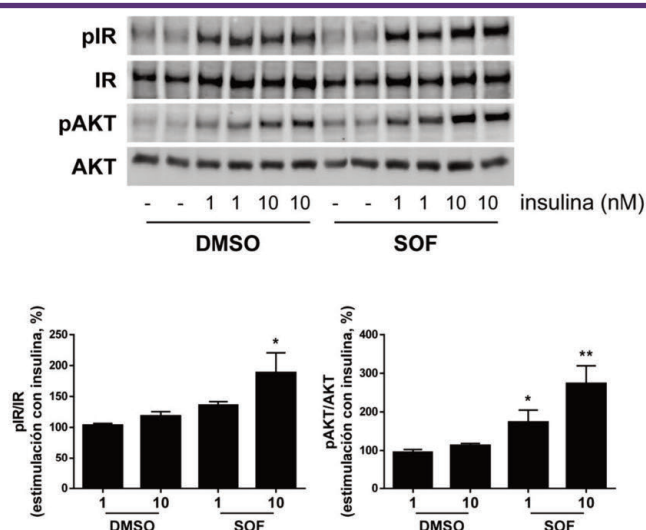


Figura 2. El tratamiento con sofosbuvir mejora la respuesta a la insulina en las células Huh7 con VHC. Análisis por Western blot de la fosforilación del receptor de insulina (pIR) y de la AKT de las células Huh7 con VHC que fueron tratadas durante 9 días con vehículo (DMSO) o sofosbuvir (SOF) y, posteriormente, se estimularon con insulina (1 o 10 nM) durante 10 min. Los datos se presentan como media \pm SEM. *p < 0.05 y **p < 0.01, SOF vs DMSO (n=4 experimentos independientes realizados por duplicado).

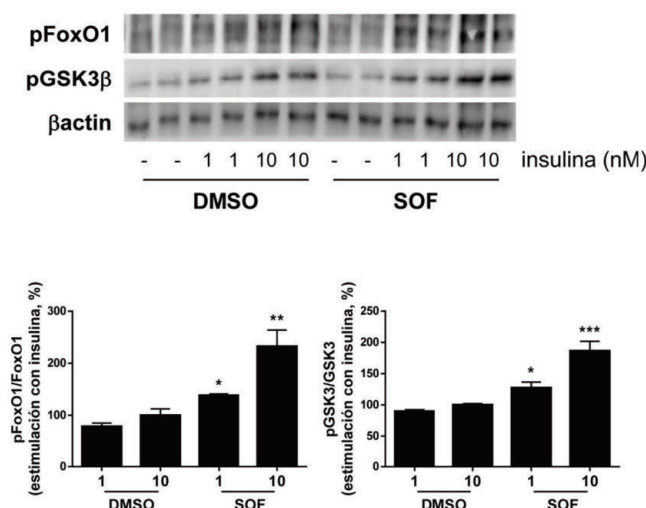


Figura 3. El tratamiento con sofosbuvir mejora la respuesta a la insulina en los hepatocitos con VHC. Análisis por Western blot de la fosforilación de FoxO1 y de GSK3 de las células Huh7 con VHC que fueron tratadas durante 9 días con vehículo (DMSO) o sofosbuvir (SOF) y, posteriormente, se estimularon con insulina (1 o 10 nM) durante 10 min. β actina se utilizó como control de carga. Los datos se presentan como media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$, SOF vs. DMSO ($n = 3$ experimentos independientes realizados por duplicado).

Por otro lado, la AKT induce la fosforilación de GSK3, inactivando su actividad quinasas, lo que posteriormente conduce a una activación de la glucógeno sintasa (GS), favoreciendo así la síntesis de glucógeno (24). En este sentido, la síntesis de glucógeno se vio impedida en las células con VHC y, tras el tratamiento con sofosbuvir, los niveles de glucógeno intracelular se incrementaron significativamente en comparación con las células tratadas con DMSO, como consecuencia directa de la recuperación de la señalización de AKT (Figura 5).

3.6. El tratamiento con sofosbuvir recupera la expresión de proteína de IRS1 en hepatocitos con VHC

Lo siguiente fue dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes a los efectos del sofosbuvir sobre la mejora de la respuesta a la insulina en los hepatocitos con VHC. Mientras que los niveles proteicos del receptor de la insulina se mantuvieron sin cambios (Figura 2), los de IRS1 aumentaron en las células tratadas con sofosbuvir (Figura 6A).

Puesto que es un hecho consolidado que el VHC altera la señalización de la insulina a través de la fosforilación en residuos serina de IRS1 (25), se analizaron los niveles de esta fosforilación, encontrando una atenuación de la misma en las células con VHC tratadas con sofosbuvir en comparación con las tratadas con DMSO (Figura 6B), lo que explicaría la restitución de la acción de la insulina, sobre todo a nivel de AKT, tras el tratamiento con el antiviral. Finalmente, evaluamos la posibilidad de que los cambios en la expresión de moduladores negativos de la señalización de la insulina también pudieran explicar la sensibilización a la insulina inducida por sofosbuvir en los hepatocitos con VHC. De acuerdo con esta hipótesis, medimos la expresión de PTP1B, PTEN y PP2A en los hepatocitos que expresan el VHC tratados con DMSO o sofosbuvir. Como se muestra en la Figura 7, los niveles de ARNm de todas estas fosfatases (PTPN1, PTEN y PPP2CA, respectivamente) permanecieron inalterados.

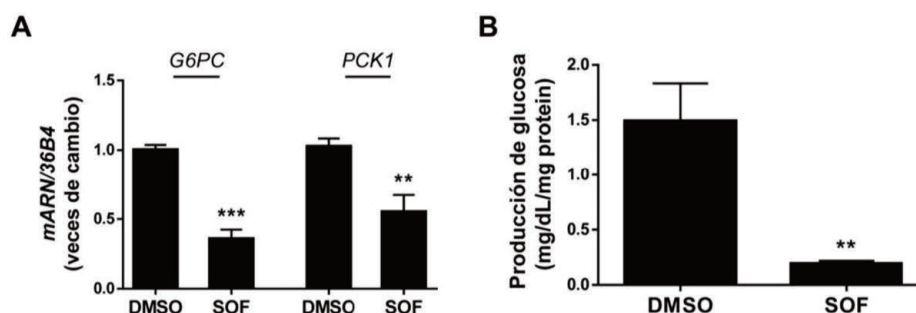


Figura 4. El tratamiento con sofosbuvir reduce la gluconeogénesis exacerbada por el VHC. Análisis por RT-qPCR de los niveles de ARNm de G6PC y PCK1 (A) y de la producción de glucosa (B) de las células Huh7 con VHC que fueron tratadas durante 9 días con vehículo (DMSO) o tratamiento con SOF. Los datos se presentan como media \pm SEM. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$, SOF vs. DMSO ($n = 3$ experimentos independientes realizados por duplicado).

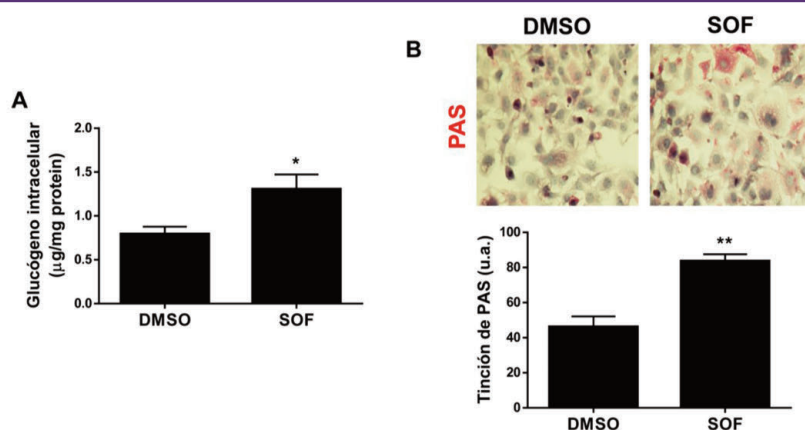


Figura 5. El tratamiento con sofosbuvir favorece la síntesis de glucógeno en los hepatocitos con VHC. Análisis del contenido de glucógeno intracelular por colorimetría (A) y por tinción de PAS (B) de las células Huh7 con VHC que fueron tratadas durante 9 días con vehículo (DMSO) o tratamiento con sofosbuvir (SOF). Los datos se presentan como media \pm SEM. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$, SOF vs. DMSO ($n = 3$ experimentos independientes realizados por duplicado).

4. DISCUSIÓN

El presente estudio traslacional ha demostrado que el tratamiento con sofosbuvir mejora la resistencia sistémica a la insulina en pacientes con VHC y, por primera vez, se ha revelado qué mecanismos moleculares están implicados en los efectos de este antiviral sobre la respuesta insulínica alterada inducida por el VHC en los hepatocitos.

Una de las principales preocupaciones en el campo de la atención sanitaria es el gran número de personas afectadas por la infección crónica por el VHC y sus complicaciones asociadas. En este sentido, la infección crónica por el VHC está asociada con la aparición de resistencia a la insulina, y se ha descrito un aumento en el riesgo de padecer diabetes tipo 2 en pacientes infectados por el VHC (4, 5). De hecho, el desarrollo de estas complicaciones metabólicas relacionadas con el VHC afecta la calidad de la salud de los pacientes y supone una carga importante para la atención médica. En los últimos años, la llegada de terapias anti-VHC basadas en antivirales

de acción directa se ha convertido en un avance revolucionario en el tratamiento de la infección por VHC. La infección crónica por VHC parece estar disminuyendo con la llegada de estos nuevos tratamientos. Este hecho se manifiesta en una menor carga de pacientes con cirrosis e insuficiencia hepática crónica entre aquellos añadidos a lista de espera y los nuevos receptores de trasplantes.

Los resultados obtenidos en el estudio clínico mostraron que los pacientes con VHC resistentes a la insulina tratados con regímenes terapéuticos basados en sofosbuvir fueron respondedores al tratamiento, independientemente del genotipo o del grado de fibrosis hepática. Como era de esperar, se detectó una disminución significativa de la concentración de marcadores séricos de daño hepático -AST, ALT, GGT y bilirrubina- en los pacientes al final del tratamiento que se mantuvo un año después, en concordancia con la consecución de una respuesta viral sostenida, en paralelo a una reducción del índice predictivo de fibrosis hepática FIB4 a lo largo del estudio. Además, se encontró que los tratamientos basados en sofosbuvir parecen mejorar la homeostasis glucídica de los pacientes

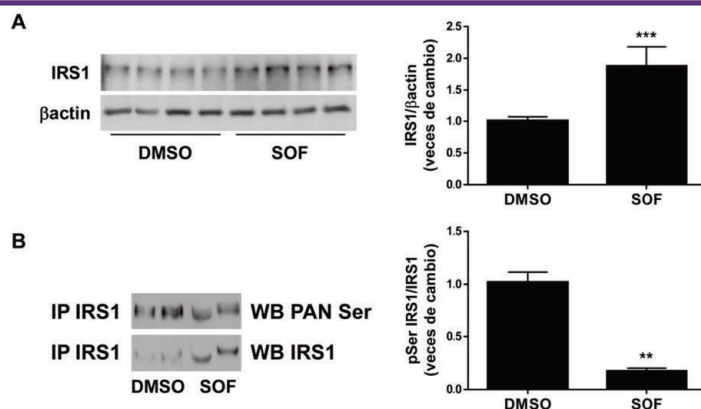


Figura 6. El sofosbuvir induce un aumento del contenido proteico de IRS1 paralelo a una reducción en su fosforilación en residuos serina en hepatocitos con VHC. Análisis por Western blot de la expresión de IRS1 (A) y de su fosforilación en residuos serina (B) de las células Huh7 con VHC que fueron tratadas durante 9 días con vehículo (DMSO) o sofosbuvir (SOF). β actina se utilizó como control de carga. Los datos se presentan como media \pm SEM. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$, SOF vs. DMSO ($n = 3-4$ experimentos independientes realizados por duplicado/triplicado).

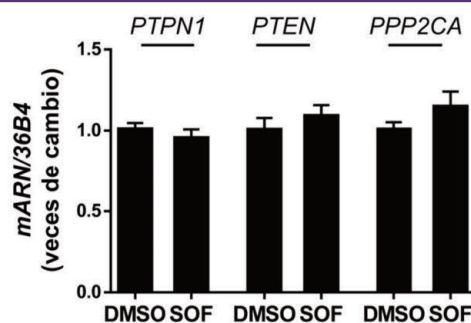


Figura 7. El sofosbuvir no altera la expresión de moduladores negativos de la señalización de insulina en células con VHC. Análisis por RT-qPCR de los niveles de ARNm de PTPN1, PTEN y PPP2CA de las células Huh7 con VHC que fueron tratadas durante 9 días con vehículo (DMSO) o tratamiento con SOF. Los datos se presentan como media \pm SEM (n=3 experimentos independientes realizados por duplicado).

con VHC. En particular, se observó una reducción significativa del índice HOMA post-tratamiento, que se mantuvo un año después. Estos hallazgos concuerdan con datos previos que mostraron que los regímenes de antivirales de acción directa libres de interferón mejoran la resistencia sistémica a la insulina y los niveles de glucosa en sangre en pacientes que eliminaron el VHC (21, 26-31). Con respecto al hígado, sólo un estudio ha demostrado que la erradicación viral conseguida con estos nuevos tratamientos mejora la sensibilidad a la insulina hepática en pacientes con VHC que se sometieron a un clamp euglicémico-hiperinsulinémico (32).

A nivel molecular, este estudio también ha demostrado que el sofosbuvir mejora la resistencia a la insulina hepática inducida por la infección por el VHC. En este sentido, es bien sabido que el VHC interfiere en los primeros pasos de la cascada de señalización de la insulina, específicamente mediante la reducción de la expresión de las proteínas IRS, IRS1 "and" IRS2 (10, 11). La inactivación de estas proteínas "embarcadero" por diferentes mecanismos, como la degradación mediada por el proteasoma, se ha asociado en gran medida con la resistencia a la insulina (33). Es importante destacar que en este estudio el VHC provocó una reducción del contenido de proteína de IRS1 en los hepatocitos, lo cual concuerda con estudios previos realizados en diferentes sistemas celulares para el estudio del VHC (12, 34), y el tratamiento con sofosbuvir fue capaz de equilibrar los bajos niveles de esta proteína IRS1 en células con VHC.

De hecho, se observó que los niveles de fosforilación en residuos serina de IRS1 disminuyeron en las células con VHC tratadas con sofosbuvir en comparación con las células con VHC no tratadas, lo que podría explicar la recuperación del contenido de proteína total de IRS1 después del tratamiento con este antiviral. En este sentido, está bien establecido que la proteína VHC-core induce la fosforilación en residuos serina de IRS1 bloqueando la fosforilación en tirosina e induciendo la degradación de IRS1 por el proteasoma (10, 14, 34). Puesto que IRS1 es una molécula crítica involucrada en la transducción de la señal de insulina desde el receptor de la insulina, su degradación altera la activación de AKT, lo

que conduce a la resistencia a la insulina. En este estudio, se encontró que el tratamiento con sofosbuvir aumentó considerablemente la fosforilación de AKT en respuesta a la insulina en hepatocitos con VHC en comparación con la condición de DMSO, revirtiendo el estado de resistencia a la insulina y, en consecuencia, la expresión elevada de genes gluconeogénicos, el aumento de la producción de glucosa y la deficiencia en la síntesis de glucógeno, todos ellos eventos inducidos por el VHC. Otros estudios también han demostrado que el tratamiento de células infectadas con VHC con interferón modifica parcialmente los marcadores indirectos de resistencia a la insulina, como la inducción de la gluconeogénesis (35, 36). Sin embargo, este es el primer estudio que muestra una reversión en el bloqueo de la vía de señalización IR / IRS1 / AKT en respuesta a la insulina en células con VHC curadas, que se refleja en una disminución de la gluconeogénesis y una recuperación de la síntesis de glucógeno, otorgando al sofosbuvir un papel clave en la regulación de esta vía y explicando sus efectos metabólicos sobre la señalización de la insulina.

Dado que se ha descrito que el VHC también puede modificar la expresión de moduladores negativos de la señalización de la insulina como son las fosfatases PTP1B, PTEN y PP2A, se evaluó la posibilidad de que cambios en su expresión pudieran explicar la sensibilización a la insulina inducida por sofosbuvir en hepatocitos que expresan el VHC; sin embargo, el antiviral no moduló sus niveles de expresión génica en las células con VHC.

Por otro lado, el VHC es también capaz alterar el metabolismo de los lípidos, ya que varios estudios han documentado hipocolesterolemia e hipolipidemia, particularmente niveles más bajos de colesterol total, LDL y ApoB, el principal componente proteico de LDL y VLDL, en pacientes con infección crónica por VHC (37-39). Aunque nuestro estudio no fue diseñado para aclarar los efectos del VHC sobre el metabolismo de lípidos, ha demostrado que la eliminación exitosa del VHC resultó en un restablecimiento de los niveles circulantes de colesterol total, LDL y ApoB, de acuerdo con las observaciones en pacientes que lograron una respuesta viral sostenida tras el tratamiento con antivirales de acción directa o con interferón (40, 41).

5. CONCLUSIONES

Tomados en conjunto, los resultados derivados de este estudio traslacional indican que el sofosbuvir mejora la respuesta a la insulina alterada por la infección del VHC. De hecho, este estudio es especialmente relevante ya que es el primero que revela los mecanismos moleculares implicados en la sensibilización a la insulina hepática inducida por el tratamiento con sofosbuvir, que implica la recuperación de los niveles de proteína IRS1 como evento clave de sus efectos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que NO tienen conflicto de intereses y agradecen el apoyo financiero de la subvención CP14/00181 del Instituto de Salud Carlos III con financiada con fondos FEDER.

6. REFERENCIAS

1. WHO. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with chronic hepatitis C infection. Guidelines for the Care and Treatment of Persons Diagnosed with Chronic Hepatitis C Virus Infection. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Geneva 2018.
2. Goldberg D, Ditah IC, Saeian K, Lalehzari M, Aronsohn A, Gorospe EC, et al. Changes in the Prevalence of Hepatitis C Virus Infection, Nonalcoholic Steatohepatitis, and Alcoholic Liver Disease Among Patients With Cirrhosis or Liver Failure on the Waitlist for Liver Transplantation. *Gastroenterology*. 2017;152(5):1090-9 e1.
3. Desbois AC, Cacoub P. Diabetes mellitus, insulin resistance and hepatitis C virus infection: A contemporary review. *World journal of gastroenterology*. 2017;23(9):1697-711.
4. Gastaldi G, Goossens N, Clement S, Negro F. Current level of evidence on causal association between hepatitis C virus and type 2 diabetes: A review. *Journal of advanced research*. 2017;8(2):149-59.
5. Wang CC, Cheng PN, Kao JH. Systematic review: chronic viral hepatitis and metabolic derangement. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2020;51(2):216-30.
6. White DL, Ratzin V, El-Serag HB. Hepatitis C infection and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Journal of hepatology*. 2008;49(5):831-44.
7. Cacoub P, Carrat F, Bedossa P, Lambert J, Penaranda G, Pol S, et al. Insulin resistance impairs sustained virological response rate to pegylated interferon plus ribavirin in HIV-hepatitis C virus-coinfected patients: HOMAVIC-ANRS HCO2 Study. *Antiviral therapy*. 2009;14(6):839-45.
8. El-Zayadi AR, Anis M. Hepatitis C virus induced insulin resistance impairs response to anti viral therapy. *World journal of gastroenterology*. 2012;18(3):212-24.
9. Romero-Gomez M, Del Mar Viloria M, Andrade RJ, Salmeron J, Diago M, Fernandez-Rodriguez CM, et al. Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology*. 2005;128(3):636-41.
10. Garcia-Monzon C, Lo Iacono O, Mayoral R, Gonzalez-Rodriguez A, Miquilena-Colina ME, Lozano-Rodriguez T, et al. Hepatic insulin resistance is associated with increased apoptosis and fibrogenesis in nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Journal of hepatology*. 2011;54(1):142-52.
11. Kawaguchi T, Yoshida T, Harada M, Hisamoto T, Nagao Y, Ide T, et al. Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3. *The American journal of pathology*. 2004;165(5):1499-508.
12. Pazienza V, Clement S, Pugnale P, Conzelman S, Foti M, Mangia A, et al. The hepatitis C virus core protein of genotypes 3a and 1b downregulates insulin receptor substrate 1 through genotype-specific mechanisms. *Hepatology*. 2007;45(5):1164-71.
13. Ahmed QL, Manzoor S, Tariq M, Khalid M, Ashraf W, Parvaiz F, et al. Hepatitis C virus infection in vitro triggers endoplasmic reticulum stress and downregulates insulin receptor substrates 1 and 2 through upregulation of cytokine signaling suppressor 3. *Acta virologica*. 2014;58(3):238-44.
14. Banerjee S, Saito K, Ait-Goughoulte M, Meyer K, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein upregulates serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and impairs the downstream akt/protein kinase B signaling pathway for insulin resistance. *Journal of virology*. 2008;82(6):2606-12.
15. Duong FH, Filipowicz M, Tripodi M, La Monica N, Heim MH. Hepatitis C virus inhibits interferon signaling through up-regulation of protein phosphatase 2A. *Gastroenterology*. 2004;126(1):263-77.
16. Pecoraro V, Banzi R, Cariani E, Chester J, Villa E, D'Amico R, et al. New Direct-Acting Antivirals for the Treatment of Patients With Hepatitis C Virus Infection: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Journal of clinical and experimental hepatology*. 2019;9(4):522-38.
17. Shah N, Pierce T, Kowdley KV. Review of direct-acting antiviral agents for the treatment of chronic hepatitis C. *Expert opinion on investigational drugs*. 2013;22(9):1107-21.
18. Umar M, Akhter TS. New Direct Acting Antiviral Agents for the Treatment of Hepatitis C: 2016 and Beyond. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP*. 2016;26(10):843-50.
19. Herbst DA, Jr., Reddy KR. Sofosbuvir, a nucleotide polymerase inhibitor, for the treatment of chronic hepatitis C virus infection. *Expert opinion on investigational drugs*. 2013;22(4):527-36.
20. Rodriguez-Torres M, Lawitz E, Kowdley KV, Nelson DR, Dejesus E, McHutchison JG, et al. Sofosbuvir (GS-7977) plus peginterferon/ribavirin in treatment-naïve patients with HCV genotype 1: a randomized, 28-day,



- dose-ranging trial. *Journal of hepatology*. 2013;58(4):663-8.
21. Ribaldone DG, Sacco M, Saracco GM. The Effect of Viral Clearance Achieved by Direct-Acting Antiviral Agents on Hepatitis C Virus Positive Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Word of Caution after the Initial Enthusiasm. *Journal of clinical medicine*. 2020;9(2).
22. Benedicto I, Molina-Jimenez F, Barreiro O, Maldonado-Rodriguez A, Prieto J, Moreno-Otero R, et al. Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *Hepatology*. 2008;48(4):1044-53.
23. Zhang W, Patil S, Chauhan B, Guo S, Powell DR, Le J, et al. FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(15):10105-17.
24. Lee J, Kim MS. The role of GSK3 in glucose homeostasis and the development of insulin resistance. *Diabetes research and clinical practice*. 2007;77 Suppl 1:S49-57.
25. Douglas MW, George J. Molecular mechanisms of insulin resistance in chronic hepatitis C. *World journal of gastroenterology*. 2009;15(35):4356-64.
26. Fabrizio C, Procopio A, Scudeller L, Dell'Acqua R, Bruno G, Milano E, et al. HCV and diabetes: towards a 'sustained' glycaemic improvement after treatment with DAAs? *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2017;23(5):342-3.
27. Gastaldi G, Gomes D, Schneiter P, Montet X, Tappy L, Clement S, et al. Treatment with direct-acting antivirals improves peripheral insulin sensitivity in non-diabetic, lean chronic hepatitis C patients. *PLoS one*. 2019;14(6):e0217751.
28. Huang JF, Huang CF, Yeh ML, Dai CY, Hsieh MH, Yang JF, et al. The outcomes of glucose abnormalities in chronic hepatitis C patients receiving interferon-free direct antiviral agents. *The Kaohsiung journal of medical sciences*. 2017;33(11):567-71.
29. Hum J, Jou JH, Green PK, Berry K, Lundblad J, Hettinger BD, et al. Improvement in Glycemic Control of Type 2 Diabetes After Successful Treatment of Hepatitis C Virus. *Diabetes care*. 2017;40(9):1173-80.
30. Pavone P, Tieghi T, d'Ettorre G, Lichtner M, Marocco R, Mezzaroma I, et al. Rapid decline of fasting glucose in HCV diabetic patients treated with direct-acting antiviral agents. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2016;22(5):462 e1-3.
31. Ciancio A, Bosio R, Bo S, Pellegrini M, Sacco M, Vogliotti E, et al. Significant improvement of glycemic control in diabetic patients with HCV infection responding to direct-acting antiviral agents. *Journal of medical virology*. 2018;90(2):320-7.
32. Lim TR, Hazlehurst JM, Oprescu AI, Armstrong MJ, Abdullah SF, Davies NP, et al. Hepatitis C virus infection is associated with hepatic and adipose tissue insulin resistance that improves after viral cure. *Clinical endocrinology*. 2019;90(3):440-8.
33. Copps KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*. 2012;55(10):2565-82.
34. Bose SK, Shrivastava S, Meyer K, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus activates the mTOR/S6K1 signaling pathway in inhibiting IRS-1 function for insulin resistance. *Journal of virology*. 2012;86(11):6315-22.
35. Deng L, Shoji I, Ogawa W, Kaneda S, Soga T, Jiang DP, et al. Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway. *Journal of virology*. 2011;85(17):8556-68.
36. Shlomai A, Rechtman MM, Burdelova EO, Zilberberg A, Hoffman S, Solar I, et al. The metabolic regulator PGC-1 α links hepatitis C virus infection to hepatic insulin resistance. *Journal of hepatology*. 2012;57(4):867-73.
37. Jung HJ, Kim YS, Kim SG, Lee YN, Jeong SW, Jang JY, et al. The impact of pegylated interferon and ribavirin combination treatment on lipid metabolism and insulin resistance in chronic hepatitis C patients. *Clinical and molecular hepatology*. 2014;20(1):38-46.
38. Lacerda GS, Medeiros T, Rosario NFD, Peralta RHS, Cabral-Castro MJ, Esberard EBC, et al. Exploring lipid and apolipoprotein levels in chronic hepatitis C patients according to their response to antiviral treatment. *Clinical biochemistry*. 2018;60:17-23.
39. Sun HY, Cheng PN, Tseng CY, Tsai WJ, Chiu YC, Young KC. Favouring modulation of circulating lipoproteins and lipid loading capacity by direct antiviral agents grazoprevir/elbasvir or ledipasvir/sofosbuvir treatment against chronic HCV infection. *Gut*. 2018;67(7):1342-50.
40. Corey KE, Kane E, Munroe C, Barlow LL, Zheng H, Chung RT. Hepatitis C virus infection and its clearance alter circulating lipids: implications for long-term follow-up. *Hepatology*. 2009;50(4):1030-7.
41. El Sagheer G, Soliman E, Ahmad A, Hamdy L. Study of changes in lipid profile and insulin resistance in Egyptian patients with chronic hepatitis C genotype 4 in the era of DAAs. *The Libyan journal of medicine*. 2018;13(1):1435124.

Si desea citar nuestro artículo:

Esther Rey, Patricia Mara \tilde{n} y \acute{A} gueda Gonz \acute{a} lez-Rodr \acute{i} guez

El tratamiento con sofosbuvir mejora la resistencia a la insulina inducida por el virus de la hepatitis C

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 87. N $^{\circ}$ 1 (2021) · pp. 15 - 26

DOI: <http://>

PERFILES DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS EN CEPAS DEL GENERO *BACILLUS* AISLADAS DE AMBIENTES ACUÁTICOS EXTREMOS DEL ECUADOR

SUSCEPTIBILITY PROFILES TO ANTIBIOTICS IN STRAINS OF THE GENUS *BACILLUS* ISOLATED FROM EXTREME AQUATIC ENVIRONMENTS OF ECUADOR

Marco González¹, Francisco Viteri¹, Luis Villacís¹, Jessica Escobar¹, Liliana Araujo³, Ana González³, Gerado Medina⁴, Judith Araque^{1,4}, Félix Andueza^{1,4}.

¹ FIGEMPA. Universidad Central del Ecuador. Quito. Ecuador; ² Escuela Superior Politécnica del Chimborazo. Riobamba. Ecuador;

³ Universidad Nacional del Chimborazo. Riobamba. Ecuador; ⁴ Universidad de los Andes. Mérida. Venezuela

*corresponding author: fdandueza@uce.edu.ec

ARTÍCULO

RESUMEN

Introducción. En el agua de los ecosistemas acuáticos considerados extremos, debido a los valores de sus parámetros fisicoquímicos y químicos, tales como altas concentraciones de sales, ambientes oligotróficos, pH extremos, alta radiación y temperaturas extremas, existe una población bacteriana que se ha adaptado a esas condiciones y que pueden ser un reservorio importante de resistomas naturales.

Objetivo. Conocer los perfiles de susceptibilidad a diversos antibióticos en cepas del género *Bacillus* aisladas de balnearios de aguas mineromedicinales y de agua de un lago cratérico volcánico del Ecuador.

Materiales y métodos. Se analizaron un total de 16 muestras de agua mineromedicinal y 32 muestras de agua de lago cratérico volcánico. El aislamiento de *Bacillus* se realizó por la técnica de filtración en membrana, utilizando filtros Millipore de 0,45 µm de poro, un volumen de muestra de 100 mL y el agar R₂A. Las cepas aisladas se identificaron siguiendo los esquemas de MacFaddin (2004), complementadas con las pruebas bioquímicas de las galerías Microgen para *Bacillus*. El perfil de resistencia a los antibióticos se determinó por el método de difusión en placas de Kirby y Bauer (1966) interpretándose según el CLSI (2019).

Resultados. Se identificaron 19 cepas de *Bacillus*. La mayoría de las cepas fueron resistentes y multiresistentes a los antibióticos clindamicina, eritromicina, gentamicina, oxacilina y penicilina.

Conclusiones. Los resultados señalan la presencia de especies de *Bacillus* y de resistomas asociados a este género en el agua de ambientes naturales extremos en el Ecuador, lo cual sugiere que estos ambientes pueden ser un reservorio importante de bacterias resistentes a los antibióticos.

ABSTRACT

Introduction. The water of aquatic ecosystems considered extreme, given the values of its physicochemical and chemical parameters, such as high concentrations of salts, oligotrophic environments, extreme pH, high radiation and extreme temperatures, there is a bacterial population that has adapted to these conditions and that they can be an important reservoir of natural resistomes.

Objective. The objective of the present work was to know the profiles of susceptibility to various antibiotics in strains of the *Bacillus* genus isolated from mineromedicinal water spas and water from a volcanic crater lake in Ecuador.

Materials and methods. A total of 16 mineromedicinal water samples and 32 samples of crater volcanic lake water were analyzed. The isolation of the *Bacillus* colonies was carried out by the membrane filtration technique, using Millipore filters of 0.45 µm pore, a sample volume of 100 mL and R₂A agar. The isolated strains were identified following the schemes of MacFaddin (2004), complemented with the biochemical tests of the Microgen galleries for *Bacillus*. The antibiotic resistance profile was determined by the plate diffusion method of Kirby and Bauer (1966), interpreted according to the CLSI (2019).

Results. 19 *Bacillus* strains were identified. Most of the strains were resistant and multi-resistant to the antibiotic clindamycin, erythromycin, gentamicin, oxacillin, and penicillin. **Conclusions.** The results indicate the presence of *Bacillus* species and resistomes associated with this genus in the water of extreme natural environments in Ecuador, which suggests that these environments may be an important reservoir of bacteria resistant to antibiotics.

Palabras Clave:

Agua mineromedicinal
Ambientes extremos
Bacillus
Lagos crátericos
Resistencia a antibióticos

Keywords:

Mineromedicinal water
Extreme environments
Bacillus
Crater lakes
Antibiotic resistance

1. INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas acuáticos considerados como extremos no son estériles y poseen una población bacteriana escasa que depende básicamente de las condiciones ambientales, ecológicas, fisicoquímicas y químicas de estos sistemas generalmente de naturaleza oligotrófica (1,2).

Según Schmidt-Lorenz (3), la microbiota de un agua natural está constituida por dos tipos de microorganismos, muy diferentes en origen y en propiedades, que coexisten: los llamados autóctonos que son los propios del hábitat y que constituyen la microbiota natural y los alóctonos procedentes de otro hábitat (aire, animales, peces, suelo y vegetales) y que se consideran contaminantes ocasionales.

Dentro de los microorganismos que se han detectado en los ambientes acuáticos extremos, se encuentran diferentes especies del género *Bacillus* (2, 4, 5).

El género *Bacillus* fue descrito por primera vez por Ferdinand Julius Cohn entre 1870 y 1880, su heterogeneidad en la fisiología ecológica ha dificultado su clasificación taxonómica (6, 7).

Bacillus es un género de interés, dado que aporta un amplio perfil de diversidad fisiológica (acidofilia, alcalofilia, psicofilia y termofilia), virtud que es otorgada por la variedad de enzimas que posee, lo cual le permite desarrollarse en diferentes hábitats tanto acuáticos como terrestres, además de permitirle la producción de diferentes tipos de metabolitos que les confieren una alta adaptabilidad a distintas condiciones ambientales (7).

Algunas de las especies de *Bacillus* son consideradas como patógenas para animales y el hombre, causando una diversidad de enfermedades tanto agudas como crónicas, algunas de ellas con una alta tasa de mortalidad, como es el caso del *Bacillus anthracis*, causante del ántrax (8).

Para tratar las infecciones causadas por las especies patógenas de *Bacillus* se han aplicado diversos tipos de antibióticos. Sin embargo, en los últimos años se han venido observando los fenómenos de resistencia y multiresistencia a los antibióticos utilizados, lo cual ha venido causando problemas de salud pública (9).

El rápido incremento de la resistencia a los antibióticos en las comunidades bacterianas es un fenómeno ecológico, pero también es un fenómeno biológico, genético, epidemiológico y social (10).

Se ha postulado que la resistencia bacteriana a los antimicrobianos es el resultado del uso indiscriminado de estas sustancias, que ejercen presión selectiva, promoviendo la supervivencia de bacterias mejor dotadas para evitar su efecto letal (11).

Por otro lado, la resistencia bacteriana a los antibióticos sustenta la existencia ambiental de genes de resistencia a estos antimicrobianos en un sistema acuático y terrestre, lo que se ha denominado resistomas ambientales en los que están presentes bacterias de distintos géneros y especies (12).

Diversos autores han demostrado la presencia de diferentes tipos de cepas bacterianas, entre ellas de *Bacillus*, resistentes y multiresistentes a los antibióticos en ecosistemas acuáticos extremos de diferentes partes del mundo (13, 14) lo que es de gran interés desde el punto de vista de la epidemiología, y sobre todo de la salud pública, dado que estas aguas son utilizadas de diferentes maneras por personas que viven cercanas a estos ambientes o por personas que las utilizan ocasionalmente en forma recreacional.

Tomando en consideración lo antes señalado, se planteó el presente trabajo de investigación cuyo objetivo principal fue determinar los perfiles de susceptibilidad a los antibióticos en especies bacterianas del género *Bacillus* aisladas de ambientes acuáticos extremos, tales como manantiales de aguas termales y agua de lagos cratéricos volcánicos del Ecuador.



Figura 1. Piscina termal del balneario "Cununyacu". Provincia de Pichincha. Ecuador



Figura 2. Piscina Balneario "La Merced". Provincia de Pichincha. Ecuador

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Sitios de muestreos

Se analizaron un total de 16 muestras de agua minero-medicinal provenientes de los sitios de emergencia del agua, como de las piscinas utilizadas por los bañistas, de cada uno de los siguientes balnearios:

- 1.- Balneario Cununyacu. Provincia de Pichincha. Ecuador (Figura 1).
- 2.- Balneario La Merced. Provincia de Pichincha. Ecuador (Figura 2).
- 3.- Balneario Rumiloma. Provincia de Pichincha. Ecuador (Figura 3).
- 4.- Balneario Urauco. Provincia de Pichincha. Ecuador (Figura 4).

De igual forma, se realizaron dos campañas de muestreos en el lago cratérico volcánico Quilotoa (Figura 5), ubicado a 3914 m.s.n.m en la Provincia de Cotopaxi, a 32 km oeste-noroeste de la ciudad de Latacunga y a 83 km al suroeste de Quito, en una zona montañosa entre las parroquias de Zumbahua (12.5 Km. Al Sur del cráter) y Sigchos (17 Km. Al Norte del cráter), ecosistema que forma parte de la reserva ecológica "Los Ilinizas".

2.1.2 Muestras

En cada uno de los balneario de agua mineromedicinal estudiados, se tomaron de manera aséptica, 2 muestras de 500 mL de agua, recolectadas en recipientes estériles, durante 2 ocasiones del año 2019. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su procesamiento en el laboratorio, lo cual se realizó dentro de las 24 horas luego de su recolección.



Figura 3. Vista del balneario "Rumiloma". Provincia de Pichincha. Ecuador



Figura 4. Manantial del balneario mineromedicinal "Urauco". Provincia de Pichincha. Ecuador

En el caso de las muestras del agua del lago cratérico Quilotoa, se tomaron un total de 32 muestras. Las muestras de agua se recolectaron en 8 sitios seleccionados a lo largo y ancho de la laguna a nivel de la superficie. Se identificaron las coordenadas geográficas de los sitios de recolección mediante un GPS (*Garmin eTrex20*).

En cada ocasión de muestreo, se recolectaron dos muestras de agua de 1 litro en cada uno de los sitios de muestreos seleccionados. Para la recolección de las muestras se utilizaron frascos esterilizados y un muestreador de agua *Van Dorn* (*Wildco Instruments* y modelo: 3-1120-G45).

Las muestras se cubrieron con papel aluminio para evitar el paso de luz solar, trasladándose bajo refrigeración en una cava refrigerada con hielo hasta el laboratorio, realizándose los análisis microbiológicos dentro de las 24 horas luego de la toma.

2.2 Métodos

2.2.1 Aislamiento de cepas bacterianas de *Bacillus* presentes en muestras de aguas de ambientes extremos de Ecuador

Se utilizó la técnica de filtración en membrana, filtrando un volumen de 100 mL de muestra de agua y utilizando filtros de 0,45 μm los cuales se colocaron sobre la superficie del Agar R₂A y se incubaron a 30 °C durante un tiempo máximo de 7 días. Se aislaron y purificaron las colonias crecidas en Agar Soja Trypticase para su posterior identificación (15).

2.2.2 Identificaciones taxonómicas de las colonias de *Bacillus* aisladas

Se realizaron tinciones de Gram y pruebas bioquímicas de acuerdo con los esquemas de MacFaddin (16) complementadas con las contenidas en el kit comercial de identificación bacteriana



Figura 5. Vista del lago craterico volcánico "Quilotoa". Provincia de Cotopaxi. Ecuador.

Microgen para *Bacillus* (17). Se consideró una buena identificación cuando los porcentajes de probabilidad de identificación arrojados por el *software* de Microgen (Microgen ID, versión 1.2.5.26) fueron superiores al 75%.

Las cepas bacterianas aisladas se clasificaron siguiendo los criterios taxonómicos del Manual de Bergey (18) y la nomenclatura del Comité Internacional de Sistemática Bacteriana (ICSB) y publicadas en el *International Journal of Systematic Bacteriology*.

2.2.3 Determinación del perfil de susceptibilidad a los antibióticos de las cepas de *Bacillus* aisladas e identificadas

Se utilizó el método de difusión en agar de acuerdo con la técnica Kirby y Bauer (19). Se tomaron 200 µL de una suspensión de bacterias equivalente al McFarland 0,5 y se mezclaron con 100 mL de agar antibiótico. Se depositaron 25 mL en placas de Petri estériles con agar Mueller Hinton y una vez solidificado se colocaron sobre su superficie discos de ampicilina (AMP 10 µg), ciprofloxacina (CIP 5 µg), clindamicina (CLI 2 µg), eritromicina (ERI 15 µg), gentamicina (GEN 10 µg), oxacilina (OXA 1 µg) y penicilina (PEN 10 U). La selección de antibióticos se realizó de acuerdo con lo recomendado por el CLSI (2019). Se incubaron durante 24 a 48 horas a 37 °C. Se utilizaron como cepas de control positivo y negativo, las cepas de referencia de *Escherichia coli* ATCC 25922 y de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La prueba se interpretó de acuerdo con las recomendaciones del CLSI (20).

3. RESULTADOS

Se aislaron e identificaron de cada uno de los balnearios de aguas mineromedicinales investigados un total de 16 cepas de bacterias del género *Bacillus* y 3 cepas de esta bacteria en el agua del lago cratérico Quilotoa, siendo la especie *Bacillus subtilis* la de mayor frecuencia de aislamiento, seguida de las especies *Bacillus cereus* y *Bacillus mycoides* (Tabla 1).

Los antibiogramas realizados a las cepas de *Bacillus* identificadas, indican resistencias y multiresistencias de las cepas bacteriana a una diversidad de antibióticos (Tabla 1). Todas las cepas de *Bacillus* analizadas resultaron sensibles al antibiótico ciprofloxacina, así como resistentes a los antibióticos eritromicina y oxacilina.

De las 19 cepas de *Bacillus* evaluadas, 47,37 % (9) resultaron resistentes al antibiótico ampicilina, 52,63 % (10) resistentes a clindamicina, 57,89 % (11) a gentamicina y 68,42 % (13) a penicilina (Tabla 1).

Con respecto a la multiresistencia de las cepas de *Bacillus* estudiadas, el 5,26 % (1) resultaron resistentes dos antibioticos, 26,32 % (5) a tres antibioticos, 21,05 % (4) a cuatro antibioticos,

31,58 (6) a cinco antibióticos y el 15,79 % (3) a seis antibióticos, siendo el patrón más común la resistencia a cinco antibióticos (Tabla 1).

Entre las cepas de *Bacillus* multiresistentes detectadas destacan la cepa de *Bacillus cereus* MB2 aislada del balneario La Merced, la cepa de *Bacillus subtilis* RB3 aislada del agua del balneario Rumiloma y la cepa de *Bacillus mycoides* UB1 aislada del balneario Urauco, las cuales resultaron resistentes a 6 de los siete antibioticos ensayados (Tabla 1).

4. DISCUSIÓN

En todos los balnearios de aguas mineromedicinales investigados y en el agua de la laguna cratérica, fue posible aislar e identificar cepas del género *Bacillus*.

Las especies bacterianas del género *Bacillus*, provienen principalmente del suelo de donde pasan al agua, en el caso de las aguas mineromedicinales se ha observado que son más comunes en aguas hipertermales, aunque crecen también en aguas meso-termales (21).

Los bacilos Gram positivo esporulados del género *Bacillus* han sido detectados en el agua de numerosos manantiales mineromedicinales de España (21, 22) como de Ecuador (5), además se trata de un género cosmopolita distribuido en el suelo y otros ambientes en diferentes partes del planeta (23).

De igual forma, se han podido detectar cepas del género *Bacillus* en aguas de lagos y ambientes volcánicos (4, 24) resultado similar al obtenido en este trabajo y que constituye el primer aislamiento de especies de este género en aguas de lagos cratericos del Ecuador.

En el presente estudio las cepas del género *Bacillus* resultaron resistentes a la mayoría de los antibióticos evaluados. Estos resultados difieren con la investigación llevada a cabo por Samanta y colaboradores (25) quienes aislaron de ambientes acuáticos, bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, resistentes a níquel, cobalto, cromo y cadmio, a los que les evaluaron la resistencia frente a once antibióticos (cloranfenicol, estreptomicina, tetraciclina, norfloxacina, rifampicina, kanamicina, metilicina, cotrimoxazol, neomicina, ampicilina y ácido nalidixico). Estos aislados mostraron un predominio de la sensibilidad, aunque fueron resistentes a kanamicina, ampicilina, eritromicina y metilicina.

Así mismo, otros investigadores han detectado diversas cepas de bacterias del género *Bacillus* en el agua y sedimento de lagos volcánicos, resultado similar al obtenido en el agua del lago Quilotoa (4, 24).



Tabla 1. Perfiles de susceptibilidad a los antibióticos de cepas bacterianas del género *Bacillus* aisladas de muestras de aguas de diferentes ecosistemas acuáticos extremos de Ecuador.

Lugar	Especies de <i>Bacillus</i> (Código cepa)	Porcentaje de identificación (%)	AMP (10 µg)	CIP (5 µg)	CLI (2 µg)	ERI (15 µg)	GEN (10 µg)	OXA (1 µg)	PEN (10 U)
Balneario Cununayacu Pichincha									
	<i>B. spp.</i> (CB1)	80	S	S	R	R	R	R	R
	<i>B. mycoides</i> (CB2)	97	S	S	S	R	S	R	R
	<i>B. subtilis</i> (CB3)	90	R	S	S	R	S	R	R
	<i>B. subtilis</i> (CB4)	99	R	S	S	R	R	R	R
Balneario La Merced Pichincha									
	<i>B. cereus</i> (MB1)	98	R	S	S	R	R	R	R
	<i>B. cereus</i> (MB2)	98	R	S	R	R	R	R	R
	<i>B. subtilis</i> (MB3)	98	S	S	R	R	S	R	S
	<i>B. spp.</i> (MB4)	87	S	S	R	R	R	R	R
Balneario Rumiloma Pichincha									
	<i>B. stearothermophilus</i> (RB1)	99	S	S	R	R	R	R	R
	<i>B. mycoides</i> (RB2)	90	S	S	S	R	R	R	R
	<i>B. subtilis</i> (RB3)	99	R	S	R	R	R	R	R
	<i>B. subtilis</i> (RB4)	90	R	S	S	R	S	R	S
Balneario Urauco Pichincha									
	<i>B. mycoides</i> (UB1)	85	R	S	R	R	R	R	R
	<i>B. cereus</i> (UB2)	88	R	S	R	R	S	R	S
	<i>B. thuringiensis</i> (UB3)	95	S	S	S	R	S	R	R
	<i>B. spp.</i> (UB4)	83	R	S	S	R	R	R	R
Lago Quilotoa Cotopaxi									
	<i>B. spp.</i> (LQB1)	79	S	S	S	R	S	R	S
	<i>B. spp.</i> (LQB2)	85	S	S	R	R	R	R	S
	<i>B. kochii</i> (LQB3)	95	S	S	R	R	S	R	S

Nota: AMP: Ampicilina, CIP: ciprofloxacina, CLI: clindamicina, ERI: Eritromicina, GEN: Gentamicina, OXA: Oxacilina, PEN: Penicilina. R: Resistente. S: Sensible.

La resistencia a los betalactámicos observada en la mayoría de las cepas aisladas, puede deberse a la presencia en el ecosistema de otras bacterias que presenten los genes de resistencias a estos antibióticos y pudieran ocurrir mecanismos de transferencia genética horizontal entre ellas. La presión ejercida por microorganismos productores de antibióticos podría conducir a la dispersión de genes de resistencia localizados en plásmidos y transposones, los cuales contienen no solo determinantes genéticos de resistencia a antibióticos, sino también otros marcadores de selección, como la resistencia a metales pesados muy común en estos ambientes (26).

Los datos del presente trabajo evidencian que bacterias resistentes a antibióticos no se circunscriben al ámbito hospitalario, ya que se encuentran circulando en el ambiente, donde sería posible su diseminación a través de los diferentes usos que tiene el agua. Estos resultados están en correspondencia con los obtenidos por otros autores en diferentes tipos de ecosistemas acuáticos del mundo (25, 26, 27).

Otros investigadores, han planteado que bacterias filogenéticamente diversas, ampliamente distribuidas en el ambiente, muestran capacidades de subsistir frente a antibióticos naturales y sintéticos. De esta manera, constituyen reservorios naturales de genes codificadores de resistencia, denominados resistomas ambientales que pueden ser transferidos horizontalmente a microorganismos patógenos, que comparten el mismo hábitat (27, 28).

El intercambio genético entre bacterias entéricas y la comunidad bacteriana autóctona, confiriendo resistencia a antibióticos, ha sido sugerido por otros investigadores (29).

Lo planteado anteriormente, así como la multiresistencia natural que pueden presentar diferentes especies microbianas, pudieran explicar los porcentajes de multiresistencia a los distintos antibióticos, superiores al 60%, detectado en las cepas de *Bacillus* estudiadas.

Es importante destacar que existe una resistencia natural contra los antibióticos en muchas especies bacterianas, las cuales



han tenido que desarrollar mecanismos de resistencia a los antibióticos de manera de poder competir, en sus hábitat, contra otros microorganismos, muchos de los cuales son productores de estas sustancias antimicrobianas. Este fenómeno de competencia y adaptación se ha observado en cepas de bacterianas que se han podido aislar y revivir de ambientes extremos, sobre todo de sitios a bajas temperatura donde se han conservado por miles de años y que al revivirlas y poder determinar sus perfiles de susceptibilidad a los antibióticos han resultado resistentes y multiresistentes a una gran diversidad de antibióticos, inclusive a los de nueva generación (30).

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que los ambientes extremos como los balnearios de aguas mineromedicinales y el agua del lago cratérico volcánicos no son ambientes estériles, en el agua oligotrófica de estos ecosistemas se han adaptado diversos tipos de microorganismos, como es el caso de especies del género *Bacillus*. En el agua mineromedicinal de balnearios de la provincia de Pichincha del Ecuador y en el agua del lago cratérico volcánico Quilotoa, se han aislado cepas de *Bacillus* multiresistentes a diversos antibióticos, lo cual indica que estos ecosistemas albergan resistomas muy importantes, los cuales deben ser estudiados y caracterizados.

Agradecimientos

El agradecimiento a la Dirección de Investigaciones de la Universidad Central del Ecuador por facilitar los fondos económicos para el desarrollo del presente trabajo a través de los proyectos 011 y 045.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no tienen ningún tipo de conflicto de intereses con los datos y la realización del trabajo realizado.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Mapelli F., Marasco R., Rolli E., Daffonchio D., Donachie S., Borin S. Microbial Life in Volcanic Lakes. In: Rouwet D., Christenson B., Tassi F., Vandemeulebrouck J. (eds) Volcanic Lakes. Advances in Volcanology. Springer, Berlín, Heidelberg. 2015.
2. Farias M. Microbial ecosystems in central Andes, extreme environments. Springer. Switzerland. 2020.
3. Schmidt-Lorenz W. Microbiological characteristics of natural mineral waters. Ann Ist Super Sanita. 1976; 12: 93-112.
4. Dib J, Motok J, Fernández Zenoff V, Ordoñez O, Fariás M. Occurrence of resistance to antibiotics, UV-B and arsenic in bacteria isolated from extreme environments in high altitude (above 4,400 m) Andean Lakes. Curr Microbiol. 2008; 56(5): 510-7.
5. Andueza F, Araque J, Parra Y, Arciniegas S, Guaita R, Escobar S, Medina G. Diversidad bacteriana en aguas mineromedicinales del balneario "Urauco". Pichincha. Ecuador. An. Real Acad. Farm. 2020; 90(1): 9 – 18.
6. Liu Y, Lai Q, Göker M, Meier-kolthoff JP, Wang M, Sun Y and Shao Z. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. Scientific Reports. 2015; 5:1-11. <http://dx.doi.org/10.1038/srep14082>.
7. Corrales-Ramírez L, Caycedo-Lozano L, Gómez Méndez M, Ramos-Rojas S, Rodríguez-Torres J. *Bacillus spp.*: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. Nova. 2017; 15 (27): 45-65.
8. Hoffmaster AR, Hill KK, Gee JE, Marston CK, De B K, Popovic T, Sue D, Wilkins PP, Avashia SB, Drumgoole R, Helma CH, Ticknor LO, Okinaka RT and Jackson PJ. Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes. Journal of Clinical Microbiology. 2006; 44:3352-3360. <https://dx.doi.org/10.1128/jcm.00561-06>.
9. Mohamed N. Alanber, Naiyf S. Alharbi, Jamal M. Khaled. Evaluation of multidrug-resistant *Bacillus* strains causing public health risks in powdered infant milk formulas, Journal of Infection and Public Health. 2020; 13(10): 1462-1468. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.11.013>.
10. Baquero F, Martínez J, Cantón R. Antibiotics, and antibiotic resistance in water environments. Current Opinion in Biotechnology. 2008; 19(3): 260-265.
11. Alonso A, Sánchez P, Martínez J. Environmental selection of antibiotic resistance genes, Environ Microbiol. 2001; 3: 1-9.
12. Dante G, Sommer M. Genética de la resistencia microbiana. Investigación y Ciencias. 2014; Agosto: 28-34.
13. Falcone-Dias MF, Vaz-Moreira I, Manaia CM. Bottled mineral water as a potential source of antibiotic resistant bacteria. Water Res. 2012; 46(11):3612-3622.
14. Berić T, Biočanin M, Stanković S, Dimkić I, Janakiev T, Fira D, Lozo J. Identification, and antibiotic resistance of *Bacillus spp.* isolates from natural samples. Archives of Biological Sciences. 2017; 70:19-19.
15. Andueza, Félix. Diversidad Microbiana de las aguas mineromedicinales de los balnearios de Jaraba. [Tesis Doctoral]. Universidad Complutense de Madrid, España. 2007.
16. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Tercera edición. Editorial médica Panamericana.



- cana. Buenos Aires. Argentina; pp. 1-850. 2004.
17. Microgen. Microgen *Bacillus*-ID system. Microgen Bioproducts. Camberley. UK. 2007.
 18. Logan NA, De Vos P. Genus I. *Bacillus*. En: Brenner et al. (Eds) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2da ed. Vol. 3. NY: Springer. 2007.
 19. Bauer AW, Kirby MM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 1966; 45(4): 493-496.
 20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA. 2019.
 21. De la Rosa MC, Andueza F, Sánchez MC, Rodríguez C, Mosso MA. Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jirabá. An R Acad Nac Farm 2004; 70:521-542.
 22. De la Rosa C, Fernández V, Pintado C, Rodríguez C. Microbiología del agua mineromedicinal del Balneario de Paracuellos de Jiloca. An. Real. Acad. Farm. 2018; 84, (Special Issue): 68-80.
 23. Priest F. Systematics and Ecology of *Bacillus*, p 3-16. In Sonenshein A, Hoch J, Losick R (ed), *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria. ASM Press, Washington DC. USA. 1993.
 24. Dib J, Weiss A, Neumann A, Ordonez O, Estevez Maria, and Farias Maria. Isolation of Bacteria from Remote High Altitude Andean Lakes Able to Grow in the Presence of Antibiotics, Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery 2009; 4: 66. <https://doi.org/10.2174/157489109787236300>.
 25. Samanta A, Bera P, Khatun M, Sinha C, Pal P, Lalee A, Mandal A. An investigation on heavy metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strain *Bacillus sp.* isolated from municipal waste. Journal of Microbiology and Biotechnology Research. 2012; 2(1): 178-189.
 26. López DP, Torres-Caycedo MI, Prada-Quiroga CF. Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. Rev. Univ. Salud. 2015; 18(1): 190-202.
 27. Martínez A, Cruz M, Veranes O, Carballo M, Salgado I, Olivares S, Lima L, Rodríguez D. Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares. Revista CENIC. Ciencias Biológicas. 2010; 41: 1-10.
 28. Dantas G, Sommer MOA, Oluwasegun RD, Church GM. Bacteria Substituting on Antibiotics. Science. 2008; 320: 100-103.
 29. Moroga R, Merino C, Mondaca MA. Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. Investigaciones Marinas. 2003; 31: 1-7.
 30. Perry J, Waglechner N, Wright G. The Prehistory of Antibiotic Resistance. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016; 6(6): 1-8.

Si desea citar nuestro artículo:

Perfiles de susceptibilidad a los antibióticos en cepas del género *bacillus* aisladas de ambientes acuáticos extremos del Ecuador

Marco González, et al.

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 87. Nº 1 (2021) · pp. 27 - 34

DOI: <http://>

SISTEMAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA DE OPIOIDES: ANALGESIA Y DEPENDENCIA

EXTENDED-RELEASE DELIVERY SYSTEMS OF OPIOIDS: ANALGESIA AND DEPENDENCE

Alexandre Pérez-López^{1,a}, Laura Gómez-Lázaro^{1,a}, Cristina Martín-Sabroso^{1,2}, Juan Aparicio-Blanco^{1,2,*}

¹Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España

²Instituto Universitario de Farmacia Industrial, Universidad Complutense de Madrid, España

^a Ambos autores han contribuido igualmente al trabajo.

*corresponding author: juan.aparicio.blanco@ucm.es

REVISIÓN

RESUMEN

El consumo de analgésicos opioides ha experimentado un vertiginoso ascenso en las últimas décadas a nivel mundial. Este elevado consumo está relacionado con el aumento del número de prescripciones de opioides para el tratamiento del dolor crónico y por el aumento de la dependencia a opioides. Los analgésicos opioides tienen una corta duración de acción, siendo necesarias múltiples administraciones para obtener analgesia prolongada. El empleo de formulaciones de liberación prolongada permite espaciar los intervalos posológicos y estabilizar las concentraciones máximas de fármaco en sangre, favoreciendo el cumplimiento terapéutico y reduciendo el riesgo de desarrollar adicción. Sin embargo, estas formulaciones llevan dosis más altas de analgésicos opioides que las hacen más susceptibles de ser alteradas. Así, los avances en tecnología farmacéutica más recientes se han orientado hacia la aplicación de recursos tecnológicos disuasorios de su utilización por vías de administración alternativas con fines no terapéuticos. A su vez, los sistemas de liberación modificada también juegan un papel esencial en el tratamiento de la adicción a opioides: con el desarrollo de sistemas de administración parenteral capaces de prolongar la liberación de opioides durante meses se consigue superar una de las mayores dificultades para alcanzar el éxito del tratamiento en este tipo de pacientes como es el cumplimiento terapéutico. En este artículo se realiza una revisión bibliográfica de los diferentes sistemas de liberación prolongada de opioides que se encuentran actualmente autorizados en Europa y/o en Estados Unidos para el tratamiento del dolor y de la dependencia a opioides.

ABSTRACT

The consumption of opioid analgesics has increased drastically in the last decades worldwide. This high consumption is linked with a surge in the number of opioid prescriptions for the treatment of chronic pain and a surge in opioid misuse and addiction. Opioid analgesics have a short duration of action, making necessary frequent administrations to provide extended analgesia. The use of prolonged-release formulations enables dosing intervals to be spaced out and drug blood levels to be stabilized, improving therapeutic compliance, and reducing the likelihood of developing addiction. However, these formulations contain higher doses of opioid analgesics which make them more susceptible to be manipulated. Hence, the most recent advances in pharmaceutical technology have been oriented towards the application of abuse deterrent technologies aiming to prevent their administration through alternative routes. Moreover, prolonged-release systems also play an essential role in the treatment of opioid addictions with the development of parenteral dosage forms capable of prolonging opioid release for months that help overcome one of the most important drawbacks in achieving treatment success, namely, patient compliance. We review herein the different prolonged-release opioid dosage forms currently approved in Europe and/or the United States for the treatment of pain and opioid dependence.

Palabras Clave:

Opioides
Dolor
Adicción
Formas sólidas orales de liberación prolongada
Tecnología antiabuso
Parches transdérmicos
Implantes
Microesferas

Keywords:

Opioids
Pain
Dependence
Prolonged-release solid oral dosage forms
Abuse deterrent technology
Transdermal patches
Implants
Microspheres



1. INTRODUCCIÓN

El consumo de analgésicos opioides ha experimentado un vertiginoso ascenso en las últimas décadas a nivel mundial. En concreto, se estima que el consumo de opioides en España aumentó un 98,51 % desde el año 2010 hasta el año 2020 (1). Los opioides son los analgésicos más potentes disponibles actualmente y deben su efecto a su acción sobre el sistema opioide endógeno.

El sistema opioide endógeno está formado por una amplia gama de péptidos y receptores presentes en el sistema nervioso central y periférico, el tracto gastrointestinal y el sistema inmunológico. Por un lado, existen tres principales familias de péptidos opioides endógenos: β -endorfinas, encefalinas, y dinorfinas, expresados ampliamente a través de las vías neuronales y, en particular, las vías del dolor. Por otro lado, se han identificado tres clases principales de receptores opioides: μ , δ y κ . Estos tres receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G. Su activación por agonistas opioides tiene como efecto común la atenuación de la percepción del dolor y la inhibición de la transmisión del estímulo nociceptivo mediante un mecanismo de hiperpolarización celular y reducción de los niveles de AMPc intracelular y de la liberación de neurotransmisores (2).

Sin embargo, cada uno de estos receptores tiene otros efectos y distribuciones específicas (3). Los receptores opioides μ , activados principalmente por endorfinas, fueron los primeros en ser descubiertos y se localizan en la corteza cerebral, el tálamo, la médula espinal y el tracto gastrointestinal. Son responsables de procesos específicos como sedación, depresión respiratoria, euforia y enlentecimiento del tránsito gastrointestinal (4). Los receptores opioides κ , unidos principalmente por dinorfinas, se localizan en el hipotálamo y en la sustancia gris del mesencéfalo y participan en la producción de efectos sedantes y disfóricos (5). Por último, los receptores opioides δ , unidos principalmente por encefalinas, están situados en los ganglios basales y su activación produce efectos ansiolíticos (6).

Los opioides son alcaloides derivados del opio (jugo extraído de las cápsulas de *Papaver somniferum*) y suelen atender a diferentes clasificaciones (7). Los opioides con indicación terapéutica autorizada pueden clasificarse, por un lado, atendiendo a su origen en: naturales (morfina, codeína); semisintéticos (buprenorfina, oxycodona, hidromorfona e hidrocodona) y sintéticos (metadona, fentanilo, tramadol, tapentadol, naloxona y naltrexona) (8). Por otro lado, atendiendo a como sea su interacción con los receptores opioides endógenos pueden clasificarse en: agonistas, (morfina, hidromorfona, tramadol, oxycodona, tapentadol, hidrocodona, codeína, metadona y fentanilo) (9); antagonistas (naloxona y naltrexona) (10) o agonistas parciales, con afinidad por el receptor pero menor capacidad de generar respuesta biológica que los agonistas (buprenorfina) (10).

El uso de analgésicos opioides se considera seguro cuando se consumen durante periodos de tiempo cortos y cuando se sigue la pauta posológica prescrita. Sin embargo, el empleo de opioides a largo plazo conlleva riesgo de adicción, donde el abuso del analgésico opioide prescrito podría suponer el paso previo al consumo de otros opioides no terapéuticos como la heroína, con riesgo de sobredosis potencialmente mortales (2). Las vías de administración más utilizadas para el abuso de los analgésicos opioides son la vía intravenosa o nasal (11). Tal es la magnitud que en 2017 se estima que en Europa 7380 personas murieron por sobredosis de opioides (12). Estos trastornos en la conducta por el uso crónico de opioides están altamente relacionados con los fenómenos de tolerancia, dependencia física y síndrome de abstinencia (13).

Por un lado, la tolerancia se define como la disminución de la respuesta farmacológica de un opioide tras una administración repetida o prolongada, llevando implícito la necesidad de consumir dosis cada vez mayores de fármaco para obtener un mismo efecto farmacológico (14). Por otro lado, la dependencia física es el estado de necesidad imperiosa de continuar el consumo de opioide que se manifiesta por la aparición de un síndrome de abstinencia ante la interrupción abrupta del consumo, la reducción rápida de la dosis, la disminución del nivel del fármaco opioide en sangre y/o la administración de un antagonista opioide. (15).

En este contexto, la formulación de opioides en sistemas de liberación prolongada supone ventajas terapéuticas considerables en la farmacología de opioides. En primer lugar, a nivel de analgésicos opioides, la liberación prolongada de fármacos favorece el cumplimiento terapéutico al aumentar los intervalos posológicos, además de reducir el riesgo de desarrollar adicción por disminuir las concentraciones máximas de opioides y aumentar los tiempos a los que éstas se alcanzan en comparación con formas de liberación inmediata. A tal efecto se han desarrollado sistemas de liberación prolongada por vía oral y transdérmica. En contrapartida, en el caso de sospecha de adicción a opioides, el aumento de dosis que conlleva el desarrollo de sistemas de liberación prolongada supone un mayor riesgo para el uso ilícito de los mismos, por lo que, en segundo lugar y de manera más reciente, los avances en formulación de opioides se han orientado hacia la implementación de recursos tecnológicos disuasorios de su utilización por vías alternativas a las autorizadas (16).

Por último, los sistemas de liberación modificada también juegan un papel esencial en el tratamiento de la dependencia a opioides, con el desarrollo de sistemas de administración parenteral capaces de prolongar la liberación de opioides durante meses, lo que supone sortear una de las mayores dificultades a la hora de alcanzar el éxito terapéutico en la deshabituación a opioides: que el tratamiento de mantenimiento no se vea influenciado por la voluntad del paciente para adherirse al mismo.

En este artículo se realiza una revisión bibliográfica de los diferentes sistemas de liberación prolongada de opioides que se encuentran aprobados en Europa y/o en Estados Unidos y que actualmente están comercializados para el tratamiento del dolor y de la dependencia a opioides.

2. SISTEMAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA DE OPIOIDES PARA EL TRATAMIENTO DEL DOLOR

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor define dolor como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con una lesión presente o potencial. El dolor se considera crónico cuando la duración es superior a tres meses, ya sea constante o intermitente (17,18). Las regiones principalmente afectadas son la cervical, la lumbar y la dorsal, además de las extremidades y las articulaciones.

La prevalencia de dolor crónico en Europa se estima en un 21% y en los Estados Unidos un 20,4 % (19,20). Debido al alto impacto que tiene el dolor crónico en nuestra sociedad no es de extrañar el alto número de recursos destinados a mejorar e individualizar el tratamiento de cada paciente. Se estima que los costes económicos directos e indirectos que supone el dolor crónico en España es del 2-2,8% del PIB (21,22).

Entre los factores de riesgo más comunes se encuentran: factores demográficos como la edad y el género, donde los pacientes de mayor edad y las mujeres son más propensas de sufrir dolor crónico (23); factores relacionados con el estilo de vida, observándose que el tabaco y alcohol aumentan la probabilidad de sufrir dolor crónico y que la realización de actividad física la disminuye; y, en último lugar, factores clínicos, ya que la probabilidad de padecer dolor crónico aumenta con la presencia de otras enfermedades como pueden ser depresión, obesidad y trastornos del sueño (24).

Los analgésicos opioides se han convertido en los fármacos de elección para el tratamiento de dolor crónico moderado-severo, dolor oncológico y dolor postoperatorio (25). Estas patologías se caracterizan por la exposición del paciente a largos periodos de dolor, por lo que el empleo de opciones terapéuticas que proporcionen largos periodos de analgesia va a mejorar la calidad de vida del paciente sustancialmente. Sin embargo, debido a que los analgésicos opioides tienen, en general, una vida media corta, su formulación en formas farmacéuticas de liberación inmediata solo permite periodos de analgesia de alrededor de 6 horas, dificultando así el cumplimiento posológico por parte del paciente por las frecuentes administraciones. Además, estas altas frecuencias de administración generan grandes fluctuaciones en las concentraciones de fármaco en sangre que aumentan el riesgo de sufrir efectos adversos (26).

Estos inconvenientes asociados a la dosificación frecuente son superados gracias al desarrollo de formas farmacéuticas de liberación prolongada. El objetivo de estas formulaciones, en las que la velocidad de liberación pasa a ser limitante en el proceso de absorción, es la prolongación de la liberación del principio activo en el tiempo, ofreciendo así varias ventajas frente a la liberación inmediata. Entre estas ventajas cabe destacar la exposición del paciente a periodos de analgesia más prolongados, permitiendo el espaciamiento de los intervalos posológicos, mejorando así el cumplimiento terapéutico por parte del paciente al requerir menor número de administraciones; y la obtención de concentraciones plasmáticas de fármaco más estables, reduciendo la incidencia de aparición de efectos adversos así como la probabilidad de generar adicción (27,28). Para el tratamiento del dolor crónico se han desarrollado formulaciones de liberación prolongada de analgésicos opioides por vía oral y transdérmica.

2.1. Sistemas de liberación prolongada por vía oral

La vía oral se caracteriza por ser una vía de administración cómoda y no invasiva (29). Un inconveniente asociado a esta vía es la biotransformación hepática que sufren ciertos fármacos administrados previa incorporación a circulación sistémica, conocido como efecto de primer paso hepático (30). Por tanto, la vía oral resulta adecuada para fármacos que no sufran un efecto de primer paso hepático muy intenso. La comodidad y no invasividad de la vía oral son aprovechadas para el desarrollo de formas farmacéuticas de liberación prolongada de analgésicos opioides por esta vía. Sin embargo, la principal limitación de los sistemas de liberación prolongada de administración por vía oral es que el tiempo durante el cual es factible prolongar la liberación del principio activo está restringido por factores fisiológicos, fundamentalmente por el tiempo de residencia de la forma farmacéutica en el tracto gastrointestinal (31).

Las formas farmacéuticas de liberación prolongada por vía oral son altamente susceptibles de ser alteradas ya que contienen mayor cantidad de fármaco activo que las formulaciones de liberación inmediata, y además son mucho más fáciles de manipular que otras formas farmacéuticas como pueden ser los parches transdérmicos. Entre las formas de abuso más comunes de opioides prescritos se encuentran: masticación, trituración o disolución de las formulaciones para posterior inhalación o inyección intravenosa. Para evitar que esto suceda se han desarrollado un nuevo tipo de formulaciones conocidas como formulaciones antiabuso (en inglés abuse-deterrent) que incorporan estrategias específicas diseñadas para limitar la capacidad de los usuarios de manipular la formulación del medicamento, evitando su posible abuso (32). Hasta la fecha, dos estrategias antiabuso se han incorporado a formas far-

macéuticas orales de liberación prolongada comercialmente disponibles en clínica. La primera estrategia consiste en incorporar barreras físicas o químicas a la formulación que proporcionan resistencia a la alteración mecánica para evitar el masticado/triturado y posterior inhalación o inyección intravenosa. Las barreras físicas están diseñadas para resistir los daños causados por los utensilios domésticos comunes y las barreras químicas están diseñadas para evitar la extracción utilizando agua, alcohol u otros disolventes orgánicos. La segunda estrategia consiste en incorporar a la formulación antagonistas opiáceos que tengan baja biodisponibilidad por vía oral y, por lo tanto, no contrarresten las propiedades analgésicas de la formulación cuando se administren por esta vía, pero reduzcan o contrarresten la euforia inducida por el analgésico opioide cuando se utilicen por inhalación o inyección intravenosa (33).

Se han desarrollado comprimidos y cápsulas de liberación prolongada (Tabla 1) capaces de prolongar la liberación de analgésicos opioides en hasta 24 horas (Figura 1).

2.1.1. Comprimidos

Existen varias estrategias tecnológicas que han servido de base para la formulación de opioides en comprimidos de liberación prolongada por vía oral.

En primer lugar, se encuentran los sistemas matriciales. En este tipo de sistemas el fármaco se dispersa uniformemente en una matriz polimérica, que controla el acceso del medio de disolución al interior de la formulación y dificulta por lo tanto la difusión hacia el exterior de las moléculas del principio activo en solución, controlando

así la velocidad de liberación (29). La primera formulación comercial basada en los sistemas matriciales para controlar la liberación de los analgésicos opioides fue MS Contin®, aprobada en 1987 por la *Food and Drug Administration* (FDA). Además, ha sido aprobada para su uso en Europa bajo el nombre de MST Continus® en 1996. Utiliza la plataforma Contin para prolongar la liberación de morfina, permitiendo así pautas de administración cada 12 horas (34). Esta plataforma matricial está constituida en esencia por una mezcla de varios polímeros hidrofílicos, como son la hidroxipropilmetilcelulosa y la hidroxietilcelulosa que contienen el fármaco disperso en su interior, y alcoholes alifáticos de alto peso molecular como es el alcohol cetoes-tearílico. El proceso tecnológico es el siguiente: primero se dispersa la morfina en los polímeros hidrofílicos, que, tras la mezcla, son sometidos a procesos de granulación, tamización y secado. Después, los gránulos matriciales obtenidos se mezclan con los alcoholes de alto peso molecular previamente granulados y se mezclan formando una masa granulada uniforme. Para terminar, esta mezcla se somete a un proceso de compresión para formar el comprimido final. Cuando se administran estos comprimidos, el medio acuoso del tracto gastrointestinal difunde hasta el interior de la formulación y provoca que los polímeros hidrofílicos se hinchen formando un gel viscoso cuyo grado de hidratación va a estar controlado y limitado por los alcoholes de alto peso molecular hidrofóbicos. La difusión del principio activo va a depender del grado de difusión a través del gel hidratado (35).

Mejoras tecnológicas en el sistema matricial Contin dieron lugar a AcroContin, plataforma utilizada con oxicodona bajo el nombre comercial de Oxycontin®, medicamento aprobado en 1995 por la FDA y en 1998 en varios países europeos como son Austria, Es-

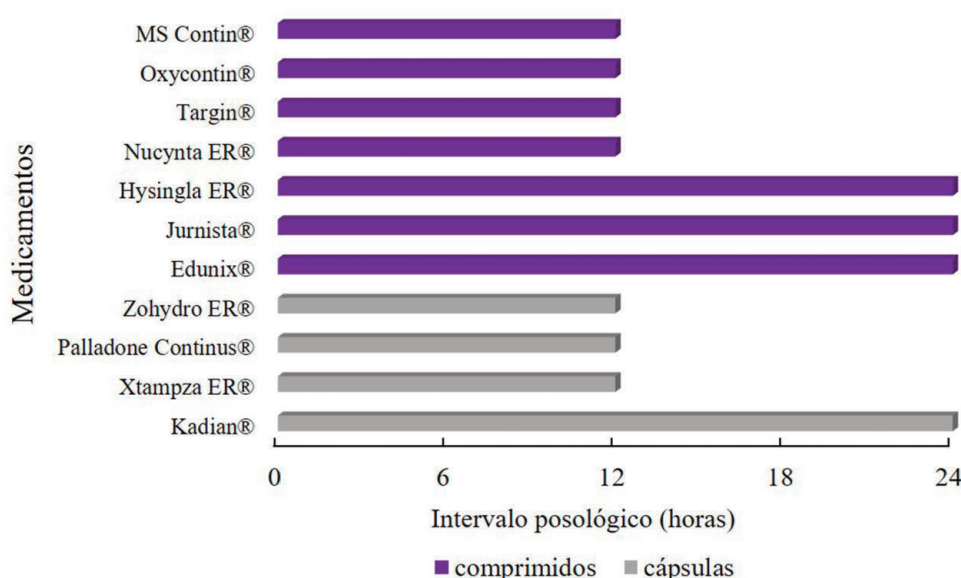


Figura 1. Intervalo posológico de los sistemas de liberación prolongada por vía oral para el tratamiento del dolor que se encuentran actualmente autorizados en Europa y/o Estados Unidos

FORMA FARMACÉUTICA	OPIOIDE	NOMBRE COMERCIAL	FECHA DE PRIMERA APROBACIÓN	TIPO DE SISTEMA (TECNOLOGÍA)	TECNOLOGÍA ANTIABUSO	DOSIS
comprimidos	morfina	MS Contin®	1987	sistema matricial (Contin™)	N/A	15, 30, 60, 100, 200 mg
comprimidos	oxicodona	Oxycontin®	1995	sistema matricial (AcroContin™)	física y química (RESISTEC™)	10, 15, 20, 30, 40, 60, 80 mg
comprimidos	oxicodona/naloxona	Targin®	2010	sistema matricial	secuestro de antagonista	5/2,5; 10/5; 20/40; 40/20 mg
comprimidos	tapentadol	Nucynta ER®	2011	sistema matricial	física y química (INTACT™)	50, 100, 150, 200, 250 mg
comprimidos	hidrocodona	Hysingla ER®	2014	sistema matricial	física y química (RESISTEC™)	20, 30, 40, 60, 80, 100, 120 mg
comprimidos	hidromorfona	Jurnista®	2006	sistema osmótico (OROS PUSH PULL™)	N/A	4, 8, 16, 32, 64 mg
comprimidos	hidromorfona	Edunix®	2015	pellets multicapa	N/A	4, 8, 16, 32 mg
cápsulas	morfina	Kadian®	1996	pellets multicapa (SODAS™)	N/A	10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 200 mg
cápsulas	hidrocodona	Zohydro ER®	2013	pellets multicapa (SODAS™)	física y química (BeadTek®)	10, 15, 20, 30, 40 y 50 mg
cápsulas	hidromorfona	Palladone Continus®	2001	sistema matricial	N/A	4, 8, 16, 24 mg
cápsulas	hidrocodona	Xtampza ER®	2016	sistema matricial física	(DETERx)	9; 3,5; 18; 27; 36 mg

Tabla 1. Formulaciones de liberación prolongada de opioides para administración por vía oral autorizadas para el tratamiento del dolor

paña, Irlanda e Italia. Al igual que su predecesor, también está formado por alcoholes alifáticos de elevado peso molecular como componente hidrofóbico; sin embargo, utiliza un copolímero de metacrilato de amonio en lugar de un polímero de celulosa hidrofílico como polímero controlador de la liberación de oxicodona (36). Una ventaja importante de este sistema frente a su predecesor es que cuando los comprimidos entran en contacto con los fluidos gastrointestinales, se produce una liberación inmediata de oxicodona durante la primera hora (30-40% de la dosis) provocada por la disolución y difusión del fármaco que se encuentra en los gránulos de la superficie del comprimido y, a continuación, se produce una liberación sostenida de hasta 12 horas, a medida que el fluido va penetrando a través de la matriz polimérica y va disolviendo el fármaco (35). Debido al incremento en los casos de abuso de formulaciones de opioides, en 2010 se reformuló Oxycontin® utilizando la tecnología RESISTEC™, una estrategia antiabuso basada en el uso de óxido de polietileno de alto peso molecular (PEO) para formar una barrera física que impide la posibilidad de que los comprimidos se puedan triturar. Además, en contacto con un disolvente, el PEO se convierte en un gel viscoso que impide su uso por vías nasal e intravenosa (37,38).

Otras tres formulaciones basadas en sistemas matriciales

han sido aprobadas. La primera de ellas es Targin®, comprimidos de oxicodona y naloxona embebidos en una matriz formada por etilcelulosa y alcohol estearílico que recibieron aprobación en varios países de Europa (entre ellos España) en 2010 (39). Targin® fue aprobado por la FDA bajo el nombre de Targiniq® en 2014 pero suspendido un tiempo después. Además, incorpora como medida antiabuso la presencia de un antagonista opioide dentro de la formulación matricial. La naloxona por vía oral sufre un fuerte efecto de primer paso, por lo que su biodisponibilidad tras administración oral es inferior al 3% y no es suficiente para antagonizar los efectos de la oxicodona. Sin embargo, cuando se altera la formulación para posterior administración por otras vías el antagonista reducirá o contrarrestará el efecto del fármaco agonista (40,41). Su pauta posológica es cada 12 horas. El segundo es Nucynta ER®, formulación de tapentadol aprobada en 2011 por la FDA. Está formulado en una matriz basada en la tecnología antiabuso INTACT™. Esta tecnología consiste en la mezcla de PEO, hipromelosa y polietilenglicol (PEG) formando una matriz, donde el PEO provee de dureza y viscosidad suficiente al comprimido para dificultar su manipulación y administración por vías alternativas a la oral (42). En cuanto a posología se administra cada 12 horas. En Europa, los comprimidos de liberación prolongada de tapen-



tadol han sido autorizados con el nombre de Palexia Retard® y Yantil Retard®. El último medicamento es Hysingla ER®, comprimidos de hidrocodona aprobados por la FDA en 2014. La matriz está compuesta por hidroxipropilcelulosa (HPC) y PEG como polímeros controladores de la liberación (43). Hysingla ER® utiliza la tecnología RESISTEC™, misma tecnología antiabuso que Oxy-Contin®, basada en el uso del polímero PEO, dando dureza y viscosidad al comprimido para que sea de mayor dificultad su administración por vías alternativas (40,44). Hysingla ER® se administra cada 24 horas y no ha sido aprobado en Europa.

Una segunda estrategia tecnológica es la utilización de sistemas osmóticos. La hidromorfona representa el primer opioide en ser comercializado utilizando la plataforma OROS (osmotic-controlled release oral delivery system) Push-Pull™. Esta tecnología consiste en un comprimido bicapa recubierto por una membrana semipermeable y con una perforación en una de sus caras. La capa inferior o capa de empuje contiene un polímero hidrófilo (agente polimérico osmótico) capaz de formar un hidrogel expandible que empuja el compartimento superior o capa del fármaco. Este comprimido osmótico actúa mediante el efecto combinado de la hidratación de sus dos compartimentos de modo que, inicialmente la capa del fármaco absorbe agua suficiente para formar una suspensión o solución que será expulsada a través del orificio de salida tan pronto como se dé la expansión y empuje por parte del compartimento inferior previamente hidratado (45,46). Esta plataforma es adecuada para fármacos con solubilidad intermedia como la hidromorfona y su velocidad de liberación es proporcional al gradiente osmótico formado. El único producto comercializado es Jurnista® cuya frecuencia de administración es cada 24 horas. Este medicamento solo ha sido aprobado para su uso en Europa.

Una última modalidad para la formulación de comprimidos de liberación prolongada de opioides consiste en la formulación de pellets multicapa que, posteriormente, son comprimidos para formar la formulación final. Es el caso de Edunix®, comprimidos de hidromorfona que permite una liberación prolongada de hidromorfona de hasta 24 horas. El proceso tecnológico consiste en añadir diferentes capas de principio activo y polímeros a una esfera inerte de azúcar: la primera capa lleva hidromorfona y PEG, la segunda propilenglicol, HPC y etilcelulosa y la tercera y última lleva hidromorfona, PEG e hidroxipropilmetilcelulosa. Para finalizar, estos pellets multicapa se comprimen para formar los comprimidos de liberación prolongada (47). Edunix® no ha recibido aprobación por la FDA, solo está disponible para su uso en clínica en varios países de la Unión Europea. En concreto, en España se aprobó en 2015.

2.1.2. Cápsulas

Al igual que en el caso de comprimidos, existen varias estrategias tecnológicas a la hora de formular fármacos opioides en cápsulas de liberación prolongada.

En primer lugar, la incorporación de pellets o perlas multicapa dentro de la cápsula. Utilizan la tecnología SODAS™ (*Spherical Oral Drug Absorption System*), que consiste en recubrir un núcleo inerte con una capa de principio activo a la que, a su vez, se recubre con posteriores capas de polímeros controladores de la liberación. Dos medicamentos formulados con esta tecnología están disponibles para su uso en clínica. El primero de ellos recibió aprobación por la FDA en 1996 bajo el nombre comercial de Kadian® y consiste en pellets rodeados por una cubierta de morfina que, a su vez, es rodeada por otra cubierta formada por dos agentes solubles controladores de la liberación diferentes, PEG y un copolímero de acrilato de etilo y ácido metacrílico (Eudragit), cuya solubilidad es dependiente del pH. Una vez que la formulación se administra, la cápsula de gelatina dura se disuelve y libera los pellets en el tracto gastrointestinal. En el pH ácido del estómago, el componente PEG del recubrimiento de polímero se disuelve inmediatamente creando poros que permiten una liberación inmediata de morfina. Sin embargo, como sólo el componente PEG puede disolverse en ese punto, los poros son relativamente pequeños, lo que limita la difusión del principio activo. A medida que aumenta el pH, el copolímero comienza a disolverse aumentando el número y el tamaño de los poros, incrementando por tanto la velocidad de liberación del fármaco (48). Kadian® debe ser administrado cada 24 horas.

El segundo medicamento es Zohydro ER®, formulación de hidrocodona aprobada por la FDA en 2013. En este caso utiliza como núcleo perlas rodeadas por dos cubiertas, una primera cubierta de hidrocodona, y una segunda cubierta formada por un copolímero de metacrilato de amonio controlador de la liberación, que gracias a su permeabilidad permite que el líquido gastrointestinal entre y vaya solubilizando el principio activo, provocando, al igual que Kadian®, primero una liberación inmediata de principio activo y una posterior liberación prolongada en el tiempo (49). Debido a que la tecnología SODAS™ no ofrece protección contra la posible manipulación intencionada de la formulación, la empresa responsable de la formulación de Zohydro ER® decidió añadir la tecnología BeadTek® para evitar posibles manipulaciones. Esta segunda tecnología consiste en la formulación de perlas de PEO con la misma apariencia que las perlas de hidrocodona y su incorporación dentro de la cápsula dura. Así se consigue que ambas perlas sean físicamente indistinguibles y se dote a la formulación de la rigidez suficiente para evitar la manipulación por parte del paciente (50). La frecuencia de administración de Zohydro ER® es cada 12 horas. Kadian® y Zohydro ER® no han sido aprobados en Europa.

La segunda estrategia tecnológica es la incorporación dentro de la cápsula de sistemas matriciales, ya sean gránulos o microesferas de liberación controlada. Existen dos medicamentos disponibles en el mercado dentro de este grupo. Por un lado, Palladone Continus®, formulación de hidromorfona aprobada en 2001 para su uso en varios países europeos, incorpora gránulos matriciales formulados mediante el método de extrusión por fusión. En este método se dispersa la hidromorfona en una matriz compuesta por polímeros hidrofóbicos controladores de la liberación como la etilcelulosa que, a continuación, se funde y se pasa a través de un cilindro extrusor formando largas fibras que posteriormente son cortadas para formar los gránulos matriciales de liberación controlada (31). Este medicamento fue aprobado por la FDA en 2004 bajo el nombre de Palladone®, pero retirado al cabo de un tiempo. Se debe administrar cada 12 horas. Por otro lado, Xtampza ER® fue aprobado en 2016 y consiste en cápsulas que incorporan microesferas de liberación prolongada de hidrocodona. Xtampza ER® está formulado con la tecnología antiabuso DETERx, que se caracteriza porque cada microesfera contiene oxycodona homogéneamente dispersa dentro de una matriz hidrofóbica formada por ácidos grasos y ceras que permiten controlar la liberación de oxycodona y además son capaces de resistir el aplastamiento, la masticación, el calentamiento y la disolución, lo que dificultará la administración por vías alternativas a la oral en caso de abuso (51). Estudios *in vitro* han demostrado que, tras manipulación de la formulación, Xtampza ER® es capaz de mantener las propiedades de liberación prolongada en mayor medida que otras formulaciones con tecnologías antiabuso como OxyContin® (52). Xtampza ER® no está aprobado en Europa y su frecuencia de administración es cada 12 horas.

2.2. Sistemas de liberación prolongada por vía transdérmica

Los sistemas de liberación prolongada por vía transdérmica están diseñados para la administración de un principio activo a través de la piel de una forma no invasiva, simple, segura y efectiva, con el objetivo de ejercer un efecto sistémico tras su liberación y absorción a través de las membranas cutáneas. Las principales ventajas de la administración de formas farmacéuticas de liberación prolongada por vía transdérmica son la obtención de concentraciones plasmáticas de fármaco más estables, espaciamiento en los intervalos posológicos y reducción de los efectos secundarios en comparación con las formas farmacéuticas de liberación inmediata (53). En concreto, el uso de parches transdérmicos permite alcanzar liberaciones constantes de principio activo siguiendo una cinética de orden cero (54). Por lo tanto, los parches transdérmicos deben ser considerados como sistemas de liberación sostenida donde los intervalos posológicos son mayores que los logrados por vía oral. Además, los fármacos administrados por vía transdérmica no sufren efecto de primer paso hepático, por lo que los analgésicos opioides cuya administración por vía oral sea inviable debido a que sufren una fuerte metabolización hepática, son fármacos idóneos para su incorporación en parches transdérmicos (55).

Una de las mayores limitaciones en el desarrollo de sistemas de liberación prolongada por vía transdérmica es el bajo número de principios activos que cumplen los requerimientos específicos para atravesar el estrato córneo. El grado de difusión del fármaco a través de la piel es directamente proporcional al coeficiente de difusión del fármaco, al coeficiente de reparto octanol:agua y a la concentración del fármaco en la formulación. A su vez, el coeficiente de difusión es inversamente proporcional al peso molecular del fármaco. En general, fármacos con un coeficiente de reparto intermedio, no iónicos, con un peso molecular bajo y con elevada potencia analgésica son adecuados para la incorporación

OPIOIDE	NOMBRE COMERCIAL	FECHA DE PRIMERA APROBACIÓN	DOSIS
fentanilo	Durogesic Matrix®	1998	2,1; 4,2; 8,4; 12,6; 16,8 mg
	Matrifen®	2007	1,38; 2,75; 5,50; 8,25; 11 mg
buprenorfina	Transtec®	2002	20, 30, 40 mg
	Feliben®	2009	20, 30, 40 mg
	Butrans®	2010	0,84; 1,26; 1,68; 2,52; 3,36 mg*

Tabla 2. Formulaciones de parches transdérmicos de liberación sostenida de opioides para administración por vía transdérmica autorizadas para el tratamiento del dolor. * En este caso, la dosis se ha calculado según la ecuación: Dosis (mg) = constante de cesión de orden cero ($\mu\text{g/h}$) * duración del intervalo posológico (horas) * 1000

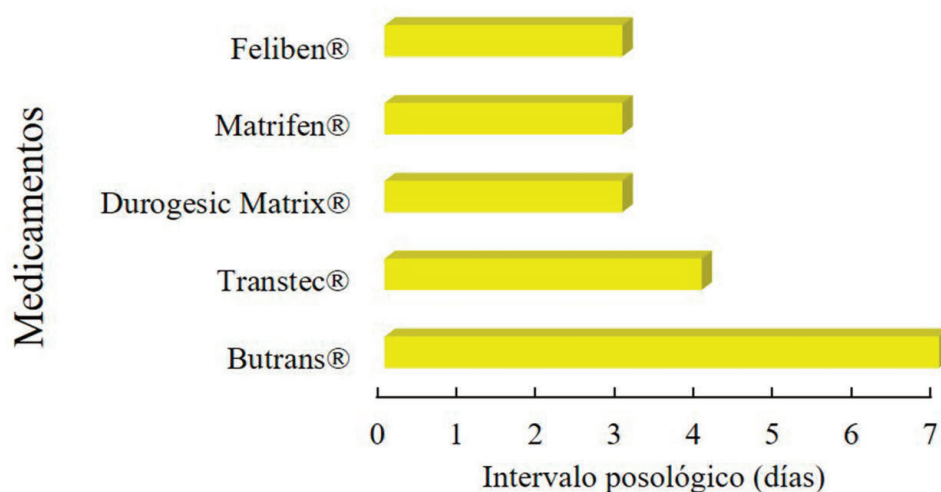


Figura 2: Intervalo posológico de los parches de liberación prolongada para el tratamiento del dolor que se encuentran actualmente autorizados en Europa y/o Estados Unidos

a parches transdérmicos (56). Debido a la dificultad de encontrar principios activos que reúnan todos estos requisitos, tan solo dos opioides (fentanilo y buprenorfina) se han formulado y comercializado en parches transdérmicos para su uso en clínica como analgésicos (Tabla 2). La razón es que el fentanilo tiene un peso molecular de 336,5 g/mol, un coeficiente de reparto de 813:1 y es unas 100 veces más potente que la morfina (57) y, la buprenorfina, tiene un peso molecular de 467 g/mol, un coeficiente de reparto de 1281:1 y es 30 veces más potente que la morfina (58). Sumado a esto, ambos sufren un gran efecto de primer paso hepático: la biodisponibilidad oral es, en el caso de la buprenorfina, de 10-15% y, en el caso del fentanilo, de 32% (59,60). Se han conseguido diseñar formulaciones de estos dos fármacos capaces de prolongar la liberación entre 3 y 7 días (Figura 2).

Una estrategia para la formulación de parches transdérmicos de liberación sostenida es la utilización de sistemas reservorio. Poseen una zona o depósito donde se encuentra el principio activo y otra zona que contiene una membrana polimérica, la cual controlará la liberación del fármaco desde el dispositivo. La primera formulación de parches transdérmicos basada en sistemas reservorio conteniendo opioides fue Duragesic®, parches de fentanilo aprobados por la FDA en 1990. Sin embargo, un problema importante asociado a este sistema es la liberación abrupta de fentanilo en caso de que la membrana controladora de la liberación sufra algún tipo de daño ya sea accidental o intencionado (61). Esto generó una gran preocupación ante la posibilidad de aumento de intentos de abuso de la formulación y sirvió de precedente para la introducción de mejoras en el sistema que evitasen la liberación repentina de fentanilo en caso de manipulación. Así, Duragesic® fue suspendido, reformu-

lado y reaprobado por la FDA en parches basados en un sistema matricial en vez de reservorio. Esta estrategia consiste en la dispersión de fentanilo en una matriz polimérica adhesiva de poliacrilato controladora de la liberación rodeada por una capa de soporte externa de acetato de etileno vinílico y tereftalato de polietileno. Además, lleva una lámina interior protectora de tereftalato de polietileno que debe ser retirada antes de adherir los parches a la superficie de la piel. Los parches se deben retirar cada 72 horas. Los parches matriciales de fentanilo están comercializados en Europa bajo el nombre de Durogesic Matrix® (conocido también como Durogesic DTrans® y Durogesic SMAT®) (62). Una última formulación de fentanilo recibió autorización para su comercialización en Europa en 2007 bajo el nombre de Matrifen® (conocida también bajo el nombre de Fendivia®). No ha sido aprobado por la FDA. Se diferencia de las formulaciones anteriores en que consiste un sistema mixto, formado por una matriz de silicona con gotas de dipropilenglicol y fentanilo dispersados en su interior rodeada por una membrana controladora de la liberación. Esta membrana de control supone una barrera adicional para evitar el posible efecto de liberación repentina del principio activo contenido en la matriz, por lo que dota de mayor seguridad al parche transdérmico (63,64). Matrifen® se deben retirar también cada 72 horas.

También se han desarrollado parches de buprenorfina utilizando sistemas matriciales (65). Estos se agrupan en dos categorías diferentes en función del valor de sus constantes de liberación de orden cero conseguidas en su desarrollo tecnológico. Por un lado, están los parches con constantes de liberación de orden cero altas (35;52,5;70 µg/hora), que solo han recibido aprobación en Europa. Son conocidos bajo los nombres comerciales de Transtec® y Feli-



ben®, aprobados en 2002 y 2009, respectivamente. Las matrices de estos dos medicamentos están compuestas por copolímeros acrílicos en el caso de Transtec® y por copolímeros de estireno-butadieno en el caso de Feliben® (66). Estas altas constantes de liberación hacen que los parches tengan intervalos posológicos más cortos, por ejemplo, Transtec® debe ser retirado cada 4 días y Feliben® cada 3. Por otro lado, están los parches transdérmicos de buprenorfina de constantes de liberación bajas (5, 10 y 20 µg/hora). Destaca Butrans®, aprobado en 2010 por la FDA, cuya matriz adhesiva está compuesta por ácido levulínico, povidona, oleato de oleilo y poliacrilato de aluminio. Estas bajas constantes de liberación permiten intervalos posológicos mayores. En concreto, los parches deben retirarse cada 7 días (67). Además, ha sido aprobado en varios países de Europa bajo el mismo nombre (Butrans®) o con otros nombres comerciales (Norspan®).

3. SISTEMAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA DE OPIOIDES PARA EL TRATAMIENTO DE LA DEPENDENCIA A OPIOIDES

En general, los analgésicos opioides son seguros cuando se toman durante periodos de tiempo cortos y bajo la pauta posológica prescrita. Sin embargo, el consumo regular de este tipo de analgésicos, que, además de calmar el dolor, poseen efectos euforizantes, podría originar en los pacientes conductas adictivas motivadas por una necesidad continua de consumir el fármaco de forma diferente a la indicada, en mayores dosis o sin prescripción médica, generando la dependencia a opioides. La dependencia a opioides, como el resto de los trastornos por abuso de sustancias adictivas, se caracteriza por una serie de síntomas cognitivos, comportamentales y fisiológicos como son la interrupción de la capacidad del individuo para priorizar comportamientos que resultan beneficiosos a largo plazo sobre aquellos que brindan recompensas emocionales a corto plazo, y la creciente dificultad de ejercer control sobre estos comportamientos. Todos estos síntomas llevan a la persona a seguir consumiendo a pesar de los problemas significativos que ocasionan (68).

El uso inapropiado de los opioides, derivado de las conductas adictivas, puede llevar a situaciones de sobredosis e incluso a causar la muerte (69). La mortalidad derivada del consumo ilícito ha supuesto un importante problema de salud pública que afecta principalmente a América del Norte, Asia y Europa. Concretamente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el daño causado por el uso de opioides es de 11,2 millones de años de vida ajustados por discapacidad. De hecho, la OMS en su informe anual sobre drogas, comunicó que el 78% de las muertes por sobredosis de sustancias en Europa son causadas por opioides (11).

Este consumo inapropiado se puede producir con cualquier sustancia opiácea, tanto con analgésicos opioides autorizados, como con drogas que no se encuentran autorizadas como medicamentos, como es el caso de la heroína. Actualmente, respecto a cuáles son las drogas más consumidas, se observa un cambio de tendencia de la heroína a otros opioides como la metadona, la buprenorfina y el fentanilo. De hecho, el 69% de las muertes por opioides son ocasionadas por fentanilo o por análogos de fabricación ilegal (11,70,71).

Los pacientes adictos se administran estas drogas fundamentalmente por vía intravenosa o inhalada, esto se debe a que por estas vías se producen incrementos rápidos de concentraciones plasmáticas, lo que se traduce en una intensificación del efecto euforizante (70). Un problema derivado de este comportamiento radica en el hecho de que las personas que se inyectan drogas generalmente comparten elementos de inyección, lo que favorece la propagación de virus como el virus de la inmunodeficiencia humana y el virus de la hepatitis C (72).

Por lo tanto, el objetivo primordial de la deshabituación a opioides persigue restablecer el estado físico del individuo, así como conseguir que el paciente adicto deje de ser dependiente del fármaco e incluso prevenir que vuelva a usarlo en el futuro, al mismo tiempo que se reducen las conductas de riesgo. Para conseguir estos objetivos, el tratamiento farmacológico empleado debe conseguir regular la actividad del sistema opioide endógeno, que en estos pacientes se encuentra disfuncional. Con este fin se emplean fármacos agonistas (metadona), antagonistas (naltrexona) y agonistas parciales (buprenorfina) de los receptores del sistema opioide endógeno (73).

Uno de los principales inconvenientes de la terapia convencional, basada en la administración de agonistas, antagonistas o agonistas parciales de liberación inmediata de forma diaria, es el riesgo de aparición de los síntomas de un síndrome de abstinencia, lo que contribuiría a incrementar el riesgo de recaída en los pacientes. Por otro lado, para que el paciente pierda el hábito de consumo, es necesario el empleo de un tratamiento de mantenimiento, lo que limita mucho las posibilidades de éxito de la terapia con los sistemas de liberación inmediata (74).

Estas limitaciones, junto con el hecho de que los pacientes dependientes a opioides presentan bajas tasas de adherencia al tratamiento de forma voluntaria, ocasionan una falta de cumplimiento terapéutico, resultando en el fracaso de la terapia convencional, lo que estimuló la búsqueda de nuevas formulaciones alternativas, desarrollándose así los sistemas de liberación prolongada (75). Estos nuevos sistemas para la administración de fármacos opioides ofrecen una serie de ventajas como son la posibilidad de mantener el efecto terapéutico durante largos periodos de tiempo tras una

única administración, lo que resulta especialmente importante en aquellos fármacos con una corta semivida plasmática. Esta prolongación del efecto terapéutico permite reducir las frecuencias de administración y con ello conseguir mejorar la adherencia (76).

3.1. Sistemas de liberación prolongada por vía parenteral

Los sistemas de liberación prolongada de administración parenteral alcanzan intervalos de administración mucho mayores a los conseguidos con este tipo de sistemas por vía oral y vía transdérmica. Además, los fármacos que pueden incluirse en los sistemas de liberación prolongada por vía parenteral (antagonistas opioides y agonistas parciales) no presentan riesgo de abuso, lo que permite diseñar sistemas con elevadas dosis de principio activo. Estas dos ventajas que se consiguen con estos sistemas resultan idóneas para conseguir la adherencia al tratamiento y por lo tanto el éxito del mismo (77). Además, el hecho de que sólo se hayan desarrollado sistemas de liberación modificada por vía parenteral para el tratamiento de la dependencia a opioides, a diferencia del tratamiento dolor, para el cual se han desarrollado presentaciones por vía oral y por vía transdérmica, se justifica con el hecho de que el empleo de estas últimas vías está íntimamente relacionado con la voluntad del propio paciente para mantener la adherencia al tratamiento. Sin embargo, en el caso de la vía parenteral, el paciente no puede interrumpir su tratamiento (78).

Uno de los inconvenientes de estos sistemas es que deben estar formulados con polímeros de máximo grado de biocompatibilidad, pudiendo ser estos biodegradables o no (implicando en este último caso la necesidad de una intervención para su retirada). La vía parenteral es la vía de elección para la administración de prin-

cipios activos de semivida corta como es el caso de naltrexona (4 horas) y buprenorfina (2,2 horas) (79). Asimismo, también son candidatos para este tipo de sistemas fármacos que sufran un intenso efecto de primer paso hepático como es el caso de naltrexona, de la cual el 98% es metabolizado en el hígado (80).

Los únicos dos fármacos para los cuales se han desarrollado sistemas de liberación prolongada de administración parenteral para el tratamiento de la dependencia a opioides son la naltrexona y la buprenorfina (Tabla 3). Estos sistemas consiguen incrementar los intervalos posológicos hasta un máximo de seis meses (Figura 3).

3.1.1. Microesferas

Las microesferas son sistemas coloidales poliméricos que encapsulan el fármaco y lo liberan de manera prolongada mediante mecanismos de difusión y erosión del polímero (81). Vivitrol® emplea microesferas biodegradables como sistema de liberación prolongada de naltrexona. Este sistema fue aprobado por la FDA en 2010 para el tratamiento de la dependencia a opioides, sin embargo, no se encuentra aprobado en Europa. La posología de Vivitrol® corresponde con una dosis de 380 mg administrada cada 4 semanas por vía intramuscular en la región del glúteo (82).

En el desarrollo de Vivitrol® se ha empleado la tecnología Medisorb®, por la cual la naltrexona es encapsulada en una matriz del copolímero poli-(D-L-láctico-co-glicólico) (PLGA) en una proporción 75:25 láctico: glicólico, formando así microesferas de 100 µm (83). La liberación de la naltrexona desde las microesferas sucede en tres fases. En primer lugar, durante las primeras 24 horas se produce la hidratación del polímero, lo que produce que se hinchen las microesferas. Posteriormente, tras 48 horas, tiene lugar la

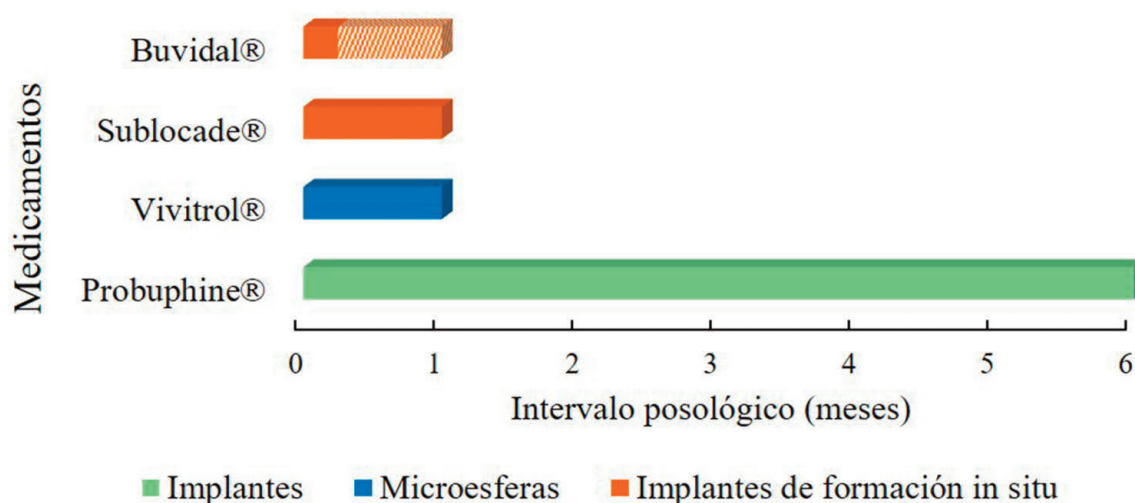


Figura 3: Intervalo posológico de los sistemas de liberación prolongada por vía parenteral para el tratamiento de la dependencia a opioides que se encuentran actualmente autorizados en Europa y/o Estados Unidos

FORMA FARMACÉUTICA	OPIOIDE	NOMBRE COMERCIAL	FECHA DE PRIMERA APROBACIÓN	TIPO DE TECNOLOGÍA	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	DOSIS
micropartículas	naltrexona	Vivitrol®	2010	Medisorb®	intramuscular	380 mg
implantes	buprenorfina	Probuphine®	2016	Pronerura™	subcutánea	80 mg
implantes de formación <i>in situ</i>		Sublocade®	2017	Atrigel®	subcutánea	100, 300 mg
		Buvidal ®	2019	FluidCrystal®	subcutánea	8,16,24 o 32 mg 64,96 o 128 mg

Tabla 3. Formulaciones de liberación prolongada de opioides para administración por vía parenteral para el tratamiento de la dependencia a opioides

difusión de naltrexona a través del polímero, esta difusión proporciona una liberación sostenida de la naltrexona durante 30 días; esta rapidez en la instauración de la liberación permite que no haya que acudir a la suplementación oral de naltrexona en las etapas iniciales. Finalmente, en la tercera y última fase el polímero se erosiona completamente transformándose en ácido láctico y glicólico, los cuales se metabolizan a compuestos fisiológicos que son eliminados por las vías habituales. De esta forma este sistema permite mantener concentraciones constantes del fármaco evitando así las posibles fluctuaciones que ocurren con las formas orales de liberación inmediata de naltrexona, lo que permite reducir los posibles efectos adversos, aumentar la eficacia, y mejorar el cumplimiento terapéutico (84,85).

3.1.2. Implantes

Los implantes son dispositivos sólidos que permiten una liberación prolongada de fármaco una vez que son insertados en el organismo.

Probuphine® es un implante cilíndrico de unos 26 mm de longitud y 2,5 mm de diámetro que fue aprobado en 2016 por la FDA y en 2019 por la EMA, donde recibe el nombre de Sixmo®. Está aprobado como tratamiento de mantenimiento en la dependencia a opioides en adultos clínicamente estables. La posología de Probuphine® corresponde con una dosis de 80 mg administrada por vía subcutánea en la parte superior del brazo. La liberación de la buprenorfina a partir de este sistema se prolonga durante 6 meses, a lo largo de los cuales el sistema proporciona dosis regulares y constantes del fármaco (86). En situaciones normales este tratamiento no requiere suplementación con buprenorfina sublingual; sin embargo, en determinadas circunstancias, como estrés o síntomas de abstinencia sí que sería necesario (87).

En el desarrollo de Probuphine® se ha empleado la tecnología ProNeura™. Este sistema consiste en una matriz polimérica no biodegradable de etil-vinil-acetato (EVA) a partir de la cual el fármaco se va liberando. Las complicaciones más graves relacionadas con el empleo de este sistema están relacionadas con la inserción y la retirada del sistema (88).

3.1.3. Implantes de formación *in situ*

Los implantes de formación *in situ* son sistemas de liberación prolongada de fármacos que se administran en forma de suspensiones y forman el implante en el organismo una vez administrados. Existen dos implantes de liberación *in situ* para la liberación prolongada de buprenorfina: Buvidal® y Sublocade®. Ambos son sistemas biodegradables, por lo que no requieren de ninguna intervención para su retirada (89).

3.1.3.1 Sublocade®

El implante de formación *in situ* Sublocade® fue aprobado por la FDA en 2017; sin embargo, aún no ha sido aprobado en Europa. En Estados Unidos, está indicado para el tratamiento de la dependencia a opioides moderada-severa en aquellos pacientes que han conseguido ser estabilizados con buprenorfina sublingual durante un periodo de al menos 7 días. Es un medicamento de liberación prolongada de inyección subcutánea en la zona abdominal de la cual existen actualmente dos presentaciones comercializadas: una con 100 mg y otra con 300 mg de buprenorfina. La transición a Sublocade® desde las formas farmacéuticas sublinguales debe hacerse inicialmente con la presentación de 300 mg durante dos meses, seguido de la dosis de 100 mg durante un periodo de mantenimiento. En ambos casos la duración de la liberación de buprenorfina a partir del sistema es de 1 mes (90). Sublocade®, a diferencia de otros sistemas, debe conservarse en refrigeración (2-8 °C) debido a que su estabilidad no supera los 7 días a temperatura ambiente (87).



Para desarrollar este sistema de buprenorfina se empleó la tecnología Atrigel®, que consiste en la incorporación del fármaco en una solución polimérica que contiene el copolímero biodegradable PLGA, en una proporción 50:50 láctico: glicólico, disuelto en el disolvente N-metil-2 pirrolidona, solvente biocompatible y miscible en agua (91). Después de la inyección subcutánea de esta solución polimérica, la N-metil-2 pirrolidona difunde hacia los fluidos biológicos ocasionando la liberación inicial del principio activo solubilizado en el solvente orgánico y desencadenando la gelificación del polímero, formando así el implante. Sublocade® libera buprenorfina de forma prolongada durante 1 mes a medida que el polímero va degradándose y dado que al mismo tiempo que se forma el implante comienza la liberación de buprenorfina, no sería necesario suplementación sublingual al principio (92).

3.1.3.2 Buvidal®

El implante de formación in situ Buvidal® fue aprobado por la EMA en 2019 para el tratamiento de la dependencia a opioides al inicio del mismo o como alternativa a la buprenorfina sublingual, pero no se encuentra aprobado por la FDA (93). Actualmente existen 2 formas de Buvidal®, ambas precisan una única administración; sin embargo, la duración de la liberación de buprenorfina es diferente en función de la viscosidad del disolvente empleado para formar el sistema. Si el solvente empleado es etanol, la duración del sistema es de una semana (diferentes dosis: 8, 16, 24 o 32 mg), mientras que si el solvente es N-metil-2-pirrolidona se consiguen niveles mantenidos de buprenorfina durante 1 mes (diferentes dosis: 64, 96 o 128 mg) (94).

Este sistema se obtiene mediante una tecnología denominada FluidCrystal®. Esta tecnología está basada en el uso de un solvente junto con dos lípidos naturales: fosfatidilcolina y dioleato de glicerol. Estos dos lípidos encapsulan la buprenorfina en una matriz de cristal, que se transforma en un gel viscoso tras la difusión del solvente al entrar en contacto con el entorno acuoso del lugar de administración y se va degradando lentamente liberando así el fármaco de forma prolongada (95).

4. DISCUSIÓN

El incesante intento de la tecnología farmacéutica por buscar alternativas a la terapia convencional en el tratamiento del dolor y de la dependencia a opioides ha llevado al desarrollo de sistemas de liberación prolongada de fármacos opioides. Aunque muchos de estos sistemas están aprobados tanto por la FDA como por la EMA, algunos solo se encuentran aprobados en Estados Unidos (Kadian®, Vivitrol®, Sublocade®), mientras que otros solo se encuentran aprobados en Europa (Matrifen®, Edunix® y Buvidal®).

Aunque estos sistemas se han desarrollado para la administración de opioides en ambas patologías, los sistemas desarrollados para el tratamiento del dolor aparecieron aproximadamente 30 años antes que los primeros sistemas desarrollados para el tratamiento de la dependencia a opioides. Esto implica que para el tratamiento del dolor hayan aparecido medicamentos genéricos, mientras que para el tratamiento de la dependencia a opioides no (96). Si bien la irrupción de medicamentos genéricos contribuye a la sostenibilidad de los sistemas sanitarios al suponer un ahorro por el hecho de entrar en competencia directa dos tipos de medicamentos que poseen ambos autorización de comercialización para una misma indicación, desde el punto de vista de los laboratorios farmacéuticos de medicamentos innovadores, dicha irrupción ha supuesto en muchos casos la suspensión de la comercialización de determinados medicamentos como es el caso de Avinza®, Oramorph SR® u Opana ER® (97).

Respecto al tratamiento del dolor, estos sistemas de liberación prolongada permiten disminuir la frecuencia de administración y las fluctuaciones de las concentraciones de fármaco en sangre. Por otro lado, las implicaciones farmacocinéticas que estos sistemas conllevan, como son el hecho de que la concentración máxima (C_{máx}) alcanzada con estos sistemas sea menor y que además esta no se alcance de forma inmediata (mayor tiempo en alcanzar la concentración máxima (T_{max})) (98), favorecen que, con un uso acorde a la prescripción médica, se reduzca el riesgo de desarrollo de la dependencia a opioides en comparación con las formas farmacéuticas de liberación inmediata. Sin embargo, para conseguir espaciar los intervalos de administración es necesario que los sistemas contengan mayores cantidades de principio activo en comparación con los sistemas de liberación inmediata. Este hecho ha de tenerse en cuenta a la hora de desarrollar sistemas de liberación prolongada de analgésicos opioides, pues las dosis más altas los hacen más susceptibles de abuso con fines no terapéuticos. En este sentido, la industria farmacéutica ha desarrollado formulaciones antiabuso con una serie de mecanismos físicos, químicos o farmacológicos (99). Un ejemplo representativo es el caso de la oxicodona, cuyos comprimidos de liberación modificada fueron reformulados con mecanismos físicos antiabuso y posteriormente relanzados al mercado (100). Análogamente, la migración desde sistemas reservorio hacia sistemas matriciales (o incluso sistemas mixtos o matriciales avanzados) en parches transdérmicos consigue disminuir la tendencia hacia el abuso de los mismos por parte de los pacientes. Hasta la fecha, el desarrollo y la reformulación de estos sistemas para disminuir la tendencia hacia un uso ilícito solo ha sido reconocida por la FDA.

La vía por la cual se han desarrollado más sistemas de liberación prolongada con analgésicos opioides es la vía oral: para



el 56% de los opioides autorizados para el tratamiento del dolor se han desarrollado sistemas de liberación prolongada de administración por vía oral (Figura 4), dado que es una vía cómoda para el paciente además de no ser invasiva. Por esta vía se han desarrollado medicamentos con morfina, oxicodona, hidromorfona, tapentadol e hidrocodona, fármacos de semivida corta y que no sufren efecto de primer paso. Con estos sistemas se consigue aumentar el intervalo posológico hasta 12-24 horas respecto a los sistemas de liberación inmediata en los que la frecuencia de administración es cada 6-8 horas (figura 1). Sin embargo, la vía oral no es de utilidad en aquellos fármacos que presentan un intenso efecto de primer paso hepático, como es el caso del fentanilo y la buprenorfina. Esta limitación consigue superarse con los sistemas de liberación prolongada por vía transdérmica, que además consiguen espaciar aún más los intervalos posológicos. En concreto el 20% de los parches se deben retirar cada 7 días y el 80% cada 3-4 días (Figura 2). Los sistemas de liberación prolongada por esta vía se han desarrollado para una menor proporción de analgésicos opioides que en el caso de la vía oral, concretamente solo el 22,2% del total de los principios activos empleados en los sistemas de liberación inmediata se encuentran desarrollados en formas de parches transdérmicos de liberación prolongada (Figura 4). Sin embargo, son los parches transdérmicos, las formas farmacéuticas más vendidas y las que representan un mayor impacto en el mercado (101).

Para el tratamiento del dolor crónico no se ha desarrollado ningún sistema de liberación prolongada por vía parenteral, ya que el uso de esta vía solo se justifica si se consigue disminuir la frecuencia de administración de forma significativa respecto a otras vías de administración por su invasividad intrín-

seca, para lo cual sería necesario diseñar sistemas con elevada dosis de principio activo. El diseño de sistemas con mayores cantidades de principio activo incrementaría el riesgo de sobredosis tanto por liberación brusca del analgésico opioide como por la elevada susceptibilidad de abuso de los mismos con fines no terapéuticos.

Atendiendo al tratamiento de las adicciones a opioides, dado que los fármacos empleados en el tratamiento (buprenorfina y naltrexona) no presentan riesgo de abuso, se pueden incorporar mayores cantidades de principio activo al sistema, lo que permite reducir aún más la frecuencia de administración, consiguiendo así aumentar el cumplimiento terapéutico de este tipo de pacientes que, por lo general, no se adhieren de forma voluntaria. No se han desarrollado sistemas de liberación prolongada para el tratamiento de la dependencia a opioides ni por vía oral ni por vía transdérmica (figura 4), ya que, en estos casos es fácil retirar el sistema (en el caso de los parches) o dejar de tomar la forma sólida oral, mientras que sí se ha desarrollado sistemas por vía parenteral, ya que en este caso el paciente no tiene la posibilidad de retirarse el sistema. Los intervalos posológicos conseguidos por vía parenteral son de 1-6 meses, siendo con la tecnología basada en los implantes con la que se consigue reducir en mayor medida la frecuencia de administración (Figura 3).

Del total de medicamentos opiáceos que pueden ser empleados para el tratamiento de la dependencia a opioides (metadona, buprenorfina y naltrexona), solo se han desarrollado sistemas de liberación prolongada por vía parenteral con dos de estos principios activos: buprenorfina y naltrexona (Figura 4).

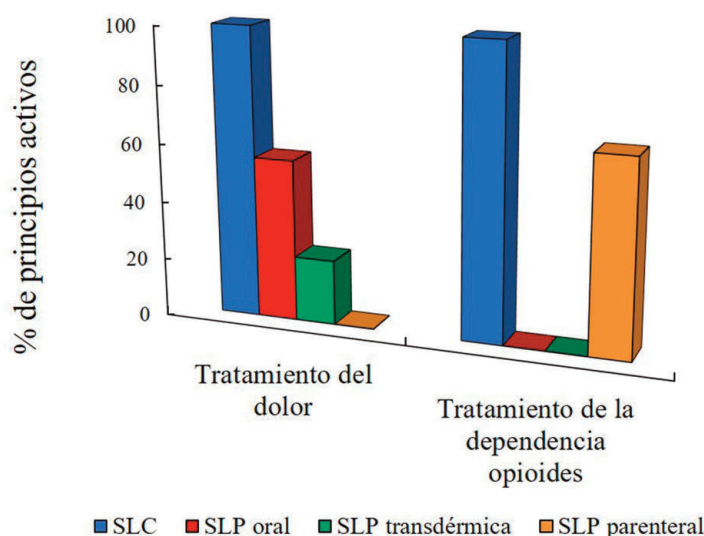


Figura 4. Comparación de los distintos sistemas de liberación de opioides autorizados para el tratamiento del dolor y de la dependencia a opioides. SLC: Sistemas de liberación convencional; SLP: Sistemas de liberación prolongada



5. CONCLUSIONES

Los sistemas de liberación prolongada han constituido un soporte fundamental en la farmacología de opioides durante las últimas décadas. En primera instancia, en el marco del tratamiento del dolor crónico, el desarrollo de sistemas de liberación prolongada de agonistas opioides de administración por vía oral y transdérmica ha servido para obtener periodos de analgesia ostensiblemente más duraderos, así como para reducir el riesgo de desarrollar dependencia a opioides, fruto de la reducción del efecto euforizante, al diferir y estabilizar los niveles plasmáticos de fármaco. En segundo lugar, tras observar que las dosis más altas que contienen estos sistemas de liberación prolongada de analgésicos opioides aumentaban la susceptibilidad de abuso de los mismos con fines no terapéuticos, muchos de estos sistemas han sido reformulados para incorporar recursos tecnológicos disuasorios de su utilización por vías de administración alternativas. Por último, los sistemas de liberación prolongada de administración por vía parenteral de agonistas parciales y antagonistas opioides, capaces de prolongar su liberación durante meses, han supuesto, más recientemente, un hito en la mejora del cumplimiento terapéutico del tratamiento de mantenimiento de los pacientes con dependencia a opioides. Esta sinergia entre opioides y el desarrollo de sistemas de liberación prolongada ha ido evolucionando a lo largo de estas décadas y seguirá haciéndolo en el futuro para dar respuesta a los nuevos retos en el campo de la farmacología de opioides que están por venir.

Conflicto de intereses

Los autores del presente estudio declaran que no existe ningún conflicto de interés.

6. REFERENCIAS

1. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Utilización de medicamentos opioides en España durante el periodo 2010-2019.
2. Holden JE, Jeong Y, Forrest JM. The endogenous opioid system and clinical pain management. *AACN Clin Issues*. 2005 Jul;16(3):291–301.
3. Corder G, Castro DC, Bruchas MR, Scherrer G. Endogenous and exogenous opioids in pain. *Annu Rev Neurosci*. 2018 Jul 8;41(1):453–73.
4. Diego L, Atayee R, Helmons P, Hsiao G, Von Gunten CF. Novel opioid antagonists for opioid-induced bowel dysfunction. *Expert Opin Investig Drugs*. 2011 Aug 12;20(8):1047–56.
5. Peciña M, Karp JF, Mathew S, Todtenkopf MS, Ehrich EW, Zubieta JK. Endogenous opioid system dysregulation in depression: implications for new therapeutic approaches. *Mol Psychiatry*. 2019 Apr 1;24(4):576–87.
6. Wang S. Historical Review: Opiate Addiction and Opioid Receptors. *CellTransplant*. 2019 Mar 13;28(3):233–8.
7. Khademi H, Kamangar F, Brennan P, Malekzadeh R. Opioid therapy and its side effects: A review. *Arch Iran Med*. 2016 Dec 1;19(12):870–6.
8. Álvarez Y, Farré M. Farmacología de los opioides. Vol. 17, Adiciones. 2005.
9. Pathan H, Williams J. Basic opioid pharmacology: an update. *Br J Pain*. 2012 Feb;6(1):11–6.
10. Tornero C, Herrera J, Molà O, Galván J. Buprenorfina transdérmica (Feliben®). Nueva opción terapéutica para pacientes con dolor moderado y severo. *Rev Soc Esp Dolor*. 2012;19(6):301–9.
11. Acuña JP. Tratamiento del dolor agudo en el paciente dependiente de sustancias. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 2014 Jul 1;25(4):664–73.
12. Alho H, Dematteis M, Lembo D, Maremmanni I, Roncero C, Somaini L. Opioid-related deaths in Europe: Strategies for a comprehensive approach to address a major public health concern. *Int J Drug Policy*. 2020 Feb 1;76.
13. Muriel C SJS-M. Farmacología de los analgésicos opiáceos. In: *Máster del Dolor*. 2017;
14. Dumas EO, Pollack GM. Opioid tolerance development: A pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective. *AAPS J*. 2008 Dec;10(4):537–51.
15. Harned M, Sloan P. Safety concerns with long-term opioid use [Internet]. Vol. 15, *Expert Opinion on Drug Safety*. Taylor and Francis Ltd; 2016. p. 955–62.
16. Vallerand AH. The use of long-acting opioids in chronic pain management. *Nurs Clin North Am*. 2003 Sep 1;38(3):435–45.
17. Steingrimsdóttir ÓA, Landmark T, Macfarlane GJ, Nielsen CS. Defining chronic pain in epidemiological studies: A systematic review and meta-analysis. Vol. 158, *Pain*. Lippincott Williams and Wilkins; 2017. p. 2092–107.
18. Sociedad Española del Dolor. Una Nueva Definición de “Dolor”. Un Imperativo de Nuestros Días.
19. Fayaz A, Croft P, Langford RM, Donaldson LJ, Jones GT. Prevalence of chronic pain in the UK: a systematic review and meta-analysis of population studies. *Open*. 2016;6:10364.
20. Latina R, De Marinis MG, Giordano F, Osborn JF, Giannarelli D, Di Biagio E, et al. Epidemiology of Chronic Pain in the Latium Region, Italy: A Cross-Sectional Study on the Clinical Characteristics of Patients Attending Pain Clinics. *Pain Manag Nurs*. 2019 Aug 1;20(4):373–81.



21. González-Escalada J. Actualizaciones en los aspectos socioeconómicos del dolor. In: Actualizaciones en el control del dolor: diez años Reunión de expertos. Salamanca: Fundación Grünenthal; 2010. p. 145–69.
22. Álvarez-Caramés MÁ, Navarro-Ribero M. Costes del tratamiento del dolor versus su no tratamiento. Aproximación a la realidad de Portugal y España. *Dor*. 2016;24:1–9.
23. Damico V, Murano L, Cazzaniga F, Dal Molin A. Pain prevalence, severity, assessment and management in hospitalized adult patients: a result of a multicenter cross sectional study. *Ann Ist Super Sanita*. 2018;54(3):194–200.
24. Mills SEE, Nicolson KP, Smith BH. Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. *Br J Anaesth*. 2019 Aug 1;123(2):e273–83.
25. Jones MR, Carney MJ, Kaye RJ, Prabhakar A, Kaye AD. Drug Formulation Advances in Extended-Release Medications for Pain Control. *Curr Pain Headache Rep*. 2016 Jun 15;20(6):36.
26. Amabile CM, Bowman BJ. Overview of Oral Modified-Release Opioid Products for the Management of Chronic Pain. *Ann Pharmacother*. 2006 Jul 4;40(7–8):1327–35.
27. Martín Montaner I. Formas farmacéuticas de liberación modificada y estereoisómeros ¿Nos aportan algo en la práctica clínica? In: Boletín de información Farmacoterapéutica de Navarra. 2005. p. 1–10.
28. Argoff CE, Silvershein DI. A Comparison of Long-and Short-Acting Opioids for the Treatment of Chronic Noncancer Pain: Tailoring Therapy to Meet Patient Needs. *Mayo Clin Proc*. 2009;84(7):602–12.
29. Smith HS. Enteral controlled-release opioid delivery systems. *Pain Med*. 2009;10.
30. Varrassi G, Angeletti C, Guetti C, Marinangeli F, Paladini A. Systemic opioid and chronic pain. *Eur J Pain Suppl*. 2009 Nov;3(2):77–83.
31. Martin C, De Baerdemaeker A, Poelaert J, Maddar A, Hoogenboom R, Ballet S. Controlled-release of opioids for improved pain management. *Mater Today*. 2016 Nov 1;19(9):491–502.
32. Mugabure Bujedo B. Opioid formulations that prevent the recreational use: More questions than answers about their utility. *Rev la Soc Esp del Dolor*. 2020;27(1):61–2.
33. Cohen JP, Mendoza M, Roland C. Challenges Involved in the Development and Delivery of Abuse-deterrent Formulations of Opioid Analgesics. *Clin Ther*. 2018 Feb 1;40(2):334–44.
34. Leslie S. The Contin delivery system: Dosing considerations. *J Allergy Clin Immunol*. 1986;78(4 PART 2):768–73.
35. Miller DA, DiNunzio JC, Williams RO. Advanced formulation design: Improving drug therapies for the management of severe and chronic pain. *Drug Dev Ind Pharm*. 2008 Feb 11;34(2):117–33.
36. Reder RF. Opioid formulations: tailoring to the needs in chronic pain. *Eur J Pain*. 2001 Dec;5(SA):109–11.
37. Litman RS, Pagán OH, Cicero TJ. Abuse-deterrent opioid formulations. *Anesthesiology*. 2018 May;128(5):1015–26.
38. Larance B, Dobbins T, Peacock A, Ali R, Bruno R, Lintzeris N, et al. The effect of a potentially tamper-resistant oxycodone formulation on opioid use and harm: main findings of the National Opioid Medications Abuse Deterrence (NOMAD) study. *The Lancet Psychiatry*. 2018 Feb 1;5(2):155–66.
39. López S. Sistemas de liberación sostenida de administración oral y parenteral. 2018.
40. Alexander L, Mannion RO, Weingarten B, Fanelli RJ, Stiles GL. Development and impact of prescription opioid abuse deterrent formulation technologies. *Drug Alcohol Depend*. 2014 May 1;138(1):1–6.
41. Smith K, Hopp M, Mundin G, Bond S, Bailey P, Woodward J, et al. Low absolute bioavailability of oral naloxone in healthy subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2012 May 1;50(05):360–7.
42. Gudín JA. Assessment of Extended-Release Opioid Analgesics for the Treatment of Chronic Pain. *J Pain Palliat Care Pharmacother*. 2013 Feb;27(1):49–61.
43. Darwish M, Bond M, Tracewell W, Robertson P, Yang R. Pharmacokinetics of hydrocodone extended-release tablets formulated with different levels of coating to achieve abuse deterrence compared with a hydrocodone immediate-release/acetaminophen tablet in healthy subjects. *Clin Drug Investig*. 2015 Jan 1;35(1):13–22.
44. Dhillon S. Hydrocodone Bitartrate ER (Hysingla® ER): A Review in Chronic Pain. *Clin Drug Investig*. 2016 Nov 1;36(11):969–80.
45. Gardner-Nix J, Mercadante S. The role of OROS® hydromorphone in the management of cancer pain. *Pain Pract*. 2010 Jan 1;10(1):72–7.
46. Wallace MS, Thipphawong J. Clinical Trial Results with OROS® Hydromorphone. *J Pain Symptom Manage*. 2007 Feb 1;33(2 SUPPL.):S25–32.
47. Zingraff M, Reher M. Sustained release tablets with hydromorphone. 2010.
48. Ross EL, Hahn K. KADIAN® (morphine sulfate extended-release) Capsules for treatment of chronic, moderate-to-severe, nonmalignant pain. *Int J Clin Pract*. 2008 Feb 1;62(3):471–9.
49. Krashin D, Murinova N, Trescot AM. Extended-release hydrocodone - gift or curse? *J Pain Res*. 2013;6:53–7.
50. Maincent J, Zhang F. Recent advances in abuse-deterrent technologies for the delivery of opioids. *Int J Pharm*. 2016 Aug 20;510(1):57–72.
51. Lamb YN, Garnock-Jones KP, Keam SJ. Oxycodone DETERx® ER Capsules: A Review in Severe, Chronic Pain. *Drugs*. 2016 Dec 1;76(18):1759–69.



52. Mayock SP, Saim S, Fleming AB. In Vitro Drug Release After Crushing: Evaluation of Xtampza® ER and Other ER Opioid Formulations. *Clin Drug Investig.* 2017 Dec 1;37(12):1117–24.
53. Patel D, Chaudhary SA, Parmar B, Bhura N. Transdermal Drug Delivery System: A Review. Vol. 1. 2012.
54. Gomez Ayala M-E. Manipulación de especialidades farmacéuticas. 2007;44–8.
55. Pastore MN, Kalia YN, Horstmann M, Roberts MS. Transdermal patches: History, development and pharmacology. *Br J Pharmacol.* 2015 Jan 5;172(9):2179–209.
56. Chandrashekar N, Shobha Rani R. Physicochemical and pharmacokinetic parameters in drug selection and loading for transdermal drug delivery. *Indian J Pharm Sci.* 2008 Jan 1;70(1):94–6.
57. Delgado-Cortés R, Martínez-Segura RT. Perfil farmacocinético de los opioides aplicado a la anestesia ambulatoria. Supl 1 Abril-Junio. 2011;34:122–4.
58. Kukanich B, Allen P. Comparative pharmacokinetics of intravenous fentanyl and buprenorphine in healthy Greyhound dogs.
59. Davis MP, Pasternak G, Behm B. Treating Chronic Pain: An Overview of Clinical Studies Centered on the Buprenorphine Option.
60. Lötsch J, Walter C, Parnham MJ, Oertel BG, Geisslinger G. Pharmacokinetics of non-intravenous formulations of fentanyl. *Clin Pharmacokinet.* 2013 Jan 26;52(1):23–36.
61. Margetts L, Sawyer R. Transdermal drug delivery: Principles and opioid therapy. *Contin Educ Anaesthesia, Crit Care Pain.* 2007 Oct 1;7(5):171–6.
62. Kress HG, Boss H, Delvin T, Lahu G, Lophaven S, Marx M, et al. Transdermal fentanyl matrix patches Matrifen® and Durogesic® DTrans® are bioequivalent. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010 Jun;75(2):225–31.
63. Hair PI, Keating GM, McKeage K. Transdermal matrix fentanyl membrane patch (Matrifen®): In severe cancer-related chronic pain. *Drugs.* 2008 Sep 17;68(14):2001–9.
64. Lane ME. The transdermal delivery of fentanyl. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013 Aug 1;84(3):449–55.
65. Likar R. Transdermal buprenorphine in the management of persistent pain - Safety aspects. *Ther Clin Risk Manag.* 2006;2(1):115–25.
66. Kress HG. Clinical update on the pharmacology, efficacy and safety of transdermal buprenorphine. *Eur J Pain.* 2009 Mar;13(3):219–30.
67. Plosker GL, Barkin RL, Breivik H, Gordon A, Hernandez JJ, Hess PE. Buprenorphine 5, 10 and 20 µg/h transdermal patch: A review of its use in the management of chronic non-malignant pain. *Drugs.* 2011;71(18):2491–509.
68. Segal H, Salgado B, Mínguez F, Quintero J. Trastornos por consumo de sustancias y fármacos. Programa Form Médica Contin Acreditado. 2015.
69. Díaz González LM, Martín Gutiérrez L, Fernández del Pozo M del B. Epilepsia y Dolor Neuropático. Principios Fisiopatol para la Atención Farm Módulo IV. 2009;18–26.
70. Acuña JP. Riesgo de adicción a analgésicos opioides en el tratamiento del dolor crónico no oncológico. *Rev Médica Clínica Las Condes.* 2019 Nov 1;30(6):466–79.
71. Soyka M, Mutschler J. Treatment-refractory substance use disorder: Focus on alcohol, opioids, and cocaine. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 2016 Oct 12;70:148–61.
72. Conrad C, Bradley HM, Broz D. Community Outbreak of HIV Infection Linked to Injection Drug Use of Oxycodone. 2015.
73. Carmen M, Casero V. Deshabitación de opiáceos (I). 2011;21(1).
74. Itzoe ML, Guarnieri M. New developments in managing opioid addiction: Impact of a subdermal buprenorphine implant. *Drug Des Devel Ther.* 2017 May 10;11:1429–37.
75. Toce MS, Chai PR, Burns MM, Boyer EW. Pharmacologic Treatment of Opioid Use Disorder: a Review of Pharmacotherapy, Adjuncts, and Toxicity. *J Med Toxicol.* 2018 Dec 1;14(4):306–22.
76. Pérez-López A, Martín-Sabroso C, Torres-Suárez AI, Aparicio-Blanco J. Timeline of translational formulation technologies for cancer therapy: Successes, failures, and lessons learned therefrom. *Pharmaceutics.* 2020 Nov 1;12(11):1–34.
77. Benítez MC, Gil-Alegre ME. Opioid Addiction: Social Problems Associated and Implications of Both Current and Possible Future Treatments, including Polymeric Therapeutics for Giving Up the Habit of Opioid Consumption. *Biomed Res Int.* 2017;2017.
78. Ilmo N, Moreno L, Discurso F, Prof C, Alarc FR. Innovaciones farmacéuticas para la administración de medicamentos. *Real Acad Med la Comunidad Val.* 2012;46–64.
79. Goonoo N, Bhaw-Luximon A, Ujoodha R, Jhugroo A, Hulse GK, Jhurry D. Naltrexone: A review of existing sustained drug delivery systems and emerging nano-based systems. *J Control Release.* 2014 Jun 10;183(1):154–66.
80. Krupitsky E, Zvartau E, Woody G. Use of naltrexone to treat opioid addiction in a country in which methadone and buprenorphine are not available. *Curr Psychiatry Rep.* 2010 Oct;12(5):448–53.
81. Kreuter J. Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery. *J Anat.* 1996 Dec;189 (Pt 3(Pt 3):503–5.
82. Kijome KL, Gerard Moeller F. Long-acting injectable naltrexone for the management of patients with opioid dependence. *Subst Abuse Res Treat.* 2011;5(1):1–9.
83. Park K, Skidmore S, Hadar J, Garner J, Park H, Otte A, et al. Injectable, long- acting PLGA formulations: Analyzing PLGA and understanding microparticle formation. *J Control Release.* 2019 Jun 28;304:125–34.
84. Jain A, Kunduru KR, Basu A, Mizrahi B, Domb AJ, Khan W. Injectable formulations of poly(lactic acid) and its copolymers in clinical use.



- Vol. 107, Advanced Drug Delivery Reviews. Elsevier B.V.; 2016. p. 213–27.
85. Jarvis BP, Holtyn AF, Subramaniam S, Tompkins DA, Oga EA, Bigelow GE, et al. Extended-release injectable naltrexone for opioid use disorder: a systematic review. *Addiction*. 2018 Jul 1;113(7):1188–209.
 86. Elliott W, Chan J. Buprenorphine Implant for Subdermal Administration (Probuphine). *Intern Med Alert*. 2016;93–4.
 87. Chappuy M, Trojak B, Nubukpo P, Bachellier J, Bendimerad P, Brousse G, et al. Prolonged-release buprenorphine formulations: Perspectives for clinical practice. *Therapies*. 2020 May 1;75(5):397–406.
 88. Goodbar NH, Hanlon KE. Implantable Buprenorphine (Probuphine) for Maintenance Treatment of Opioid Use Disorder. *Am Fam Physician*. 2018;97(10):668–70.
 89. Park K, Otte A. Prevention of Opioid Abuse and Treatment of Opioid Addiction: Current Status and Future Possibilities. *Annu Rev Biomed Eng*. 2019 Jun 4;21(1):61–84.
 90. Neale J, Tompkins CNE, Strang J. Prolonged-release opioid agonist therapy: Qualitative study exploring patients' views of 1-week, 1-month, and 6-month buprenorphine formulations. *Harm Reduct J*. 2019 Apr 3;16(1):25.
 91. Malik K, Singh I, Nagpal M. Atrigel: A potential parenteral controlled drug delivery system. *Der Pharm Sin*. 2010;1(1):74–81.
 92. Heidebreder C. Driving innovation, strengthening our leadership profile.
 93. Lofwall MR, Walsh SL, Nunes E V., Bailey GL, Sigmon SC, Kampman KM, et al. Weekly and monthly subcutaneous buprenorphine depot formulations vs daily sublingual buprenorphine with naloxone for treatment of opioid use disorder a randomized clinical trial. *JAMA Intern Med*. 2018 Jun 1;178(6):764–73.
 94. Vorspan F, Hjelmström P, Simon N, Benyamina A, Dervaux A, Brousse G, et al. What place for prolonged-release buprenorphine depot-formulation Buvidal® in the treatment arsenal of opioid dependence? Insights from the French experience on buprenorphine. *Expert Opin Drug Deliv*. 2019 Sep 2;16(9):907–14.
 95. Lintzeris N, Dunlop A, Masters D. Clinical guidelines for use of depot buprenorphine (Buvidal ® and Sublocade ®) in the treatment of opioid dependence. 2019. 1–56 p.
 96. López-Muñoz F, García-García P, Alamo González C. Trastornos adictivos. 231–268 p.
 97. Chai G, Xu J, Osterhout J, Liberatore MA, Miller KL, Wolff C, et al. New Opioid Analgesic Approvals and Outpatient Utilization of Opioid Analgesics in the United States, 1997 through 2015. *Anesthesiology*. 2018 May 1;128(5):953–66.
 98. Chowdhury BA. Summary Review Of Regulatory Action-Incruse Ellipta. 2014.
 99. Ahmad R, Alaei S, Omidian H. Safety and performance of current abuse- deterrent formulations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2018 Dec 2;14(12):1255–71.
 100. Kopecky EA, Fleming AB, Levy-Cooperman N, O'Connor M, M. Sellers E. Oral Human Abuse Potential of Oxycodone DETERx® (Xtampza® ER). *J Clin Pharmacol*. 2017;57(4):500–12.
 101. Divins M. Información de mercado. Analgésicos opiáceos. 2012;26.
 101. Divins M. Información de mercado. Analgésicos opiáceos. 2012;26.

Si desea citar nuestro artículo:

**Sistemas de liberación prolongada de opioides:
analgesia y dependencia**

Alexandre Pérez-López, Laura Gómez-Lázaro, et al.

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 87. Nº 1 (2021) · pp. 35 - 51

DOI: <http://>

DETERGENTES: DE LOS PRINCIPIOS FÍSICOS A LAS APLICACIONES BIOFARMACÉUTICAS (O POR QUÉ PREVENIMOS LA COVID-19 CON AGUA Y JABÓN)

DETERGENTS: FROM PHYSICAL PRINCIPLES TO BIOPHARMACEUTICAL APPLICATIONS (OR WHY WE FIGHT COVID-19 WITH TOILET SOAP).

Félix M. Goñi y Alicia Alonso

Instituto BIOFISIKA (CSIC, UPV/EHU) y Dpto. de Bioquímica, Universidad del País Vasco, 48940 Leioa, Vizcaya

*corresponding author: felix.goni@ehu.es

REVISIÓN

RESUMEN

Los detergentes son anfífilos solubles que poseen la capacidad de solubilizar grasas, dando lugar a micelas mixtas lípido-detergente, que son solubles en agua. Los detergentes son ampliamente utilizados en las industrias alimentaria y de bebidas, textil, médica y farmacéutica, entre otras. En biología molecular, los detergentes son herramientas insustituibles en la solubilización de las membranas celulares y la posterior purificación de proteínas de membrana. La presente revisión resume cuatro décadas de investigación sobre detergentes en el laboratorio de los autores. Una introducción sobre los detergentes y las membranas va seguida por una descripción cuantitativa detallada del mecanismo de solubilización de la membrana por los detergentes, y por una discusión crítica del concepto de membranas resistentes a los detergentes en relación con la hipótesis de las balsas lipídicas (*rafts*). A continuación, se incluye una sección experimental que resume los principales resultados del grupo de los autores. Finalmente, se describen algunas aplicaciones biofarmacéuticas. Como ejemplo práctico, se discute el uso de jabón de tocador en la prevención de la COVID-19.

ABSTRACT

Detergents are soluble amphiphiles that possess the capacity to solubilize fats, giving rise to water-soluble, lipid-detergent mixed micelles. Detergents find an extensive use in food and drink, textile, medical and pharmaceutical industries, among others. In molecular biology, detergents are irreplaceable tools in the solubilization of cell membranes and subsequent membrane protein purification. The present review summarizes four decades of investigation on detergents in the authors' laboratory. An introduction on detergents and membranes is followed by a detailed, quantitative description of the mechanism of membrane solubilization by detergents, and a critical discussion of the concept of detergent-resistant membranes as related to the lipid raft hypothesis. An experimental section follows, summarizing the main results in the authors' group. Finally, some biopharmaceutical applications are described. As a working example, the use of toilet soap in the prevention of COVID-19 is discussed.

Palabras Clave:

Detergentes
Surfactantes
Jabones
Membranas
Fosfolípidos
Micelas
Solubilización

Keywords:

Detergents
Surfactants
Soaps
Membranes
Phospholipids
Micelles
Solubilization

Detersit sidera nubes
M.T. Cicerón

1. INTRODUCCIÓN

La pandemia de COVID-19 nos ha llevado, entre otros cambios de hábitos, a lavarnos con mucha frecuencia las manos con agua y jabón. El motivo es sencillo de enunciar, pero no tan fácil de comprender, al menos a nivel molecular. Se trata de que el virus (SARS-CoV-2) está rodeado por una membrana, muy parecida a las membranas celulares, de las que procede. Esta membrana es muy sensible a los detergentes. El jabón de tocador tiene como principio activo, e ingrediente mayoritario, los llamados en lenguaje químico "jabones", sales sódicas o potásicas de ácidos grasos (ácidos monocarboxílicos, generalmente de 14-18 átomos de carbono) (Fig. 1). Los jabones son detergentes, y por ello destruyen en muy poco tiempo las membranas de los virus (en realidad, cualquier membrana biológica) y nos protegen de la enfermedad COVID-19.

Comencemos por precisar el sentido de algunos términos. Acabamos de decir que los jabones sódicos o potásicos son detergentes. Ésta es hoy una palabra de uso común, aunque hace un siglo se utilizara tan solo en el lenguaje técnico. El vocablo tiene prosapia clásica, el verbo latino *detergo* aparece utilizado por los escritores romanos clásicos, con el significado de borrar, ocultar o anular. En

castellano, el diccionario de la RAE da la definición "Sustancia o producto que limpia químicamente", expresión poco afortunada, como veremos enseguida. El *Oxford English Dictionary* da más en el clavo, cuando define "*detergent*. A water-soluble cleansing agent which combines with impurities and dirt to make them more soluble [...]" Larousse define: "*détergent*. Se dit d'un produit présentant les propriétés de détergence et utilisé pour cette raison dans les processus de lavage", definición algo irritante, porque nos obliga a buscar "détergence", definida como: "*Phénomène permettant d'éliminer d'un milieu solide les salissures qui y adhèrent par leur mise en suspension ou en solution*", lo que no está tan mal.

En un contexto más estrictamente científico, en su *Gold Book*, la IUPAC define "*detergent*" como: "*A surfactant (or a mixture containing one or more surfactants) having cleaning properties in dilute solutions (soaps are surfactants and detergents)*". Esto nos lleva a la importante definición de surfactante, o tensioactivo, o tensoactivo. Un surfactante es una sustancia capaz de disminuir la tensión superficial en la superficie de contacto entre dos fases (aire y agua, en el contexto biológico). Por lo tanto, no todos los surfactantes son detergentes, porque no todos tienen las propiedades "limpiadoras", pero todos los detergentes son surfactantes, pues todos ellos actúan disminuyendo la tensión superficial aire-agua. Y, volviendo a los jabones, los jabones de sodio y potasio son detergentes, pero la mayoría de los detergentes hoy en uso no son jabones.

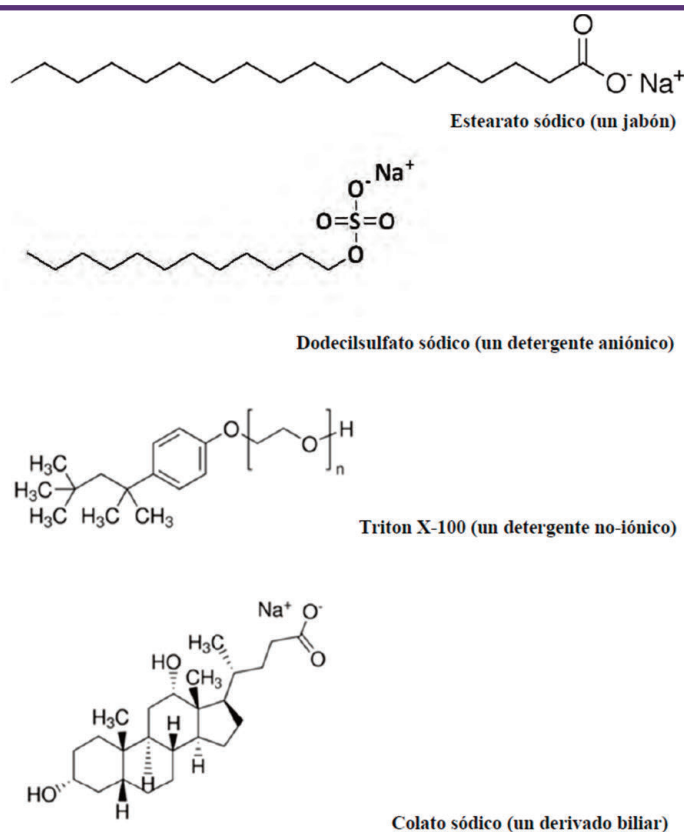


Figura 1. Estructuras químicas de algunos detergentes representativos.

Desde la perspectiva de su estructura, los detergentes son anfífilos solubles [1-3]. Los anfífilos son moléculas que contienen una parte hidrofílica, o polar, y otra hidrofóbica, o apolar. La biología nos muestra numerosos ejemplos de anfífilos, como los fosfolípidos de las membranas, y numerosas proteínas. Pero muy pocos anfífilos de origen natural son razonablemente hidrosolubles, y por tanto detergentes; por ejemplo, los fosfolípidos se agregan en medio acuoso formando micelas, o bicapas u otras formas de agregado, pero no son solubles en agua. Podemos resumir diciendo que la palabra “detergente” hace alusión a una función limpiadora, mientras que anfífilo o surfactante se refieren a propiedades físico-químicas de la molécula.

De entre los detergentes, el uso de los jabones se pierde, literalmente, en la noche de los tiempos. Sin embargo, solo en el siglo XX, en Alemania y durante la Gran Guerra, la falta de grasas biológicas obligó a la síntesis de productos químicos con propiedades detergentes, distintos de los jabones. Los primeros, hacia 1916, fueron alquil naftalenosulfonatos, y en la siguiente década se sintetizaron los alquil sulfonatos. Uno de estos es el muy conocido lauril sulfato sódico, o dodecil sulfato sódico (SDS), aún hoy muy empleado en numerosos ambientes, desde los laboratorios, en las técnicas de electroforesis, hasta los hogares, en los dentífricos. Durante la segunda guerra mundial aparecieron los alquil arilsulfonatos, que

pronto dominaron el mercado. En la actualidad, son muchas decenas las familias de compuestos químicos sintéticos con propiedades detergentes que se encuentran en el mercado.

¿Cómo actúan los detergentes? En realidad, esta es la pregunta a la que intenta responder todo el presente trabajo. Sin embargo, podemos dar un primer esbozo de explicación, dentro de esta sección introductoria. Todo se basa en sus dos propiedades principales: son anfífilos y son hidrosolubles. Cuando se nos cae una mancha en la camisa, generalmente de naturaleza grasa, podemos eliminarla eficazmente tratándola con un detergente (p. ej. jabón de tocador, en una emergencia) y luego con agua abundante. Al secarse el agua, la mancha ha desaparecido. Lo que ocurre es que cada molécula de detergente tiene una parte hidrofóbica, que se une a la grasa, y una hidrofílica, que se une al agua. Se forman unas nanopartículas esféricas, las micelas, que contienen detergente y grasa. Las micelas se organizan de modo que los grupos polares (hidrofílicos) de los detergentes quedan orientados al exterior, o sea que, aunque la micela contiene grasas (hidrofóbicas) en su interior, el conjunto es hidrofílico y se dispersa fácilmente en el agua. Así la grasa queda solubilizada (Fig. 2).

Volvamos a la COVID-19. ¿Por qué lavarse las manos evita la infección? Pues, sobre todo, porque el coronavirus SARS-CoV-2, como muchos otros, está rodeado por una membrana, y las mem-

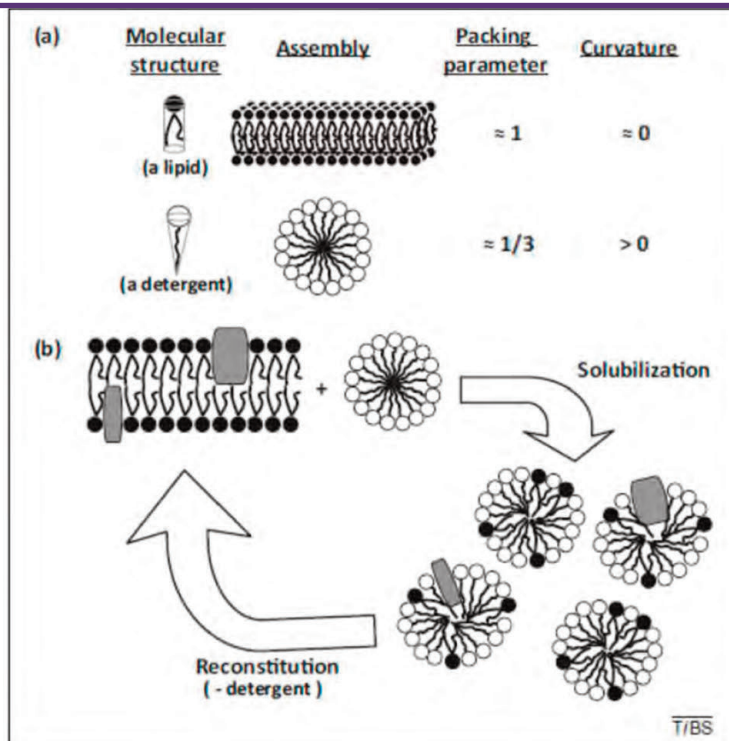


Figura 2. Autoensamblajes en mezclas de lípidos y detergentes. (a) Geometrías moleculares y ensamblajes de lípidos puros o detergentes puros. La geometría molecular del lípido o del detergente determina el modo de ensamblaje: moléculas lipídicas aproximadamente cilíndricas dan origen en agua a bicapas planas, mientras que un detergente cónico origina micelas altamente curvadas. En ambos casos los contactos cadena hidrocarbonada-agua se minimizan. (b) Solubilización y reconstitución de membranas por adición y eliminación de detergentes. Cuando las bicapas planas (que pueden incluir proteínas) interaccionan con micelas de detergente curvas, se forman micelas mixtas lípido – proteína – detergente en el proceso llamado solubilización. El fenómeno puede revertirse eliminando el detergente (reconstitución) [26].

branas biológicas están formadas, básicamente, por un tipo de grasas, los llamados fosfolípidos. El detergente (jabón) solubiliza los fosfolípidos de la membrana, con lo que el genoma del virus queda desnudo, y pierde su estructura y su funcionalidad. Este es, básicamente, el mecanismo. Se dice fácil, pero comprender en detalle el mecanismo de la solubilización es otro cantar, y nos llevará unas cuantas páginas explicarlo bien, dentro de lo que hoy conocemos.

Nuestro trabajo comienza revisando brevemente la composición y arquitectura de las membranas celulares, sigue con una descripción sucinta de la estructura y propiedades de las membranas modelo utilizadas en las investigaciones biológicas, dedica luego su cuerpo principal a explicar la interacción de los detergentes con las bicapas fosfolípicas que constituyen la matriz estructural de las biomembranas, y termina con algunas aplicaciones a la farmacia. Las fuentes primarias para el presente ensayo son los trabajos de investigación de los autores, desarrollados durante cuatro décadas largas, naturalmente complementadas y contrastadas con la de otros cultivadores de este importante campo de la biofísica. Quizá resulte procedente aquí un acto de justicia, al reconocer a los iniciadores e impulsores de este campo, el alemán Charles Tanford (nacido Tanenbaum) [2], y los finlandeses Ari Helenius y Kai Simons [3].

1.1. LAS MEMBRANAS CELULARES

Las biomembranas, o membranas celulares, constituyen los límites o fronteras celulares, y también los límites de los orgánulos dentro de la célula. Consisten en una matriz hidrófoba, formada por una doble capa orientada de fosfolípidos (glicolípidos en plantas) a la cual las proteínas se unen en diferentes formas. Las membranas existen en un estado condensado (sólido), y contradicen la creencia común de que las reacciones bioquímicas ocurren en solución acuosa. Una parte muy importante de los procesos bioquímicos que son esenciales para la célula ocurren dentro de las membranas celulares, es decir, en estado sólido. Esto se demuestra por la proporción de enzimas celulares que existen unidos a la mem-

brana, que es más alta en los organismos más complejos, y que llega a un 25% del total en la especie humana.

Nuestra visión actual de la estructura y dinámica de las membranas biológicas se enmarca en el modelo del "mosaico fluido", propuesto en 1972 por Singer y Nicolson [4], influido por el modelo anterior de Danielli y Davson (1935), que ya había propuesto la doble capa de fosfolípidos como el elemento estructural básico de las biomembranas (Fig. 3). El modelo de Singer y Nicolson, calificado por sus detractores como una "caricatura" de la membrana, fue un éxito instantáneo, ya que incorporó de forma sencilla y racional una gran cantidad de observaciones e ideas experimentales acumuladas en los años 50 y 60, muchas de las cuales parecían irreconciliables en ese momento. El éxito no solo fue muy rápido, sino que también fue duradero ya que, después de casi cinco décadas, la "caricatura" Singer-Nicolson aparece sin cambios en el capítulo dedicado a las membranas de cualquier libro de texto en Bioquímica o Biología Celular. De hecho, el modelo de mosaico fluido ha resistido notablemente bien el paso de los años, y esto en un campo en el que la investigación ha sido muy activa, con nuevas hipótesis importantes que han aparecido y desaparecido en ese período. Como consecuencia, nuestra visión de la estructura de la biomembrana no sigue siendo la misma que hace cincuenta años, y sin embargo, a los efectos de comprender el mecanismo de acción de los detergentes, el modelo del mosaico fluido en su forma clásica es perfectamente utilizable. El lector interesado en las modificaciones recientes del mismo puede consultar [5].

1.2. MEMBRANAS MODELO

La complejidad estructural de las membranas celulares ha hecho necesaria la utilización de modelos simplificados de su estructura ("membranas modelo") para el estudio experimental. Prácticamente toda la biofísica de membranas como hoy la conocemos ha sido estudiada en membranas modelo. Históricamente, el primer modelo experimental de membranas fue la monocapa de fosfolípi-

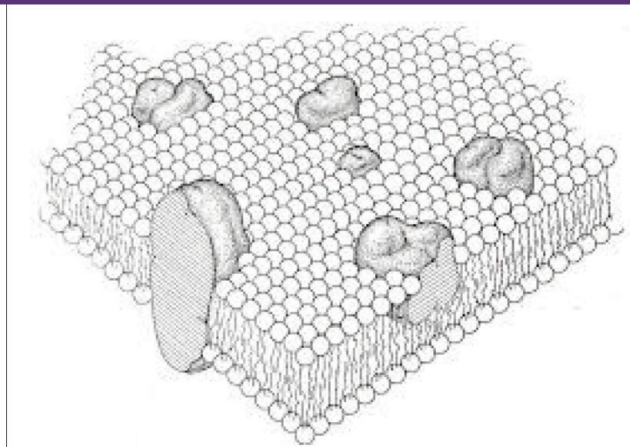


Figura 3. El modelo de mosaico fluido de las membranas biológicas (Singer y Nicolson, 1972) [4].

dos extendida en una interfaz aire-agua en lo que luego se habría de llamar la "balanza de Langmuir" (Fig. 4a). Esta técnica permitió a Gorter y Grendel demostrar en 1925 que los lípidos en la membrana de los eritrocitos estaban organizados en una doble capa, o bicapa [6]. Desde entonces, las monocapas de Langmuir y sus modificaciones (Langmuir-Blodgett, etc.) han sido extremadamente útiles en los estudios biofísicos y tecnológicos de membranas y películas (*films*) en general. Es curioso que todos los estudios de monocapas se basan en los trabajos de Agnes Pokels, una ama de casa germana sin formación científica, que publicó sus resultados en 1891 en *Nature*, de la mano de Lord Rayleigh [7].

La misma revista publicó en 1962 los trabajos de Mueller y Rudin [8], que dieron lugar a las membranas lipídicas negras (black lipid membranes, BLM), otro modelo de membrana muy útil

(Fig. 4b). Para establecer una BLM se utiliza una cámara de unos pocos mililitros de capacidad. Una hoja de plástico rígido con un pequeño agujero (inferior a 1 mm) en el centro separa los dos lados de la cámara. La bicapa se forma a través de este agujero, pintándolo con un pincel impregnado en una solución de fosfolípidos en disolvente orgánico. Las propiedades eléctricas de la bicapa se pueden medir colocando un electrodo a cada lado de la cámara. La composición iónica del medio acuoso se puede variar a voluntad a cada lado. Las BLM son el modelo de elección para estudiar las características de los canales iónicos, proteínas que pueden incorporarse a las BLM, y cuya conductancia y otros parámetros se miden directamente con este montaje experimental.

Unos veinte años más tarde Tamm y McConnell [9] describieron otro útil modelo de membrana, llamado bicapa lipídica

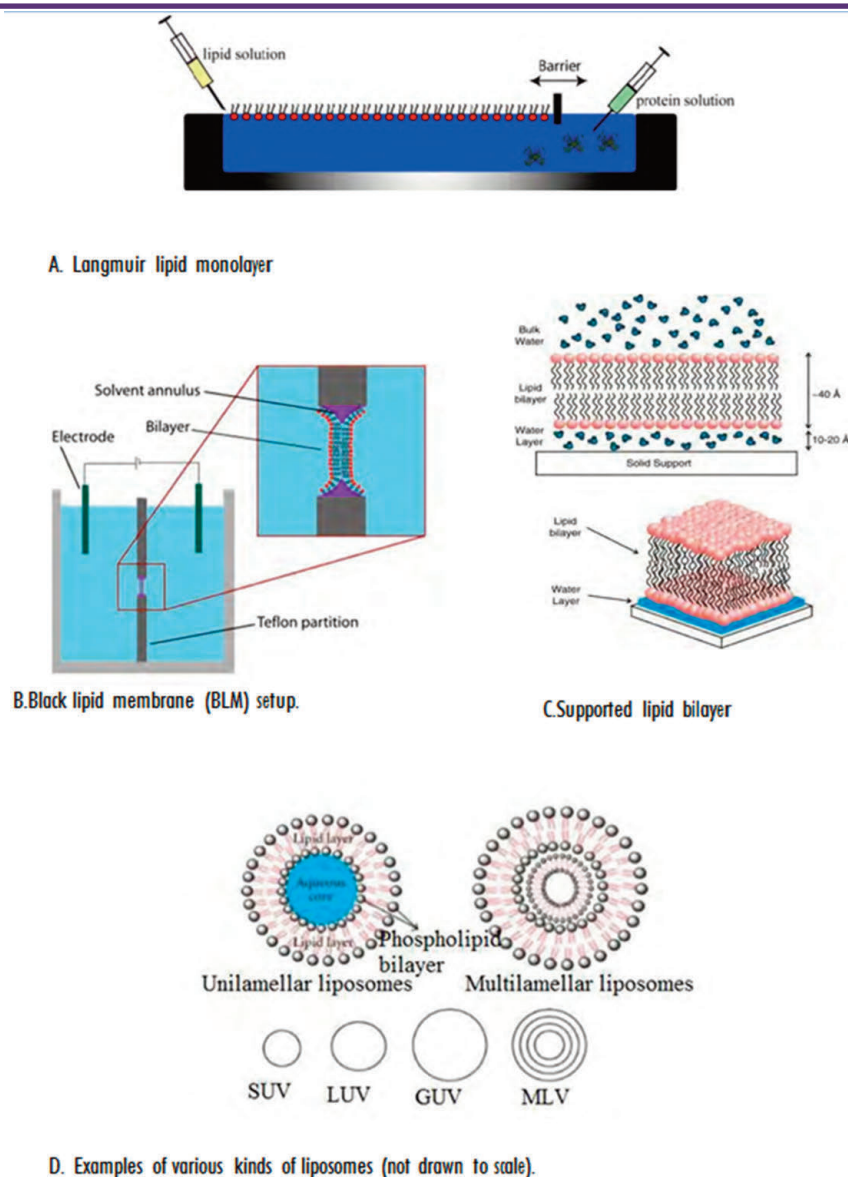


Figura 4. Representación esquemática de distintas membranas modelo



apoyada, (*supported lipid bilayer, SLB*) en el que, como su nombre indica, la bicapa lipídica, que flotaba libremente en el agua en los BLM, se encuentra apoyada en un soporte sólido inerte, p. ej. mica (Fig. 4c). Las SLB superan con mucho a los BLM en estabilidad y facilidad de manejo. Las SLB se preparan normalmente depositando sobre el soporte vesículas fosfolipídicas de la composición deseada. Las vesículas se fusionan espontáneamente y recubren el soporte. Entre éste y la SLB queda una capa de agua de 1-2 nm. Estas construcciones son la forma de membrana ideal para el uso de la microscopía de fuerza atómica [10].

Pero quizá el modelo de membrana más universalmente aceptado, y desde luego el más usado en estudios de detergentes, son las vesículas fosfolipídicas o liposomas (Fig. 4d). Inicialmente descritos como “mesofases esmécticas” por su descubridor/inventor el hematólogo británico Alec D. Bangham en 1964 [11] pronto adquirieron su nombre actual. Se distinguen cuatro tipos diferentes de liposomas, según su tamaño y método de preparación. Los originalmente descritos por Bangham corresponden a las hoy llamadas vesículas multilamelares (*multilamellar vesicles, MLV*), consistentes en decenas de esferas concéntricas, cada una limitada por una bicapa fosfolipídica, y de un tamaño típico de 10 a 100 μm . Las MLV se forman espontáneamente dispersando fosfolípidos secos en un medio acuoso. Tratando las MLV con ultrasonidos se obtienen las vesículas pequeñas unilamelares (*small unilamellar vesicles, SUV*), de un tamaño entre 40 y 60 nm, y limitadas por una sola bicapa [12]. Su principal desventaja es que su pequeño tamaño conlleva una gran curvatura de la bicapa, que la hace poco estable. Las llamadas vesículas unilamelares grandes (*large unilamellar vesicles LUV*), de 80-200 nm, se obtienen también a partir de las MLV, extruyéndolas a través de filtros de policarbonato del tamaño de poro adecuado [13]. Las LUV reúnen las ventajas de MLV y SUV, al ser suficientemente grandes como para tener una curvatura que no las desestabilice, y al mismo tiempo ser unilamelares, lo que imita mejor el caso de las células. Por último, las vesículas unilamelares gigantes (*giant unilamellar vesicles, GUV*) se obtienen por procedimientos específicos, muy a menudo por aplicación de campos eléctricos [14, 15]. Las GUV tienen un tamaño (decenas de micras) comparable al de las células.

1.3. EL PAPEL DE LOS DETERGENTES EN LA INVESTIGACIÓN DE MEMBRANAS

Como hemos dicho, la membrana biológica es una barrera hidrófoba entre dos compartimentos acuosos. Aunque la composición de la membrana varía considerablemente, hay varios atributos comunes a todas las biomembranas. Una característica común importante es que su matriz estructural está hecha de anfífilos insolubles en agua, particularmente fosfolípidos y proteínas

anfífilas, que son muy difíciles de disociar. Gran parte de los datos disponibles sobre la composición de las membranas celulares proviene de soluciones acuosas isotrópicas termodinámicamente estables, obtenidas al mezclar las membranas con anfífilos solubles en agua, los llamados detergentes (Fig. 1) [16-18]. Por encima de una concentración específica, llamada concentración micelar crítica (cmc), estos compuestos se autoensamblan en forma de micelas. Cuando las micelas de detergente se mezclan con estructuras laminares (membranas) hechas de anfífilos insolubles, se forman conjuntos mixtos cuya estructura depende de la relación molar de anfífilos solubles a insolubles: por debajo de un valor crítico de esta relación (R_e^{sat}), los conjuntos mixtos son lamelares, mientras que por encima de otra relación crítica, R_e^{sol} (ambos valores R_e están definidos más abajo), las membranas se transforman en micelas mixtas detergente-lípido-proteína (Fig. 2) [19-22].

Este proceso, denominado solubilización, permite la identificación y caracterización de proteínas de membrana solubilizadas. Usando suficiente detergente y fosfolípido, se pueden hacer micelas mixtas para que contengan una sola molécula de proteína de membrana o ninguna. En estas condiciones, se pueden usar métodos estándar para purificar proteínas de membrana, cristalizarlas o reconstituirlas en proteoliposomas. A pesar de su importancia, la solubilización de las membranas celulares con detergentes no se ha estudiado sistemáticamente, en parte debido a la composición compleja de las biomembranas. En cambio, se ha dedicado mucho trabajo a la solubilización de las membranas modelo relativamente simples descritas en 1.2. Aunque estas bicapas lipídicas son ciertamente más sencillas que las biomembranas, su solubilización es compleja y muchas preguntas básicas aún no han sido respondidas. Una mejor comprensión de cómo funcionan los detergentes conduciría a métodos más eficientes de purificación y reconstitución de proteínas de membrana [16, 17, 23-25], y sobre todo a una elección racional del detergente más adecuado para cada caso, una decisión que actualmente se toma de manera puramente empírica.

2. EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS DETERGENTES

Nos adentramos ya en la parte nuclear de nuestro trabajo, o sea, los mecanismos moleculares de la acción de los detergentes como solubilizantes de membranas. El detergente más utilizado en estos estudios ha sido el detergente no iónico Triton X-100, un detergente no homogéneo que contiene restos de polioxietileno de varias longitudes (Fig. 1). En esta sección sobre mecanismos de acción nos centramos en la solubilización de liposomas por Triton X-100. Los datos relativos a la solubilización por otros detergentes también se discuten cuando es relevante. En nuestra interpretación, los datos disponibles, y a menudo dispersos, obte-

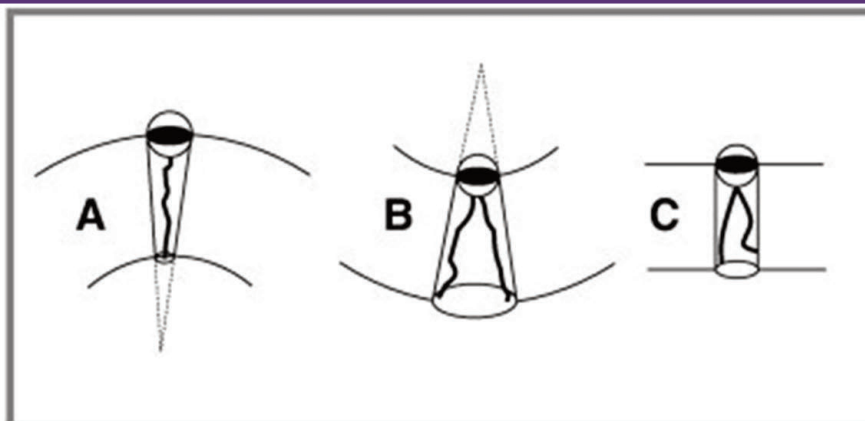


Figura 5. Curvatura espontánea y empaquetamiento molecular de lípidos. A, curvatura positiva; B, curvatura negativa; C, curvatura cero. Los lípidos pueden corresponder, por ejemplo, a dodecilsulfato sódico, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina respectivamente [5]. Los detergentes tienen normalmente curvatura espontánea positiva.

nidos con una variedad de detergentes son consistentes con las conclusiones generales del trabajo. Esta sección está basada en nuestras revisiones en [26, 27].

2.1. Autoensamblaje en mezclas de anfífilos

El autoensamblaje de anfífilos se produce para evitar la exposición de sus restos hidrófobos al agua [2]. Intuitivamente, la naturaleza del autoensamblaje se rige por la estructura molecular del anfífilo: cuando la estructura molecular es cilíndrica (es decir, puede idealizarse como un cilindro), como es el caso de los fosfolípidos más estudiados, el volumen molecular (V) es aproximadamente igual al producto del área transversal de la superficie polar (S) y la longitud (l) de la cadena hidrofóbica [28]. Por lo tanto, el parámetro de empaquetamiento p [$p = V / (S \cdot l)$] será 1,0 [28, 29]. Es probable que tales anfífilos formen autoensamblajes que son bicapas planas porque dicho ensamblaje produce una exposición mínima de las cadenas hidrofóbicas al agua (Fig. 2a).

La estructura molecular del Triton X-100, y de la mayoría de los otros detergentes, se puede idealizar como un cono, de modo que el volumen de la molécula sea menor que el producto del área de la superficie polar por la longitud de la cadena extendida. Por lo tanto, el parámetro de empaquetamiento para los anfífilos cónicos es inferior a 1,0 y la exposición de las cadenas hidrofóbicas al agua es mínima cuando se forman micelas curvas en lugar de bicapas (Fig. 2a) [28, 29].

La mezcla de fosfolípidos con un detergente producirá capas en las que no encajan idealmente ninguno de los dos anfífilos: los dos componentes son forzados por la entropía a residir en agregados mixtos. Antes de ser solubilizados, las bicapas retienen su estructura lamelar, pero a medida que aumenta la relación detergente: lípido en las bicapas, se forman agujeros de diámetro creciente [30, 31]. El producto final de la micelización son casi siempre cilindros largos filiformes cuya superficie está curvada positivamente. La descripción alternativa (menos reciente) de las micelas

mixtas en términos de un modelo de forma de disco también sería esperable, particularmente para las mezclas de sales biliares y fosfolípidos, porque los autoensamblajes discoidales pueden permitir la formación de una bicapa casi plana rica en fosfolípidos con los bordes curvos en el perímetro del disco cubiertos por detergente [32-34]. Al menos para el Triton X-100 y detergentes estructuralmente relacionados, favorecemos la descripción de la solubilización en términos de una serie hipotética de dos pasos (formación y sellado de micelas mixtas huecas) porque el producto de esta serie son micelas alargadas en lugar de discoidales. Además, las consideraciones teóricas demostraron que se puede esperar que los discos mixtos sean más estables que los cilindros solo en condiciones fisiológicamente no relevantes [35,36].

Otro enfoque más utilizado para el autoensamblaje de anfífilos se basa en la curvatura espontánea (Fig. 5), que se define como el recíproco del radio de la superficie sobre la cual se ensambla un anfífilo dado [37, 38]. El radio de curvatura espontánea se puede determinar experimentalmente [39]. Las moléculas cilíndricas son curvofóbicas, ya que tienden a agregarse a lo largo de superficies planas, cuyo radio de curvatura espontáneo es infinito (la curvatura espontánea es cero). Los anfífilos con una estructura molecular cónica son curvofílicos. Su parámetro de empaquetado puede ser menor o mayor que 1.0. Aquellos con $p < 1$ (grupo de cabeza relativamente grande) tienden a agregarse en forma de micelas y su curvatura espontánea es positiva e igual al radio de sus micelas esféricas. Un tipo diferente de anfífilo con una geometría molecular cónica pero un grupo de cabeza relativamente pequeño ($p > 1$) tiende a formar estructuras hexagonales (tubulares) de curvatura espontánea negativa (no mostrada).

A partir de estas consideraciones, podemos ver el estado de agregación en las mezclas de lípidos y detergentes como un equilibrio entre las geometrías preferidas de los componentes. Cuando un anfífilo se ve obligado a residir en una superficie de curvatura diferente de su curvatura espontánea, se produce inestabilidad local.

A veces el anfífilo se describe como “frustrado”. En estos términos, una mezcla de un fosfolípido curvofóbico y un detergente curvofílico forma agregados mixtos en los que se cancelan las inestabilidades causadas por ambos anfífilos, como se muestra esquemáticamente en la fig. 2. Se puede esperar que la curvatura promedio de un agregado mixto sea una media ponderada de la curvatura espontánea del detergente y los lípidos, como se discute en 2.9.

2.2. PARÁMETROS EN LA CARACTERIZACIÓN DE MEZCLAS DE LÍPIDOS Y DETERGENTES

Los autoensamblajes formados en mezclas acuosas de detergentes y fosfolípidos se han estudiado exhaustivamente con diferentes detergentes y lípidos en función de sus concentraciones, en ausencia y presencia de diferentes lípidos y a diferentes temperaturas, utilizando diversos métodos [17, 19, 20]. Los resultados de estos estudios se han presentado en términos de diagramas de fase, en los que las concentraciones totales de detergente requeridas para el inicio y la finalización de la formación de micelas mixtas (D_t^{sat} y D_t^{sol} , respectivamente) se describen en función de la concentración de lípidos $[L]$. Nótese que los límites de fase, obtenidos a partir de la dependencia de D_t con respecto a $[L]$, son aparentemente funciones lineales de la concentración de lípido (Fig. 6b). En consecuencia, la solubilización se caracteriza cuantitativamente por cuatro

términos [20, 40], (a) la relación molar detergente/lípido efectiva (es decir, en la bicapa), requerida para el inicio de la solubilización R_e^{sat} , (b) la proporción molar efectiva detergente/ lípido, R_e^{sol} , un término similar correspondiente a la solubilización completa, (c) D_w^{sat} y (d) D_w^{sol} , que son las concentraciones de detergente obtenidas en extrapolaciones a $[L] = 0$ de las dependencias de D_t^{sat} y D_t^{sol} con $[L]$.

R_e se refiere a la relación molar efectiva (en oposición al total) [detergente] / [lípido], que es la fracción de la concentración total (o agregada) de detergente que reside en estructuras mixtas en condiciones de equilibrio. La distinción es necesaria porque en un sistema de membrana-detergente-agua el detergente se divide entre la membrana y el agua. En el rango entre R_e^{sat} y R_e^{sol} (Fig. 6b), las bicapas de fosfolípidos saturadas con detergente coexisten con micelas de detergente saturadas con lípidos, lo que implica que la energía de las bicapas de fosfolípidos saturadas con detergente (de una composición dada por R_e^{sat}) es del mismo orden de magnitud que la energía de las micelas mixtas de una composición dada por R_e^{sol} .

D_t^{sat} y D_t^{sol} tendrían que aproximarse a la concentración micelar crítica (cmc) del detergente, pero son con frecuencia más bajas que la cmc de los detergentes puros, probablemente debido al tamaño finito de las micelas, ya que a concentraciones muy bajas

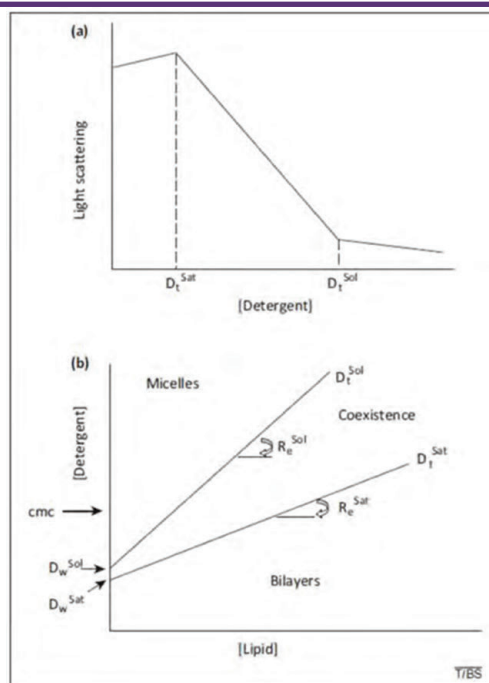


Figura 6. Caracterización de mezclas lípido-detergente. (a) Esquema descriptivo de la solubilización de membranas seguida a través de cambios en la dispersión luminosa de la suspensión de membranas. D_t^{sat} y D_t^{sol} corresponden a las concentraciones totales (no efectivas) de detergente que producen respectivamente el comienzo de la solubilización y la solubilización completa, para una determinada concentración de membrana. (b) Dependencia de D_t^{sat} y D_t^{sol} de la concentración de lípido. Las líneas rectas son los límites de la coexistencia de bicapas y micelas mixtas en mezclas acuosas lípido-detergente. Las pendientes de estas líneas son R_e^{sat} y R_e^{sol} , que corresponden respectivamente a las proporciones molares efectivas detergente/lípido que causan el comienzo y la finalización del proceso de solubilización. D_w^{sat} y D_w^{sol} son las concentraciones de detergente monomérico en agua al comienzo y al final de la solubilización, respectivamente. Ambos valores son más bajos que la concentración micelar crítica (cmc) del detergente puro en solución acuosa [26].



de lípido las concentraciones críticas de detergente pueden no ser función lineal de $[L]$ [41]. Los diagramas de fases describen los estados de equilibrio. En sistemas mixtos de lípidos y detergentes en soluciones acuosas, los límites de fase describen el rango de solubilización parcial, a saber, el rango de concentraciones de fosfolípidos y detergentes donde la energía asociada a las micelas mixtas lípido-detergente es del mismo orden de magnitud que el de los liposomas saturados con detergente [20]. En varias publicaciones se observó que los límites de fase eran independientes del procedimiento utilizado para preparar el sistema mixto, asegurando que los diagramas de fase describían la situación de equilibrio, por ejemplo, en Schnitzer y cols. [41]. Desgraciadamente, en muchas publicaciones el procedimiento utilizado para estudiar los diagramas de fase es tal que no se puede garantizar que todos los experimentos se hayan realizado en condiciones de equilibrio (por ejemplo, Kragh-Hansen y cols. [42], y Stuart y Boekema [43]). A pesar de esta deficiencia, consideramos que cada mezcla de estado estacionario está en equilibrio, pero somos conscientes de la posibilidad de que, para ciertas composiciones, la estructura de los agregados lípido-detergente pueda ser simplemente un reflejo de trampas cinéticas, como se describe a continuación.

2.3. MÉTODOS PARA CARACTERIZAR LA SOLUBILIZACIÓN DE MEMBRANAS POR DETERGENTES

En la mayoría de los estudios, las suspensiones de liposomas se mezclan con disoluciones de detergentes y los sistemas resultantes se analizan por métodos espectrofotométricos, más comúnmente la dispersión luminosa. El efecto inicial de la adición de detergente sobre los liposomas depende del estado de agregación de los lípidos y del tamaño de las vesículas. En concreto, la adición de detergente a vesículas unilamelares pequeñas (SUV) da como resultado una mayor dispersión luminosa debido al crecimiento del tamaño de las vesículas inducido por el detergente. Sin embargo, para vesículas unilamelares grandes (LUV), el tamaño de la vesícula puede permanecer inalterado o modificarse ligeramente antes del inicio de la solubilización debido a una solubilización de transición y la posterior reconstitución. En general, a medida que se agregan cantidades crecientes de detergente a una suspensión de membranas, la dispersión de la luz permanece constante o incluso aumenta hasta que, en un punto crítico, comienza a disminuir. Este es el inicio de la solubilización (Fig. 6a, D_i^{sat}). A medida que aumenta la concentración de detergente, se alcanza otro punto crítico al finalizar la solubilización (D_f^{sol}), más allá del cual la dispersión de la luz no sigue disminuyendo. La dependencia (aparentemente lineal) de los últimos dos puntos críticos con respecto a la concentración de fosfolípidos (Fig. 6b) da lugar a un diagrama de fases sencillo. La pendiente de cada una de estas líneas [detergente] / [lípido] es la relación entre la con-

centración de detergente en estructuras mixtas de lípido-detergente y la concentración de fosfolípido en los puntos de inicio y finalización de la solubilización. Estos dos parámetros son los R_e^{sat} y R_e^{sol} , antes descritos.

Además de la dispersión luminosa, existe toda una serie de técnicas destinadas a estudiar la dinámica de la solubilización de liposomas y la formación de los autoensamblajes formados por mezclas de detergente y lípido, incluyendo el tamaño, la forma y la composición de los liposomas y las micelas mixtas, preferiblemente sin separar las formas solubilizadas de las no solubilizadas, pues las técnicas de separación llevan con frecuencia a la aparición de artefactos. El método más directo para proporcionar información sobre la forma y el tamaño de los conjuntos detergente-lípido es la criomicroscopía electrónica de transmisión (crio-TEM) [44-46]. Sin embargo, la crio-TEM difícilmente puede arrojar resultados cuantitativos fiables sobre partículas pequeñas en presencia de partículas grandes. Esto último también es cierto para la dispersión de la luz, tanto estática como dinámica (correlación de fotones). En consecuencia, la espectroscopía de dispersión de la luz y otras técnicas de dispersión, aunque ampliamente utilizadas por razones de comodidad, producen resultados cuestionables en el inicio de la solubilización. También se debe tener en cuenta que los métodos de dispersión de la luz pueden verse perturbados por el aumento de la turbidez de algunos detergentes, por ejemplo el Triton X-100, que por encima de cierta temperatura ("punto de nube") da lugar a formaciones altamente dispersantes [47].

Por el contrario, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de fósforo-31 (^{31}P -RMN) es sensible a partículas pequeñas porque solo partículas pequeñas (por ejemplo, micelas mixtas) producen señales relativamente estrechas (observables) [48-50], mientras que el espectro de vesículas grandes se ensancha hasta hacerse casi indetectable. Dadas las diferentes sensibilidades de la dispersión de la luz y la RMN, estos métodos son complementarios. La RMN se puede usar para determinar cuantitativamente la etapa inicial de solubilización (por lo tanto, R_e^{sat}), mientras que las técnicas de dispersión de la luz pueden ser útiles para proporcionar datos de R_e^{sol} . También se puede obtener mucha información sobre los procesos estudiados utilizando la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) [51-55]. Si se interpreta correctamente, este método puede proporcionar información tanto sobre la concentración de detergente a la cual ocurre una transformación como sobre el calor asociado a cada proceso. Las mediciones del ITC no proporcionan información estructural, pero la técnica es útil para obtener datos sobre procesos rápidos. Dados los problemas asociados a la sensibilidad de las técnicas de dispersión a partículas grandes, el ITC es beneficioso para estudiar procesos que probablemente se vean afectados por tales artefactos.

La espectroscopía de fluorescencia ofrece un conjunto



completo de técnicas para ser utilizadas en relación con la solubilización de membranas por detergentes. La liberación al medio acuoso externo de compuestos fluorescentes hidrosolubles encapsulados en los liposomas se puede observar en tiempo real. El uso de compuestos fluorescentes de diferentes pesos moleculares [30, 56] indica el tamaño de las discontinuidades en la bicapa. Ciertas sondas fluorescentes bien conocidas, por ejemplo, el difenilhexatrieno, proporcionan información sobre el orden molecular de la bicapa y su perturbación por los tensioactivos [57]. Además, el movimiento transbicapa, o *flip-flop*, de moléculas anfifílicas, incluidos los tensioactivos, también se puede evaluar con técnicas de fluorescencia [56, 58].

En general, se recomienda una combinación de técnicas. Por ejemplo, a pesar de sus deficiencias, la crio-TEM es una herramienta muy útil en la investigación del mecanismo de solubilización. La información cualitativa sobre los tipos de estructuras en las mezclas de lípidos y detergentes es esencial para la correcta interpretación de la dispersión de la luz y los datos de RMN. Esto es particularmente importante en los estudios mecanísticos, porque se puede esperar que las estructuras de transición contribuyan muy poco (si es que lo hacen) a las mediciones espectroscópicas. Sin embargo, la mera existencia de una estructura transitoria proporciona pistas sobre el mecanismo de solubilización, incluso cuando tales estructuras rara vez se observan. Como ejemplo, la crio-TEM de las estructuras presentes en dispersiones obtenidas por adición del detergente no iónico octilglucósido a las vesículas de fosfolípidos reveló, antes de la formación de micelas mixtas cilíndricas, liposomas con poros de tamaños cada vez mayores al agregar más octilglucósido [59]. La última observación concuerda con los datos de fluorescencia sobre la fuga de solutos encapsulados [56, 60, 61].

2.4. EL MODELO DE TRES ETAPAS: DEFINICIONES Y AMBIGÜEDADES

Se han propuesto varios mecanismos para la solubilización de bicapas por detergentes. El consenso más general es que puede describirse según un modelo de tres etapas o pasos, como lo proponen Helenius y Simons [3]. El término "modelo de tres etapas" en sí es bastante ambiguo. A menudo se entiende en términos termodinámicos, lo que significa que, en el equilibrio, en el rango de valores debajo de R_e^{sat} (Etapa 1), los conjuntos mixtos son bicapas; que por encima de R_e^{sol} (Etapa 3), son micelas; y que dentro del rango de valores entre R_e^{sat} y R_e^{sol} (Etapa 2), coexisten bicapas y micelas. Sin embargo, el modelo también a menudo se entiende en términos cinéticos o mecanísticos, es decir, en términos de la secuencia de procesos que ocurren cuando se agrega una concentración solubilizante de detergente a las bicapas lipídicas. En estos

términos, la Etapa 1 se relaciona con interacciones entre detergentes y lípidos que no producen estructuras micelares, la Etapa 2 es aquella en la que las bicapas saturadas de detergente se convierten en micelas mixtas, y la Etapa 3 está reacionada con la reducción del tamaño de las micelas mixtas como resultado de su interacción con más detergente. En términos de procesos, el modelo incluye una serie de etapas:

Etapa 1. Partición del detergente entre las bicapas lipídicas y el medio acuoso, descrita por un coeficiente de partición K , definido como

$$K = D_t / (L + D_b) D_w$$

Donde D_t es la concentración total de detergente, L es la concentración de lípido y D_b y D_w son las concentraciones de detergente unida a la membrana y en el agua, respectivamente. Por lo tanto,

$$1/K = (1/R_e) / (1/D_w)$$

Etapa 2. Una desintegración inducida por el cambio en la composición de las bicapas, para formar micelas mixtas largas y filiformes.

Etapa 3. A concentraciones de detergente aún más altas, la solubilización es seguida por una serie relativamente rápida de procesos entrópicos, en los que se mezclan micelas grandes de detergente-fosfolípido con micelas de detergente puro, y se obtienen micelas mixtas más pequeñas con una mayor relación detergente / fosfolípido.

La primera y tercera etapas en este esquema son aparentemente triviales. Se cree comúnmente que, para el detergente, el reparto membrana/agua es rápido, pero la saturación de la bicapa se puede ralentizar por la necesidad de una difusión (nuevo reparto) del detergente entre las monocapas externa e interna de la bicapa (ver 2.7.a). El equilibrio de los sistemas mixtos de micelas (en la Etapa 3) es mucho más rápido que el equilibrio de los sistemas micelares y lamelares. La etapa 2 corresponde al proceso de disociación de micelas de una composición dada por R_e^{sol} a partir de las bicapas saturadas en detergente, de una composición dada por R_e^{sat} . El mecanismo detallado de esta transformación de bicapa en micelas (micelización) no se comprende completamente y es el tema de varias de nuestras investigaciones.

En la mayoría de los protocolos de solubilización comúnmente utilizados, la concentración de detergente es suficiente para la solubilización de la membrana (en equilibrio), y el comienzo de la micelización (Etapa 2) a menudo ocurre antes de que la Etapa 1 alcance el equilibrio. Esto, por supuesto, añade complejidad al proceso.

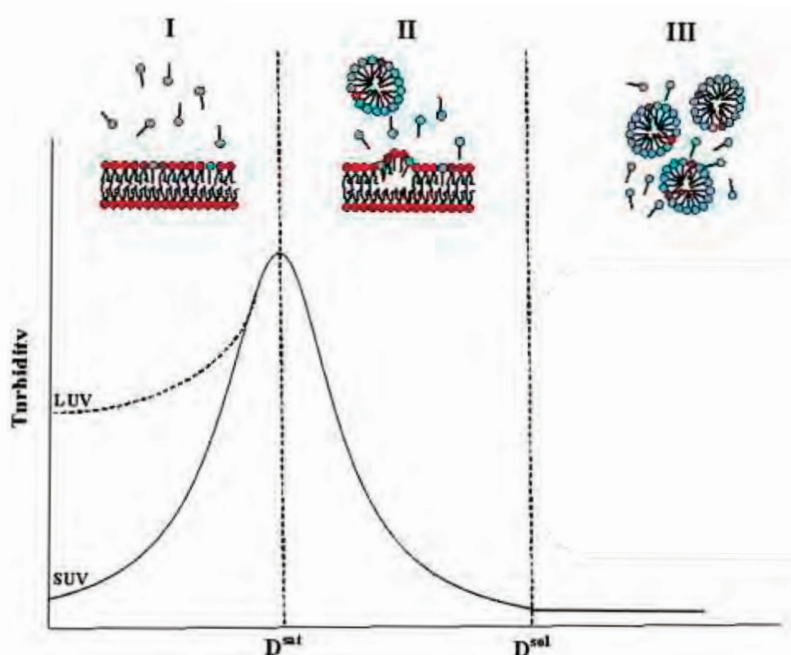


Figura 7. Las tres etapas de solubilización de la bicapa por los detergentes (11). (Arriba) Representación esquemática de las etapas I – III. (Rojo) Grupos polares de fosfolípidos. (Azul) Grupos polares de detergente. (Abajo) La solubilización de una preparación de vesículas (vesículas unilamelares pequeñas o grandes) se siguió a través de los cambios en la turbidez. [20].

2.5. DIAGRAMAS DE FASE Y LA NECESIDAD DE ESTUDIOS CINÉTICOS

Los límites de fase mostrados en la figura 6b son significativos solo para sistemas en equilibrio. Es importante tener en cuenta que una estructura en estado estacionario podría reflejar trampas cinéticas, es decir, estados de equilibrio aparentes, pero no reales si se considera un periodo de tiempo suficientemente largo. Por lo tanto, la afirmación de que en ocasiones la solubilización requiere más detergente debido a dificultades en la penetración no es estrictamente cierta porque, con el tiempo suficiente, ocurriría la solubilización. La forma tradicional de asegurar que un sistema dado esté en equilibrio es mostrar que las mezclas de igual composición preparadas de manera diferente son idénticas. Por ejemplo, las mezclas de una composición dada obtenida por co-dispersión de lípidos y detergente en soluciones acuosas deberían comportarse de la misma manera que las mezclas de la misma composición obtenida mezclando dispersiones de lípidos y detergentes que se han preparado individualmente. Las pocas investigaciones publicadas en las que se llevaron a cabo tales experimentos brindan un fuerte respaldo a la conclusión de que los sistemas estudiados estaban en equilibrio [41].

Lo menos que debemos hacer para descartar la posibilidad de que los límites de fase aparentes reflejen trampas cinéticas en lugar de estados de equilibrio es mostrar que las mezclas estudiadas se miden en condiciones de estado estacionario, tal como se

detecta al controlar la dependencia del tiempo de una propiedad fisicoquímica. Pero alcanzar el equilibrio puede llevar de segundos a muchos días, dependiendo de la composición del sistema y la temperatura [41, 62-66]. Las cuestiones importantes del mecanismo y la cinética de la solubilización están más allá del alcance de la presente revisión, sin embargo, los estudios cinéticos son importantes para respaldar la validez de los aspectos termodinámicos discutidos aquí.

Los estudios cinéticos son particularmente importantes cuando el equilibrio es muy lento, como en los experimentos realizados a baja temperatura con lípidos en fase gel [67] o / y cuando el protocolo del experimento de solubilización implica la titulación de liposomas multilamelares (MLV) por una solución de detergente, por ejemplo desoxicolato [32] o Triton X-100 [52]. Proponemos que las causas más importantes de resultados irreproducibles son protocolos experimentales inapropiados que usan condiciones de no equilibrio y / o métodos poco sensibles.

Las mezclas de detergente y fosfolípidos pueden ser estables durante largos periodos de tiempo sin estar en equilibrio [41, 68]. Como ejemplo, cuando se agrega una solución de detergente a vesículas unilamelares preformadas con el lípido en el estado gel o en los estados cristalinos (por ejemplo, DPPC por debajo de 40 °C) [41,69], el equilibrio puede ser tan lento que la mezcla parece ser constante con respecto al estado de agregación de los conjuntos mixtos, a pesar de no estar en equilibrio. Agregados



metastables atrapados cinéticamente pueden permanecer estables durante horas y, a veces, durante muchos días, como en el caso de las micelas metaestables ricas en colesterol formadas al mezclar vesículas de fosfolípidos ricas en colesterol con sales biliares [70, 71]. En el último caso, cuando se agrega una sal biliar a los liposomas de PC-colesterol, en ciertas condiciones la sal biliar agregada solubiliza los liposomas rápidamente pero posteriormente precipitan los liposomas ricos en colesterol formados inicialmente. Eventualmente, el colesterol cristaliza dentro de los agregados de vesículas, produciendo precipitados [71]. Procesos similares pueden ser responsables de la formación de cálculos biliares de colesterol [72].

La solubilización de vesículas multilamelares (MLV) es un proceso lento. Cuando los MLV se exponen a una solución de detergente [68], solo la bicapa más externa del MLV se expone al detergente agregado. En relación con la última bicapa, la concentración de detergente puede ser suficiente para solubilizar esta bicapa, dando como resultado la exposición de la siguiente bicapa al detergente. Las bicapas en las MLV pueden ir despegándose y solubilizándose una después de otra, pero incluso si la concentración total de detergente es suficiente para solubilizar todas las capas de lípidos, el proceso será mucho más lento que la solubilización de vesículas unilamelares de masa y composición idénticas [68]. Es probable que esto produzca errores graves si la solubilización es tan lenta que, en el momento de medir la turbidez de la dispersión, la solubilización aún no está completa. En otras palabras, se sobreestimaré la concentración de detergente requerida para la solubilización completa.

Por el contrario, si la concentración de detergente es suficiente para solubilizar una o más bicapas lipídicas, pero no todas, la solubilización se hará visible a una concentración de detergente menor que la necesaria para el inicio de la solubilización de vesículas unilamelares de idéntica composición y concentración. En tales condiciones, las micelas mixtas formadas inicialmente se reconvertirán en bicapas cuando se solubilice más fosfolípido, debido a que disminuirá la relación efectiva detergente / lípido. En este caso, alcanzar un estado estable puede ser muy lento y si se mide antes del equilibrio completo, se subestimaré el inicio de la solubilización.

2.6. LOS FACTORES QUE GOBIERNAN LA SOLUBILIZACIÓN

Comprender el mecanismo de la micelización requiere información sobre al menos tres factores, a saber:

- (a) los conjuntos detergente-lípido que existen en R_g^{sat} ,
- (b) el producto de la transición de fase inducida por la composición, a saber, micelas de una composición dada por R_g^{sol} , y
- (c) el examen de tantas estructuras intermedias como sean necesarias para ayudar a determinar el mecanismo.

Una suposición subyacente esencial es que en cualquier punto dado

la mezcla de detergente-lípido está en un estado estable. Éste puede ser el caso de un experimento de titulación lenta, como en el ITC, pero en términos generales, la Etapa 2 (es decir, la micelización) comienza antes del final de la Etapa 1, un hecho que a menudo complica la interpretación de los datos experimentales.

2.7. VESÍCULAS SATURADAS DE DETERGENTE (EN RESAT): COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y FÍSICAS

2.7.a. Partición del detergente de medios acuosos a bicapas, incluyendo la monocapa interna

El primer paso de la interacción bicapa / detergente es la introducción de moléculas de detergente en la monocapa externa de la bicapa de fosfolípidos. El coeficiente de partición K que describe el equilibrio del detergente entre las bicapas y la solución acuosa se rige por dos factores, a saber,

(a) la hidrofobicidad del detergente,

(b) su equilibrio hidrofílico / lipofílico y su curvatura espontánea [43, 73]. La curvatura espontánea refleja la tendencia de los anfífilos a empaquetarse en una superficie curva, como se ha comentado en 2.1 (Fig. 5) [26]. Los detergentes son curvofílicos, es decir, tienen una curvatura espontánea positiva, mientras que los fosfolípidos tienden a autoensamblarse formando una superficie plana, por lo tanto, su curvatura espontánea es aproximadamente cero, o incluso ligeramente negativa [36].

El coeficiente de partición K depende de estos factores, pero la velocidad a la que se equilibra la concentración de detergente en las dos monocapas puede variar considerablemente. En particular, la acumulación de detergente en la monocapa externa induce el paso de detergente a la monocapa interna, probablemente al perturbar la región interfacial de la bicapa mediante moléculas de detergente insertadas, lo que a su vez aumentará la probabilidad de formación de defectos estructurales transitorios en la membrana [59]. El movimiento transbicapa, o *flip-flop*, es a menudo el factor limitante de la solubilización. A su vez, este movimiento depende del tamaño y la polaridad del grupo polar del detergente [44]. No es probable que una molécula con un grupo polar muy grande se mueva a través de la bicapa [74, 75]. Por lo tanto, el sistema no puede alcanzar el equilibrio en un corto período de tiempo y la solubilización comúnmente comienza antes de que se pueda alcanzar el equilibrio. El consiguiente desequilibrio de masas puede desempeñar un papel en el mecanismo de solubilización por estos detergentes.

Tanto la penetración de un detergente en la monocapa externa como su movimiento transmembrana hacia la monocapa interna dependen de la composición de la bicapa. Como ejemplo, en su estudio de la solubilización de liposomas de varias composi-



ciones diferentes por el detergente no iónico miristilsacarosa, Toro et al. [76] encontraron que la localización del detergente en la bicapa lipídica dependía de las características del grupo de cabeza polar lipídico, influyendo este último en el proceso de solubilización. También descubrieron que la inserción de moléculas de colesterol en la bicapa lipídica dificultaba la solubilización.

Se han llevado a cabo simulaciones de dinámica de partículas [77], destinadas a investigar el mecanismo de solubilización de vesículas por tensioactivos, centradas en el efecto de la hidrofobicidad del detergente. Según la interpretación de los autores, solo los tensioactivos con hidrofobicidad adecuada pueden solubilizar las vesículas. Los detergentes hidrofílicos permanecen sobre todo en la fase acuosa, mientras que los tensioactivos muy hidrofóbicos se incorporan casi totalmente a las bicapas, lo que induce el crecimiento del tamaño de las vesículas sin solubilizar la membrana. Solo los tensioactivos con hidrofobicidad moderada forman vesículas perforadas antes de la formación de micelas mixtas, por las razones que se describen a continuación. La extensión de la perforación crece con el aumento de la concentración de surfactante, hasta que finalmente se observa el colapso total de la vesícula. Se ha podido detectar la formación de poros en muchos sistemas detergente-lípido antes de la solubilización.

2.7.b. Aumento de tamaño de vesícula inducido por detergente

Se ha observado un aumento de tamaño inducido por detergente en pequeñas vesículas unilamelares, para muchos detergentes y varias composiciones diferentes de liposomas, a concentraciones sub-solubilizantes de detergente (Fig. 6a) [66, 78-81]. El crecimiento del tamaño de las vesículas desde un radio inicial r_i a uno final r_f aumenta por un factor de $(r_f / r_i)^2$ el área de la superficie de las vesículas, lo que significa que se espera que disminuya el número de vesículas por un factor de $(r_i / r_f)^2$.

Este proceso podría haberse producido a través de uno (o más) de estos tres mecanismos:

(a) fusión inducida por detergente, que implica la mezcla de los dos compartimentos acuosos y de las bicapas de las membranas que se fusionan;

(b) mecanismos de solubilización - reensamblaje inducidos por detergente, con lisis parcial seguida de la reconstitución de vesículas más grandes; y

(c) dismutación de los liposomas, caracterizada por la transferencia de lípidos de parte de las vesículas (probablemente las más pequeñas) a otros liposomas (presumiblemente más grandes).

Una diferencia importante entre los tres posibles mecanismos es la retención del soluto encapsulado. Por lo tanto, se puede esperar que los solutos de alto peso molecular permanezcan

encapsulados en los liposomas si el crecimiento del tamaño se produce por fusión (como se cree que ocurre normalmente), mientras que se espera que la solubilización-reensamblaje esté acompañada por la pérdida de los solutos. Se espera que la tercera posibilidad esté acompañada de una retención parcial de solutos, es decir, solo los solutos de esas vesículas que se hicieron más grandes permanecerán atrapados, mientras que las moléculas de soluto que estaban atrapadas en las vesículas decrecientes se encontrarán en la solución externa [79].

Se ha demostrado el crecimiento de tamaño inducido por detergente mediante fusión de vesículas para liposomas cargados negativamente en presencia de Ca^{2+} [82]. La solubilización parcial de vesículas pequeñas producidas por sonicación, inducida por Triton X-100, es seguida por el reensamblaje en liposomas más grandes, según lo propuesto por Alonso et al. [80, 81], y por Edwards y Almgren [45]. El mecanismo de dismutación se propuso por primera vez para el aumento de tamaño inducido por sales biliares [83, 84]. Un estudio sobre el crecimiento del tamaño de liposomas inducido por concentraciones sub-solubilizantes del detergente no iónico octilglucósido reveló una retención parcial de dextrano de alto peso molecular, marcado con fluorescencia [79]. La fracción de soluto retenido era proporcional al crecimiento del tamaño observado, apoyando así el mecanismo de dismutación [79]. La similitud del aumento de tamaño inducido por detergente en presencia de tensioactivos tan diferentes como las sales biliares y el octilglucósido [79-82] respalda la idea de que la dismutación puede ser un mecanismo frecuente para el crecimiento de tamaño inducido por detergentes.

2.7.c. Permeabilidad de las bicapas que contienen detergente

La liberación de solutos encapsulados de liposomas tratados con detergente se ha observado en varios estudios a concentraciones sub-solubilizantes de los anfífilos [30, 56, 80, 81]. Parte de esta liberación se puede atribuir al aumento de tamaño inducido por el detergente, pero se han observado agujeros en los LUV en ausencia de un crecimiento del tamaño.

Las simulaciones de dinámica de partículas muestran que durante el proceso de partición (Etapa 1), las moléculas tensioactivas individuales se incorporan a la bicapa lipídica de manera independiente [85]. La compatibilidad de las colas hidrofóbicas entre lípidos y tensioactivos permite que los tensioactivos penetren a través de la membrana con bastante facilidad y las moléculas de tensioactivo aparezcan en la región interna de la bicapa. Esta penetración del detergente puede deberse a la promoción del movimiento transbicapa del detergente, o a la penetración del detergente en el compartimento acuoso encapsulado y al posterior



reparto entre este compartimento y la monocapa interna. En otras palabras [86], al aumentar la concentración de detergente en las monocapas externas, el área en exceso que resulta de la unión de los tensioactivos a la monocapa externa da como resultado la formación de poros trans-bicapa, la fluidificación de la bicapa y el aumento de las fluctuaciones de la bicapa, con mayor frecuencia y / o probabilidad cuando la concentración de surfactante se aproxima a R_e^{sat} . Además, siempre que el detergente esté distribuido de manera no homogénea, las vesículas adoptan aspectos altamente deformados antes de que tenga lugar la perforación de la vesícula. La formación de poros se ha observado antes de la solubilización en muchas investigaciones. Con el desarrollo de más agujeros al incorporar más tensioactivo, la vesícula se rompe en unos pocos fragmentos de bicapas, que eventualmente, con nuevas adiciones de tensioactivo, se desintegran en pequeñas micelas mixtas [85]. Como ejemplo, estudios de la cinética de liberación del contenido liposomal tras la exposición de los liposomas a un exceso de surfactante [86] revelaron que, a bajas concentraciones de detergente, la liberación del contenido liposomal es consistente con la formación de canales en un número crítico de moléculas tensioactivas. Sin embargo, solo a concentraciones considerablemente más altas la cinética concuerda con la esperada para la ruptura de los liposomas inducida por detergente. Creemos que la estructura de tales canales (o poros) es la clave para comprender el mecanismo detallado de solubilización, como se discute más adelante.

2.8. LA ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LAS MICELAS MIXTAS DE UNA COMPOSICIÓN DADA POR R_e^{sol}

La solubilización de lípidos por sales biliares se ha estudiado con gran detalle, utilizando muchos métodos. Estos estudios conducen a un consenso sobre una estructura discoidal de los agregados mixtos formados cuando se solubiliza todo el lípido. Según ese modelo, las micelas mixtas resultan ser bicapas discoidales pobres en detergente, cubiertas en su borde por una monocapa curva rica en detergente [87-90]. De manera similar, los datos sobre las micelas formadas tras la titulación de fosfolípidos por otros detergentes, particularmente los resultados de la dispersión dinámica de la luz y la dispersión de rayos X de ángulo pequeño, se interpretaron en el sentido de que estas micelas son elipsoides oblatos, con un gradiente creciente de tensioactivo desde el centro al perímetro siguiendo el eje mayor [47, 90].

Este enfoque produjo un mecanismo razonable y fácil de entender para la solubilización y la reconstitución de las bicapas lipídicas. Sin embargo, estudios posteriores con crio-TEM y detergentes distintos de las sales biliares mostraron objetos largos filiformes en lugar de las estructuras esperadas con forma de disco

[44, 91]. Posteriormente, se demostró que los datos de dispersión concordaban con el modelo de barras flexibles y diversos estudios teóricos explicaron "por qué cilindros, y no discos" [36].

El paradigma actual es que, para la mayor parte de los detergentes, las micelas mixtas más grandes son estructuras muy largas y filiformes, y que al aumentar la concentración de detergente se reduce la longitud de estas micelas. En estas estructuras, casi todas las moléculas de lípidos son equivalentes, con la excepción de un pequeño número de moléculas en los dos bordes (extremos) de las micelas alargadas. Lo mismo es casi cierto para el detergente, excepto que la concentración de detergente en los extremos es algo mayor.

2.8.a. Estructuras intermedias observadas en el rango de coexistencia

Como se describió anteriormente, las bicapas lipídicas pueden considerarse sobresaturadas incluso por debajo de R_e^{sat} , porque contienen paredes ricas en detergente que cubren los bordes de los poros observados por crio-TEM. Cuando la bicapa contiene más detergente, el tamaño de los poros es mayor, lo que permite que las moléculas más grandes puedan salir de los liposomas [79]. La crio-TEM no proporciona datos cuantitativos, pero la existencia de estructuras distintas a las observadas en R_e^{sat} o en R_e^{sol} da una pista sobre el mecanismo de micelización de una bicapa sobresaturada. Tales estructuras intermedias han sido observadas por crio-TEM, que se sabe que preserva las microestructuras originales de los sistemas fluidos, en estudios de mezclas tanto de Triton X-100 [91] como de octilglucósido con PC de huevo [60] por debajo de R_e^{sat} . A concentraciones de detergente algo más altas, además de los liposomas y las micelas largas filiformes, el sistema contenía algunos liposomas que parecían tener objetos largos (presumiblemente micelas mixtas) unidos a ellos [60].

En la mayoría de los casos de solubilización los detergentes se unen al exterior de las bicapas de fosfolípidos y voltean hacia la monocapa interna. En estos casos, la Etapa 2 de solubilización es una transición inducida por la composición de liposomas sobresaturados de detergente, grandes, perforados, de una composición dada por R_e^{sat} , que se convierten en micelas largas, filiformes, de una composición dada por R_e^{sol} . Las estructuras intermedias observadas ayudan a comprender el mecanismo detallado como se describe a continuación. Por el contrario, cuando una molécula de detergente no puede voltearse hacia la monocapa interna, la solubilización rápida por saturación de las bicapas está precedida por otros procesos que dan lugar a la exposición de ambas monocapas al detergente, como se describe en la siguiente sección.

2.9. EL MECANISMO DE LA TRANSICIÓN DE BICAPA A MICELA INDUCIDA POR DETERGENTES

En relación con los mecanismos de solubilización, es importante tener en cuenta que la solubilización depende de manera crítica del movimiento transmembrana del detergente, a veces denominado *flip-flop* [42]. Específicamente, se ha demostrado que cuando el volteado del detergente a la monocapa interna es rápido (por ejemplo, detergentes del Grupo A en la Tabla 1), la solubilización es rápida, mientras que cuando el volteado del detergente es lento (por ejemplo, el Grupo B), la solubilización es lenta.

Dos investigaciones detalladas propusieron diferentes mecanismos específicos de solubilización rápida y lenta [42, 43]. Ambos estudios coincidieron en que la solubilización rápida se produce a través de la saturación de las bicapas de fosfolípidos. En uno de los estudios [42], el mecanismo de la solubilización rápida de las bicapas se denominó mecanismo transbicapa, y se describió como un proceso de todo o nada que da como resultado la solubilización completa (o la no-solubilización) de un liposoma. En el otro mecanismo publicado, el mismo proceso se describió como una rápida solubilización de fosfolípidos que ocurre a través de intermedios vesiculares abiertos [43]. Ambos mecanismos se proponen para sistemas en los que la velocidad de *flip-flop* es rápida, y ambos son experimentalmente muy similares, si no idénticos.

Por el contrario, los mecanismos propuestos para la solubilización lenta diferían considerablemente. Ambos estudios coincidían en que el proceso era lento porque el *flip-flop* era lento, y ambos acordaron que la solubilización lenta da como resultado la micelización de solo una parte de los fosfolípidos en un liposoma dado. No obstante, según uno de los mecanismos [42], la solubilización se produce mediante la unión de las micelas de detergente a las bicapas y la posterior "extracción de los componentes de la membrana directamente por las micelas de detergente" [43], mientras que según el otro mecanismo este proceso ocurre a través de las "micelas mixtas que se despegan de las vesículas cerradas" [85].

2.9.a. Evaluación de los mecanismos propuestos de solubilización lenta

En nuestra opinión, las pruebas experimentales de la unión de las micelas a una bicapa no son convincentes. Los hallazgos de agregados pre-micelares muy por debajo de la cmc (en un rango similar a D_w^{sat}), que podrían estabilizarse reclutando lípidos de la membrana, no son consistentes con el mecanismo de extracción de micelas. No es muy probable que se formen pre-micelas de lípido-detergente mediante la extracción de fosfolípidos por detergente pre-micelar porque es probable que dichas pre-micelas no estén muy por debajo de D_w^{sat} antes de mezclar el detergente con liposomas estables. Por el contrario, la unión de los

monómeros a la monocapa externa de la bicapa es probablemente lo suficientemente rápida como para alcanzar un reparto de detergente en cuasi-equilibrio entre la monocapa externa y la solución acuosa. La "monocapa externa con detergente" resultante puede que sea inestable debido a dos factores, a saber: (a) el desequilibrio de masa entre las monocapas externas e internas, y (b) la presencia de un anfífilo curvofílico (es decir, detergente) de una curvatura espontánea altamente positiva en una monocapa casi plana hecha de fosfolípidos, cuyo radio de curvatura espontáneo es cero o ligeramente negativo.

Por lo tanto, si una molécula de detergente no puede voltearse hacia la monocapa interna, es probable que se formen estructuras micelares en la monocapa externa y se desprendan de las vesículas cerradas como micelas mixtas [43]. En otras palabras, una concentración de detergente suficientemente alta promueve el desprendimiento (*shedding*) de tales micelas mixtas de la superficie de las bicapas en un amplio rango de concentraciones [85]. Un modelo similar, propuesto por Mrowczynska et al. [103], implica que cuando se insertan en las bicapas, las moléculas de detergente curvofílicas afectan a la curvatura o flexión (*bending*) de la bicapa, lo que da lugar a la perturbación de la membrana. Específicamente, cuando el detergente penetra en una bicapa, la membrana se invaginará o se evaginará, produciendo endo o exovesiculación, respectivamente. La forma alterada de la bicapa se acompaña de una segregación lateral dependiente de la curvatura de los componentes de la membrana. Basados en estos argumentos, los autores plantearon la hipótesis de que la solubilización se produce a través de la segregación, dependiente de la curvatura de la membrana, de los componentes de la misma [44]. Este mecanismo puede considerarse consistente con la formación de dominios de membrana que no pueden ser solubilizados por Triton X-100 (membranas resistentes a detergentes).

En relación con la solubilización lenta, esta hipótesis implica que la acumulación de detergente en la monocapa externa da como resultado el siguiente curso de eventos:

- (a) el detergente monomérico se intercala en las áreas de membrana casi planas, lo que da como resultado la expansión de la monocapa externa; y
- (b) cuando el detergente no volteo hacia la monocapa interna, se acumula en la monocapa externa, esforzándose por curvar la membrana hacia afuera, creando pequeñas invaginaciones de membrana (o micelas mixtas).

Nótese que, si el detergente puede voltearse a la monocapa interna y la monocapa interna resulta relativamente enriquecida en el mismo, también se crearán pequeñas invaginaciones de membrana o dominios cuasi-vesiculares o yemas (*buds*). Las micelas mixtas formadas a partir de partes ricas



en detergente de la monocapa externa pueden existir por debajo de D_w^{sat} y pueden extraer componentes de la membrana directamente al interior de las micelas mixtas [44]. Por lo tanto, mientras el equilibrio transmembrana sea muy lento y no ocurra la penetración de detergente a través de la bicapa, es probable que se formen dominios curvos laterales ricos en detergente en la monocapa externa y que experimenten desprendimiento o gemación de micelas, es decir, que ocurra micelización de solo una parte de la membrana. Suponiendo que tanto el desprendimiento como la solubilización micelar (mixta) contribuyen a la solubilización lenta observada cuando el equilibrio transmembrana es muy lento, la pregunta es cuál de las dos últimas posibilidades contribuye más a la solubilización. Desgraciadamente no sabemos, en este momento, cómo evaluar la contribución relativa de los dos mecanismos.

2.9.b. El mecanismo de saturación de la bicapa para una solubilización relativamente rápida

La rápida solubilización observada cuando el detergente puede voltearse desde las monocapas externas hacia las internas, con la solubilización de fosfolípidos que ocurre a través de intermediarios vesiculares abiertos [45], o bien por un ataque trans-bicapa, después del *flip-flop* de las moléculas de detergente a través de la bicapa lipídica [44], ha sido investigada con gran detalle. La solubilización a través de este mecanismo ocurre después de que toda la bicapa se satura (o sobresatura) y toda la membrana rica en detergente se solubiliza a través de un mecanismo de solubilización de todo o nada [44], como se discutió anteriormente. Este mecanismo puede seguir a la solubilización parcial por cualquiera de los mecanismos propuestos porque se puede

esperar el equilibrio trans-bicapa si la bicapa se vuelve permeable al detergente, debido a la creciente incorporación de detergente a la monocapa externa. Así, ambos mecanismos de solubilización parcial allanan el camino para la exposición de la monocapa interna al detergente, y de ahí la rápida solubilización a través de un mecanismo de saturación rápida de bicapa. Esto es particularmente claro cuando la solubilización rápida aparece precedida por una fase de duración variable, el periodo de latencia, durante la cual la solubilización es mucho más lenta.

Durante el periodo de latencia, las moléculas de detergente saturan las dos monocapas ya sea volteándose hacia la monocapa interna o migrando a través de los orificios inducidos por el detergente. Finalmente se produce la desintegración (micelización) de toda la membrana [63, 92]. En el rango de coexistencia de bicapa / micela, la crio-TEM revela principalmente micelas laminares y filiformes, así como algunos intermediarios de tipo vesículas perforadas [44]. En muchos sistemas, las bicapas se desestabilizan a partir de un cierto contenido de tensioactivo en la membrana y luego se desintegran, formando micelas mixtas, o una fase hexagonal, u otras estructuras intermedias. En algunos casos las membranas perforadas pasan a micelas filiformes y a otros intermediarios, en forma de discos, micelas o fragmentos de bicapa, particularmente en sistemas que contienen una gran fracción de colesterol en la bicapa. Sin embargo, las micelas en forma de disco no son las estructuras principales, más bien existen como elementos transitorios en la transformación de micelas mixtas a vesículas [44].

La información disponible sobre el orden temporal de estas observaciones y sobre la dependencia de dicho orden temporal de las propiedades fisicoquímicas y de las concentraciones de lípidos y detergentes es bastante limitada. Sin embargo,

Tabla 1. Algunos detergentes de acción rápida y de acción lenta.

Grupo	Detergentes	Referencias
A, acción rápida	Clorpromazina	[93]
	C12E8	[86]
	DDAO	[42]
	Triton X-100	[42, 68]
B, acción lenta	Decilmaltósido	[43]
	Dodecilmaltósido	[42, 43, 99]
	Lisofosfatidilcolina	[79, 100]
	SDS	[42, 51]

La cinética de solubilización puede estar muy influenciada por factores como la temperatura, composición de vesículas y procedimiento de preparación de vesículas, entre otros. Los datos de esta tabla se han recopilado principalmente de publicaciones en las que se han comparado varios detergentes en las mismas condiciones. Se pueden ver más ejemplos en [150].

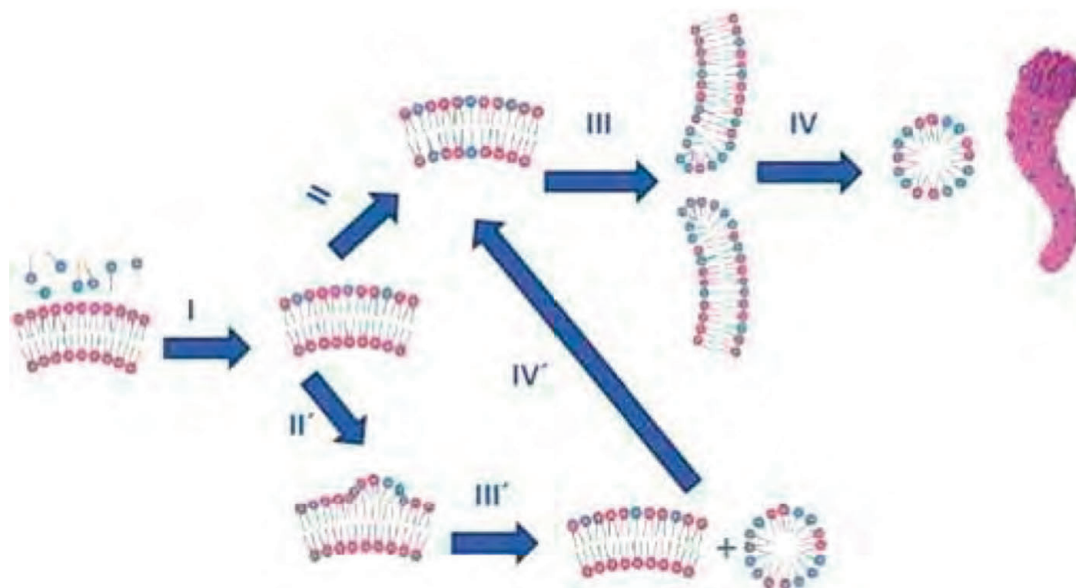


Figura 8. Mecanismos propuestos de micelización de la bicapa en una vesícula: (I) Los monómeros de detergente se insertan en la monocapa exterior de la vesícula. (II) El detergente se equilibra entre la monocapa interior y exterior mediante un rápido *flip-flop*. (III) Se forman poros en la bicapa. (IV) Se forman micelas mixtas lípido-detergente. Se muestran tanto una sección transversal como una vista general de una micela alargada. Cuando no es posible un *flip-flop* rápido, se produce una vía alternativa: (II') La inserción de múltiples moléculas de detergente curvofílico provoca un gran aumento en la curvatura de la bicapa exterior. (III') Las micelas mixtas lípido-detergente se desprenden de la bicapa, y este proceso conduce a movimientos trans- bicapa de detergente (IV'). El sistema puede entonces continuar siguiendo los procesos III y IV.

se sabe que la solubilización está precedida por la liberación de solutos encapsulados, como lo indican las investigaciones de permeabilidad a concentraciones sub-solubilizantes de detergente [93, 94]. Cuando la solubilización es precedida por una fase de latencia, la fuga es lenta, lo que sugiere que el equilibrio del detergente entre las dos monocapas es un requisito previo para la formación de poros y la solubilización y, por lo tanto, parece que la solubilización ocurre solo después de que se perfora la bicapa [56]. No se sabe mucho sobre cómo depende del tiempo de solubilización de la velocidad de *flip-flop* del detergente, pero es probable que la diferencia de concentraciones del detergente entre las dos monocapas se desvanezca cuando la membrana se vuelva permeable al detergente. En condiciones R_e^{sat} , las mezclas de detergente y lípidos generalmente contienen vesículas grandes, incluso si las vesículas originales eran pequeñas (debido al crecimiento del tamaño inducido por el detergente), y la membrana está perforada, con agujeros cubiertos por paredes curvas ricas en detergente como se describe en la figura 8.

Las estructuras resultantes del proceso III en la Fig. 8 probablemente reflejan el equilibrio después de una inserción relativamente rápida, impulsada por la entropía, del detergente curvofílico en las bicapas, a través de un crecimiento de tamaño posterior (si las vesículas originales eran pequeñas), y de la formación de poros para acomodar las moléculas de detergente curvofílicas que residen a lo largo de las paredes curvas ricas en detergente de las perforaciones.

2.9.c. Micelización de liposomas sobresaturados

La transformación de liposomas saturados en detergente, con una composición dada por R_e^{sat} , en micelas mixtas de composición R_e^{sol} , requiere que, dentro del rango entre R_e^{sat} y R_e^{sol} , el detergente agregado se distribuya de manera desigual. Específicamente, si en R_e^{sat} cada liposoma está formado por L moléculas de PC y $L \cdot R_e^{sat}$ moléculas de detergente, la adición de detergente a concentración suficiente para la solubilización parcial produce una mezcla de liposomas cuya composición permanece inalterada. Sin embargo, otros liposomas absorben suficiente detergente para descomponerse en micelas mixtas, que contienen $L \cdot R_e^{sol}$ moléculas de detergente, donde R_e^{sol} es mucho mayor que R_e^{sat} . Nuestra interpretación de esta distribución desigual es que la unión del detergente a las bicapas es cooperativa, tal vez porque inicialmente se acumula en defectos de la malla, y/o quizás las moléculas de detergente se mezclan mejor con los microdominios de lípido-detergente que con lípidos puros [48].

En algunos casos, las vesículas saturadas de detergente existentes en R_e^{sat} surgen del movimiento rápido a través de la bicapa (*flip-flop*) de moléculas de detergente desde la monocapa lipídica externa a la interna. Este sería el caso en particular con detergentes (denotados como Grupo A en la Tabla 1), cuya cabeza polar es relativamente pequeña, de modo que el movimiento trans-bicapa es rápido. En este caso, la solubilización consistiría en la disociación de un liposoma sobresaturado completo en una o más micelas filiformes. En conclusión, las bicapas se someten a so-



lubilización completa con detergente cuando toda la bicapa (incluida la monocapa interna) está saturada de detergente, y la bicapa está perforada con niveles sobresaturados de detergente. Consideramos que los datos disponibles son consistentes con este mecanismo. Esto incluye los experimentos que fueron considerados como pruebas para el mecanismo 'basado en la formación directa de micelas mixtas' [95] y el mecanismo 'basado en la destrucción de vesículas a través de partículas pequeñas que contienen grandes cantidades de detergentes' [96].

2.9.d. Dependencia de la velocidad de solubilización de las propiedades físico-químicas del detergente y la membrana

La incorporación de detergente a las membranas depende tanto de la naturaleza química del detergente como de la composición de la membrana. En ciertas condiciones puede estar prácticamente restringida a la monocapa externa, cuando el *flip-flop* de las moléculas de detergente hacia la monocapa interior es lento [51, 74]. Eventualmente, la perforación de la bicapa abolirá el gradiente de concentración de detergente entre las dos monocapas, pero esto ocurre simultáneamente con la Etapa 2.

Los datos en la Tabla 1 pueden interpretarse en términos de la hipótesis de que la solubilización, cuando va precedida por un periodo de latencia, ocurre solo después de que el gradiente de detergente es abolido. En particular, los detergentes que pertenecen a lo que hemos denominado Grupo B, probablemente penetran solo en la monocapa externa porque sus grupos hidrófilos son grandes, de modo que pueden acercarse a la monocapa interna solo después de que la membrana se perfora. Esto también es coherente con el hallazgo de que incluso los detergentes de este grupo pueden solubilizar fácilmente las bicapas, siempre y cuando estén empaquetadas con menor presión lateral (por ejemplo, a temperaturas más altas) [51, 97].

Por lo tanto, el mecanismo responsable del inicio lento de la solubilización por los detergentes del Grupo B se debe al gradiente de concentración de detergente entre las dos monocapas y al consiguiente desequilibrio de masa que provoca el desprendimiento (escape) de las micelas mixtas lípido-detergente a partir de las monocapas externas. La interacción entre las bicapas y las micelas de detergente puro es quizás menos probable que la penetración de monómeros de detergente en la monocapa exterior. Mientras el detergente no tenga acceso a la monocapa interna, se pueden formar algunas micelas mixtas individuales (presumiblemente esféricas); pero cuando la monocapa interna está accesible al detergente, debido al aumento de la permeabilidad de la membrana, el mecanismo se vuelve similar al seguido por detergentes del grupo A, y se produce una extensa solubilización.

Se ha propuesto [42, 43] que cada miembro de los dos grupos de detergentes, los solubilizadores rápidos y lentos (respectivamente, los Grupos A y B en la Tabla 1), seguirían un mecanismo de solubilización diferente. El Grupo A actuaría según un mecanismo transbicapa, como consecuencia de un *flip-flop* rápido, causando la desintegración de las vesículas, mientras que las micelas de detergentes del Grupo B extraerían gradualmente fosfolípidos de monocapa exterior de la membrana. Sin embargo, los datos disponibles [56, 86, 98-100] muestran, para diferentes detergentes del Grupo B, distintas composiciones de lípidos y concentraciones de vesículas, que esos detergentes (p. ej. colato, o dodecil sulfato de sodio) causan la completa o casi completa solubilización de la bicapa a concentraciones muy por debajo de su cmc, por lo que no es probable la extracción de fosfolípidos de las monocapas por micelas. La diferencia entre los dos grupos de detergentes es muy clara a partir de las observaciones de microscopía óptica de la solubilización de las bicapas lipídicas de vesículas unilamelares gigantes por dos detergentes representativos, Triton X-100 (Grupo A) y SDS (Grupo B) [101]. En presencia de Triton X-100, las GUV inicialmente mostraron un aumento en su área superficial, debido a la inserción de moléculas de detergente con un rápido equilibrio entre las dos monocapas. Luego, por encima de un determinado umbral de solubilidad, se abrieron agujeros, dando a la bicapa una apariencia de tela de encaje, y la bicapa desapareció gradualmente. Por otro lado, el SDS causó solo un aumento en la curvatura espontánea de la membrana, que se puede atribuir a la incorporación de SDS en la monocapa externa. El estrés resultante en la membrana podría causar la apertura de macroporos transitorios con una disminución sustancial del tamaño de la vesícula o el estallido completo de las vesículas. Para probar debidamente esta hipótesis se requeriría una investigación detallada del orden temporal de los eventos: cambio de las velocidades de *flip-flop* del detergente, fuga de solutos encapsulados a través de la bicapa, y solubilización. Hasta el momento, dicha información experimental no está disponible.

En conclusión, la Etapa 2 de la solubilización de las bicapas lipídicas por detergente, a saber, la transición de bicapas a micelas, puede entenderse en términos de un modelo basado en la estructura de las bicapas saturadas con detergente. La formación de tales bicapas está impulsada por la entropía, pero para compensar la introducción de una molécula de detergente curvofílica en una bicapa plana, la bicapa se convierte en una estructura perforada y eventualmente se miceliza. Esta secuencia de eventos solo puede ocurrir si la concentración de detergente en las dos monocapas es igual. Los detergentes con grandes grupos de cabeza hidrófilos no pueden voltearse a la monocapa interna. En cambio, forman micelas mixtas de lípido-detergente y, a través del escape

de estos agregados, hacen que la bicapa sea permeable a las moléculas de detergente, lo que de hecho permite el equilibrio del detergente y, posteriormente, la solubilización de todo el liposoma.

2.9.e. Dependencia de la temperatura de la solubilización de las bicapas líquido- cristalinas

Tanto R_e^{sat} como R_e^{sol} dependen de la longitud y la insaturación de las cadenas hidrofóbicas, así como de la transición de fase y la temperatura [26]. Se dispone de abundantes datos sobre el efecto de la temperatura en la solubilización de bicapas gel y fluidas o líquido-cristalinas. Los resultados de estos estudios [41, 48, 102] son clave para comprender los efectos de otros factores. Por ejemplo, la concentración de detergente requerida para solubilizar las bicapas líquido-cristalinas aumenta al calentar el sistema. En comparación con las diferencias entre las bicapas de gel y las de cristal líquido, el cambio debido al calentamiento de los liposomas en fase cristal líquido es pequeño pero reproducible. Nuestra interpretación de estos resultados se basa en el supuesto de que la con-

centración de detergente requerida para la solubilización aumenta con la diferencia de curvatura entre los dos anfífilos. Por lo tanto, en la expansión inducida por calentamiento de las cadenas hidrocarbonadas del fosfolípido en relación con el grupo polar de cabeza, la curvatura espontánea del fosfolípido se vuelve más negativa, de modo que se necesita más detergente para solubilizar las bicapas a temperaturas más altas. Además, el área de la sección transversal del resto de detergente hidrófobo aumenta y, por lo tanto, el detergente se vuelve menos cónico, lo que significa que se necesita más cantidad para la solubilización [41, 69, 102]. Muchos experimentos confirman este enfoque, mostrando que la mayor contribución al cambio tanto en R_e^{sat} como en R_e^{sol} de las bicapas de cristal líquido es el cambio en la curvatura espontánea. En otras palabras, la flexión de una monocapa casi plana formada por fosfolípidos se vuelve más difícil (y por lo tanto requiere más energía) con el aumento de la temperatura. Otras fuerzas parecen jugar solo roles menores.

A partir de los datos disponibles, muchos de ellos resumidos en [26], podemos generalizar que la concentración de detergente requerida para la solubilización de las bicapas en fase líquido-cristalina es: (i) una función creciente del desorden molecular lipídico; (ii) una función creciente de la insaturación; (iii) una función ligeramente decreciente de la longitud de la cadena; y (iv) menor para la esfingomielina (SM) (0.5 Triton:SM) que para PC (2 Triton:PC) [63]. Además, a una concentración de detergente suficiente para la solubilización parcial de las bicapas mixtas PC-SM, las micelas mixtas ricas en SM aparecen antes de las micelas mixtas ricas en PC (Fig. 9a-c). Curiosamente, la concentración requerida para la solubilización de las bicapas que contienen colesterol es una función creciente de la concentración de colesterol [50] y se requieren concentraciones de detergente mucho más altas para SM que para PC en la solubilización de las bicapas SM – PC – colesterol [69, 102, 103]. Esto significa que el colesterol estabiliza SM frente a la solubilización (Fig. 9d), probablemente debido a la formación de un complejo SM-colesterol de gran curvatura negativa. Esta podría ser la base del efecto DRM (ver sección 3).

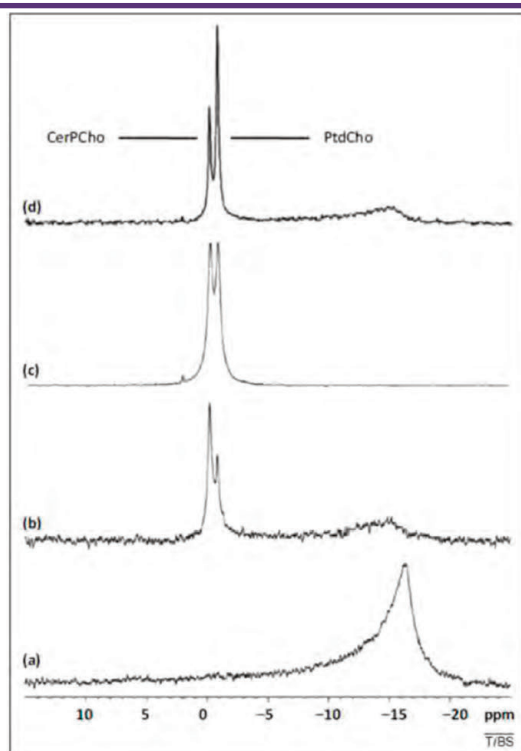


Figura 9. Solubilización de membranas seguida por RMN. (a-c) Espectros de ^{31}P -RMN de mezclas equimolares de fosfatidilcolina (PC)/esfingomielina (SM) en presencia de distintas concentraciones de Triton X-100. La relación molar efectiva detergente/lípido es de (a) 0, (b) 0,5 y (c) 1,3. La solubilización se detecta por la aparición de señales isotrópicas (desplazamiento químico 0 ppm) estrechas al añadir el detergente [31]. (d) Espectros de ^{31}P -RMN de mezclas de PC/SM/colesterol en presencia de Triton X-100 a $R_e = 1,0$. Obsérvese que la solubilización parcial en presencia de colesterol implica la solubilización preferente de PC sobre SM [26].

2.9.f. Solubilización de bicapas en estado gel

Hay muchos menos datos disponibles sobre la solubilización de las bicapas en fase gel. Además, varias investigaciones publicadas contienen resultados cuestionables porque algunos experimentos utilizaron mezclas que no estaban en equilibrio. Por otra parte, los métodos utilizados a veces eran inapropiados para las preguntas formuladas. La razón principal de nuestras dudas es que la solubilización de las bicapas en fase gel es muy lenta (mucho

más lenta que la solubilización de las bicapas líquido-cristalinas), lo que implica que las mezclas estudiadas podrían no estar en equilibrio y, por lo tanto, haber dado lugar a artefactos. A pesar de las limitaciones de los datos disponibles, se pueden hacer dos generalizaciones [41, 102-104]: (i) en comparación con las bicapas líquido-cristalinas, se requiere menos detergente para el inicio y la finalización de la solubilización de las bicapas en fase de gel; y (ii) dentro del rango de temperaturas de la fase de gel, la concentración de detergente requerida para la solubilización disminuye al aumentar la temperatura.

Sugerimos que la concentración de detergente necesaria para solubilizar las bicapas en fase gel es menor que la necesaria para solubilizar las bicapas en fase cristal líquido porque la curvatura espontánea del fosfolípido es menos negativa en las bicapas en fase gel, más compacta. Además de la flexión de las monocapas

de fosfolípidos, el otro contribuyente a la energía de solubilización es la energía asociada con el llenado del vacío en el centro de las micelas mixtas recién formadas (Fig. 10a) [41]. El proceso que conduce a las micelas sin vacío (Fig. 10c) se llama energía intersticial o *void energy*. Esta descripción no significa que alguna vez haya una micela con un vacío en el centro en equilibrio; más bien, hay energía asociada con el llenado necesario de una micela hueca (teórica y extremadamente inestable) que conduce a una estructura que no es hueca. Proponemos que (i) el efecto de la energía intersticial en la dependencia de la temperatura de la solubilización se opone al de la energía de flexión, (ii) los efectos de la temperatura en R_e^{sat} y R_e^{sol} reflejan un equilibrio entre la energía de flexión y la energía intersticial, y (iii) la contribución de la energía intersticial es más importante en el estado del gel que en las micelas mixtas más flexibles presentes por encima de la temperatura de transición térmica. El valor más bajo de R_e^{sat} para la solubilización de las bicapas en fase gel significa que el coeficiente de partición del detergente entre las bicapas en fase gel y el medio acuoso es mayor que el observado para las bicapas de cristal líquido, o que las bicapas en fase de gel pueden acomodar menos detergente antes de que la energía asociada con las micelas mixtas que contienen lípidos sea igual a la de las bicapas que contienen detergente. La primera posibilidad puede descartarse sobre la base de que el coeficiente de reparto del Triton X-100 entre los lípidos en fase gel y el agua es igual al obtenido para las bicapas en fase cristal líquido [52]. Además, algunos datos brindan un fuerte respaldo a la posibilidad alternativa, mostrando que los lípidos en fase gel se saturan con detergente a concentraciones de detergente más bajas que las de la fase fluida [48]. La razón por la cual las fases gel y fluida acomodan diferentes cantidades máximas de detergente no está clara en la actualidad. Una posibilidad es que, en el estado fluido, el empaquetamiento de las moléculas de lípidos sea lo suficientemente flexible como para compensar la diferente curvatura espontánea del detergente; por lo tanto, la bicapa acomodaría más detergente antes de fragmentarse en micelas mixtas.

2.9.g. Solubilización diferencial

Poco se sabe sobre la solubilización de las bicapas formadas por más de un fosfolípido. De gran interés es la solubilización de fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina (SM) en bicapas de PC-SM-colesterol, porque las bicapas en fase líquida-ordenada que contienen SM y colesterol son resistentes a los detergentes. Se cree que algunas membranas resistentes a los detergentes (DRMs) existen como *rafts* o balsas de membrana [23, 50, 105] (ver sección 3). El interés del colesterol en el contexto de esta discusión es que rigidifica el empaquetamiento de fosfolípidos en bicapas líquido-cristalinas pero fluidifica el empaquetamiento de las bicapas en fase gel.

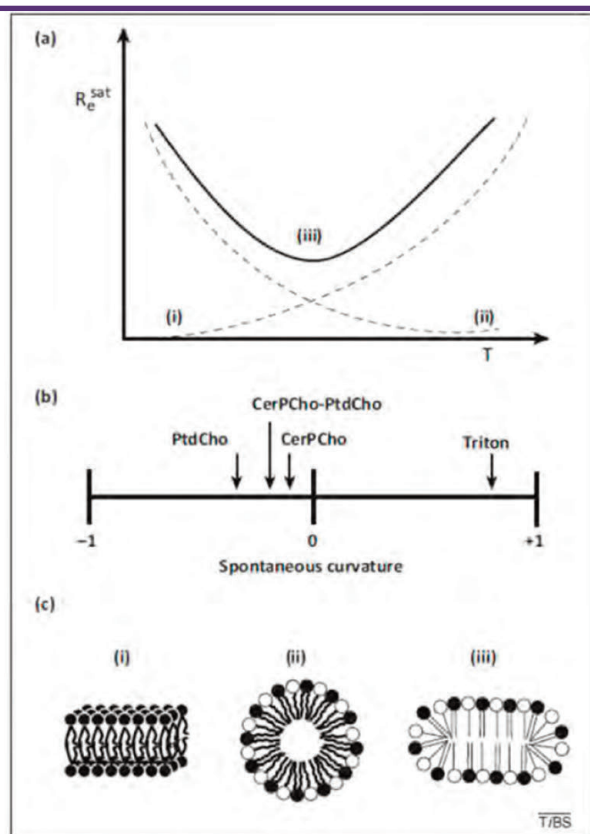


Figura 10. Las dos fuerzas que compiten en la solubilización de bicapas por detergentes. (a) Dependencia de la temperatura (T) de las dos contribuciones a R_e^{sat} : (i) contribución de la flexión, (ii) contribución intersticial, (iii) suma de ambas contribuciones. (b) Se muestran la fosfatidilcolina (PtdCho), esfingomielina (CerPCho) y Triton X-100 sobre un eje de curvatura espontánea. Cuanto más negativa es la curvatura espontánea del lípido, más detergente se requiere para su solubilización. (c) Deformaciones hipotéticas de la monocapa que acompañan la transición bicapa — micela: (i) estado inicial plano, (ii) estado intermedio resultante de la flexión de la monocapa y formación de un vacío, y (iii) estado final resultado del colapso del vacío y formación de un interior hidrofóbico [26].



Cuando se añade a un lípido en fase gel, el colesterol transforma la fase gel de las bicapas en una nueva fase llamada "líquida (o fluida) ordenada". El cambio en el empaquetamiento de lípidos cambia la curvatura espontánea del conjunto de lípidos a un valor menos negativo, reduciendo así la concentración de detergente necesario para la solubilización.

Una investigación con 31P-NMR reveló que, en ausencia de colesterol, cuando se añadió Triton X-100 a las bicapas de PC-SM a una concentración suficiente para que se pudiera realizar una solubilización parcial (pero no completa), la fracción solubilizada por el detergente estaba enriquecida en SM [50], como se esperaba de la menor curvatura negativa de la SM en relación con la PC (Fig. 9b y 10b). El colesterol invierte esta susceptibilidad relativa. Las bicapas que contienen colesterol están más ordenadas que las líquido-cristalinas, pero menos ordenadas que las de fase gel. En presencia de colesterol en bicapas PC-SM, la fracción solubilizada de las mezclas PC-SM-colesterol es pobre en SM (compárese el espectro de la figura 9b con el de la 9d). Estas observaciones sugieren que las mezclas de SM-colesterol tienen una curvatura espontánea negativa muy grande, que hace que sean resistentes a la solubilización por detergentes, como se muestra esquemáticamente en la figura 10b. También se ha propuesto que la razón por la que ciertas fracciones de membrana resisten a los detergentes es la mayor afinidad del colesterol por la SM, en comparación con la PC [106, 107].

2.9.h. ¿Cuánto detergente se necesita para solubilizar bicapas de fosfolípidos?

Suponiendo que la curvatura espontánea de las micelas mixtas (S_m) es un promedio ponderado de las curvaturas espontáneas (Fig. 5) de los dos anfífilos (lípido y detergente), S_m se puede calcular como:

$$S_m = N_l S_l = N_d S_d$$

donde N_l y N_d son las fracciones molares del lípido y detergente, respectivamente ($N_l + N_d = 1,0$), S_l es la curvatura espontánea del lípido, y S_d es la curvatura espontánea del detergente.

La curvatura espontánea de un anfífilo formador de micelas es positiva e igual al recíproco del tamaño de las micelas que se forman en soluciones acuosas [108, 109], mientras que la curvatura espontánea de la PC es ligeramente negativa [39]. Por lo tanto, el fosfolípido se autoensambla en bicapas y siempre que la fracción molar del detergente sea mucho menor que la del fosfolípido, la curvatura espontánea efectiva permanece cercana a la del lípido, y la mezcla lípido-detergente sigue siendo lamelar. La solubilización comienza a una fracción molar crítica en la que la bicapa no puede acomodar más detergente. En este punto, la bicapa acumula sufi-

ciente detergente para que la curvatura espontánea de los conjuntos mixtos alcance un valor suficientemente positivo como para adoptar una estructura micelar [35, 41].

Estudios anteriores han demostrado que la concentración saturante de detergente, expresada en términos de fracción molar de detergente necesario para superar la energía de flexión (N_d^{sat}), es aproximadamente igual a la relación entre la curvatura espontánea del lípido y la del detergente. En términos de R_e ,

$$R_e^{sat} / (1 - R_e^{sat}) = S_l / S_d$$

y por lo tanto,

$$R_e^{sat} = S_l / S_d + S_l$$

Si se conocen los radios de curvatura de un par detergente-lípido dado, esta última aproximación se puede utilizar para predecir cuánto detergente se necesita para solubilizar el lípido dado. En ausencia de estimaciones razonables de la curvatura curvatura, todavía podemos utilizar el razonamiento discutido anteriormente para explicar observaciones experimentales como la susceptibilidad de los liposomas de SM en comparación con los liposomas de PC. Específicamente, la solubilización de SM requiere una cuarta parte de la concentración de Triton X-100 porque su curvatura espontánea es menos negativa que la del PC.

3. MEMBRANAS RESISTENTES A DETERGENTES (DRM) Y RAFTS

La hipótesis de los *rafts* o balsas lipídicas fue propuesta por Simons y colaboradores en 1997 [110-112] para explicar ciertos aspectos del tráfico intracelular de esfingolípidos. Según esta hipótesis, las balsas serían regiones pequeñas y efímeras de la membrana plasmática celular, con una composición peculiar de lípidos (ricas en esfingolípidos, colesterol) y proteínas específicas. Los roles propuestos para los *rafts* crecieron a lo largo de los años hasta incluir muchos aspectos del tráfico de membranas intracelulares, la señalización celular, entrada de toxinas y virus, y apoptosis. Desgraciadamente, poco después de ser propuesta, la hipótesis, muy bien aceptada en su momento, se vio mezclada, en contra de toda lógica, con los componentes de membranas que resisten a la acción solubilizante de los detergentes, "membranas resistentes a los detergentes" (DRM) [113]. Esto ha dado origen a un sinnúmero de artefactos y datos experimentales erróneos. Esta sección está dedicada a aclarar esta confusión, y está basada en nuestra publicación de 2005 [23].

De manera en nada relacionada con los *rafts*, Ipsen y col. [114], con impecable razonamiento físico-químico, explicaron la exis-

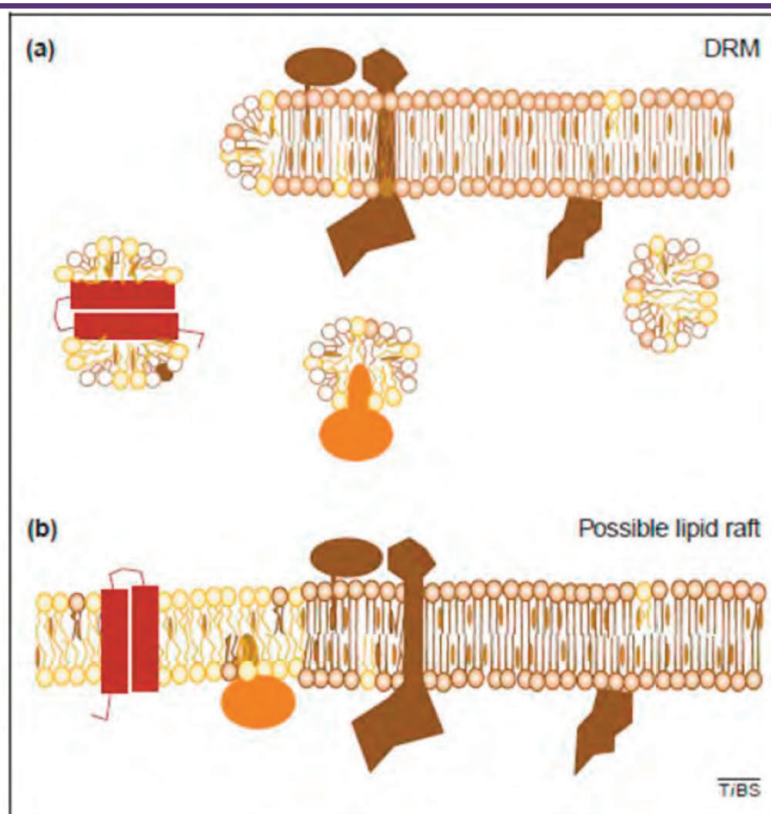


Fig. 11. Las membranas resistentes a los detergentes no se corresponden necesariamente con los rafts. (a) Esquema de la suspensión resultante de tratar una membrana celular con detergente. Las cabezas polares de las moléculas de detergente se representan como círculos vacíos. La suspensión contiene micelas mixtas lípido-proteína-detergente [las tres estructuras globulares en la zona media de la figura], y un residuo no solubilizado, DRM. (b) La membrana original. En este caso la DRM [la misma dibujada en (a)] correspondería a una estructura preexistente en la membrana nativa, pero éste no es, ni mucho menos, un caso general [23].

tencia de dos tipos distintos de fases líquidas: una líquida ordenada (lo) y una líquida desordenada (ld). La fase líquido-ordenada estaría enriquecida en colesterol. Pero pronto los promotores de los *rafts*, atendiendo a su supuesta alta concentración de esteroides, decidieron que las balsas se considerarían en la fase lo [115]. Sin embargo la evidencia experimental disponible habla en contra de la identificación de DRM con dominios de fase lo y con *rafts*. En particular, algunos protocolos experimentales podrían conducir a la formación de artefactos de estructuras DRM que no están presentes en las membranas nativas antes del tratamiento con detergente.

3.1.RESISTENCIA A LOS DETERGENTES Y BALSAS DE MEMBRANA

Una observación importante que atrajo poca atención en su momento es que, en ciertas condiciones, algunos componentes de membrana no se solubilizan incluso a altas concentraciones de determinados detergentes [116]. En particular, se sabe desde hace mucho tiempo que hay proteínas de membrana que están ancladas a la bicapa lipídica por glicosilfosfatidilinositol (GPI), y que son resistentes a la solubilización por detergentes como el Triton X-100 [117]. Brown y Rose [118] introdujeron la idea de microdominios

de la bicapa lipídica que serían insolubles, y en los cuales se anclarían las moléculas de GPI insertado. Siguiendo una línea de pensamiento independiente, Simons y colaboradores [110-112] propusieron la existencia de las llamadas "balsas", microdominios enriquecidos en esfingolípidos y colesterol que están involucrados en numerosas funciones celulares, desde el tráfico de membranas y la morfogénesis celular hasta la señalización celular. Balsas y "membranas resistentes a los detergentes" (DRM) se propusieron en una etapa bastante temprana en estos estudios y se intentaron relacionar física y conceptualmente [113], lo que implicaría que proteínas de membrana resistentes a altas concentraciones de Triton X-100 estarían ubicadas en balsas. Los términos "balsas" y "DRM" se han utilizado a menudo como sinónimos, a pesar de sus diferentes orígenes y significados conceptuales. Por ejemplo, cuando se obtiene una fracción resistente al detergente a 4 °C a partir de una membrana (que se solubiliza completamente con exceso de Triton X-100 a 37 °C), esto se interpreta en términos de la hipótesis de que los DRM recuperados a 4 °C están a 37 °C en forma de "balsas" que existirían en las membranas en ausencia de detergente (Fig. 11). Como se discutirá más adelante, esta hipótesis no es apoyada por la evidencia experimental.



Otro hallazgo fue que los DRM son ricos en esfingomielina (SM) y colesterol [119]. Esta observación fue importante porque se sabe que, en membranas modelo compuestas por SM, colesterol y fosfatidilcolina insaturada (PC), se produce una separación lateral de fase entre dominios de fase líquido-ordenada lo ricos en colesterol y SM, y dominios de fase *ld* ricos en PC [120]. Estos tres lípidos son abundantes en las membranas plasmáticas; por lo tanto, las fracciones resistentes a Triton X-100 (a 4 °C) ricas en colesterol y SM se identificaron con dominios de fase *lo* y balsas de membrana.

3.2. ¿QUÉ SISTEMAS LIPÍDICOS SON RESISTENTES A LOS DETERGENTES?

La resistencia al detergente implica que una fracción de la membrana permanece en fragmentos de bicapa muy grandes y no es transformada en pequeñas micelas incluso con altas concentraciones de detergente. Esto significa que la solubilización muchas veces se inicia, pero no se completa. Las razones de la solubilización incompleta pueden ser de naturaleza termodinámica o cinética.

Se ha propuesto que los DRM son dominios de baja fluidez porque contienen fosfolípidos que se encuentran en fase gel (baja fluidez) a la temperatura experimental y / o dominios ricos en colesterol (se sabe que el colesterol disminuye la fluidez de bicapas que de otro modo serían muy fluidas). Varias líneas de evidencia descartan tanto la posibilidad de que bicapas en fase gel o bicapas ricas en colesterol sean necesariamente resistentes a los detergentes [63, 102, 103]. Otra posibilidad que se ha sugerido como base para la resistencia a los detergentes pero se puede descartar es que las "bicapas resistentes" son aquellas formadas por esfingomielina u otros esfingolípidos. De hecho, la solubilización de bicapas de SM de huevo requieren menos Triton que la solubilización de bicapas de PC de huevo [47, 103, 121]. Además, otros esfingolípidos que se supone que existen en balsas, como los gangliósidos, en realidad facilitan la solubilización de bicapas por Triton X-100 [63].

También se ha sugerido que la resistencia a la solubilización se debe al hecho de que las balsas están en la fase *lo*. Se sabe que mezclas de esfingomielina y colesterol, dos lípidos presumiblemente comunes en balsas, dan lugar a fases *lo* [122]. La fase *lo* se caracteriza por permitir la difusión traslacional y al mismo tiempo mantener un alto grado de orden molecular en las cadenas de hidrocarburos. Se ha demostrado que al menos algunas fases *lo* son de hecho resistentes a los detergentes. Sin embargo, por razones de precisión conceptual, las fracciones de membrana deben denominarse micro- o nanodominios en la célula nativa y DRM sólo después de que el detergente se haya utilizado eficazmente (ver 3.6).

Una posibilidad que debe investigarse más a fondo es que la resistencia a los detergentes sea un resultado de interacciones

SM-colesterol. Esta idea está respaldada por el hallazgo de DRM ricos en colesterol y SM en mezclas de Triton X-100 con vesículas de PC, SM y colesterol [63]. SM interactúa con el colesterol en las bicapas, quizás a través del puente de hidrógeno entre el 3 β -OH del colesterol y el grupo carbonilo de SM [103, 122]. La condensación de las monocapas de SM en presencia de colesterol también se ha tomado como prueba que respalda una interacción específica entre estos dos lípidos, pero esta interpretación ha sido debatida. Cualquiera sea la razón, está claro que el SM y el colesterol podrían co-segregarse del fosfolípido en forma de bicapas fluidas-ordenadas, y que la presencia de ambos lípidos puede hacer las bicapas resistentes a la solubilización por Triton X-100 en una amplia gama de temperaturas.

En los experimentos de solubilización descritos en la literatura, no siempre está claro si los resultados representan estados de equilibrio de agregación. Dada la posibilidad de que la velocidad de solubilización sea lenta a bajas temperaturas y considerando que, en la mayoría de estudios previos, los estados de agregación han sido investigados sólo un corto tiempo después de mezclar la solución de detergente con las bicapas, es muy posible que sean los factores cinéticos en lugar de los termodinámicos los responsables de las observaciones. De hecho, muchos experimentos recientes [41, 63, 102, 103] indican que la resistencia de ciertas membranas a detergentes no se debe a su alta rigidez ni a la presencia de colesterol o esfingolípidos *per se*. Más específicamente, el efecto del colesterol y los esfingolípidos depende claramente (de manera compleja) tanto de la temperatura como de la composición de las bicapas.

3.3. RAFTS Y EL EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA SOLUBILIZACIÓN DE LA MEMBRANA

Los estudios que tratan las balsas y los DRM como sinónimos asumen, al menos implícitamente, (i) que existen los mismos dominios de fase *lo* en una membrana a 4 °C y a 37 °C, y (ii) que estos dominios *lo* son resistentes al detergente a 4 °C pero pueden ser solubilizados a 37°C. Ninguna de estas suposiciones está claramente apoyada por la evidencia experimental. De hecho, parece haber consenso entre los estudios sobre mezclas "raft-like" que imitan los lípidos de las balsas (sin detergente) [123, 124] en las que las mezclas muestran una transición gradual con el aumento de temperatura, de una fase líquida-ordenada a otra líquida-desordenada. Esto es inconsistente con la identificación de balsas con DRM y proporciona una explicación del hallazgo de que se pueden obtener DRM a 4 °C pero no a 37 °C.

La dependencia de la temperatura de la solubilización por detergente es compleja. En términos generales, la solubilización de bicapas en fase cristal-líquido requiere más detergente con mayor temperatura (es decir, R_g^{sol} aumenta con la temperatura). Esta tendencia se ha observado para las vesículas de DPPC [41] y



de 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC) [125], y puede explicarse por el hecho de que aumentar la temperatura hace que la curvatura espontánea de la moléculas se haga más negativa (o menos positiva) al desordenar las colas hidrofóbicas y, posiblemente, también al deshidratar los grupos de cabeza. Esta curvatura espontánea más negativa contrarresta la transición a micelas mixtas curvadas positivamente.

El efecto de la temperatura sobre la solubilización de bicapas en la fase gel es resultado de una compensación de factores opuestos [41]: por un lado, se requiere más detergente para la solubilización a una temperatura más alta debido al efecto de la temperatura sobre la curvatura espontánea de los lípidos (y detergente); por otro lado, la solubilización requiere la "reabsorción" del vacío formado al curvar la monocapa lipídica [68], y este proceso (que consume energía) se promueve aumentando la temperatura.

Experimentalmente, la concentración de Triton X-100 requerida para solubilizar DPPC en fase gel es una función decreciente de la temperatura [41, 102]. La observación de que la cantidad de detergente necesaria para la solubilización de SM disminuye al aumentar la temperatura a bajas temperaturas, pero aumenta con el aumento de temperatura a altas temperaturas [70, 116] también puede ser interpretado en términos de la compensación descrita. En una mezcla de POPC-SM-colesterol, que se supone que forma fases coexistentes lo y ld, la solubilización de ld requiere, en términos generales, más detergente a alta temperatura [63].

Finalmente, cabe destacar que la concentración total de detergente que se requiere para la solubilización también depende de la CMC del detergente y su partición micela-agua. Ambos factores son comúnmente funciones de la temperatura en forma de campana, con la CMC en un mínimo y el coeficiente de partición membrana-agua a un máximo a unos 40 °C, cuando el efecto hidrofóbico es más fuerte [125]. Con una concentración baja de lípidos y detergente, una cantidad sustancial de detergente (por debajo de la CMC) puede estar en agua e inactivo para la solubilización. Sin embargo, los monómeros no tienen ningún papel cuando se trata de completar la solubilización a concentraciones totales de detergente muy por encima de la CMC.

3.4. CAMBIOS INDUCIDOS POR EL TRITON X-100 EN LA ESTRUCTURA DE LOS DOMINIOS

Algunos autores han propuesto que un detergente como el Triton X-100 dejaría intactos los dominios ricos en SM en la membrana porque no podría penetrar en ellos. Sin embargo, esta idea entra en conflicto con la suposición de que los dominios ordenados y desordenados en las membranas están en equilibrio; cambiar las propiedades de la fase rica en PC perturbará el equilibrio, y el re-equilibrio necesariamente alterará también la fase rica en SM.

Los cambios inducidos por detergentes en los dominios ordenados comienzan a concentraciones de detergente por debajo de las requeridas para formación de micelas. Suponiendo una mezcla ideal dentro de o entre los dominios, la preferencia del detergente por la fase más fluida debería inducir una tendencia a convertir los dominios ordenados en dominios desordenados. Sin embargo, la mezcla de detergente con los componentes de la membrana no es ideal y provoca una aun mayor fluidización de los dominios fluidos ricos en detergente [126]. El efecto desfavorable del detergente sobre los lípidos, en particular sobre la SM, que prefiere las fases ordenadas, cambia la partición de los lípidos a favor de los dominios ordenados (de los cuales el Triton X-100 parece ser repelido). Por lo tanto, el número y / o el tamaño de los dominios ordenados se puede aumentar mediante la adición del (paradójicamente) fluidificante Triton X-100; de hecho, el Triton puede incluso estimular la aparición de dominios ordenados en una mezcla homogénea. Este efecto ha sido detectado por una variedad de métodos microcalorimétricos independientes [105] y se ha explicado cuantitativamente sobre la base de entalpías y entropías de interacciones Triton-SM no ideales [127]. La aplicación de Triton X-100 a membranas homogéneas de PC de huevo, SM y colesterol (proporción molar 7: 1: 1) produce DRM compuestas por PC: SM: colesterol 1: 1: 1 (mol: mol: mol), generalmente considerada una composición típica de *rafts* [63].

Además de afectar a los fenómenos termodinámicos, el Triton X-100 influye en los aspectos mecanicistas y / o cinéticos de los dominios de membrana. Podría, por ejemplo, conducir a la coalescencia de dominios ordenados. Giocondi y col. [128] han sugerido, a partir de la obtención de imágenes in situ de membranas celulares tratadas con Triton X-100 por microscopía de fuerza atómica, que los microdominios de membrana pueden organizarse en membranas resistentes a detergentes más grandes durante el tratamiento con Triton. Varias otras observaciones también indican que los detergentes provocan grandes cambios en la arquitectura de la bicapa (a saber, lisis de membrana y reensamblaje) a concentraciones sub-solubilizantes [45, 80]. En esta zona de "sub-solubilización", una fracción del lípido de la bicapa de hecho se solubiliza y los lípidos restantes forman grandes estructuras que pueden sedimentarse fácilmente [63].

Otro punto importante es que, mientras que la composición en lípidos difiere mucho entre una y otra monocapa de las membranas celulares, las peculiaridades de las composiciones lipídicas locales (que gobiernan la posible formación de los dominios) se pierden al solubilizar la célula. Este efecto podría agotar la disponibilidad de lípidos formadores de balsas (desintegrando así las balsas) o juntar lípidos que no interactúan in vivo (creando así dominios artificiales).

3.5. UTILIZANDO DIFERENTES DETERGENTES SE OBTIENEN DIFERENTES DRM

Las DRM más comúnmente estudiadas son las obtenidas de disoluciones de Triton X-100. Sin embargo, se pueden utilizar otros detergentes, que son menos fluidificantes. Tales detergentes tendrían un efecto más débil en la fase rica en PC y también serían capaces de insertarse, hasta cierto punto, en dominios ricos en SM. Como consecuencia, las diferencias estructurales entre dominios se reducirían (en lugar de aumentar, como con el Triton). El resultado sería la partición de más PC en los dominios ricos en SM y viceversa, y eventualmente la desaparición de dominios a favor de una membrana homogéneamente mezclada. Los posibles efectos de la promoción o reducción de balsas inducida por detergente han sido comentados por London y Brown [129], pero son ignorados por muchos investigadores. Estudios sistemáticos cuidadosos han revelado una gran variedad en la composición de lípidos y proteínas en las DRM obtenidas de una membrana dada utilizando diferentes detergentes [130]. Estos datos pueden considerarse pruebas de que los DRM difieren sustancialmente de los *rafts*. La interpretación alternativa - que las membranas nativas contienen diferentes tipos de balsas que son específicamente aisladas por detergentes específicos - no es consistente con la suposición básica de que las balsas se forman por una separación de dos fases líquidas en la bicapa lipídica. La idea de "balsas Lubrol" (es decir, balsas que estarían aisladas como "membranas resistentes al detergente Lubrol") a diferencia de "balsas de Triton" y otros dominios *in vivo* en equilibrio supone implícitamente la coexistencia de membranas con más de dos fases líquidas, algo difícil de concebir y que carece de cualquier base experimental o teórica. Si hay, de hecho, diferentes tipos de balsas, éstas deben ser controladas por diferentes complejos de proteínas (que pueden adquirir ciertos lípidos en su entorno), pero no por la separación espontánea de fases de los lípidos. Incluso si éste fuera el caso, sería muy poco probable que diferentes complejos proteína-lípido pudieran aislarse selectivamente mediante diferentes detergentes. De hecho, existen pruebas sólidas de que no existen Balsas Lubrol y Balsas Triton, sino solo DRM Lubrol y DRM Triton. La identificación de estos DRM con dominios tipo raft preexistentes en la célula sería incorrecta.

3.6. APLICACIONES E INTERPRETACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE DRM

Aunque muchas conclusiones de los estudios sobre DRM deben ser reconsideradas críticamente a la luz de nuestros actuales conocimientos, la aplicación de Triton X-100 y otros detergentes a 4 °C a las células sigue siendo una herramienta interesante y útil en la investigación de membranas. La original y modesta intención de Yu y col. [116] para lograr una preselección de ciertas proteínas

de membrana solubilizando las membranas con Triton X-100 frío claramente se ha cumplido. Además, ahora sabemos algo (ciertamente no todo) sobre los criterios de qué proteínas y lípidos se extraen preferentemente en las DRM. Al igual que muchas otras técnicas, desde los experimentos clásicos de reparto octanol-agua a las técnicas cromatográficas modernas, la extracción de DRM caracteriza las propiedades de una molécula en términos de su afinidad diferencial por varios ambientes (artificiales). Esto sin duda es interesante, pero el hallazgo de DRM no parece justificar la conclusión de que las balsas estén presentes en la membrana nativa, y encontrar una molécula en la fracción DRM no prueba su localización en balsas (ni viceversa) [131]. Las moléculas pueden tender a incluirse en DRM por una variedad de razones, por ejemplo: (i) es posible que prefieran un entorno de membrana más ordenado y compacto; (ii) podrían interactuar preferentemente con otros componentes de DRM como el colesterol o glicolípidos; o (iii) podrían favorecer una membrana de distinto espesor. Dar cuenta de los resultados obtenidos con diferentes detergentes podría ser mucho más complejo que simplemente recuperar un conjunto más o menos fijo de proteínas y lípidos [130]. Las proteínas de membrana que prefieren entornos ordenados, ricos en colesterol, podrían también inducir algún orden y enriquecimiento en colesterol dentro de su "vecindario". Estas proteínas vecinas pueden estabilizarse si las propiedades generales de la membrana se ajustan para hacerse más ordenadas y, por supuesto, es probable que muestren una mayor afinidad por dominios o entornos de membrana que sean más ordenados y ricos en colesterol. A su vez, la ubicación específica de una proteína en un entorno DRM podría conducir a una función proteica mejorada o modificada (ver [148] para el caso de los receptores de células inmunitarias).

En este sentido, la solubilización selectiva por detergentes, es decir, la técnica DRM, no se limita al problema de las balsas de lípidos, sino que tiene potencial para ser de valor general para la comprensión de las interacciones proteína-lípido. En contraste con nuestro conocimiento creciente de cada vez más proteínas de membrana, nuestro conocimiento de las funciones biológicas de los numerosos lípidos regulados de forma muy específica en las membranas celulares todavía es limitado. Después de muchos años en que esta falta de conocimiento fue malinterpretada como prueba de que la especificidad de los lípidos es irrelevante, la hipótesis de los *rafts* ha creado un enorme interés en los lípidos de membrana. Esto es una suerte, ya que se necesitarán muchos más modelos de complejos proteína-lípido para lograr una comprensión adecuada de las multiformes funciones de los lípidos de membrana. Las técnicas a base de detergentes pueden seguir teniendo un papel clave en tales estudios si los efectos de membrana de los detergentes se tienen en cuenta correctamente.



En resumen:

* Los DRM son solo el resultado de una solubilización incompleta de membranas por detergentes. Como tales, los DRM solo existen después del tratamiento con detergente. Los DRM no corresponden necesariamente a ninguna estructura de membrana que exista antes del tratamiento con detergentes. La resistencia a la solubilización por el detergente podría tener un origen termodinámico (por ejemplo, las geometrías relativas de ciertos componentes de la membrana y de ciertos detergentes no facilitan la formación de micelas mixtas) o cinético (por ejemplo, tratamientos con detergente demasiado cortos).

* Los dominios líquido-ordenados se forman en las membranas lipídicas como resultado de un enriquecimiento local en esteroides que dificulta la formación de *conformers gauche* (es decir, "acodamientos") en las cadenas acilo de los fosfolípidos, aumentando así el orden de la cadena sin alterar la traslación y difusión en el plano de los lípidos y proteínas asociadas. Se ha demostrado que los dominios líquido-ordenados son más resistentes a la solubilización por detergentes que los que se hallan en fase líquido-desordenada.

* Los *rafts* o balsas se definen como nanodominios transitorios de membrana in vivo, enriquecidos en esfingolípidos y colesterol. Los límites precisos de tiempo de vida y tamaño de lo que debe y no debe considerarse una balsa son actualmente un tema de debate. Dada su composición propuesta, es probable que las balsas constituyan dominios en fase lo, y que, frente a un detergente, su solubilización sea problemática. Sin embargo, la existencia de balsas es completamente independiente del uso de detergentes. Específicamente, no se ha demostrado que todas las balsas sean resistentes a los detergentes. Por el contrario, se ha mostrado que se pueden obtener muchas fracciones de DRM que no están relacionadas con los *rafts*.

4. ALGUNOS ESTUDIOS EXPERIMENTALES

En esta sección presentamos de forma resumida algunos resultados experimentales de nuestro laboratorio, obtenidos a lo largo de varias décadas, y que han contribuido a nuestra comprensión actual de los efectos biológicos de los detergentes.

4.1. MEMBRANAS MITOCONDRIALES

Algunos de nuestros primeros estudios sobre los fundamentos del uso de los detergentes se llevaron a cabo con membranas mitocondriales o sus proteínas integrales. Ya en 1980, Gurtubay y cols. [133] llevaron a cabo un análisis detallado de la solubilización de las membranas internas y externas mitocondriales, purificadas por centrifugación en gradiente. Entonces estaba reciente la publicación pionera de Helenius y Simons [3], basada en membra-

nas de virus, en la que se proponían las tres etapas de la solubilización, mencionadas en la sección 2.4. El estudio de Gurtubay y cols. proporcionó un importante respaldo experimental a las ideas de Helenius y Simons. El detergente parecía actuar induciendo una transición de fase de membrana lamelar a micelas mixtas de proteína-lípido-detergente. Las membranas internas mostraban diferentes patrones de microscopía electrónica después del tratamiento con diferentes cantidades de tensioactivo (Fig. 12), mientras que las imágenes correspondientes de las membranas externas variaban solo ligeramente. Se observó una solubilización selectiva de varios componentes, especialmente en el caso de la membrana interna. Algunos lípidos de la membrana (p. ej., cardiolipina) se solubilizaban totalmente a concentraciones de detergente con las que otros, como la esfingomielina, permanecían en la membrana. Otros componentes de la membrana interna (flavinas, citocromos, coenzima Q) mostraron cada uno diferentes patrones de solubilización. Esto permitía la selección de condiciones para la solubilización óptima de un determinado componente de membrana con cierto grado de selectividad. También se estudió la influencia del Triton X-100 en diversas actividades enzimáticas de la membrana interna mitocondrial. El detergente parecía actuar especialmente mediante la alteración de la topología de los complejos funcionales, aunque al parecer se conservaba la actividad de las enzimas individuales. Las actividades enzimáticas relativamente simples, como la ATPasa, se solubilizaban más o menos según la concentración de detergente, mientras que la actividad succinato-citocromo c reductasa, estructuralmente más compleja, prácticamente desaparecía incluso a concentraciones bajas de Triton X-100.

Los efectos funcionales del Triton X-100 sobre la mitocondria, a concentraciones inferiores a las que producen solubilización, fueron objeto de trabajos ulteriores. Así Barbero y cols. [134] estudiaron con detalle la oxidación del succinato en las mitocondrias y su alteración por Triton X-100. Las actividades específicas de la succinato:coenzima Q reductasa, ubiquinona:citocromo c reductasa, citocromo oxidasa, succinato:citocromo c reductasa, succinato oxidasa y ubiquinol oxidasa se midieron en mitocondrias de hígado de rata en presencia de Triton X-100. Las últimas tres actividades resultaron ser mucho más sensibles a Triton X-100 que las primeras; los datos sugieren que los complejos lipoproteicos que conforman la cadena de transporte de electrones no pueden reaccionar entre sí en presencia del detergente. Al menos en el caso de la succinato:citocromo c reductasa, la reconstitución de las membranas tratadas con detergente con fosfolípidos añadidos externamente revierte la inhibición producida por Triton X-100. Estos resultados apoyan la idea de que los componentes de la cadena respiratoria difunden al azar en el plano de la membrana mitocondrial interna; el efecto principal del detergente sería perjudicar la difusión lateral al disminuir el área

de la bicapa lipídica. Cuando se centrifugaron suspensiones mitocondriales tratadas con detergente para separar el material solubilizado del material particulado, sólo las tres primeras actividades enzimáticas mencionadas anteriormente se encontraban en los sobrenadantes. Después de la centrifugación, se manifestó una actividad latente de ubiquinol: citocromo c oxidasa, mientras que el mismo proceso de centrifugación produjo la inhibición de la citocromo c oxidasa en presencia de ciertas concentraciones de Triton

X-100. Estos efectos podrían deberse a una solubilización selectiva de las subunidades reguladoras o catalíticas, o a un cambio conformacional del complejo enzima-detergente. Más tarde, utilizando partículas submitocondriales de corazón de buey, Goñi y cols. [135] observaron que los efectos del Triton X-100 a concentraciones sub-solubilizantes cambiaban según el estado fisiológico de las partículas: acopladas (funcionales), desacopladas (cadena transportadora de electrones y ATPasa activas, pero incapaces de producir ATP), e inhibidas con azida (cadena transportadora de electrones inactivada). Esto apoyaba la idea, entonces aún debatida, de que la síntesis de ATP en la fosforilación oxidativa pasaba por cambios conformacionales en la mitocondria.

4.2. VESÍCULAS DE RETÍCULO SARCOPLÁSMICO

Las células musculares tienen un retículo endoplásmico especializado en el almacenamiento/liberación de calcio en la contracción muscular, que se conoce como retículo sarcoplásmico (RS). El RS se aísla con facilidad a partir de músculo, y es muy rico en la llamada bomba de calcio, o ATPasa dependiente de Ca^{2+} (RS ATPasa, o Ca^{2+} -ATPasa) que se purifica con detergentes con relativa facilidad [136]. Las vesículas de RS han sido muy utilizadas en estudios de solubilización de membranas por detergentes.

En nuestro laboratorio, Villalain y cols. [137] estudiaron comparativamente los efectos producidos por los detergentes Triton X-100, dodecilsulfato de sodio (SDS) y colato de sodio sobre las vesículas del RS. En todos los casos, los efectos máximos se encontraron ya 5 min después de la adición de detergente. Triton X-100 y SDS eran aproximadamente diez veces más eficaces que el colato en la solubilización de proteínas y fosfolípidos. Tanto el Triton X-100 como el SDS mantenían la acumulación de Ca^{2+} en vesículas de SR a concentraciones de detergente por debajo de 10^{-3} M; concentraciones más altas provocaban sin embargo una fuerte inhibición. Por otro lado, el colato producía una inhibición gradual de la acumulación de Ca^{2+} en el rango de concentración entre 10^{-4} M y $2.5 \cdot 10^{-2}$ M. El Triton X-100 y el SDS causaban una solubilización gradual de la actividad específica de la CaCa^{2+} -ATPasa hasta una concentración de detergente 10^{-3} M, por encima de la cual se producía una fuerte inactivación, mientras que la solubilización de la enzima aumentaba con la presencia de colato en todo el rango de concentración en estudio. El estudio sugería que el comportamiento diferente del colato de sodio, en comparación con SDS o Triton X-100, estaba relacionado con las estructuras moleculares de los tensioactivos, rígida plana en el caso del colato, y lineal flexible en los otros dos casos.

Estos estudios fueron continuados por Prado y cols. [138], que estudiaron el efecto de Triton X-100 sobre las vesículas del retículo sarcoplásmico mediante técnicas químicas, ultraestructurales y enzimáticas. En proporciones bajas de detergente / membrana

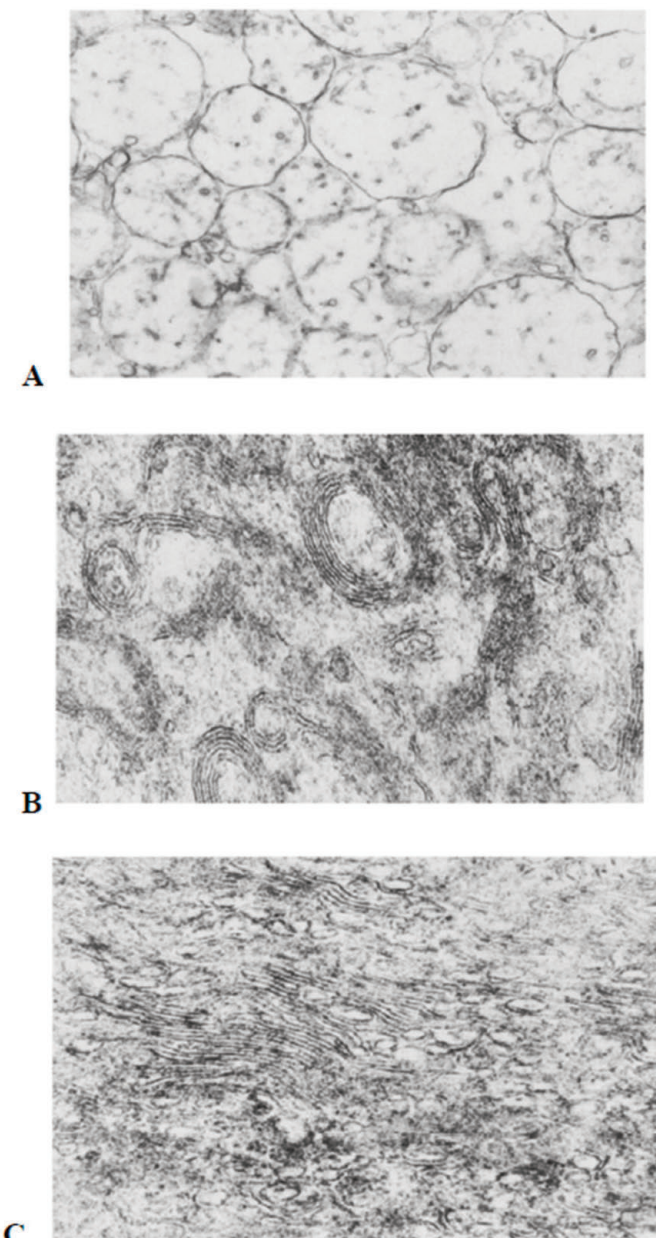


Figura 12. Micrografías electrónicas de cortes finos de pellets obtenidos por centrifugación de membranas internas mitocondriales tratadas con Triton X-100. Concentraciones de detergente: (A) 0%, (B) 0,05%, (c) 0,10%. Las vesículas de membrana interna (A), sufren lisis y reensamblaje, dando lugar a vesículas multilamelares (B), y posteriormente, a bicapas planas apiladas (C). Aumentos: A, 20.000, B, 33.000; C, 42.000 [133].

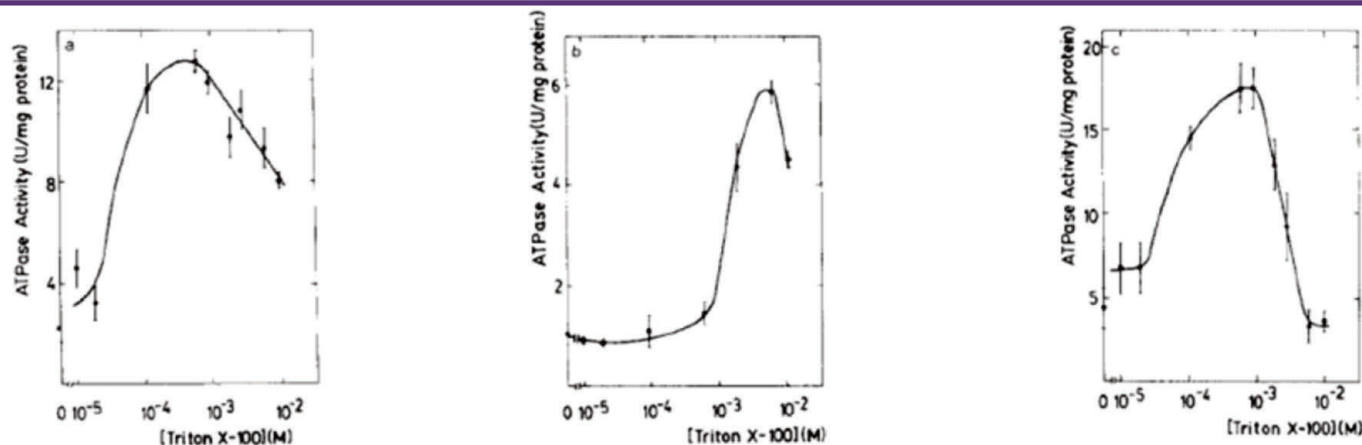


Figura 13. Efecto del Triton X-100 sobre la actividad específica de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico. En ausencia de detergente, la actividad era de 2,6 U/mg proteína. Las actividades se midieron en (a) suspensión completa de retículo sarcoplásmico, (b) sobrenadantes de la centrifugación de la suspensión anterior a 150.000 xg, 60 min, 4 °C, (c) sedimento post-centrifugación. Proteína: $8,7 \times 10^{-6}$ M; lípido: $6,2 \times 10^{-4}$ M. Valores medios \pm S.E. (n = 4).

(aproximadamente 1 Triton X-100 por 60 moléculas de fosfolípidos), el único efecto observado era un aumento en la permeabilidad de las vesículas. Concentraciones más altas de tensioactivo, hasta una proporción de detergente / fosfolípido de 1: 1, producían un gran aumento de la actividad ATPasa (Fig. 13). La solubilización de la membrana se producía como un fenómeno crítico cuando la relación molar tensioactivo / fosfolípido alcanzaba un valor de alrededor de 1,5: 1, correspondiente a $2 \mu\text{mol}$ de Triton X-100 / mg de proteína. En este punto, la turbidez de la suspensión caía, prácticamente toda la proteína y el fosfolípido se solubilizaba, y toda estructura organizada desaparecía. Simultáneamente, se observaba un aumento espectacular de la actividad específica de la ATPasa solubilizada. La repentina solubilización de casi todos los componentes de la bicapa a una determinada concentración de detergente se atribuyó a la relativa simplicidad de este sistema de membranas. La solubilización tenía lugar a la misma relación tensioactivo / membrana, al menos entre 0,5 y 4 mg de proteína de membrana / ml. El residuo no solubilizado parecía consistir principalmente en formas agregadas y deslipidizadas de ATPasa.

Los mismos autores se centraron a continuación en la solubilización del RS por dodecil sulfato sódico (SDS), seguida por espectroscopía IR [139]. Esta técnica espectroscópica permitía conectar los datos de solubilización de la bicapa con los cambios en la estructura de la proteína. El IR reveló que el SDS producía, de manera dependiente de la concentración, una disminución en la estructura de la hoja β , un cambio en los giros β y un aumento en la estructura desordenada de la Ca^{2+} -ATPasa. El aumento de la actividad enzimática inducida por SDS a una proporción molar de proteína detergente de 80: 1 era concomitante con una reducción de la estructura en hoja β y una reordenación de los giros β , un efecto similar al observado con Triton X-100 [138]. La estructura de la RS

Ca^{2+} -ATPasa consiste en un dominio intramembranoso, principalmente helicoidal, y varios dominios citoplasmáticos compuestos por hélices α , hojas β , giros β y elementos desordenados [139]. El espectro infrarrojo sugería una influencia de las moléculas de tensioactivo en los dominios citoplasmáticos, en lugar de los intramembranosos, de la Ca^{2+} -ATPasa a concentraciones de tensioactivo que potenciaban la actividad enzimática. Sin embargo, se había demostrado [137] que, en estas proporciones detergente / proteína, la capacidad de las vesículas de RS para acumular Ca^{2+} se ve afectada, probablemente debido a una mayor permeabilidad de la bicapa. Por tanto, el SDS podría actuar como un desacoplante para la Ca^{2+} -ATPasa, y el aumento de la actividad enzimática podría deberse a uno o ambos efectos tensioactivos, sobre la proteína y / o sobre la bicapa. La acción detergente sobre la proteína podría consistir en un 'aflojamiento' de la puerta del canal, o de una barrera compuesta por una estructura de hoja β delante de la puerta del canal, facilitando así el cambio conformacional inducido por la unión de ATP [154] y estimulando la bomba de Ca^{2+} . Con una alta concentración de SDS, la imagen era diferente: el aumento de la estructura desordenada se hacía obvio, incluso si todavía había alguna α -hélice presente. La pérdida de actividad enzimática podía deberse al menos a dos factores: uno, como se señaló anteriormente, a que la conformación general de la proteína en la micela se hallaba en gran medida modificada, y otro a que, incluso si la estructura del canal no se alterara, se mantendría en el interior de la micela, impidiendo así al sustrato alcanzar el sitio activo de la enzima.

La solubilización de RS por detergentes fue posteriormente estudiada con gran detalle por le Maire y cols. (ver una revisión en [140]). Según estos autores la solubilización implicaría una serie de estados intermedios que podrían estudiarse mediante diversos métodos fisicoquímicos y cinéticos; generalmente el proceso



comenzaría por la desestabilización del componente lipídico de las membranas, lo cual se vería acompañado por una modificación de la unión del detergente a la membrana (por debajo de la concentración micelar crítica, CMC) pasando de una interacción no cooperativa a una cooperativa. Esto conduciría a la formación de fragmentos de proteínas y lípidos de membrana con bordes protegidos por detergente. En la etapa final de solubilización, las proteínas de membrana estarían presentes como protómeros, con los dominios originalmente insertados en la membrana recubiertos por detergente. Los autores llegaron a la conclusión de que, en general, el mecanismo más probable para la solubilización consistiría en la unión del detergente en forma de anillo, más que formando una micela. Este modo de interacción estaría respaldado por investigaciones de difracción de neutrones sobre la disposición del detergente en cristales tridimensionales de proteínas de membrana. Por otra parte, le Maire y cols. contribuyeron a la clasificación de los detergentes mostrada en la Tabla 1 (sección 2.9). Los detergentes más utilizados en la solubilización del RS son el colato y desoxicolato sódicos, y otros estructuralmente relacionados. Todos ellos pertenecen, según le Maire y cols. a los llamados en la Tabla 1 detergentes del grupo B, con una velocidad de volteo (*flip*) de la cara externa a la interna relativamente lenta, lo que sería el paso limitante y determinante para una solubilización lenta [27]. Más adelante (4.4.c) comentaremos nuevos datos sobre este aspecto cinético de la solubilización.

4.3. MEMBRANA PÚRPURA DE *HALOBACTERIUM*

Las bacterias del género *Halobacterium* contienen en su membrana plasmática unos dominios ("membrana púrpura", MP) que consisten en cristales bidimensionales de la proteína bacteriorrodopsina junto con lípidos característicos. El grupo prostético retinal que posee la bacteriorrodopsina imparte a los cristales su color púrpura característico, y puede existir en dos formas isoméricas, 13-*cis* y todo-*trans*. La MP ha sido muy utilizada para estudiar los efectos de los detergentes, pues el retinal sirve como sonda espectroscópica que informa de la situación de la proteína. A su vez, la bacteriorrodopsina ha servido con frecuencia como modelo de proteína intrínseca de membranas, por su relativamente fácil purificación en estado nativo.

En nuestro laboratorio, González-Mañas y cols. [141] observaron la interacción del Triton X-100 con las membranas púrpura de *Halobacterium*, a concentraciones de tensioactivo sublícticas y lícticas. Estas membranas presentaban una serie de peculiaridades importantes en su comportamiento hacia el tensioactivo. Aunque la solubilización era un proceso muy lento, con un tiempo medio del orden de horas, la unión del detergente parecía ocurrir a la misma velocidad que la encontrada en otras membranas. Los lípidos se so-

lubilizaban más fácilmente que las proteínas, de modo que casi nada de la proteína se solubilizaba a concentraciones de tensioactivo en las que aproximadamente el 75% del lípido estaba en forma de micelas mixtas con detergente. Sin embargo, una vez iniciada, la solubilización de proteínas tenía lugar dentro de un rango estrecho de concentraciones de tensioactivo. No se detectó variación en el espectro de absorción del retinal en la etapa prelíctica, es decir, cuando el detergente se incorporaba a la membrana en forma monomérica. La rotura de la membrana se acompañaba de un cambio al azul en el máximo de absorción, isomerización del retinal (de todo-*trans* a 13-*cis*) y una disminución de la absorbancia específica (blanqueamiento) (Fig. 14). El aumento de las concentraciones de detergente después de completada la solubilización no producía más cambios en el máximo espectral, pero la absorbancia específica disminuía progresivamente. Estos trabajos demostraron que Triton X-100 tiene un efecto complejo sobre el cromóforo retinal, modificando su configuración y microambiente (cambios en la longitud de onda máxima) y promoviendo la hidrólisis de la base de Schiff retinal-bacteriorrodopsina, lo cual se traduce en un blanqueamiento de la membrana.

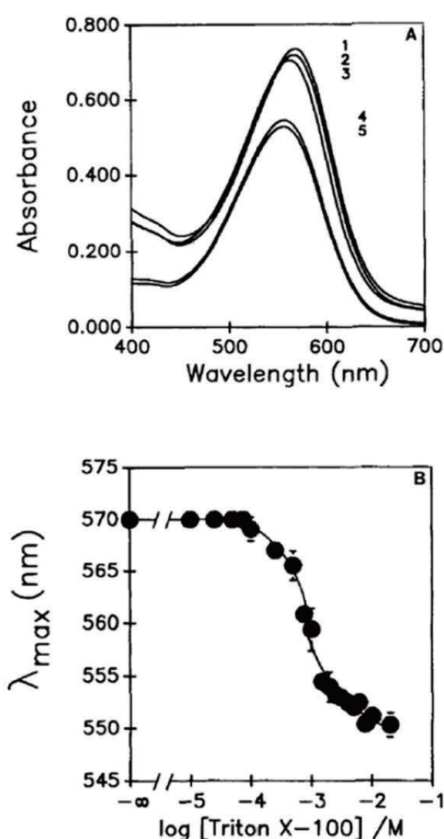


Figura 14. Cambios inducidos por el Triton X-100 en el espectro visible de la membrana púrpura. (A) Espectros registrados en ausencia (1) y en presencia (2-5) de detergente a concentraciones 0,1, 0,5, 3 y 10 mM respectivamente. (B) Máximo de absorción luminosa por la membrana púrpura, en función de la concentración de detergente [141].



En la MP iluminada predomina el isómero todo-trans del retinal, pero en la oscuridad, el equilibrio entre las dos formas isoméricas del retinal en la bacteriorrodopsina cambia lentamente hasta alcanzar concentraciones iguales. Esto se acompaña de un desplazamiento del espectro de absorción de 568 a 558 nm. Estudios posteriores de los autores citados [142] profundizaron en la cinética de la adaptación a la oscuridad de la membrana púrpura a pH 5 y 7, en presencia y ausencia del detergente Triton X-100. Se consideró el efecto de las concentraciones de tensioactivo tanto subópticas como ópticas. Los resultados mostraron que: (a) la adaptación a la oscuridad era más rápida a pH 5 que a pH 7, (b) la adaptación a la oscuridad era más lenta y de menor amplitud en presencia que en ausencia de Triton X-100. Los datos pudieron interpretarse en términos de un modelo cinético sencillo de primer orden, según el cual la adaptación luz-oscuridad dependería básicamente del equilibrio entre los isómeros 13-cis y todo-trans. Los experimentos también sugerían que a pH 5, pero no a pH 7, las concentraciones solubilizantes de tensioactivo producían un aumento considerable en la velocidad de la reacción de adaptación a la oscuridad, quizás a través de cambios en el microambiente de un grupo protonable.

Otro trabajo de nuestro laboratorio, relacionado con la MP, es el de Del Río y cols. [143], a partir de la observación de que la bacteriorrodopsina se podía solubilizar fácilmente con Triton X-100 y otros detergentes, pero no con desoxicolato. Para comprender este comportamiento, se examinaron los efectos de una variedad de tensioactivos. Se pudo demostrar que los detergentes que contienen el anillo de colano (colato, taurocolato, ácido 3 [(3-colamido)propil] dietilamonio] propanosulfónico ...) son virtualmente incapaces de solubilizar la bacteriorrodopsina nativa. Sin embargo, cuando la proteína se reconstituye en dimiristil fosfatidilcolina y se analiza la solubilización a una temperatura tal que la bacteriorrodopsina esté en forma de monómeros, se produce la solubilización por los detergentes de colano. Los autores propusieron que los factores estéricos impedían el acceso de las moléculas tensioactivas planas rígidas a las regiones proteicas hidrófobas. Estas quizás se encontrarían en la interfaz monómero-monómero, cuya solvatación por los tensioactivos sería esencial para producir la solubilización. Observaron que la capacidad de algunos detergentes para solubilizar la bacteriorrodopsina siempre estaba asociada, dentro del mismo rango de concentraciones de tensioactivo, con el blanqueamiento (parcial o total) del cromóforo de la proteína. El blanqueamiento inducido por detergente era al menos parcialmente reversible, lo que sugería que el retinal libre (hidrolizado) permanecía asociado de manera no covalente a algunos componentes de la membrana. Mientras que algunas moléculas de tensioactivo permanecerían fuertemente unidas a la proteína de la membrana, los detergentes de colano se pueden eliminar por completo de la

bacteriorrodopsina. Estos resultados indicaban que existía una relación estructura-función para los detergentes aplicados a la solubilización de bacteriorrodopsina, y son los precedentes de las clasificaciones funcionales de los detergentes como la que se muestra en la Tabla 1.

Otra contribución significativa al tema de la solubilización de la MP es la de Viguera y cols. [65], que exploraban las razones por las cuales la solubilización de estas membranas con detergentes necesita horas, o incluso días, para alcanzar el equilibrio, mientras que la mayoría de las biomembranas se solubilizan en cuestión de segundos o pocos minutos. Con ese objetivo, compararon los cambios en el espectro de absorción de la membrana púrpura producidos por el Triton X-100 hidrogenado en condiciones de equilibrio (24 h) con los provocados por el mismo tensioactivo en la escala de tiempo de minutos, segundos y fracciones de segundo. Hallaron que los diversos procesos que acompañan o conducen a la solubilización ya se detectaban, e incluso alcanzaban un equilibrio aparente, en los 10 s siguientes a la adición de detergente. No se detectaban nuevos fenómenos en los siguientes minutos u horas que fueran relevantes para el proceso en estudio. Esto llevó a la conclusión de que el largo proceso de solubilización consistía en la operación repetida de fenómenos simples que eran relativamente rápidos en sí mismos. Se propuso una hipótesis según la cual la rígida organización cristalina de la MP impediría la inserción de monómeros de detergente en la bicapa lipídica; en cambio, el tensioactivo se uniría a la periferia de los parches, es decir, a la región de contacto hidrocarburo-agua, y la solubilización se llevaría a cabo gradualmente, desde la periferia hacia el núcleo de los parches de membrana, a una velocidad progresivamente menor según descenden las cantidades de detergente libre, y los sitios de unión al detergente se reducen mediante los pasos de solubilización anteriores.

4.4. MEMBRANAS MODELO (LIPOSOMAS)

4.4.a. Lisis y reensamblaje (fusión) de membranas inducida por detergentes

Algunos de nuestros primeros estudios con liposomas estudiaron el efecto de los detergentes sobre vesículas pequeñas unilamelares, obtenidas por ultrasonación [80, 81]. La predicción de Alonso y cols. era que, al añadir el detergente, la turbidez de la suspensión de liposomas descendería, como resultado de la solubilización de membranas. Pero lo que observaron fue que el Triton X-100, dodecilsulfato de sodio, colato de sodio o beta-octilglucósido aumentaban el tamaño de las vesículas de fosfolípidos cuando estaban por encima de la temperatura de transición de gel a líquido-cristalina. El fenómeno observado de crecimiento de vesículas prácticamente no se veía afectado por la composición de fosfolípi-



dos, el potencial de superficie, los iones calcio, EDTA o la albúmina. La presencia de colesterol hacía que las vesículas fueran más susceptibles al crecimiento inducido por el detergente. Las concentraciones más altas de detergente causaban finalmente la solubilización de los liposomas. Estos estudios fueron continuados años más tarde por Urbaneja y cols. [94], que observaron cómo la solubilización de las vesículas pequeñas unilamelares comenzaba a bajas concentraciones de detergente, en comparación con el caso de vesículas grandes multilamelares, y se acompañaba de la rápida formación simultánea de grandes liposomas multilamelares. Las mediciones de la distribución de lípidos y detergente indicaban que, para una relación molar de lípido:detergente de 1:1, aproximadamente un tercio del lípido, con la mayor parte del detergente, se solubilizaba en forma de micelas mixtas. Los dos tercios restantes se encontraban en forma de liposomas multilamelares, prácticamente libres de detergente. Se consideró que estos resultados podían tener implicaciones con respecto a la fusión de membranas, así como a la reconstitución de proteínas de membrana en presencia de detergentes. Estas ideas encontraron más tarde su confirmación en los modelos de fusión de membranas propuestos en los años 90 y siguientes [144]. Se demostró además que los surfactantes potenciaban el papel del polietilenglicol utilizado experimentalmente para inducir fusión de células [145].

4.4.b. Permeabilización de membranas y liberación del contenido vesicular

La presencia de detergentes, incluso en concentraciones muy inferiores a las requeridas para observar cualquier aumento en el tamaño de las vesículas, favorece la liberación de su contenido [80, 81]. Esta observación, original en su día, ha recibido abundante confirmación experimental más tarde, en liposomas y en eritrocitos [30, 56]. Así, Ruiz y cols. [30] afrontaron un enfoque sistemático del fenómeno de la liberación de contenido liposómico dependiente

de tensioactivos. Estudiaron separada y comparativamente una serie de métodos distintos, y variaron el tamaño de la molécula atrapada, la naturaleza del tensioactivo, la composición de las bicapas y la ultrasonación de los liposomas. Para comparar diferentes resultados, se definió un parámetro, R50, como la relación molar fosfolípido / tensioactivo que produce una liberación del 50 % del soluto atrapado (Fig. 15). Este parámetro parecía ser, en gran medida, independiente de la concentración de liposomas. La liberación del contenido de liposomas inducida por tensioactivos no ocurría como resultado de la destrucción/solubilización de las bicapas de fosfolípidos, sino que era un fenómeno diferente, que ocurría a concentraciones de detergente sustancialmente más bajas (2-5 veces) que la solubilización. La cantidad requerida de tensioactivo parecía aumentar con el tamaño del soluto atrapado. El R50 dependía claramente de la naturaleza del anfífilo soluble, pero no existía una relación obvia con su concentración micelar crítica. La liberación del contenido de vesículas también dependía de la composición de la bicapa: los fosfolípidos tenían diferentes efectos sobre la estabilidad de la membrana, según sus cabezas polares. El colesterol era interesante, ya que en proporciones equimolares con fosfatidilcolina, disminuía la estabilidad de la bicapa frente al Triton X-100, mientras que la aumentaba en presencia de colato. La ultrasonación también ejercía una influencia sobre la liberación del contenido de vesículas dependiente del tensioactivo; parecía disminuir la estabilidad de la bicapa, por lo que se requerían concentraciones más bajas de detergente para liberar los solutos atrapados.

La liberación del contenido acuoso de las vesículas no es el único fenómeno producido por los detergentes a concentraciones sublípticas de la membrana. Ahyayauch y cols. [56] estudiaron por diversas técnicas los principales efectos de los detergentes a concentraciones subsolubilizantes sobre las membranas, a saber, el movimiento lipídico transmembrana (*flip-flop*), la ruptura de la barrera de permeabilidad de la membrana (liberación de contenidos) y la

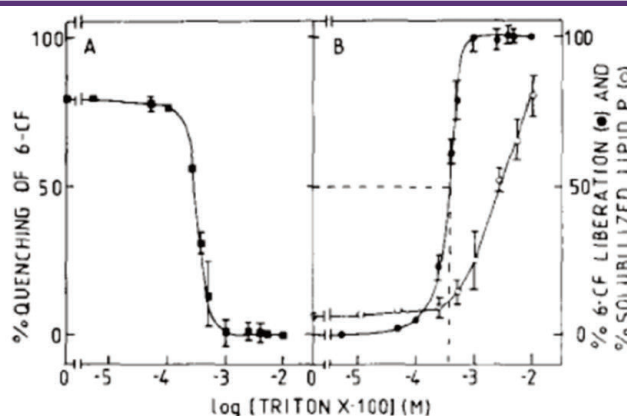


Figura 15. Utilización de la 6-carboxifluoresceína para detectar la permeabilización de liposomas inducida por detergente. (A) Porcentaje de auto-atenuación de la fluorescencia de la 6-carboxifluoresceína, originalmente encapsulada en liposomas, en función de la concentración de Triton X-100. (B) Círculos negros, porcentaje de liberación de 6-carboxifluoresceína; círculos blancos, porcentaje de fosfolípido solubilizado. Las líneas de puntos indican el procedimiento para calcular el parámetro R50.



lisis / reensamblaje de vesículas. Para una comprensión adecuada de la solubilización de membranas mediante detergentes, es importante evaluar si los diversos efectos observados a concentraciones de surfactante subsolubilizantes ocurren de forma independiente entre sí o están interconectados por relaciones de causa- efecto para que puedan interpretarse como pasos necesarios en el proceso general de solubilización. Para responder a esta pregunta, dichos autores exploraron los tres efectos mencionados anteriormente (*flip-flop*, fuga y lisis / reensamblaje), además de la solubilización o micelización, en membranas modelo (vesículas unilamelares grandes) y celulares (eritrocitos). Se utilizaron cinco tensioactivos estructuralmente diferentes, a saber, clorpromazina, imipramina, Triton X-100, dodecilsulfato de sodio y desoxicolato de sodio. Cada uno de ellos se comportó de forma diferente. Estos resultados revelaron que el *flip-flop* de lípidos, la fuga de vesículas y la lisis / reensamblaje de vesículas ocurrían de forma independiente entre ellos y con respecto a la solubilización de bicapas, por lo que no podrían considerarse partes necesarias y ordenadas de un proceso unificado de orden superior de solubilización de membranas por detergentes.

4.4.c. Solubilización de bicapas lipídicas por detergentes

Describimos en este apartado una serie de experimentos orientados a describir el fenómeno específico de la solubilización de membranas lipídicas, o sea su conversión en micelas mixtas lípido-detergente. Inicialmente se utilizaron bicapas formadas por fosfatidilcolina (lecitina) de huevo, con Triton X-100 como detergente. Más adelante se utilizaron otras composiciones lipídicas y otros surfactantes. En un artículo temprano [126] Goñi y cols. estudiaron el fenómeno de solubilización en condiciones de equilibrio. El equilibrio con vesículas grandes multilamelares se logró en menos de 24 h. Las estimaciones de la unión del detergente a las bicapas, utilizando [^3H]Triton X-100, indicaron que el anfífilo se incorporaba incluso a concentraciones muy bajas (por debajo de su concentración micelar crítica); a concentraciones de detergente justo por debajo de las que producen la solubilización de la membrana se producía un aumento espectacular en la cantidad de Triton X-100 unido. La solubilización se producía a proporciones molares fosfolípido / detergente cercanas a 0,65, independientemente de la concentración de lípidos. La perturbación producida por el tensioactivo en la bicapa de fosfolípidos se estudió mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC), RMN y espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier. A baja concentración de detergente (relaciones molares lípido / detergente superiores a 3), se producía una reducción en la separación cuadrupolar de ^2H -NMR, lo que sugería una disminución en el orden estático de las cadenas de acilo; el mismo efecto era detectado por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier en forma de

cambios al azul de las bandas de vibración de estiramiento de los metilenos. Simultáneamente, la variación de entalpía de la transición de fase principal de los fosfolípidos se reducía en aproximadamente un tercio con respecto a su valor en el sistema lípido / agua puro. Para relaciones molares de fosfolípido / detergente entre 3 y 1, la disminución del orden estático de los lípidos no prosiguió; más bien se observaba un aumento en la fluidez, caracterizado por una marcada disminución en la temperatura de transición del punto medio de la transición de fosfolípido gel a fluido. Al mismo tiempo, un componente isotrópico aparecía en los espectros de ^{31}P -NMR y ^2H -NMR, y se detectaba una nueva endoterma de baja temperatura en las trazas calorimétricas. Cuando el fosfolípido y el Triton X-100 estaban presentes a proporciones equimolares, persistía alguna estructura en bicapa, a juzgar por las observaciones calorimétricas, pero la RMN revelaba sólo señales isotrópicas de un componente. En relaciones molares lípido / detergente por debajo de la unidad, las líneas de RMN se volvían más estrechas, la endoterma calorimétrica principal (lamelar) tendía a desaparecer y se producía la solubilización.

Los aspectos cinéticos de la solubilización fueron explorados por Alonso y cols. [68]. Se trataron suspensiones de liposomas unilamelares pequeñas (ultrasonadas) y multilamelares grandes con el detergente no iónico Triton X-100, y se estudiaron los cambios subsiguientes en la turbidez en función del tiempo, utilizando un sistema de cinética rápida por flujo detenido. Las suspensiones de liposomas ultrasonadas exhibieron un aumento de la turbidez que tenía lugar en dos etapas, una rápida de baja amplitud, que se completaba en menos de 100 ms, y una lenta de gran amplitud, que ocurría en 20-40 s. El primer aumento de turbidez estaba asociado a la incorporación de detergente a la bicapa y el segundo a la fusión de vesículas. La etapa rápida se puede detectar en todas las concentraciones de detergente, mientras que la lenta solo se ve por encima de la concentración micelar crítica de Triton X-100. Ambos procesos podían interpretarse en términos de cinéticas de primer orden. Los estudios de la variación de la constante de velocidad aparente k_{exp} con la concentración de lípidos y detergente sugerían un mecanismo complejo de múltiples pasos. En el caso de los liposomas multilamelares, también se observó un rápido aumento de la turbidez después de la adición de detergente, seguido por una disminución lenta (20-60 s) de la turbidez y una disminución muy lenta (hasta 12 h) de la turbidez a gran escala. Estos procesos no se ajustaban a patrones exponenciales simples. También con estas vesículas grandes se concluyó que la etapa rápida reflejaba la incorporación de tensioactivo, mientras que la disminución de la turbidez se interpretó como la solubilización de la bicapa comenzando con la bicapa externa (etapa lenta) y avanzando a través de las restantes bicapas hacia el interior de la vesícula (etapa muy lenta).

Por su naturaleza hidrosoluble, los detergentes tienden a repartirse entre el medio acuoso y la membrana en los sistemas de tres componentes detergente — lípido — agua. La adecuada comprensión de los fenómenos de solubilización y relacionados requieren el estudio cuantitativo del reparto membrana — agua de los surfactantes, que se suele expresar normalmente como la relación efectiva detergente-lípido R_e en la membrana (ver sección 2.2). Parterroyo y cols. hicieron estas medidas para el sistema fosfatidilcolina — Triton X-100 — agua [146], y obtuvieron relaciones molares efectivas tanto para el inicio (R_e^{sat}) como para la finalización (R_e^{sol}) de la solubilización de las bicapas. Los valores de R_e^{sat} fueron de 0.71-0.78 y los de R_e^{sol} de 3.0 — 3.7 para las vesículas unilamelares. Las relaciones efectivas detergente: lípido resultaron ser independientes de la concentración de fosfolípidos.

Otra serie de estudios fueron dirigidos a observar la solubilización de bicapas en cuya composición entraban lípidos diferentes de la fosfatidilcolina de huevo. Así, Urbaneja y cols. [147] estudiaron la solubilización por Triton X-100 de liposomas multilamelares formados por mezclas de PC con colesterol, palmitato de colesterilo, betacaroteno, cardiolipina, fosfatidiletanolamina o gramicidina A (un péptido antibiótico de carácter hidrofóbico). La solubilización fue seguida a través de la disminución de la turbidez de la suspensión de liposomas, y también mediante la determinación de los componentes de la bicapa en la fracción solubilizada. El mismo patrón de solubilización se encontraba para PC insaturada (yema de huevo) o saturada (dimiristil PC). El colesterol se solubilizaba en paralelo con la PC; la gramicidina A se solubilizaba con preferencia a dicho fosfolípido, y los lípidos no-polares palmitato de colesterilo o betacaroteno permanecían insolubles a concentraciones de detergente que causaban la solubilización completa de la PC. La adición de cardiolipina o fosfatidiletanolamina no parecía alterar el patrón general de solubilización de la PC. La fosfatidiletanolamina era menos soluble que la PC, mientras que la cardiolipina se solubilizaba a las mismas concentraciones de detergente que la PC. Estos resultados pudieron utilizarse para la interpretación de estudios previos con membranas naturales.

En un paso más hacia la complejidad, Ahyayauch y cols. [148] observaron la influencia de las cadenas acilo de la PC en la solubilización. Ensayaron diecisiete fosfatidilcolinas diferentes, químicamente definidas, dispersas en medio acuoso en forma de vesículas grandes unilamelares, con el detergente no iónico Triton X-100. Las temperaturas (20 °C o 45 °C) eran tales que las bicapas estaban siempre en estado líquido desordenado. Para cada caso, los parámetros de solubilización, Don (relación molar de detergente total: lípido que produce el inicio de la solubilización) y D50 (relación molar de detergente total: lípido que produce 50 % de solubilización), se determinaron en condiciones de equilibrio. Ambos pará-

metros variaron generalmente en paralelo. Cuando se introdujeron dobles enlaces en las cadenas acilo, permaneciendo constantes otros factores, la solubilización se hizo más difícil, es decir, se requirió más detergente. Los fosfolípidos *cis*-insaturados requerían más detergente que los correspondientes isómeros *trans*. El aumento de la longitud de la cadena en los fosfolípidos saturados entre C12 y C16 disminuyó moderadamente las relaciones de detergente / lípido necesarias para la solubilización. Los fosfolípidos con cadenas acilo y alquilo fueron igualmente susceptibles a la solubilización por Triton X-100. El orden de las cadenas de los ácidos grasos, medido por la polarización de fluorescencia de DPH, pareció facilitar la solubilización, quizás porque las bicapas más ordenadas tienen una menor capacidad para acomodar monómeros de detergente sin descomponerse en micelas mixtas de lípido-detergente.

El tema de la carga eléctrica de bicapas y detergentes fue estudiado por Urbaneja y cols. [149], que examinaron la interacción de nueve tensioactivos cargados eléctricamente con liposomas neutros o cargados eléctricamente. Los detergentes pertenecían a las familias de alquilpiridinio, alquiltrimetilamonio o alquilsulfato. Se utilizaron liposomas unilamelares grandes formados por fosfatidilcolina de huevo con o sin estearilamina (catiónica) o fosfato de dicetilo (aniónico). Los resultados sugirieron que las fuerzas electrostáticas no juegan un papel significativo en la formación de micelas mixtas y que las interacciones hidrofóbicas son, con mucho, las principales fuerzas involucradas en la solubilización. Además, a partir del estudio de treinta sistemas diferentes de liposoma- surfactante, se derivaron una serie de reglas empíricas que pueden ser útiles para predecir el comportamiento de surfactantes no probados: (i) la concentración de detergente que produce el inicio de la solubilización (Don) disminuye a medida que aumenta la longitud de la cadena de alquilo; la disminución sigue un patrón semilogarítmico en el caso de compuestos de alquilpiridinio; (ii) para tensioactivos con concentraciones micelares críticas (cmc) inferiores a 6×10^{-3} M, Don es independiente de la naturaleza del detergente y de la composición de la bicapa; para detergentes que tienen cmc superior a 6×10^{-3} M, Don aumenta linealmente con la cmc; y (iii) Don varía linealmente con la concentración de tensioactivo que produce la máxima solubilización.

Más recientemente, Lete y cols. [150] hicieron un gran esfuerzo para entender la distinción entre detergentes que actúan lenta o rápidamente según su cabeza polar, o su capacidad de volteo de una monocapa a la otra (*flip-flop*) (ver 2.9.d y 4.2). Evaluaron la solubilización de vesículas lipídicas de fosfatidilcolina de huevo por veintidós detergentes estructuralmente heterogéneos disponibles comercialmente, mediante la disminución de la turbidez de la suspensión de vesículas, ampliando así notablemente los resultados expuestos en la Tabla 1. Se realizaron mediciones tanto en equilibrio como con resolución temporal. Los resultados mostraron que los de-



tergentes en estudio se clasificaban en una de dos categorías, a saber, detergentes de solubilización rápida y de solubilización lenta. Esta categorización era independiente de la concentración de detergente, es decir, un tensioactivo "lento" no se podía convertir en un tensioactivo "rápido" aumentando su concentración. Los espectros de ^{31}P -NMR indicaron que los detergentes de acción lenta causaban una micelización gradual y monótona de las bicapas (dodecilsulfato de sodio) o la formación de intermediarios no micelares más complejos, quizás no lamelares (dodecilmaltósido). Por el contrario, los detergentes rápidos (por ejemplo, Triton X-100) provocaban la lisis y el reensamblaje de las vesículas antes de que tuviera lugar la solubilización en masa. Estos resultados apoyan la idea de que la solubilización de la membrana por los detergentes es rápida solo cuando el movimiento transbica (volteo) del surfactante es fácil.

4.4.d. Membranas resistentes a los detergentes

Desde los primeros estudios de solubilización de biomembranas por detergentes [116] quedó claro que, en casi todos los casos, había una fracción de componentes de membrana que no se lograba solubilizar por completo. Este residuo se llamó "membranas resistentes a los detergentes", DRM por sus siglas en inglés. Ya hemos comentado (sección 3) la confusión que se creó en la década 1997-2006 cuando algunos autores asimilaron las DRM con las balsas lipídicas o *rafts*. En este apartado describiremos sucintamente nuestros esfuerzos por clarificar la situación, mediante el estudio de membranas modelo en equilibrio con detergente. Una vez más, el Triton X-100 fue el surfactante más utilizado en este contexto.

La hipótesis de los *rafts* [110] tuvo, entre otras virtudes, la de hacernos pensar en la posibilidad de dominios de membrana con propiedades distintas de las de la fase líquida-desordenada, por ejemplo microdominios en fase gel, o en fase líquido-ordenada. Por ese motivo comenzamos una larga serie de estudios examinando, en primer lugar, la solubilización de bicapas en fase gel, lo que hasta entonces apenas se había estudiado. Patra y cols. [102], midiendo la solubilización de las bicapas de fosfatidilcolinas saturadas por Triton X-100, pudieron observar que en el estado de gel, mucho más que en el estado fluido, la cantidad de detergente requerida para solubilizar el fosfolípido dependía en gran medida de la longitud de la cadena. Las PC con ácidos grasos saturados de 16 y 18 carbonos eran prácticamente insolubles a 4 °C. Sin embargo, la adición de reactivos solubles en agua que perturban el enlace de hidrógeno, por ejemplo, urea, o de pequeñas proporciones de lípidos con escasa tendencia a formar fases lamelares, hacía que las bicapas fueran susceptibles de solubilización por detergente, incluso a bajas temperaturas.

Un descubrimiento importante en el terreno de las DRM fue la constatación de que las bicapas que contenían esfingomielina

u otros esfingolípidos complejos eran más fácilmente solubilizables que las basadas en PC. Patra y cols [103] estudiaron experimentalmente la solubilización por Triton X-100 de vesículas unilamelares grandes formadas por esfingomielina de huevo pura o mezclas de esfingomielina:colesterol a diversas temperaturas. Para la esfingomielina pura, la solubilización ocurría más fácilmente a temperaturas justo por debajo de la temperatura de transición gel-fluido T_m . En general, la esfingomielina de huevo se solubilizaba con Triton X-100 más fácilmente que la fosfatidilcolina de huevo. Las mezclas de esfingomielina y colesterol eran insolubles en detergente en la mayoría de las condiciones. Se aplicó espectroscopia infrarroja para explorar las interacciones del colesterol y la esfingomielina a nivel de la interfaz lípido-agua. Además, se utilizaron varios análogos de colesterol (colestano, colestanona, androstenol) en experimentos de solubilización en paralelo con observaciones de IR. Los resultados mostraron que el colesterol modificaba la conformación (o las propiedades del enlace de H, o ambas cosas) del grupo de cabeza polar de la esfingomielina, tanto por encima como por debajo de T_m . Además, tanto el grupo hidroxilo en C3 como la cadena de hidrocarburos en C17 del núcleo esteroide parecen ser necesarios para que se detecte la insolubilidad. Estos resultados estarían relacionados con la insolubilidad observada de las 'balsas' de la membrana celular en detergente a 4 °C, y en general con el origen de las DRM.

Otro dato importante resultó ser el de la insolubilidad de las bicapas formadas por esfingomielina y ceramida [151]. En este trabajo, Sot y cols., para responder a algunas de las preguntas relevantes, comenzaron por buscar una composición de bica sencilla que imitara a las membranas resistentes a los detergentes. El cribado de múltiples composiciones lipídicas demostró que la mezcla binaria de esfingomielina de huevo / ceramida de huevo (SM / Cer) presentaba la resistencia a los detergentes requerida. En membranas sin detergente compuestas por diferentes mezclas de SM y Cer (5-30 % en moles de Cer), la calorimetría de barrido diferencial, la espectroscopia de fluorescencia y los experimentos de microscopia de fluorescencia revelaron la presencia de dominios discretos de gel enriquecidos en Cer en un amplio rango de temperaturas. En particular, a temperaturas por debajo de la transición de fase de SM (aproximadamente 40 °C), usando microscopia de fluorescencia, se observaban directamente dos fases gel (respectivamente enriquecidas en Cer y en SM). Aunque las membranas SM puras se solubilizaban completamente con Triton X-100 a temperatura ambiente, un 5% mol/mol de Cer era suficiente para inducir la resistencia al detergente, incluso con un gran exceso de detergente y tiempos de tratamiento prolongados. Las Cer de cadena corta no daban lugar a resistencia a los detergentes. Las mezclas de SM / Cer que contenían hasta 30 moles % de Cer se volvían completamente solubles

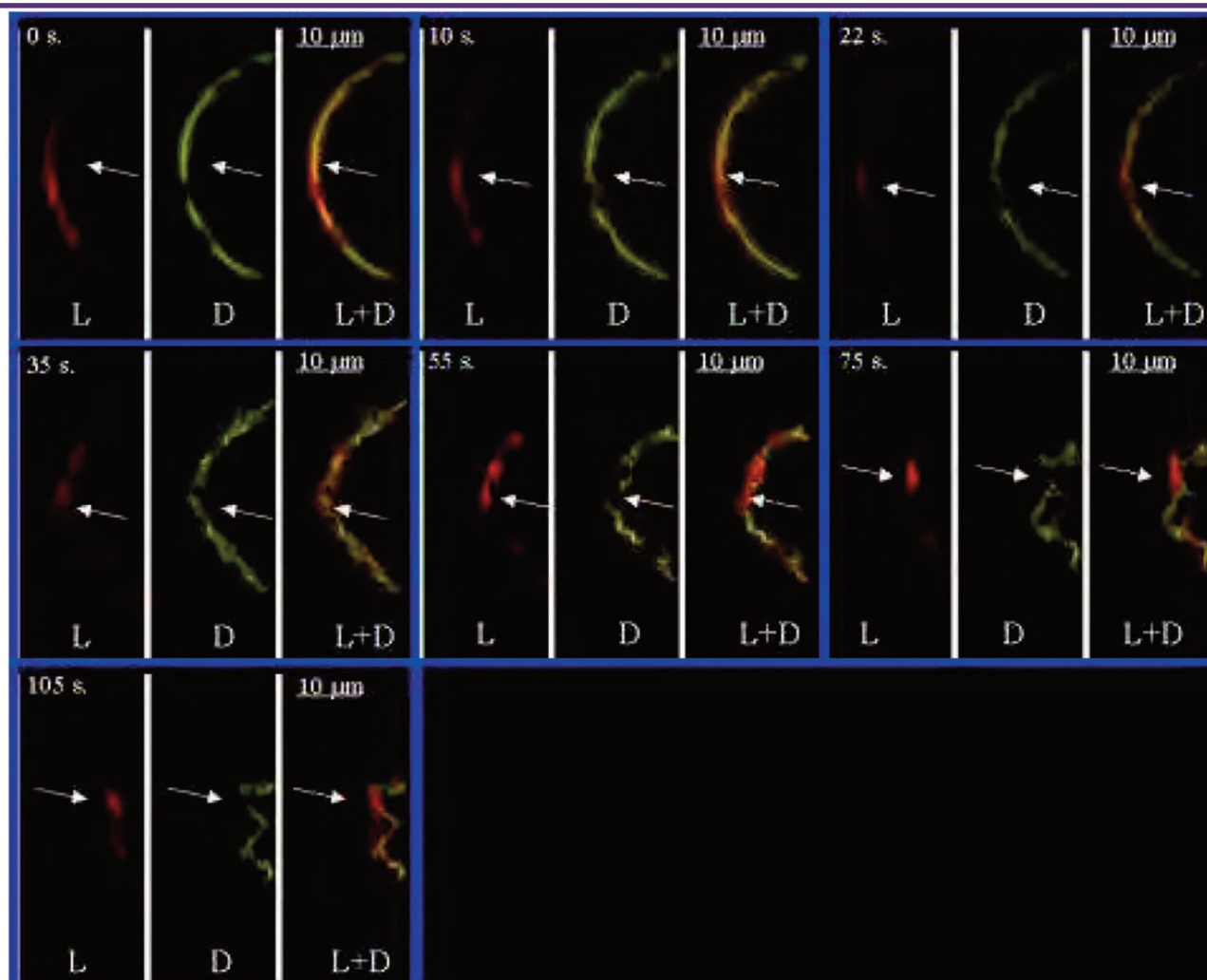


Figura 16. Microscopía confocal de fluorescencia. Estudio en función del tiempo (de 0 a 105 s) de la solubilización parcial de vesículas de esfingomielina y ceramida de huevo (relación molar 80:20) con doble tinción (Dil-C18, pseudocolor amarillo, tiñe preferentemente dominios fluidos y Laurdan, pseudocolor rojo, tiñe preferentemente dominios rígidos). Se muestran sólo los planos ecuatoriales. Cada grupo de tres figuras incluye imágenes teñidas por lauridan (L), por Dil-C18 (D) y una superposición de las dos anteriores (L + D). Las flechas indican la formación de un gran dominio enriquecido en ceramida [151].

a aproximadamente 50 °C, es decir, muy por encima de la temperatura de transición gel-fluido de la SM. Los resultados combinados de la solubilización dependiente de la temperatura y la calorimetría de barrido diferencial revelaron que los dominios ricos en SM se solubilizaban preferentemente sobre los ricos en Cer tan pronto como el primer lípido se fundía (es decir, a aproximadamente 40 °C). Como consecuencia, a temperaturas que permiten sólo una solubilización parcial, el residuo no solubilizado se enriquece en Cer con respecto a la composición de la bicapa original. La microscopía de fluorescencia de vesículas unilame-lares gigantes a temperatura ambiente muestra claramente que los dominios ricos en SM se solubilizan preferentemente sobre los ricos en Cer y que estos últimos se vuelven más rígidos y extensos como consecuencia de los efectos de los detergentes. Estas observaciones proporcionaron un fundamento físico-químico para los fenómenos de señalización dependiente de esfingomielinasa, generación de "plata-formas de balsa" y membranas celulares resistentes a detergentes.

Desde Patra y cols. [103] se sabe que las bicapas de SM se solubilizan más fácilmente que las de PC. Una posible explicación era que el Triton X-100 tuviera mayor afinidad por las bicapas de SM. Por otra parte, la hipótesis de los *rafts*, en uno de sus corolarios, sostenía que los lípidos a baja T se solubilizaban más difícilmente que a T alta, aunque esto ya se había mostrado contrario a la experiencia [63, 102]. Arnulphi y cols. [52] examinaron estas proposiciones midiendo el reparto lípido-agua del detergente no iónico Triton X-100 a concentraciones sub-solubilizantes, con bicapas de esfingomielina de huevo (SM), palmitil SM o dipalmitilfosfatidilcolina. Los tres lípidos exhiben una transición de fase gel-fluido en el rango de temperatura de 38-41 °C. Solo se realizaron experimentos a concentraciones de Triton X-100 muy por debajo de la concentración micelar crítica, por lo que solo deben considerarse los monómeros de detergente. Las relaciones molares lípido / detergente nunca fueron <10:1, lo que garantiza que nunca se alcanzó la

etapa de solubilización. Se aplicaron calorimetría de titulación isotérmica, DSC y espectroscopias de infrarrojos, fluorescencia y ^{31}P -NMR en el rango de temperatura de 5-55 °C. Los resultados mostraron que, independientemente de la naturaleza química del lípido, los valores de ΔG de reparto lípido/agua permanecieron en torno a -27 kJ / mol de lípido en la fase de gel y a -30 kJ / mol de lípido en la fase fluida. Esta pequeña diferencia no puede explicar las diferencias observadas dependientes de la fase en la solubilización. Estos valores prácticamente constantes de ΔG se produjeron como resultado de la compensación de los componentes entálpicos y entrópicos, que variaron tanto con la temperatura como con la composición de lípidos. En consecuencia, las diferentes susceptibilidades a la solubilización observadas no se pueden atribuir a diferencias en la unión detergente-bicapa sino a eventos adicionales en el proceso de solubilización, por ejemplo, diferente saturabilidad de bicapa por detergente o distinta propensión a formar micelas mixtas lípido-detergente. Los datos aquí resumidos arrojaron luz sobre las primeras etapas relativamente inexploradas de la solubilización de membranas y abrieron nuevas formas de comprender el fenómeno de la resistencia de las membranas a la solubilización por detergentes.

En relación con la observación [63, 102] de que las bicapas en fase gel requerían menos detergente para su solubilización que las que se hallan en fase fluida (al contrario de lo que muchos aseguraban), y para probar si esto se debía a una más fácil saturabilidad de la bicapa por el detergente, Ahyayauch y cols. [48] pudieron demostrar, a partir de datos de turbidez, calorimetría y ^{31}P -NMR, que las bicapas en estado de gel (al menos hasta 13-20 °C por debajo de la temperatura de transición gel-fluido) se saturaban con detergente a concentraciones de detergente significativamente más bajas que las del estado fluido, independientemente de la temperatura. La diferente saturación podía explicar las diferencias observadas en la solubilización, y así estos datos proporcionaron una base física sólida a la observación de que para solubilizar bicapas en fase gel se necesitaba menos, y no más, detergente que cuando las membranas se hallaban en fase fluida.

En otra serie de experimentos, Ahyayauch y cols. [152] exploraron las primeras etapas de la solubilización de bicapas formadas por SM y ceramida (Cer), que son muy resistentes a la solubilización por Triton X-100 [151]. Para ello utilizaron una combinación de técnicas calorimétricas y espectroscópicas. Examinaron composiciones basadas en esfingomielina, con hasta un 30% molar de Cer, a 4, 20 y 50 °C. La presencia de Cer no modificaba la afinidad por el Triton X-100 (en términos de ΔG de unión por mol de lípido total) de las bicapas basadas en SM, aunque sí aumentaba la cantidad de detergente requerida para el inicio de la solubilización. A 50 °C se requirió más detergente para solubilizar las bicapas SM /

Cer que a 20 °C. Es decir, tanto la presencia de Cer como la elevada T aumentaban la cantidad de detergente unido a bicapa necesario para iniciar su solubilización. Estos datos se pudieron racionalizar en términos de geometrías e interacciones de lípidos y detergentes [26].

Nuestro último, por el momento, esfuerzo por comprender el origen de la resistencia de ciertas fracciones de membrana a la solubilización por detergentes ha consistido en un estudio comparativo de la solubilización por Triton X-100 de mezclas binarias compuestas por esfingomielina de huevo (SM) y ceramida, o bien diacilglicerol, o colesterol [153]. La solubilización se ensayó en el rango de 4-50 °C, y los resultados se pudieron resumir en la que creemos ser una nueva forma de gráficos, que hemos llamado diagramas de temperatura-solubilización. A pesar de usar un gran exceso de detergente (relación lípido / detergente 1:20 en moles) y tiempos de solubilización prolongados (24-48 h), ciertas mezclas no podían ser solubilizadas por el Triton X-100 a una o más temperaturas. La DSC de todas las mezclas de lípidos y de todas las mezclas de lípido + detergente reveló que la resistencia al detergente estaba asociada con la presencia de dominios en fase gel a la temperatura del ensayo. Una vez que el sistema se "fundió" (pasó por encima de T_m), pudo producirse la solubilización. En general, la adición de lípidos de alto punto de fusión limitó la solubilización, mientras que la adición de lípidos de bajo punto de fusión la promovió. El análisis lipídico de las membranas celulares de riñón canino Madin-Darby y de la correspondiente fracción DRM indicó un gran enriquecimiento en diacilglicerol saturado y ceramida en las fracciones no solubilizadas. Las mezclas de SM-colesterol eran especiales

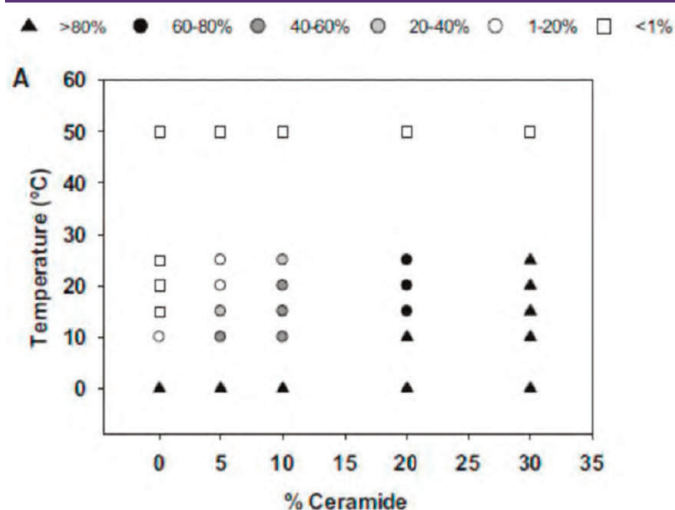


Figura 17. Ejemplo de un diagrama temperatura-solubilización [153]. El diagrama representa la turbidez (%A500) de dispersiones lipídicas (MLV) 48 h después de la adición de Triton X-100, en este caso para bicapas de SM/Cer. Los distintos símbolos indican el descenso de turbidez alcanzado (ver la escala arriba). El 100% corresponde a la turbidez en ausencia de detergentes. Relación molar detergente:lípido 20:1.



porque la solubilización del detergente iba acompañada, para ciertas temperaturas y composiciones, por un fenómeno independiente de reensamblaje de las bicapas lipídicas parcialmente solubilizadas. La temperatura a la que prevaleció la lisis y el reensamblaje fue de $\sim 25^\circ\text{C}$, por lo que para algunas mezclas de SM-colesterol la solubilización se produjo tanto por encima como por debajo de 25°C , pero no a esa temperatura. Estas observaciones pueden estar en el origen de los efectos de resistencia a los detergentes observados con las membranas celulares, y también significan que los restos de membranas resistentes a los detergentes que contienen colesterol pueden no corresponder a estructuras existentes en la membrana nativa antes de la adición del detergente.

Concluimos esta sección con una nota metodológica. Aunque muchos investigadores no sean conscientes de ello, los estudios cuantitativos de solubilización por detergentes se ven alterados con frecuencia por artefactos producidos durante la separación física de las fracciones solubilizada y resistente. Esto ocurre con prácticamente todos los métodos de separación, que son fundamentalmente centrifugación, filtración por membranas y filtración molecular por gel. El problema fue resuelto en nuestro laboratorio, al estudiar las mezclas lípido-detergente por ^{31}P -NMR (Fig. 9). Esta técnica sólo detecta núcleos que giran con rapidez, como ocurre en el caso de las micelas, pero no con las bicapas. En consecuencia, la ^{31}P -NMR permite medir la fracción micelizada (solubilizada) de una muestra sin separarla de la fracción no solubilizada. Ahayyauch y cols. [50] demostraron la aplicabilidad de la técnica al estudiar comparativamente la solubilización de las mezclas PC – colesterol y SM – colesterol, las últimas, como ya sabemos, mucho más difíciles de solubilizar.

5. APLICACIONES BIOFARMACÉUTICAS

Las aplicaciones de los detergentes a la farmacia son innumerables. Aquí nos limitaremos a exponer algunos ejemplos.

Fármacos detergentes. En primer lugar, se deben mencionar los fármacos con propiedades detergentes, es decir, moléculas de uso terapéutico que son anfífilos solubles, y por lo tanto es de suponer que su mecanismo de acción debe incluir, al menos parcialmente, las consecuencias de esta propiedad. Es el caso, por ejemplo, del antipsicótico clorpromazina y del antidepresivo imipramina, cuyas propiedades solubilizantes de membranas fueron demostradas entre otros por Ahayyauch y cols. [93]. Otro caso es el del dioctil sulfosuccinato de sodio (docusato sódico) detergente aniónico utilizado como laxante emoliente [154]. Debemos quizá también incluir en este apartado a la dipalmitil fosfatidilcolina, un surfactante, aunque no un detergente, utilizado como medicamento de sustitución en el síndrome de dificultad respiratoria neonatal.

Detergentes y estabilidad de los fármacos. Las micelas y otros agregados supramoleculares pueden afectar profundamente la estabilidad de los fármacos [155]. Los enlaces éster y amida son afectados particularmente, sobre todo por los detergentes con cargas eléctricas netas. Los efectos suelen estar relacionados con dos factores independientes, a saber, el coeficiente de partición del fármaco en la micela y el mecanismo de la reacción en el agregado. Los estudios publicados hacen referencia sobre todo a detergentes sintéticos, pero cabe esperar que los múltiples tensioactivos biológicos, p. ej. muchas proteínas, van a tener efectos similares. Por citar algunos casos característicos, los detergentes no-iónicos protegen de la hidrólisis al enlace éster del ácido acetilsalicílico, y lo mismo ocurre con el enlace éster de los anestésicos locales procaina, tetracaina y benzocaína. Entre las moléculas con enlaces amida, los detergentes eléctricamente neutros protegen al antiinflamatorio indometacina de la degradación hidrolítica, mientras que los catiónicos (ejemplo, hexadeciltrimetilamonio bromuro, HTAB) facilitan la reacción. En el caso de las benzodiazepinas, las micelas de detergentes neutros o catiónicos no afectan a la hidrólisis del enlace amida, que sin embargo es fuertemente inhibida por los detergentes aniónicos. Entre los antibióticos beta-lactámicos, la hidrólisis de su enlace característico se ve con frecuencia afectada por los surfactantes: la hidrólisis ácida de la propicilina y la cefazolina son estabilizadas por el HTAB e inhibidas por el aniónico SDS, probablemente por interacciones coulombicas con el H^+ [155].

Preparaciones farmacéuticas. El monumental Handbook of Detergents de Uri Zoller, en su parte E [154], y el menos voluminoso, pero muy informativo *Liquid Detergents*, de Kuo-Yann Lai [156], contienen información valiosísima sobre el papel de los detergentes en las preparaciones farmacéuticas y usos clínico-sanitarios. Según Zoller, la americana *Food and Drug Administration* (FDA) ha aprobado varias docenas de surfactantes para su uso en preparaciones farmacéuticas, entre ellos los polioxietilenglicol éteres de n-alcoholes, familia con la que está relacionado el Triton X-100, los poloxámeros y el dodecil sulfato sódico (SDS). Los detergentes son ampliamente utilizados en las formas para uso oral, incluidas nanopartículas y dispersiones sólidas, con el fin de proteger los fármacos y facilitar su absorción en el tracto gastrointestinal. En la administración parenteral se usan sistemas coloidales para direccionar los fármacos o para conseguir su liberación controlada. Con este fin se utilizan a menudo moléculas surfactantes, aunque no necesariamente detergentes, como la lecitina, una mezcla de lípidos de soja que emulsiona los triglicéridos y estabiliza así las formas parenterales tipo Intralipid, o verdaderos detergentes como los polioxil derivados del aceite de ricino que se dispersan en forma de micelas y se utilizan en la administración de fármacos muy hidrofóbicos, como el paclitaxel.



Para uso tópico, se aprueba la utilización de diversos detergentes en aplicaciones oftálmicas, vaginales, nasales y dérmicas. La administración de fármacos insolubles en agua en forma de colirios se consigue, por ejemplo, mediante el uso de poloxámeros, o de polisorbato 80. Para usos vaginales se ha utilizado el monoestearato de glicerilo, los poloxámeros y los polisorbatos. Los polisorbatos se usan también para aplicaciones locales nasales. Las cremas, pomadas y lociones de uso dérmico contienen a menudo liposomas, o las vesículas formadas por detergentes no-iónicos llamadas niosomas (Zoller, cap. 18).

Biosurfactantes. Parece adecuado incluir aquí una breve mención a los llamados biosurfactantes, que se suelen definir como surfactantes de origen microbiano. Entre ellos se encuentran los rhamnolípidos, producidos por algunas especies de *Pseudomonas*, los sophorolípidos, sintetizados por levaduras, o el emulsano, producido por *Acinetobacter calcoaceticus*. Sus aplicaciones surfactantes incluyen preparaciones herbicidas, pesticidas, detergentes domésticos, usos farmacéuticos y cosméticos. Los biosurfactantes presentan la ventaja de poder obtenerse en grandes cantidades a partir de cultivos microbianos a gran escala. Además, muchas de sus aplicaciones no requieren una purificación exhaustiva de los mismos. Su biodegradabilidad y baja toxicidad han hecho de los biosurfactantes una "estrella" de la "química verde" y de la "industria sostenible" [157, 158].

Detergentes e higiene personal. Por razones operativas, la industria distingue entre los detergentes líquidos y los sólidos. Los detergentes líquidos para la higiene personal (*light-duty*) se desarrollaron a partir de 1950 (Lai, cap. 7). Se trataba de surfactantes aniónicos, de tipo alquilbenceno sulfonato, a los que se añadían alcanolamidas para reforzar la espuma, un aspecto éste más bien psicológico, pero demandado por los consumidores. A partir de los años 60 se añadieron también agentes antimicrobianos. Desde los años 90 se han incorporado nuevos detergentes (p. ej. etoxisulfatos de cadena ramificada), nuevos antimicrobianos, polímeros que facilitan la retirada de la grasa, y diversos enzimas. A veces la base de estos "nuevos" detergentes líquidos es el oleato potásico. El siglo XXI ha visto el desarrollo de preparaciones con determinados colores y aromas supuestamente atractivos, dando lugar a productos con nombres comerciales tales como *Spring Sensations* (Colgate-Palmolive), *Joy Invigorating Splash* o *Dawn Fresh Escapes* (Procter & Gamble), este último con "brotes de manzana, explosión de cítricos y mezcla de flores salvajes".

Los detergentes sólidos más utilizados para la higiene personal siguen siendo los jabones sódicos, es decir las sales sódicas de ácidos grasos (con frecuencia creciente, se usan los de origen ve-

getal con preferencia a las grasas animales). Son las pastillas de jabón que, con ciertos aditivos y perfumes, constituyen el llamado jabón de tocador, presente de manera casi universal en nuestros hogares.

Cerramos así el círculo de este trabajo, volviendo a los jabones utilizados en el lavado de manos para eliminar las partículas de SARS-CoV-2. Ahora comprendemos mejor el mecanismo por el cual esta operación tan sencilla destruye la membrana del virus, haciéndolo inviable. Sólo esperamos que llegue pronto el momento en que la ciencia (y solo la ciencia) alcanzará a controlar este agente patógeno.

ABREVIATURAS

BLM, black lipid membranes
Cer, ceramida
cmc, concentración micelar crítica
COVID-19, coronavirus disease 2019
crio-TEM, crio-microscopía electrónica de transmisión
DPPC, dipalmitil fosfatidilcolina
DRM, detergent-resistant membranes, membranas resistentes a los detergentes
Dtsat / Dtsol, concentración total de detergente requerida para el inicio / la finalización de la formación de micelas mixtas
GUV, giant unilamellar vesicles, vesículas gigantes unilamelares
ITC, isothermal calorimetry, calorimetría isotérmica lo / ld, fase lamelar fluida ordenada / desordenada
LUV, large unilamellar vesicles, vesículas unilamelares grandes
MLV, multilamellar vesicles, vesículas multilamelares
PC, fosfatidilcolina
Resat / Resol, relación molar efectiva [detergente] : [lípidos] que produce el comienzo de la micelización / la micelización completa
RMN, resonancia magnética nuclear
SARS-CoV-2, Severe Acute Respiratory Syndrome — coronavirus — 2
SDS, sodio dodecil sulfato
SLM/SLB, supported lipid membranes/bilayers, membranas / bicapas lipídicas apoyadas
SM, esfingomielina
SUV, small (sonicated) unilamellar vesicles, vesículas unilamelares pequeñas (ultrasonadas).

Agradecimientos

Los autores desean mostrar su gratitud a los colegas y estudiantes que durante tantos años les han prestado su colaboración fiel y entusiasta en sus investigaciones sobre detergentes. Deseamos

destacar en particular a nuestro técnico de laboratorio, Dr. Jesús Sot, y a nuestra antigua colaboradora, ahora en Rabat, Dra. Hasna Ahayauch. De los colegas internacionales que han compartido con nosotros horas de análisis y discusión deseamos mencionar especialmente a los profesores Kai Simons (Dresden), Dov Lichtenberg (Tel Aviv) y Heiko Heerklotz (Friburgo de Brisgovia).

Nuestras investigaciones han sido subvencionadas, a lo largo de los años, por la Unión Europea, el Gobierno de España, el Gobierno Vasco, la Diputación Foral de Bizkaia y la Universidad del País Vasco.

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflicto de intereses de ningún tipo.

6. REFERENCIAS

1. Surface and bulk interactions of lipids and water with a classification of biologically active lipids based on these interactions. Small DM. Fed Proc. 1970;29(4):1320-6.
2. The hydrophobic effect and the organization of living matter. Tanford C. Science. 1978; 200(4345):1012-8.
3. Solubilization of membranes by detergents. Helenius A, Simons K. Biochim Biophys Acta. 1975; 415(1):29-79.
4. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Singer SJ, Nicolson GL. Science. 1972; 175(4023):720-31.
5. The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the Singer- Nicolson model. Goñi FM. Biochim Biophys Acta. 2014; 1838(6):1467-76.
6. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. Gorter E, Grendel F. J Exp Med. 1925; 41(4):439-43.
7. Surface tension. Pokels A. Nature 1891; 46:437-39.
8. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. Mueller P, Rudin DO, Tien HT, Wescott WC. Nature. 1962; 194:979-80.
9. Supported phospholipid bilayers. Tamm LK, McConnell HM. Biophys J. 1985; 47(1):105-13.
10. Atomic force microscopy of supported planar membrane bilayers. Singh S, Keller DJ. Biophys J. 1991; 60(6):1401-10.
11. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. J Mol Biol. 1965; 13(1):238-52.
12. Studies on membrane fusion. I. Interactions of pure phospholipid membranes and the effect of myristic acid, lysolecithin, proteins and dimethylsulfoxide. Papahadjopoulos D, Hui S, Vail WJ, Poste G. Biochim Biophys Acta. 1976;448(2):254-64.
13. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure: characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. Hope MJ, Bally MB, Webb G, Cullis PR. Biochim Biophys Acta. 1985;812(1):55-65.
14. Electric-field-dependent thermal fluctuations of giant vesicles. Mitov MD, Méléard P, Winterhalter M, Angelova MI, Bothorel P. Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics. 1993; 48(1):628-631.
15. Giant unilamellar vesicles electroformed from native membranes and organic lipid mixtures under physiological conditions. Montes LR, Alonso A, Goñi FM, Bagatolli LA. Biophys J. 2007; 93(10):3548-54.
16. Reconstitution of membrane processes. Racker E. Methods Enzymol. 1979; 55:699-711.
17. Special Issue: Detergents in biomembrane studies. Goñi FM, Alonso A. (eds.). Biochim Biophys Acta. 2000; 1508:1-252.
18. Liposomes as a model for solubilization and reconstitution of membranes. Lichtenberg D. In: Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes (Barenholz, Y. and Lasic, D.D., eds.), pp. 199–218, 1996, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
19. Interactions of surfactants with lipid membranes. Heerklotz H. Q Rev Biophys. 2008; 41(3-4):205-64.
20. Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. Lichtenberg D. Biochim Biophys Acta. 1985; 821(3):470-8.
21. Detergents: an overview. Linke D. Methods Enzymol. 2009; 463, 603-617.
22. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. Seddon AM, Curnow P, Booth P.J. Biochim. Biophys. Acta 2004; 1666:105-117.
23. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. Lichtenberg D, Goñi FM, Heerklotz H. Trends Biochem Sci. 2005; 30(8):430-6.
24. Membrane protein solubilization. Duquesne K, Sturgis JN. Methods Mol Biol. 2010;601:205-17.
25. Strategies for the purification of membrane proteins. Smith SM. Methods Mol Biol. 2011; 681:485-96.
26. Detergent solubilization of lipid bilayers: a balance of driving forces. Lichtenberg D, Ahyauch H, Alonso A, Goñi FM. Trends Biochem Sci. 2013;38(2):85-93.
27. The mechanism of detergent solubilization of lipid bilayers. Lichtenberg D, Ahyauch H, Goñi FM. Biophys J. 2013; 105(2):289-99.
28. Physical principles of membrane organization. Israelachvili JN, Marcelja S, Horn RG. Q Rev Biophys. 1980; 13(2):121-200.
29. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. Israelachvili, JN, Mitchell DJ, Ninham DW. J. Chem. Soc. Faraday Trans. II 1976; 72,1525–1568.
30. Surfactant-induced release of liposomal contents. A survey of me-



- thods and results. Ruiz J, Goñi FM, Alonso A. *Biochim Biophys Acta*. 1988; 937(1):127-34.
31. Intermediate structures in the cholate-phosphatidylcholine vesicle-micelle transition. Walter A, Vinson PK, Kaplun A, Talmon Y. *Biophys J*. 1991; 60(6):1315-25.
 32. Structural and kinetic studies on the solubilization of lecithin by sodium deoxycholate. Lichtenberg D, Zilberman Y, Greenzaid P, Zamir S. *Biochemistry*. 1979;18(16):3517-25.
 33. Detergent-phospholipid mixed micelles with a crystalline phospholipid core. Funari SS, Nuscher B, Rapp G, Beyer K. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(16):8938-43.
 34. Formation of Polymerlike Mixed Micelles and Vesicles in Lecithin-Bile Salt Solutions: A Small-Angle Neutron-Scattering Study. Pedersen JS, Egelhaf SU, Schurtenberger P. *J. Phys. Chem.* 1995; 99, 1299-1305.
 35. Phase behavior of dilute aqueous solutions of lipid-surfactant mixtures: effects of finite size of micelles. Roth Y, Opatowski E, Lichtenberg D, Kozlov MM. *Langmuir* 2000; 16:2052-2061.
 36. Shape of phospholipid/surfactant mixed micelles: cylinders or disks? Theoretical analysis. Kozlov MM, Lichtenberg D, Andelman D. *J. Phys. Chem. B* 1997; 101:6600-6606.
 37. Phase transitions between vesicles and micelles driven by competing curvature. Andelman D, Kozlov MM, Helfrich, W. *Europhys. Lett*. 1994; 25:231-236.
 38. Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles. Lichtenberg D, Opatowski E, Kozlov MM. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1508(1-2):1-19.
 39. Intrinsic Curvature-Mediated Transbilayer Coupling in Asymmetric Lipid Vesicles. Eicher B, Marquardt D, Heberle FA, Letofsky-Papst I, Reicherberger GN, Appavou MS, Katsaras J, Pabst G. *Biophys J*. 2018;114(1):146-157.
 40. Micelle to vesicle transition in aqueous solutions of bile salts and lecithin. Schurtenberger P, Mazer NA, Kanzig W. *J. Phys. Chem.* 1985; 89:1042-1059.
 41. Temperature-dependence of the solubilization of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) by the non-ionic surfactant Triton X-100, kinetic and structural aspects. Schnitzer E, Lichtenberg D, Kozlov MM. *Chem Phys Lipids*. 2003; 126(1):55-76.
 42. The mechanism of detergent solubilization of liposomes and protein-containing membranes. Kragh-Hansen U, le Maire M, Møller JV. *Biophys J*. 1998; 75(6):2932-46.
 43. Two distinct mechanisms of vesicle-to-micelle and micelle-to-vesicle transition are mediated by the packing parameter of phospholipid-detergent systems. Stuart MC, Boekema EJ. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1768(11):2681-9.
 44. Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants. Almgren M. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1508(1-2):146-63.
 45. Solubilization of lecithin vesicles by C12E8-structural transitions and temperature effects. Edwards K, and Almgren M. *J. Colloid Interface Sci*. 1991; 147:1-21.
 46. Intermediate structures in the cholate-phosphatidylcholine vesicle-micelle transition. Walter A, Vinson PK, Kaplun A, Talmon Y. *Biophys J*. 1991; 60(6):1315-25.
 47. Studies on the molecular packing of mixed dispersions of Triton X-100 and sphingomyelin and its dependence on temperature and cloud point. Lichtenberg D, Yedgar S, Cooper G, Gatt S. *Biochemistry*. 1979; 18(12):2574-82.
 48. Lipid bilayers in the gel phase become saturated by Triton X-100 at lower surfactant concentrations than those in the fluid phase. Ah-yayauch H, Collado MI, Alonso A, Goñi FM. *Biophys J*. 2012; 102(11):2510-6.
 49. Phosphorus NMR analysis of phospholipids in detergents. London E, Feigenson GW. *J Lipid Res*. 1979; 20(3):408-12.
 50. Cholesterol reverts Triton X-100 preferential solubilization of sphingomyelin over phosphatidylcholine: a ³¹P-NMR study. Ah-yayauch H, Collado MI, Goñi FM, Lichtenberg D. *FEBS Lett*. 2009;583(17):2859-64.
 51. Thermodynamics of lipid membrane solubilization by sodium dodecyl sulfate. Keller S, Heerklotz H, Jahnke N, Blume A. *Biophys J*. 2006; 90(12):4509-21.
 52. Triton X-100 partitioning into sphingomyelin bilayers at subsolubilizing detergent concentrations: effect of lipid phase and a comparison with dipalmitoylphosphatidylcholine. Arnulphi C, Sot J, García-Pacios M, Arrondo JL, Alonso A, Goñi FM. *Biophys J*. 2007; 93(10):3504-14.
 53. The heat of transfer of lipid and surfactant from vesicles into micelles in mixtures of phospholipid and surfactant. Opatowski E, Lichtenberg D, Kozlov MM. *Biophys J*. 1997; 73(3):1458-67.
 54. Partitioning of octyl glucoside between octyl glucoside/phosphatidylcholine mixed aggregates and aqueous media as studied by isothermal titration calorimetry. Opatowski E, Kozlov MM, Lichtenberg D. *Biophys J*. 1997; 73(3):1448-57.
 55. Titration calorimetry of surfactant-membrane partitioning and membrane solubilization. Heerklotz H, Seelig J. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1508(1-2):69-85.
 56. Detergent effects on membranes at subsolubilizing concentrations: transmembrane lipid motion, bilayer permeabilization, and vesicle lysis/reassembly are independent phenomena. Ah-yayauch H, Ben-nouna M, Alonso A, Goñi FM. *Langmuir*. 2010; 26(10):7307-13.
 57. Classifying surfactants with respect to their effect on lipid membrane order. Nazari M, Kurdi M, Heerklotz H. *Biophys J*. 2012; 102(3):498-506.
 58. Acceleration of phospholipid *flip-flop* in the erythrocyte membrane



- by detergents differing in polar head group and alkyl chain length. Pantaler E, Kamp D, Haest CW. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1509(1-2):397-408.
59. Vesicle-micelle transition of phosphatidylcholine and octyl glucoside elucidated by cryo-transmission electron microscopy. Vinson PK, Talmon Y, Walter A. *Biophys J*. 1989; 56(4):669-81.
60. Structural phase transitions involved in the interaction of phospholipid bilayers with octyl glucoside. De la Maza A, Parra JL. *Eur J Biochem*. 1994; 226(3):1029-38.
61. 'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. Ladokhin AS, White SH. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1514(2):253-60.
62. Solubilization of phospholipid bilayers by surfactants belonging to the Triton X series: effect of polar group size. Partearroyo MA, Alonso A, Goñi FM, Tribout M, Paredes S. *J. Colloid Interface Sci*. 1996; 178:156-159.
63. Triton X-100-resistant bilayers: effect of lipid composition and relevance to the raft phenomenon. Sot J, Collado MI, Arrondo JLR, Alonso A, and Goñi FM. *Langmuir* 2002; 18:2828-2835.
64. Loading of preformed liposomes with high trapping efficiency by detergent- induced formation of transient membrane holes. Schubert R, Wolburg H, Schmidt KH, Roth HJ. *Chem Phys Lipids*. 1991; 58:121-129.
65. Early and delayed stages in the solubilization of purple membrane by a polyoxyethylene surfactant. Viguera AR, González-Mañas JM, Taneva S, Goñi FM. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1196(1):76-80.
66. Interaction of detergents with lipid vesicles. Lasch J. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1241(2):269-92.
67. Titration calorimetry of surfactant-membrane partitioning and membrane solubilization. Heerklotz H, Seelig J. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1508(1-2):69-85.
68. Kinetic studies on the interaction of phosphatidylcholine liposomes with Triton X-100. Alonso A, Urbaneja MA, Goñi FM, Carmona FG, Cánovas FG, Gómez- Fernández JC. *Biochim Biophys Acta*. 1987; 902(2):237-46.
69. The effect of cholesterol on the solubilization of phosphatidylcholine bilayers by the non-ionic surfactant Triton X-100. Schnitzer E, Kozlov MM, Lichtenberg D. *Chem Phys Lipids*. 2005; 135(1):69-82.
70. Cholesterol precipitation from cholesterol-supersaturated bile models. Fudim- Levin A, Bor A, Kaplun A, Talmon Y, Lichtenberg D. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1259(1):23-8.
71. Stability of mixed micellar bile models supersaturated with cholesterol. Lichtenberg D, Ragimova S, Bor A, Almog S, Vinkler C, Kalina M, Peled Y, Halpern Z. *Biophys J*. 1988; 54(6):1013-25.
72. Stability of mixed micellar systems made by solubilizing phosphatidylcholine- cholesterol vesicles by bile salts. Lichtenberg D, Ragimova S, Bor A, Almog S, Vinkler C, Peled Y, Halpern Z. *Hepatology*. 1990; 12(3 Pt 2):149S-153S; discussion 153S-154S.
73. Binding of a nonionic detergent to membranes: *flip-flop* rate and location on the bilayer. Le Maire M, Møller JV, Champeil P. *Biochemistry*. 1987; 26(15):4803-10.
74. Influence of the level of ceramides on the permeability of stratum corneum lipid liposomes caused by a C12-betaine/sodium dodecyl sulfate mixture. Cócera M, Lopez O, Coderch L, Parra JL, de la Maza A. *Int J Pharm*. 1999; 183(2):165-73.
75. Membrane stress and permeabilization induced by asymmetric incorporation of compounds. Heerklotz H. *Biophys J*. 2001; 81(1):184-95.
76. Solubilization of lipid bilayers by myristyl sucrose ester: effect of cholesterol and phospholipid headgroup size. Toro C, Sanchez SA, Zanocco A, Lemp E, Gratton E, Günther G. *Chem Phys Lipids*. 2009; 157(2):104-12.
77. Solubilization mechanism of vesicles by surfactants: effect of hydrophobicity. Lin CM, Chang GP, Sheng YJ. *J. Chem. Phys*. 2011; 135:045102.
78. Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle- forming amphiphiles. Lichtenberg D, Opatowski E, Kozlov MM. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1508(1-2):1-19.
79. States of aggregation and phase transformations in mixtures of phosphatidylcholine and octyl glucoside. Almog S, Litman BJ, Wimley W, Cohen J, Wachtel EJ, Barenholz Y, Ben-Shaul A, Lichtenberg D. *Biochemistry*. 1990; 29(19):4582-92.
80. Lysis and reassembly of sonicated lecithin vesicles in the presence of Triton X-100. Alonso A, Villena A, Goñi FM. *FEBS Lett*. 1981; 123(2):200-4.
81. Increase in size of sonicated phospholipid vesicles in the presence of detergents. Alonso A, Sáez R, Villena A, Goñi FM. *J Membr Biol*. 1982; 67(1):55-62.
82. Effect of calcium on kinetic and structural aspects of dilution-induced micellar to lamellar phase transformation in phosphatidylcholine- cholate mixtures. Almog S, Lichtenberg D. *Biochemistry*. 1988; 27(3):873-80.
83. Structural characterization of the micelle-vesicle transition in lecithin-bile salt solutions. Long MA, Kaler EW, Lee SP. *Biophys J*. 1994; 67(4):1733-42.
84. Size disproportionation in vesicular dispersions. Johnson NW, Kaler EW. *J. Colloid Interface Sci*. 1987; 116:444-457.
85. The vesicle-to-micelle transformation of phospholipid-cholate mixed aggregates: a state of the art analysis including membrane curvature effects. Elsayed MM, Cevc G. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1808(1):140-53.
86. Use of simple kinetic and reaction-order measurements for the evaluation of the mechanism of surfactant-liposome interactions. Velluto D, Gasbarri C, Fontana A. *J. Phys. Chem. B*. 2011; 115:8130-



- 8137.
87. From discoid micelles to spherical vesicles. The concept of edge activity. Fromherz P, Rocker C, Ruppel D. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 1986; 81:39–48.
88. A molecular model for vesicle formation. Lasic DD. *Biochim Biophys Acta.* 1982; 692(3):501-2.
89. The mechanism of vesicle formation. Lasic DD. *Biochem. J.* 1988; 256:1-11.
90. Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects. Lichtenberg D, Robson RJ, Dennis EA. *Biochim Biophys Acta.* 1983; 737(2):285-304.
91. Effects of Triton X-100 on sonicated lecithin vesicles. Edwards K, Almgren M, Brown W. *Langmuir.* 1989; 5:473–478.
92. Curvature factor and membrane solubilization, with particular reference to membrane *rafts*. Mrówczyńska L, Salzer U, Iglič A, Hägerstrand H. *Cell Biol Int.* 2011 Oct;35(10):991-5.
93. Surfactant effects of chlorpromazine and imipramine on lipid bilayers containing sphingomyelin and cholesterol. Ahyyaach H, Requero MA, Goni FM. *J. Colloid Interface Sci.* 2002; 256:284–289.
94. Structural changes induced by Triton X-100 on sonicated phosphatidylcholine liposomes. Urbaneja MA, Goni FM, Alonso A. *Eur J Biochem.* 1988; 173(3):585-8.
95. Solubilization of liposomes by sodium dodecyl sulfate: new mechanism based on the direct formation of mixed micelles. López O, Keller M, Wehrli E, Parra JL, de la Maza A. *Arch Biochem Biophys.* 1999; 367(2):153-60.
96. Process of destruction of large unilamellar vesicles by a zwitterionic detergent, CHAPS: partition behavior between membrane and water phases. Viriyaroj A, Kashiwagi H, Ueno M. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2005; 53(9):1140-6.
97. Thermodynamics of sodium dodecyl sulfate partitioning into lipid membranes. Tan A, Ziegler A, Steinbauer B, Seelig J. *Biophys J.* 2002; 83(3):1547-56.
98. Reconstitution in liposome bilayers enhances nucleotide binding affinity and ATP-specificity of TrwB conjugative coupling protein. Vecino AJ, Segura RL, Ugarte-Uribe B, Aguila S, Hormaeche I, de la Cruz F, Goni FM, Alkorta I. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1798(11):2160-9.
99. Membrane solubilization by detergent: use of brominated phospholipids to evaluate the detergent-induced changes in Ca²⁺-ATPase/lipid interaction. De Foresta B, le Maire M, Orlowski S, Champell P, Lund S, Møller JV, Michelangeli F, Lee AG. *Biochemistry.* 1989; 28(6):2558-67.
100. Membrane-perturbing effect of fatty acids and lysolipids. Aroui A, Mouritsen OG. *Prog Lipid Res.* 2013; 52(1):130-40.
101. Observing the solubilization of lipid bilayers by detergents with optical microscopy of GUVs. Sudbrack TP, Archilha NL, Itri R, Riske KA. *J Phys Chem B.* 2011; 115(2):269-77.
102. Detergent solubilisation of phospholipid bilayers in the gel state: the role of polar and hydrophobic forces. Patra SK, Alonso A, Goni FM. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1373(1):112-8.
103. Liposomes containing sphingomyelin and cholesterol: detergent solubilisation and infrared spectroscopic studies. Patra SK, Arrondo JL, Alonso A, Goni FM. *J. Liposome Res.* 1999; 9, 247–260.
104. Solubilization of supported lipid membranes by octyl glucoside observed by time-lapse atomic force microscopy. Morandat S, El Kirat K. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 2007; 55, 179–184.
105. Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. Heerklotz H. *Biophys J.* 2002; 83(5):2693-701.
106. Cholesterol homeostasis and the escape tendency (activity) of plasma membrane cholesterol. Lange Y, Steck TL. *Prog Lipid Res.* 2008; 47(5):319-32.
107. Sphingomyelin and cholesterol: from membrane biophysics and *rafts* to potential medical applications. Barenholz Y. *Subcell Biochem.* 2004; 37:167-215.
108. Temperature dependence of Triton X-100 micelle size and hydration. Streletzky K, Phillies GD. *Langmuir* 1995; 11, 42–47.
109. Size and shape of detergent micelles determined by small-angle X-ray scattering. Lipfert J, Columbus L, Chu VB, Lesley SA, Doniach S. *J Phys Chem B.* 2007; 111(43):12427-38.
110. Functional *rafts* in cell membranes. Simons K, Ikonen E. *Nature.* 1997; 387(6633):569-72.
111. Model systems, lipid *rafts*, and cell membranes. Simons K, Vaz WL. *Annu Rev. Biophys Biomol Struct.* 2004;33:269-95.
112. Lipid *rafts* and signal transduction. Simons K, Toomre D. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000; 1(1):31-9.
113. Association of GAP-43 with detergent-resistant membranes requires two palmitoylated cysteine residues. Arni S, Keilbaugh SA, Ostermeyer AG, Brown DA. *J Biol Chem.* 1998; 273(43):28478-85.
114. Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. Ipsen JH, Karlström G, Mouritsen OG, Wennerström H, Zuckermann MJ. *Biochim Biophys Acta.* 1987; 905(1):162-72.
115. Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. Scheiffele P, Roth MG, Simons K. *EMBO J.* 1997;16(18):5501-8.
116. Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. Yu J, Fischman DA, Steck TL. *J Supramol Struct.* 1973; 1(3):233-48.
117. Ectoenzymes of the kidney microvillar membrane. Differential solubilization by detergents can predict a glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor. Hooper NM, Turner AJ. *Biochem J.* 1988; 250(3):865-9.
118. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. Brown DA,



- Rose JK. Cell. 1992; 68(3):533-44.
119. Both sphingolipids and cholesterol participate in the detergent insolubility of alkaline phosphatase, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, in mammalian membranes. Hanada K, Nishijima M, Akamatsu Y, Pagano RE. J Biol Chem. 1995; 270(11):6254-60.
120. The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane *rafts*. Rietveld A, Simons K. Biochim Biophys Acta. 1998; 1376(3):467-79.
121. Permeability and integrity properties of lecithin-sphingomyelin liposomes. Hertz R, Barenholz Y. Chem Phys Lipids. 1975;15(2):138-56.
122. Interaction of cholesterol with sphingomyelin in mixed membranes containing phosphatidylcholine, studied by spin-label ESR and IR spectroscopies. A possible stabilization of gel-phase sphingolipid domains by cholesterol. Veiga MP, Arrondo JL, Goñi FM, Alonso A, Marsh D. Biochemistry. 2001;40(8):2614-22.
123. Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (*rafts*). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebrosides, and ceramide. Xu X, Bittman R, Duportail G, Heissler D, Vilcheze C, London E. J Biol Chem. 2001; 276(36):33540-6.
124. Cholesterol-phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid *rafts* in model and biological membranes. McMullen TP, Lewis RN, McElhaney RN. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2004; 8: 459-468.
125. Lipid/detergent interaction thermodynamics as a function of molecular shape. Heerklotz H, Binder H, Lantzsch G, Klose G, Blume A. J. Phys. Chem. B 1997; 101, 639-645.
126. The interaction of phosphatidylcholine bilayers with Triton X-100. Goñi FM, Urbaneja MA, Arrondo JL, Alonso A, Durrani AA, Chapman D. Eur J Biochem. 1986; 160(3):659-65.
127. The sensitivity of lipid domains to small perturbations demonstrated by the effect of Triton. Heerklotz H, Szadkowska H, Anderson T, Selig J. J Mol Biol. 2003; 329(4):793-9.
128. In situ imaging of detergent-resistant membranes by atomic force microscopy. Giocondi MC, Vié V, Lesniewska E, Goudonnet JP, Le Grimallec C. J Struct Biol. 2000; 131(1):38-43.
129. Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (*rafts*). London E, Brown DA. Biochim Biophys Acta. 2000; 1508(1-2):182-95.
130. Resistance of cell membranes to different detergents. Schuck S, Honsho M, Ekroos K, Shevchenko A, Simons K. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(10):5795-800.
131. Insights into the association of FcγRIII and TCR with detergent-resistant membrane domains: isolation of the domains in detergent-free density gradients facilitates membrane fragment reconstitution. Korzeniowski M, Kwiatkowska K, Sobota A. Biochemistry. 2003; 42(18):5358-67.
132. Location is everything: lipid *rafts* and immune cell signaling. Dykstra M, Cherukuri A, Sohn HW, Tzeng SJ, Pierce SK. Annu Rev Immunol. 2003; 21:457-81.
133. Triton X-100 solubilization of mitochondrial inner and outer membranes. Gurtubay JI, Goñi FM, Gómez-Fernández JC, Otamendi JJ, Macarulla JM. J Bioenerg Biomembr. 1980; 12(1-2):47-70.
134. Effect of the nonionic detergent Triton X-100 on mitochondrial succinate-oxidizing enzymes. Barbero MC, Valpuesta JM, Rial E, Gurtubay JI, Goñi FM, Macarulla JM. Arch Biochem Biophys. 1984; 228(2):560-8.
135. Physiological state of submitochondrial particles and their susceptibility to Triton X-100. Goñi FM, Valpuesta JM, Barbero MC, Rial E, Gurtubay JI, Macarulla JM. Experientia. 1984; 40(2):193-5.
136. Protein-lipid interactions. A study of (Ca²⁺ + -Mg²⁺ +)ATPase reconstituted with synthetic phospholipids. Gómez-Fernández JC, Goñi FM, Bach D, Restall C, Chapman D. FEBS Lett. 1979; 98(2):224-8.
137. A comparative study of the effect of various detergents on the structure and function of sarcoplasmic reticulum vesicles. Villalaín J, Goñi FM, Macarulla JM. Mol Cell Biochem. 1982; 49(2):113-8.
138. Membrane-surfactant interactions. The effect of Triton X-100 on sarcoplasmic reticulum vesicles. Prado A, Arrondo JL, Villena A, Goñi FM, Macarulla JM. Biochim Biophys Acta. 1983; 733(1):163-71.
139. Solubilization of sarcoplasmic reticulum membranes by sodium dodecylsulphate. A Fourier-transform infrared spectroscopic study. Prado A, Muga A, Castresana J, Goñi FM, Arrondo JL. FEBS Lett. 1990; 269(2):324-7.
140. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. le Maire M, Champeil P, Møller JV. Biochim Biophys Acta. 2000; 1508(1-2):86-111.
141. The interaction of Triton X-100 with purple membranes. Detergent binding, spectral changes and membrane solubilization. González-Mañas JM, Virto MD, Gurtubay JI, Goñi FM. Eur J Biochem. 1990; 188(3):673-8.
142. Kinetics of purple membrane dark-adaptation in the presence of Triton X-100. González-Mañas JM, Goñi FM, Tribout M, Paredes S. Arch Biochem Biophys. 1990; 282(2):239-43.
143. On the mechanism of bacteriorhodopsin solubilization by surfactants. Del Río E, González-Mañas JM, Gurtubay JI, Goñi FM. Arch Biochem Biophys. 1991; 291(2):300-6.
144. The role of amphiphiles in model and cell membrane fusion. Prado A, Partearroyo MA, Nieva JL, Alonso A, Goñi FM. Prog Clin Biol Res. 1990; 343:103-16.
145. Surfactant enhancement of polyethyleneglycol-induced cell fusion.



- Prado A, Partearroyo MA, Mencía M, Goñi FM, Barberá-Guillem E. FEBS Lett. 1989; 259(1):149-52.
146. Effective detergent/lipid ratios in the solubilization of phosphatidylcholine vesicles by Triton X-100. Partearroyo MA, Urbaneja MA, Goñi FM. FEBS Lett. 1992; 302(2):138-40.
147. The influence of membrane composition on the solubilizing effects of Triton X-100. Urbaneja MA, Nieva JL, Goñi FM, Alonso A. Biochim Biophys Acta. 1987; 904(2):337-45.
148. Detergent solubilization of phosphatidylcholine bilayers in the fluid state: influence of the acyl chain structure. Ahyayauch H, Larijani B, Alonso A, Goñi FM. Biochim Biophys Acta. 2006; 1758(2):190-6.
149. Detergent solubilization of phospholipid vesicle. Effect of electric charge. Urbaneja MA, Alonso A, Gonzalez-Mañas JM, Goñi FM, Partearroyo MA, Tribout M, Paredes S. Biochem J. 1990; 270(2):305-8.
150. Fast and slow biomembrane solubilizing detergents: Insights into their mechanism of action. Lete MG, Monasterio BG, Collado MI, Medina M, Sot J, Alonso A, Goñi FM. Colloids Surf B Biointerfaces. 2019; 183:110430.
151. Detergent-resistant, ceramide-enriched domains in sphingomyelin / ceramide bilayers. Sot J, Bagatolli LA, Goñi FM, Alonso A. Biophys J. 2006; 90(3):903-14.
152. The onset of Triton X-100 solubilization of sphingomyelin/ceramide bilayers: effects of temperature and composition. Ahyayauch H, Arulphi C, Sot J, Alonso A, Goñi FM. Chem Phys Lipids. 2013; 167-168:57-61.
153. High-melting lipid mixtures and the origin of detergent-resistant membranes studied with temperature-solubilization diagrams. Sot J, Manni MM, Viguera AR, Castañeda V, Cano A, Alonso C, Gil D, Valle M, Alonso A, Goñi FM. Biophys J. 2014; 107(12):2828-2837.
154. Handbook of detergents, part E: applications. U. Zoller. Surfactant Science Series, vol. 141 CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2009.
155. Effect of detergents and other amphiphiles on the stability of pharmaceutical drugs. AG Oliveira, H Chaimovich. J Pharm Pharmacol 1993; 45:850-861.
156. Liquid Detergents. Kuo-Yann Lai, Surfactant Science Series, vol. 129 CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2005.
157. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. Khadydja D, Santos F, Rufino RD, Luna JM, Santos VA, Sarubbo LA. Int J Mol Sci. 2016; 17(3):401.
158. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. Jahan R, Bodratti AM, Tsianou M, Alexandridis P. Advances in Colloid and Interface Science. 2020; 275:102061.

Si desea citar nuestro artículo:

Detergentes: de los principios físicos a las aplicaciones biofarmacéuticas (o por qué prevenimos la covid-19 con agua y jabón)

Félix M. Goñi y Alicia Alonso

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 87. Nº 1 (2021) : pp. 53 - 96

DOI: <http://>

PRODUCTOS NATURALES: DE LA MEDICINA TRADICIONAL A CABEZAS DE SERIE PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS DEL SIGLO XXI

NATURAL PRODUCTS: FROM TRADITIONAL MEDICINE TO LEAD COMPOUNDS FOR DRUG DEVELOPMENT IN THE 21ST CENTURY

Beatriz de las Heras Polo

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

*corresponding author: lasheras@ucm.es

REVISIÓN

Discurso de Ingreso como Académico Correspondiente en la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

Los productos naturales han contribuido históricamente al descubrimiento de fármacos como fuente de moléculas bioactivas, debido a la gran diversidad y complejidad estructural que presentan. Así, han aportado moléculas "cabeza de serie" para el desarrollo de fármacos en distintas áreas terapéuticas, con una representación muy destacada en el tratamiento del dolor y de la inflamación, trastornos de la coagulación, trastornos metabólicos, así como en el tratamiento del cáncer y enfermedades infecciosas. En las últimas décadas se ha producido un cambio de paradigma en las estrategias de descubrimiento de fármacos que ha permitido la identificación de nuevos productos naturales activos en dianas terapéuticas. La Química Combinatoria y las pruebas biológicas de alto rendimiento ("High Throughput Screening"), junto al desarrollo de las técnicas computacionales, han contribuido decisivamente al diseño y optimización de quimiotecas de derivados de productos naturales en base a su actividad biológica. En paralelo, los avances tecnológicos en el campo de las ciencias ómicas y en el procesamiento de datos han llevado a un abordaje multidimensional del proceso de descubrimiento de fármacos. Estas poderosas herramientas permitirán analizar el potencial farmacológico de los productos naturales y de sus derivados y, llegar a convertir a estas moléculas en productos activos con baja toxicidad. En la era de la Medicina de Precisión, los productos naturales siguen siendo moléculas con un gran potencial en el desarrollo farmacéutico, ya que a diferencia de otras estrategias terapéuticas, presentan una relación coste-beneficio favorable lo que permitirá su uso futuro en esta disciplina.

ABSTRACT

Natural products have historically contributed to drug discovery as a source of bioactive molecules, due to their great diversity and structural complexity. They have provided "lead" molecules for the development of drugs in different therapeutic areas, with a very prominent representation in the treatment of pain and inflammation, coagulation disorders, metabolic disorders, as well as in the treatment of cancer and infectious diseases. In recent decades there has been a paradigm shift in drug discovery strategies that has allowed the identification of new active natural products in therapeutic targets. Combinatorial Chemistry and biological tests (High Throughput Screening), together with the development of computational techniques, have contributed decisively to the design and optimization of libraries of natural product derivatives based on their biological activity. In parallel, technological advances in the field of Omics sciences and in data processing lead to a multidimensional approach in the drug discovery process. These powerful tools will allow the analysis of the pharmacological potential of natural products and their derivatives for the conversion of these molecules to active products with low toxicity. In the Precision Medicine era, natural products continue to be molecules with great potential in pharmaceutical development, since, unlike other therapeutic strategies, they have a favorable cost-benefit ratio, which will allow their future use in this discipline.

Palabras Clave:

Descubrimiento de fármacos
Productos naturales
Compuestos inspirados en productos naturales
Medicina de Precisión

Keywords:

Drug discovery
Natural products
Natural product inspired compounds
Precision Medicine



1. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de fármacos es un proceso complejo, lento, que supone una gran inversión económica sin que se puedan asegurar garantías de éxito. A pesar de que en los últimos años la aprobación de fármacos biológicos se ha consolidado, representando más del 25% de los nuevos fármacos aprobados en el periodo de 2015-2019, tradicionalmente el descubrimiento de un nuevo fármaco se ha basado en la identificación de nuevas entidades químicas, que a día de hoy sigue constituyendo la fuente más productiva en la obtención (1). Estas entidades pueden obtenerse bien por síntesis química o por un proceso de aislamiento a partir de distintas fuentes naturales como sucede con los productos naturales, con un papel destacado como moléculas bioactivas de partida en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. El número de nuevas entidades químicas derivadas de productos naturales aprobadas entre 1981 y 2014 fue de 1328, siendo la mayoría de ellas fármacos antibacterianos, antitumorales o antivirales. Se estima que más de la mitad de los fármacos en uso clínico son derivados de productos naturales.

Los productos naturales son metabolitos secundarios que los organismos vivos han desarrollado a lo largo de su evolución como mecanismos defensivos frente a patógenos. Estos compuestos desempeñan diversas funciones biológicas, incluyendo la regulación de mecanismos endógenos de defensa y la interacción con otros organismos, lo que explicaría la relevancia de los mismos en enfermedades infecciosas y en cáncer. Por todo ello, los productos naturales son capaces de comportarse como compuestos activos en una gran variedad de procesos biológicos. Además de considerarse como una fuente de estructuras privilegiadas, los productos naturales presentan tres importantes características estructurales: diversidad, complejidad y quiralidad, ésta última correlacionándose positivamente con la capacidad de interaccionar eficazmente con dominios de proteínas.

La importancia de los productos naturales o derivados de los mismos como fuente de nuevos fármacos en el periodo 1981-2019 ha quedado reflejada en una revisión recientemente publicada (2). Los autores analizan los que son propiamente productos naturales, aquellos derivados de un producto natural por ligeras modificaciones por semisíntesis o aquellos inspirados en productos naturales que contienen grupos farmacóforos del producto natural de origen. A finales de 2019 se mantiene el éxito de los productos naturales frente a las moléculas de síntesis como fuente de nuevos fármacos. Se estimó que sólo el 28% de ellas tendrían un origen exclusivamente sintético, sin relación directa o indirecta con productos naturales.

2. LOS PRODUCTOS NATURALES EN LA TERAPÉUTICA

Es interesante señalar que, a lo largo de la historia, los productos naturales han aportado moléculas "cabezas de serie" para el desarrollo de fármacos en distintas áreas terapéuticas, con una representación muy destacada en el tratamiento del dolor y de la inflamación, trastornos de la coagulación, trastornos metabólicos, así como en el tratamiento del cáncer y de enfermedades infecciosas (3).

Cabe destacar que entre los fármacos más prescritos en EEUU se encuentran algunos derivados de productos naturales, como es el caso de las estatinas atorvastatina y simvastatina o de fármacos opioides para el tratamiento del dolor como la hidrocodona, un derivado de la codeína. En concreto, las principales estatinas, fármacos que supusieron un avance importante en el tratamiento de la hipercolesterolemia, son derivados de un producto natural la mevastatina, que se obtuvo del hongo *Penicillium citrinum*. Además, el fármaco rosuvastatina se desarrolló como un producto mimético sintético del producto natural mevastatina. Ambos compuestos presentan en su estructura grupos farmacóforos comunes, pero también sustituyentes químicos diferentes lo que ha permitido optimizar las estructuras y la obtención de nuevos derivados (4).

Numerosos ejemplos ilustran el potencial de los productos naturales o de moléculas inspiradas en ellos como fármacos en el tratamiento del cáncer. Así, encontramos diterpenos antitumorales de amplio uso clínico como el paclitaxel, obtenido del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia* Nutt.), comercializado como Taxol, probablemente uno de los fármacos más utilizados en clínica en el tratamiento de tumores sólidos; o su análogo docetaxel con mayor eficacia. Otros ejemplos representativos son los inhibidores de topoisomerasas derivados del alcaloide camptotecina, obtenido de la corteza de *Camptotheca acuminata* Decne.: irinotecan y topotecan, con utilidad clínica en tumores hematológicos; o los alcaloides obtenidos de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: vincristina y vinblastina y sus derivados semisintéticos como vinorelbina, también de amplio uso en linfomas y leucemias (5, 6).

Finalmente señalar que el Premio Nobel de Fisiología y Medicina del año 2015 puso en valor el papel de la Medicina Tradicional China y de los productos naturales con el descubrimiento por la Dra. Youyou Tu de la artemisinina, lactona sesquiterpénica aislada de la especie vegetal *Artemisia annua* L. conocida como ajenjo dulce. Este compuesto y sus derivados son actualmente utilizados como fármacos antimaláricos (7). Este Premio Nobel fue compartido con los doctores Campbell y Omura por el descubrimiento de otro producto natural, avermectina producida por una cepa de *Streptomyces* para infecciones parasitarias causadas por nematodos.

Este compuesto fue modificado químicamente para aumentar su actividad y seguridad bajo el nombre de ivermectina, que se comercializó en 1981 para uso animal y pronto se convirtió en uno de los fármacos veterinarios más vendidos en el mundo para el tratamiento de la oncocercosis y la filariasis linfática (8).

3. ESTRATEGIAS Y METODOLOGÍAS EN EL DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS INSPIRADOS EN PRODUCTOS NATURALES

El descubrimiento de fármacos inspirados en productos naturales ha experimentado un gran desarrollo con tres etapas claramente diferenciadas. La investigación se inicia con el uso de estrategias relativamente simples durante los primeros años, aplicando ensayos de cribado, lo que se conoce en terminología científica como "screening fenotípico" basado en el uso de bioensayos. En décadas sucesivas, la investigación evoluciona paralelamente a procesos más diversos y complejos, con la Química Combinatoria y las pruebas biológicas de alto rendimiento en los años 90s. Los avances tecnológicos e instrumentales acompañan el desarrollo en las últimas dos décadas con novedosas técnicas computacionales, las ciencias ómicas y la Bioinformática (9).

3.1 Los primeros 30 años (1940-1970s): "screening fenotípico"

En esta etapa un gran porcentaje de las nuevas entidades químicas aprobadas fueron aisladas de fuentes naturales, con predominio de moléculas obtenidas de plantas, bacterias y hongos. Los años 1950s y 1960s se consideran una edad de oro en la investigación de productos naturales, pues en estos años emergen numerosos fármacos de origen natural. Sin embargo, en la segunda

década se observa que el porcentaje general de nuevas entidades químicas aprobadas de origen vegetal disminuye, dando paso a otras de origen bacteriano o fúngico (3, 10).

La estrategia tradicionalmente utilizada para el aislamiento de productos naturales era el "screening fenotípico" basado en el uso del bioensayo. Un extracto (mezcla compleja), obtenido en muchos casos de una especie vegetal en base a aproximaciones etnofarmacológicas o taxonómicas, era sometido al aislamiento guiado por bioensayo. El bioensayo permitía estudiar la actividad antes de conocer el mecanismo. La aplicación repetida de distintos métodos de fraccionamiento conducía a la obtención de distintas fracciones del extracto que, junto a la determinación de la actividad biológica, llevaba al aislamiento del compuesto puro que se completaba con la elucidación estructural (Fig.1).

En estos primeros 30 años se sigue el paradigma: (1) "screening fenotípico", (2) aislamiento de compuestos y caracterización estructural y, (3) modo de acción en algunos casos. Sin embargo, esta estrategia mostró numerosas deficiencias derivadas de la complejidad estructural que presentaban los extractos y el bajo rendimiento en la obtención de productos naturales.

3.2 Período 1970s-2000s: Química Combinatoria y "High Throughput Screening"

Esta etapa se acompaña de una gran expansión de nuevas estrategias químicas que permitieron obtener un gran número de moléculas, así como por el desarrollo de ensayos de cribado dirigidos a evaluar la interacción de un compuesto con la diana terapéutica (habitualmente una enzima, complejo enzimático o un receptor) que resultará en el efecto farmacológico deseado.

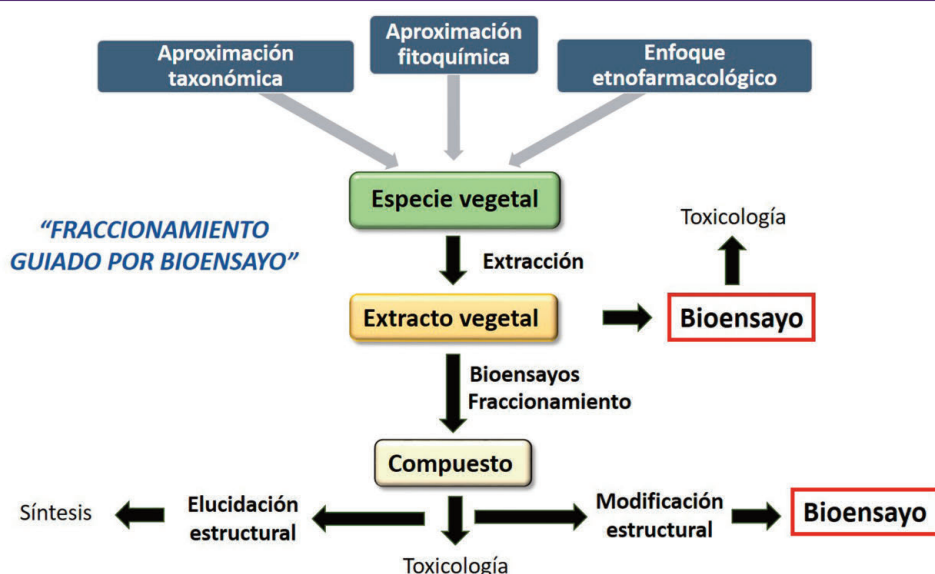


Figura 1. Esquema del proceso de aislamiento de productos naturales guiado por bioensayo.

Adicionalmente se exploran nuevas fuentes de productos naturales poco estudiadas hasta ese momento. En concreto, la biodiversidad de los ecosistemas marinos resulta ser una fuente natural inagotable en el descubrimiento de nuevos fármacos antitumorales (11, 12). Extractos obtenidos de numerosos invertebrados marinos (tunicados, corales, esponjas...) permitieron el aislamiento y la obtención de diversos fármacos. En la actualidad, ocho fármacos de origen marino han sido aprobados en el tratamiento de distintos tipos de cáncer. El primer fármaco fue la citarabina, aislada en 1969 y obtenido de una esponja, con uso clínico en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica. Sucesivamente se aprobarían fludarabina y nelarabina, también indicadas en tumores hematológicos; trabectedina o eribulina en 2010 para el tratamiento del cáncer de mama metastásico.

Algunas de estas moléculas de origen marino han cobrado gran interés en la actualidad. Es el caso de la plitidepsina, desarrollada por la empresa española Pharmamar e indicada en el tratamiento del mieloma múltiple, a la que diversas evidencias científicas señalan como potencial tratamiento anti-COVID 19. Más recientemente se han aprobado anticuerpos conjugados (brentuximab vedotin y polazutumab vedotin) donde se conjuga una molécula de origen marino, es decir, un producto antitumoral con un anticuerpo monoclonal que identifica y se dirige a la célula tumoral, ofreciendo una elevada selectividad en el tratamiento del cáncer.

Las dificultades técnicas en el aislamiento de productos naturales llevan en los años 1990s al desarrollo de la Química Combinatoria, con la síntesis de librerías de compuestos que se evalúan

mediante las pruebas biológicas de alto rendimiento, lo que se conoce como "Screening de alto rendimiento" (*High Throughput Screening*). Ello ha permitido llevar a cabo el cribado de millones de compuestos frente a cientos de dianas moleculares en distintas áreas terapéuticas como el cáncer, enfermedades infecciosas o enfermedades cardiovasculares, entre otras (9).

En esta etapa, el interés por los productos naturales decae, en parte debido a las barreras técnicas para llevar a cabo las pruebas biológicas de alto rendimiento con los extractos y los propios productos naturales aislados frente a distintas dianas moleculares. Sin embargo, los resultados no fueron tan prometedores como se esperaba, y el rendimiento de obtención de moléculas activas "cabezas de serie" fue solo del 0.01%, quizá debido a la falta de diversidad estructural y complejidad que si aportan los productos naturales. A partir de este momento se constata una nueva oportunidad para los productos naturales, resurgiendo el interés por los mismos, con el desarrollo de nuevas estrategias químicas para la obtención de moléculas inspiradas en ellos. Entre ellas se incluyen la síntesis orientada a la biodiversidad, el concepto y uso de estructuras privilegiadas, o la quimiomodulación de bioactividades (13).

El grupo de investigación al que pertenezco ha trabajado en el desarrollo de quimiotecas que han permitido identificar requerimientos estructurales relacionados con la actividad farmacológica y acceder a los productos más activos y con menor toxicidad. En este contexto, se llevó a cabo un estudio de quimiomodulación de la actividad antiinflamatoria y antitumoral de una quimioteca obtenida a partir de dos diterpenos: ácido *ent*-kaurénico y ácido

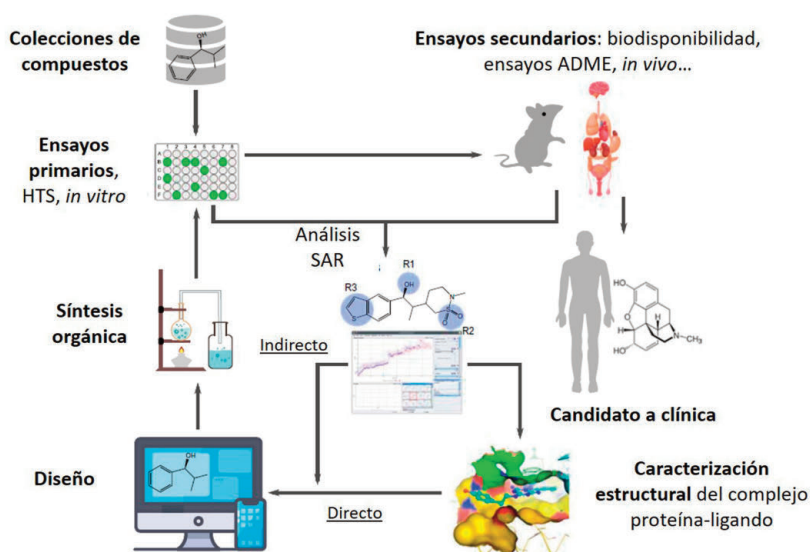


Figura 2. Etapas en el proceso de descubrimiento de fármacos. Adaptado de Chan *et al.* (16).

grandiflorénico. Estos diterpenos se aislaron de la especie *Tamania chardonii* (A.C.Sm.) Cuatrec, y se eligieron como compuestos “cabeza de serie” para la obtención de una quimioteca de 79 derivados que nos permitió realizar estudios de relación estructura-actividad farmacológica (SAR). Los resultados obtenidos permitieron concluir que la actividad biológica se modulaba por simples modificaciones en la estructura de los compuestos cabezas de serie utilizados para el desarrollo de la quimioteca, permitiendo obtener compuestos con distintas actividades biológicas, en concreto con potencial antiinflamatorio y antitumoral (14, 15).

3.3. Periodo 2000-2020: nuevas tecnologías

El avance tecnológico ha acompañado las dos últimas décadas con el desarrollo de técnicas computacionales, la secuenciación del genoma en 2001 y el desarrollo de las ciencias ómicas y la Bioinformática, contribuyendo a configurar la Medicina de Precisión.

La mayoría de los fármacos que están en uso clínico son el resultado de un proceso de investigación muy complejo. Se requiere la unión de esfuerzos de diferentes disciplinas científicas para desarrollar un fármaco con efectos clínicos beneficiosos y mínimos efectos adversos. La Figura 2 muestra las etapas principales del desarrollo de un fármaco (16). El proceso comienza con la investigación sobre las causas de una enfermedad, que en algunos casos puede llevar a la identificación de una o varias dianas moleculares asociadas a esa enfermedad específica. Los pasos siguientes implican la identificación de compuestos activos en la diana molecular y la optimización de su actividad biológica. El diseño de fármacos asistido por ordenador, al poder acceder a la estructura tridimensional de las proteínas, permite predecir que una proteína diana pueda

unirse a una pequeña molécula y, por tanto, optimizar la estructura química de dichas moléculas en base a la afinidad de unión, seleccionando candidatos para su evaluación experimental. El siguiente paso será identificar un compuesto “prototipo” que muestre la actividad biológica buscada a partir de la evaluación de colecciones de compuestos en ensayos celulares. En paralelo se realizan los estudios de relación estructura-actividad en el diseño de series de compuestos hasta obtener un compuesto “cabeza de serie”, así como estudios *in silico* que permiten predecir el modo de unión del ligando a una diana. Los compuestos activos se someterán a distintos tipos de estudios en animales (farmacocinéticos, toxicológicos...), cuyos resultados contribuirán a la selección de candidatos para ser evaluados en ensayos clínicos y, finalmente ser incluidos en la terapéutica humana.

En este contexto, estudios computacionales de Docking Molecular y Dinámica Molecular realizados por el grupo de investigación han permitido predecir la capacidad de unión al sitio activo del receptor de tipo Toll, TLR-4, de una serie de derivados del diterpeno solidagenona con el fin de evaluar si estos compuestos podrían interaccionar con esta diana terapéutica. Estos modelos ayudan a predecir la actividad de un derivado bromado de esta quimioteca, al acoplarse en el bolsillo hidrofóbico de la proteína adaptadora MD-2 ocupando el lugar de unión del lipopolisacárido LPS. Posteriormente, estos resultados fueron confirmados en modelos celulares que pusieron de manifiesto la actividad antiinflamatoria de este derivado al inhibir la producción del mediador proinflamatorio óxido nítrico cuando los macrófagos se estimulaban con distintos ligandos de receptores TLRs. Por tanto, se confirma el potencial de los diterpenos derivados de solidagenona como inhibidores de receptores TLRs (17).

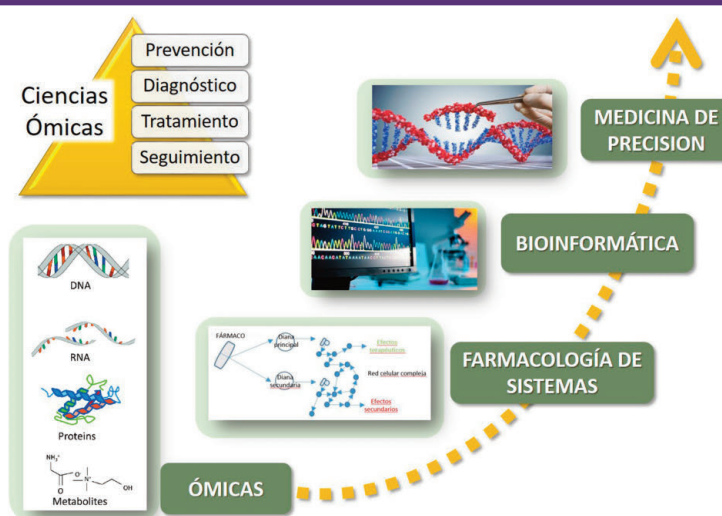


Figura 3. Nuevas tecnologías aplicadas al desarrollo de fármacos



4. EL FUTURO DEL DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS INSPIRADOS EN PRODUCTOS NATURALES

A mediados del siglo XX, la irrupción de la Biología Molecular y el desarrollo de las ciencias ómicas genera gran cantidad de información cuyo potencial se ha visto reforzado por la Farmacología de Sistemas, un nuevo paradigma que persigue descubrir medicaciones efectivas con pocos efectos adversos, al identificar y validar las dianas farmacológicas, explorando el mecanismo de acción y mejorar su uso clínico con la dosis adecuada para ser administrada a la medida del paciente (18, 19).

La Farmacología de Sistemas, junto a las herramientas de análisis de datos nos lleva al objetivo último de llevar a cabo ensayos clínicos que identifiquen a la población susceptible y nos permita aproximarnos a una medicina estratificada, cada vez más personalizada, basada en las características individuales de cada paciente en el tratamiento de enfermedades crónicas; siendo por el momento la Oncología el campo más innovador en Medicina de Precisión (Fig.3) (20).

En este contexto, los avances tecnológicos e instrumentales también han supuesto una revolución en el descubrimiento de fármacos inspirados en productos naturales que permitirán obtener mejores candidatos a fármacos. Se pueden señalar tres grandes actuaciones: 1) Avances en las técnicas analíticas que facilitarán los procesos de extracción de productos naturales de forma eficiente (extracción con fluidos supercríticos...); 2) Técnicas computacionales como el diseño y cribado de fármacos asistido por ordenador, y 3) Las nuevas tecnologías de las que se sirven las ciencias ómicas (genómica, proteómica, metabolómica, transcriptómica...), esenciales para el avance en el conocimiento de las bases moleculares de los procesos biológicos (21-24).

Estas nuevas tecnologías han incrementado significativamente el volumen de datos generados, por lo que ha sido necesario impulsar el diseño y mejora de herramientas computacionales y bioinformáticas que tengan capacidad de analizar eficientemente miles de datos con la mínima intervención humana. Estas herramientas para el análisis de los datos, permiten hacer minería de datos, establecer asociaciones matemáticas entre la estructura y la actividad o aplicar la inteligencia artificial (25).

Por tanto, en el momento actual, el descubrimiento de fármacos basados en productos naturales está ligado a la integración de los datos provenientes de distintas fuentes: recursos quimiinformáticos con valiosa aplicación en el análisis y manejo de bases de datos públicas que contienen información para realizar cribado virtual, quimiogenómica y análisis estructura-actividad (DrugBank, ChEMBL, Binding Database y PubChem); y aproximaciones computacionales con técnicas de Docking y Dinámica Molecular, Inteligen-

cia artificial y datos generados por las ciencias ómicas basadas en la biología de sistemas. Todo ello permite un nuevo abordaje para el descubrimiento de fármacos (23, 26-28). Adicionalmente, el avance en el conocimiento de las vías moleculares del cáncer a partir de datos genómicos, ayudará a explorar nuevas dianas de actuación de los productos naturales y posicionarlos como fármacos de utilidad en la Medicina de Precisión, dirigidos a actuar en vías de señalización específicas en cáncer (18, 27, 29, 30).

5. CONCLUSIONES

Los productos naturales han contribuido históricamente al descubrimiento de fármacos como fuente de moléculas activas, aportando una gran diversidad estructural que ha sido optimizada a lo largo de la evolución para interaccionar con distintas biomoléculas desempeñando funciones biológicas específicas.

En los últimos años, la investigación en el desarrollo de nuevos fármacos ha experimentado un progreso sin precedentes, gracias a los avances en distintas disciplinas como la Química Analítica, Biología Molecular, Quimiinformática, Ciencias Ómicas, que junto al desarrollo de técnicas computacionales y la revolución tecnológica en el procesamiento de datos han contribuido a implementar la Medicina de Precisión. En el momento actual, asistimos a una optimización del proceso de descubrimiento de fármacos multidimensional, con poderosas herramientas que permitirán analizar el potencial farmacológico de los productos naturales o de productos derivados de ellos y llegar a convertir a estas moléculas en productos activos con baja toxicidad.

Por todo ello, los productos naturales siguen siendo moléculas con un gran potencial en el desarrollo farmacéutico, ya que a diferencia de otras estrategias terapéuticas presentan una relación coste-beneficio favorable, lo que les permitirá un uso futuro en Medicina de Precisión.

Agradecimientos

Mi agradecimiento a aquellas personas que a lo largo de mi vida personal y profesional confiaron en mí, sin cuya ayuda hoy no estaría aquí.

En primer lugar, al Profesor Angel Villar, académico numerario de esta institución con quien me unen lazos muy estrechos, por animarme a iniciar la carrera académica, invitándome a venir con él a la Universidad Complutense. Muchas gracias por sus enseñanzas, pero también muy importante para mí ha sido el apoyo y el cariño recibido a durante todo este tiempo. Agradecimiento que hago también extensivo a todos mis compañeros del departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica de la Facultad de Farmacia, por todo lo compartido.

No puedo olvidarme en este momento de mis profesores de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia, en especial, los del departamento de Farmacología.

Quiero dar las gracias a mi grupo de investigación en productos naturales. Especial mención al Dr Lisardo Bosca, Académico Correspondiente de esta institución, a quien tuve la gran suerte de conocer a la vuelta de mi estancia postdoctoral y ha sido un apoyo constante, transmitiéndome su entusiasmo por la investigación. Agradecimiento que hago extensivo también a las Dras Sonsoles Hortelano del Instituto de Salud Carlos III y a la Dra. Ana Estevez de la Universidad de la Laguna, por su amistad y profesionalidad, lo que nos ha permitido formar un grupo multidisciplinar desde hace muchos años. También a todos los becarios que han participado a lo largo de estos años en nuestras investigaciones y, que hoy están en pleno desarrollo profesional, entre los que incluyo a mis actuales colaboradoras. Gracias Irene y Laura por vuestra dedicación y esfuerzo a esta actividad que tanto nos gusta.

Mi reconocimiento a investigadores con los que he venido colaborando: a la Dra. Rocío Herrero, catedrática y directora del grupo de investigación en nuevas formulaciones de administración oftálmica, de la Facultad de Farmacia: Muchas gracias Rocío por confiar siempre en mí, lo que ha permitido que hayamos emprendido muchos proyectos juntos. También a otros grupos de investigación como la Dra. Abdalla de la Universidad de Sao Paulo.

Y en el plano personal más íntimo, una mención muy especial a mi familia. Mi más profundo agradecimiento a mis padres, que con su esfuerzo y sacrificio me han permitido llegar hasta aquí. A mi marido Juan por la paciencia y comprensión que me has demostrado en todo momento. A mi hermano Adolfo y demás familia.

He tenido la inmensa fortuna de contar también con buenos amigos tanto en el ámbito académico como fuera de él, a los que quiero también decir gracias. Gracias nuevamente a todos por estar conmigo en este momento.

6. REFERENCIAS

- Mullard A. 2019 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19:79-84.
- Newman DJ and Cragg GM. Natural Products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod.* 2020;83:770-803.
- Patridge E, Gareiss P, Kinch MS and Hoyer D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discov Today.* 2016;21:204-207.
- Rodrigues T, Reker D, Schneider P and Schneider G. Counting on natural products for drug design. *Nat Chem.* 2016;8:531-541.
- Oberlies NH and Kroll DJ. Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. *J Nat Prod.* 2004;67:129-135.
- Martino E, Casamassima G, Castiglione S, Cellupica E, Pantalone S, Papagni F, Rui M, Siciliano AM and Collina S. Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. *Bioorg Med Chem Lett.* 2018;28:2816-2826.
- Zheng WR, Li EC, Peng S and Wang XS. Tu Youyou winning the Nobel Prize: Ethical research on the value and safety of traditional Chinese medicine. *Bioethics.* 2020;34:166-171.
- Campbell WC. History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13:853-865.
- Katz L and Baltz RH. Natural product discovery: past, present, and future. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2016;43:155-176.
- Heinrich M and Gibbons S. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *J Pharm Pharmacol.* 2001;53:425-432.
- Wang E, Sorolla MA, Krishnan PDG and Sorolla A. From seabed to bedside: A review on promising marine anticancer compounds. *Bio-molecules.* 2020;10:248.
- Stien D. Marine microbial diversity as a source of bioactive natural products. *Mar Drugs.* 2020;18:215.
- Laraia L and Waldmann H. Natural product inspired compound collections: evolutionary principle, chemical synthesis, phenotypic screening, and target identification. *Drug Discov Today Technol.* 2017;23:75-82.
- Hueso-Falcon I, Cuadrado I, Cidre F, Amaro-Luis JM, Ravelo AG, Estevez-Braun A, de Las Heras B and Hortelano S. Synthesis and anti-inflammatory activity of ent-kaurene derivatives. *Eur J Med Chem.* 2011;46:1291-1305.
- Hueso-Falcon I, Giron N, Velasco P, Amaro-Luis JM, Ravelo AG, de las Heras B, Hortelano S and Estevez-Braun A. Synthesis and induction of apoptosis signaling pathway of ent-kaurane derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2010;18:1724-1735.
- Chan HCS, Shan H, Dahoun T, Vogel H and Yuan S. Advancing drug discovery via Artificial Intelligence. *Trends Pharmacol Sci.* 2019;40:592-604.
- Cuadrado I, Amesty A, Cedron JC, Oberti JC, Estevez-Braun A, Hortelano S and de Las Heras B. Semisynthesis and inhibitory effects of solidagene derivatives on TLR-mediated inflammatory responses. *Molecules.* 2018;23:3197.
- Fang J, Cai C, Wang Q, Lin P, Zhao Z and Cheng F. Systems Pharmacology-based discovery of natural products for precision oncology through targeting cancer mutated genes. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2017;6:177-187.
- Bradshaw EL, Spilker ME, Zang R, Bansal L, He H, Jones RDO, Le K, Penney M, Schuck E, Topp B, Tsai A, Xu C, Nijssen M and Chan JR.



- Applications of Quantitative Systems Pharmacology in model-informed drug discovery: Perspective on impact and opportunities. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2019;8:777-791.
20. Janiaud P, Serghiou S and Ioannidis JPA. New clinical trial designs in the era of precision medicine: An overview of definitions, strengths, weaknesses, and current use in oncology. *Cancer Treat Rev.* 2019;73:20-30.
 21. Machado H, Tuttle RN and Jensen PR. Omics-based natural product discovery and the lexicon of genome mining. *Curr Opin Microbiol.* 2017;39:136-142.
 22. Khaw KY, Parat MO, Shaw PN and Falconer JR. Solvent supercritical fluid technologies to extract bioactive compounds from natural sources: A review. *Molecules.* 2017;22:1186.
 23. Duarte Y, Marquez-Miranda V, Miossec MJ and Gonzalez-Nilo F. Integration of target discovery, drug discovery and drug delivery: A review on computational strategies. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2019;11:e1554.
 24. Atanasov AG, Zotchev SB and Dirsch VM. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20:200-216.
 25. Schneider P, Walters WP, Plowright AT, Sieroka N, Listgarten J, Godnow RA, Jr., Fisher J, Jansen JM, Duca JS, Rush TS, Zentgraf M, Hill JE, Krutcholew E, Kohler M, Blaney J, Funatsu K, Luebkeermann C and Schneider G. Rethinking drug design in the artificial intelligence era. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19:353-364.
 26. Tung CW. Public databases of plant natural products for computational drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des.* 2014;10:191-196.
 27. Fang J, Liu C, Wang Q, Lin P and Cheng F. In silico polypharmacology of natural products. *Brief Bioinform.* 2018;19:1153-1171.
 28. Thomford NE, Senthilane DA, Rowe A, Munro D, Seele P, Maroyi A and Dzobo K. Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. *Int J Mol Sci.* 2018;19:1578.
 29. Wolfender JL, Litaudon M, Touboul D and Queiroz EF. Innovative omics-based approaches for prioritisation and targeted isolation of natural products - new strategies for drug discovery. *Nat Prod Rep.* 2019;36:855-868.
 30. Atanasov AG, Yeung AWK and Banach M. Natural products for targeted therapy in precision medicine. *Biotechnol Adv.* 2018;36:1559-1562.

Si desea citar nuestro artículo:

Productos Naturales: De la medicina tradicional a cabezas de serie para el desarrollo de nuevos fármacos del siglo XXI

Beatriz de las Heras Polo

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 87. Nº 1 (2021) · pp. 97 -104

DOI: <http://>

OFICINA DE FARMACIA. ATENCIÓN FARMACÉUTICA. SERVICIO PERSONALIZADO DE DOSIFICACIÓN

PHARMACY OFFICE. PHARMACEUTICAL CARE. PERSONALIZED DOSING SERVICE

Teresa Gil Alegre

Farmacéutica Adjunta en Oficina de Farmacia

***corresponding author:** mifarma.ap@hotmail.com

OTROS ARTÍCULOS

RESUMEN

Intento acercar la oficina de farmacia desde su legislación hasta su ejercicio profesional centrándonos en puntos menos conocidos como la atención farmacéutica y calidad de vida el perfil psiquiátrico que acompaña a la no adherencia al tratamiento médico. Quisiera sacar la Conclusión de que he conseguido interesar para que se conozca la misión de los farmacéuticos y técnicos en farmacia que los integran.

ABSTRACT

I try to bring the pharmacy office closer from its legislation to its professional practice, focusing on less known points such as pharmaceutical care and quality of life, the psychiatric profile that accompanies non-adherence to medical therapy. I would like to draw the conclusion that I have managed to interest so that the mission of the pharmacists and pharmacy technicians who are part of them is known.

Palabras Clave:

Oficina de farmacia
Servicios profesionales farmacéuticos

Keywords:

Pharmacy Office
Professional pharmaceutical services



Iniciaremos la comunicación conociendo a la Oficina de Farmacia desde los ojos del legislador.

La Ley 16/1997, de 25 de abril, de regulación de los servicios de oficinas de farmacia indica:

"Artículo 1. Definición y funciones de las oficinas de farmacia.

En los términos recogidos en la Ley 14/1986, General de Sanidad de 25 de abril, y la Ley 25/1990, de 20 de diciembre, del Medicamento, las oficinas de farmacia son establecimientos sanitarios privados de interés público, sujetos a la planificación sanitaria que establezcan las Comunidades Autónomas, en las que el farmacéutico titular-propietario de las mismas, asistido, en su caso de ayudantes o auxiliares, deberá prestar los siguientes servicios básicos a la población:

1. La adquisición, custodia, conservación y dispensación de los medicamentos y productos sanitarios.
2. La vigilancia, control y custodia de las recetas médicas dispensadas.
3. La garantía de la atención farmacéutica, en su zona farmacéutica, a los núcleos de población en los que no existan oficinas de farmacia.
4. La elaboración de fórmulas magistrales y preparados oficiales, en los casos y según los procedimientos y controles establecidos.
5. La información y el seguimiento de los tratamientos farmacológicos a los pacientes.
6. La colaboración en el control del uso individualizado de los medicamentos, a fin de detectar las reacciones adversas que puedan producirse y notificarlas a los organismos responsables de la farmacovigilancia.
7. La colaboración en los programas que promuevan las Administraciones sanitarias sobre garantía de calidad de la asistencia farmacéutica y de atención sanitaria en general, promoción y protección de la salud, prevención de la enfermedad y educación sanitaria.
8. La colaboración con la Administración sanitaria en la formación e información dirigidas al resto de profesionales sanitarios y usuarios sobre el uso racional de los medicamentos y productos sanitarios.
9. La actuación coordinada con las estructuras asistenciales de los Servicios de Salud de las Comunidades Autónomas.
10. La colaboración en la docencia para la obtención del título de Licenciado en Farmacia, de acuerdo con lo previsto en las Directivas Comunitarias, y en la normativa estatal y de las Universidades por las que se establecen los correspondientes planes de estudio en cada uno de ellas.

Artículo 2. Ordenación territorial.

1. En desarrollo de lo que se establece en el artículo 103.3

de la vigente ley 14/1986, General de Sanidad de 25 de abril, y el artículo 88 de la Ley 2571990, de 20 de diciembre, del Medicamento. y al objeto de ordenar la asistencia farmacéutica a la población, las Comunidades Autónomas, a las que corresponde garantizar dicha asistencia, establecerán criterios específicos de planificación para la autorización de la oficina de farmacia.

En Julio de 2006, se publica la ley 29/2006, de 26 de julio de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. Se trataba de una ley enfocada a la realidad social del siglo XXI con más protagonismo del uso de medicamentos que no precisan prescripción médica pero que debe realizarse en el marco del uso racional del medicamento, ante esta situación el farmacéutico de oficina de farmacia informará, aconsejará e instruirá sobre su correcta utilización.

La oficina de farmacia no existe como consecuencia de una Licencia Administrativa, existe por la decisión de un farmacéutico en crear con sus haberes como todo empresario, un establecimiento que supone una creación de riqueza (salarios de sus subordinados), gran ahorro a la Administración del Estado. Esta licencia se concede porque la solicita un profesional formado científicamente en una Facultad especial dentro de una Universidad: es el Farmacéutico.

Este farmacéutico al que la Universidad le ha dado toda la formación científica del momento debe actualizarse al mismo ritmo que vayan los avances él y sus compañeros de profesión no deben olvidar que ninguna profesión tiene razón de ser sin una misión que cumplir y, que cuando la misión se pierde la profesión desaparece.

Nos desilusiona ver que la Administración Sanitaria los requisitos exigidos para conceder la oficina de farmacia son de orden cuantitativo (distancia, número de habitantes) y no cuantitativos (servicios profesionales que prestará, número de profesionales que trabajarán en ella) y que no estemos ejerciendo en una profesión liberal, estamos en un sector intervenido.

Siguiendo la ley de Garantías, vemos la Dispensación: Es la actuación clínica del profesional farmacéutico por la cual proporciona, a un paciente o a su cuidador, además de medicamentos y/o productos sanitarios, los servicios clínicos que acompañan la entrega del mismo, con el objetivo de mejorar su proceso de uso y proteger al paciente de la posible aparición de problemas relacionados con los medicamentos PRM.

Para exponer la diferenciación entre los conceptos Venta y Dispensación el profesor Félix Sánchez López de Vinuesa indicaba que la dispensación como concepto conlleva una serie de fases que la convierte en un acto claramente diferente de una venta:

- a) Consideración técnico-sanitaria:
 - . Sobre la receta: confirmación de su correcta cumplimentación.
 - . Sobre el medicamento: verificación de su dosificación, envase con número de unidades, etc.
 - . Sobre el enfermo: confirmación de que ha entendido la



pauta posológica, duración de tratamiento, efectos buscados por el medicamento, o bien asegurar de que solicita el medicamento adecuado en caso de necesidad de prescripción.

. Evaluación de la relación beneficio/riesgo de la indicación prescrita o solicitada por el paciente.

b) Decidirá la entrega efectiva del medicamento al paciente una vez analizados los parámetros anteriores.

c) Control del fármaco una vez suministrado al paciente con el objetivo de prever, detectar, resolver posibles problemas relacionados con el mismo.

La entrega física del producto-medicamento no implica una dispensación; esta se produce cuando el farmacéutico informado entregará el producto al paciente.

Seguindo a la Ley de Garantías el farmacéutico asumirá la Atención Farmacéutica, entendiéndolo como tal el seguimiento individualizado de la farmacoterapia de los pacientes. La atención farmacéutica implica trabajar con el equipo de salud de la Zona interactuar con otros profesionales de la salud, principalmente los médicos pero ésta es más escasa y más difícil.

Para ella se va a necesitar de un espacio integrado pero independiente, que aporte confidencialidad y una atención totalmente personalizada es la Zona de Atención Personalizada ZAPE. Cualquier actuación debe responder a un Protocolo Normalizado de Trabajo PNT.

En 1999 la Fundación Pharmaceutical Care España publicó un Manual de Procedimientos en Atención Farmacéutica en él indica que esto supone tres funciones primordiales: Identificación de problemas relacionados con la medicación; resolver Problemas Relacionados con Medicamentos; Prevenir Problemas Relacionados con medicamentos.

Una faceta interesante es la atención farmacéutica y la calidad de vida del paciente. A finales del siglo XX surge el concepto "calidad de vida" difícil de definir pues consideran se puede distinguir diferentes interpretaciones biomédicas, socio económica, psicológica etc.

Tomando como referente principal la enfermedad, calidad de vida significa que se le garantice al paciente no solo los recursos y medio materiales, sino los asistenciales como es la atención farmacéutica.

La atención farmacéutica (seguimiento farmacoterapéutico) mide los efectos de la intervención farmacéutica y los beneficios para el paciente.

Un factor esencial en el buen resultado de un tratamiento farmacológico es la fidelidad del paciente en la toma de sus medicamentos, esta situación tiene varias denominaciones, Adherencia /no Adherencia; Cumplimiento/Incumplimiento del tratamiento fármaco-terapéutico.

¿Qué se debe entender por adherencia?. La contestación más repetida en la bibliografía son; Cumplimiento "compliance" y Adherencia "adherence". El concepto cumplimiento suscita controversias pero es el más aceptado y, lo definen como "el grado en que la conducta de un paciente en relación con la toma de medicamentos, seguimiento de una dieta o modificación de hábitos de vida coincide con las instrucciones proporcionadas por el médico o personal sanitario".

El incumplimiento puede ser eventual o habitual y esa eventualidad condicionada por situaciones sociales; familiares; anímicas. En ese punto se necesita la habilidad psicológica del farmacéutico.

Esta situación despierta inquietudes en el campo de la psiquiatría, de la farmacia hospitalaria y de la oficina de farmacia.

Emilio García Jimenez, en su tesis doctoral Incumplimiento como causa de problemas relacionados con medicamentos en el seguimiento farmacoterapéutico. Universidad de Granada. 2003 ofrece la definición dada por Antonio Iniesta en su libro Cumplimiento o Adherencia en Atención Farmacéutica, recomendaba el término "adherencia terapéutica", ya que "cumplimiento", según él, implicaba un modelo de "obediencia ciega" en la que el paciente es el responsable en seguir un plan de tratamiento prescrito sin consultarle, "paciente pasivo", mientras que la "adherencia" supone un acuerdo sobre el tratamiento y sus posibilidades.

Actualmente, las investigaciones se centran en controlar la adherencia con dispositivos de ayuda para que el paciente tome sus medicamentos facilitándole su consumo.

El servicio que ofrece la oficina de farmacia denominado Sistema Personalizado de Dosificación SPD es un servicio voluntario para el paciente voluntario para el médico, voluntario para el farmacéutico, carece de precio venta al público.

Se centra en pacientes polimedcados mayores de 65 años, pero se pueden incluir los pacientes que por diversas circunstancias tienen problema para fidelizarse al tratamiento.

El médico recomienda al paciente vaya a su farmacia y solicite preparen su medicación en un dispositivo SPD. La oficina de farmacia tiene que tener en su plantilla un farmacéutico que hubiera realizado la preparación que ofrece su Colegio Profesional consigue su acreditación que generalmente pasado un tiempo concreto (marcado por cada Colegio) deberá reacreditarse dispondrá de un espacio acondicionado en luz, temperatura, humedad, adecuadas para la manipulación de medicamentos, la farmacia precisa adquirir el material necesario para elaborarlos pudiendo ser manual o mecánicamente.

El dispositivo donde se distribuye la medicación de cada paciente consta de un soporte con alveolos para colocar la medicación acondicionada por días de la semana y momento de consumir-



los: desayuno, comida, cena; una vez distribuidos se acoplará la tapa que puede ser por calor o en frío, garantizando siempre la hermeticidad. Se recomienda que si se prepara para personas que conviven se acuerde con ellos un logotipo o cualquier señal que sirva para distinguirlos. Antes de prepararlo el paciente practica en la farmacia, debemos asegurar que tiene la suficiente destreza en su utilización. Son dosis semanales y se recomienda al paciente recoja los siguientes y traiga las carcassas para unirlos con los residuos.

El farmacéutico no está autorizado a entregar ningún medicamento en envase deteriorado o abierto, por tanto es un acto post dispensación y precisamos nos autorice por escrito la apertura de su envase original y trasladarlo a su SPD.

La farmacia preparadora puede darse de baja cuando quiera y, el paciente también causa baja cuando lo desee.

Respecto al precio no hay ninguno legalmente reconocido, los Colegios Oficiales de Farmacéuticos convienen con sus colegiados un precio modesto (en Madrid el mínimo suele ser 3euros/semana, pero se puede cobrar más); con un paciente acostumbrado a su pastillero casero que hace años le regalaron en su farmacia se niega a ese abono; incluso en determinadas ubicaciones de las farmacias (rurales, barrios marginales, etc.) hay pacientes que su economía no le permite abonarlo y el farmacéutico, generalmente opta por hacerlo gratis, hay Colegios que consiguen ayudas, (Obra Social La Caixa,.). Es una situación pendiente desde hace muchos años; el farmacéutico que prepara SPD no amortiza los aparatos adquiridos ni el gasto del material de envasado que tiene cada vez que lo prepara. Se olvidan, también que a tenor de los convenios laborales el tiempo invertido por el farmacéutico tiene un precio, aquí no, de momento.

Los pacientes que utilizan este servicio están muy satisfechos también sus cuidadores o familiares que están a su cargo y el farmacéutico también, pues sabe que semanalmente viene a la farmacia el paciente o su cuidador y le ofrece la oportunidad de ofrecerle su atención farmacéutica.

REFERENCIAS

1. Ley 16/1997, de 25 de abril, de Regulación de Servicios de oficina de farmacia. BOE núm.100, de 26 de abril de 1997, páginas 13450-13452. Referencia, BOE-A-1997-9022.
2. Ley 29/2006 de 26 de julio de 2006 de Garantías y uso Racional de los medicamentos y productos sanitarios. BOE,27/07/2006, 178:28124-28149.
3. Sánchez López de Vinuesa, Félix. 1996. "Dispensación". En Farmacia Profesional. 10(4): 6-14. 1996.
4. Guía Práctica para los Servicios de Atención Farmacéutica en la Farmacia Comunitaria, https://www.pharmaceutical-care.org/archivos/812/cuaderno_foro-v17_56_pag_alta.pdf
5. Estudios sobre la calidad de vida de pacientes afectados por determinadas patologías.2009. Informes, Estudios e Investigaciones 2009. Agencia de Calidad del Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad y Política Social. Centro de Publicaciones. Madrid. 2009
6. Iniesta García, Antonio. 1999. Cumplimiento o Adherencia en Atención Farmacéutica. Escuela Nacional de Salud. Madrid 1999
7. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. 2018. Buenas Prácticas en Farmacia Comunitaria en España. Cuadernillo Nº 14. Servicios de elaboración y provisión de Sistemas Personalizados de Dosificación (SPD). Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos . Aprobada la difusión de este documento en Pleno día 20 de marzo de 2018.

Si desea citar nuestro artículo:

**Oficina de farmacia. Atención farmacéutica.
Servicio personalizado de dosificación**

Teresa Gil Alegre

An Real Acad Farm [Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 87. Nº 1 (2021) · pp. 105 - 108

DOI: <http://>

