

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

VOLUMEN 90. NUMERO 3 (2024)
JULIO - SEPTIEMBRE
ACCESO ABIERTO





ANALES RANF

REAL ACADEMIA
NACIONAL DE FARMACIA

REVISTA CIENTÍFICA

VOLUMEN 90 · AÑO 2024 · NÚMERO 03
DOI: <https://doi.org/10.53519/analesranf>
ISSN: 1697-4271 E-ISSN: 1697-428X

VOLUMEN 90. NÚMERO 3 (2024) · JULIO - SEPTIEMBRE

SUMARIO

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

LA MAGIA DE LA FARMACBIOTECNOLOGÍA:
DE LAS MAGISTRALES A LOS VIRUS
RECOMBINANTES EN TERAPIA GÉNICA
ANTONIO LIRAS MARTÍN

DINÁMICA DE LOS RECEPTORES DE
QUIMIOQUINAS EN LA MEMBRANA CELULAR
MARIO MELLADO GARCÍA

BIOCATÁLISIS: UNA INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA FASCINANTE EN EL CSIC
ANTONIO BALLESTEROS OLMO

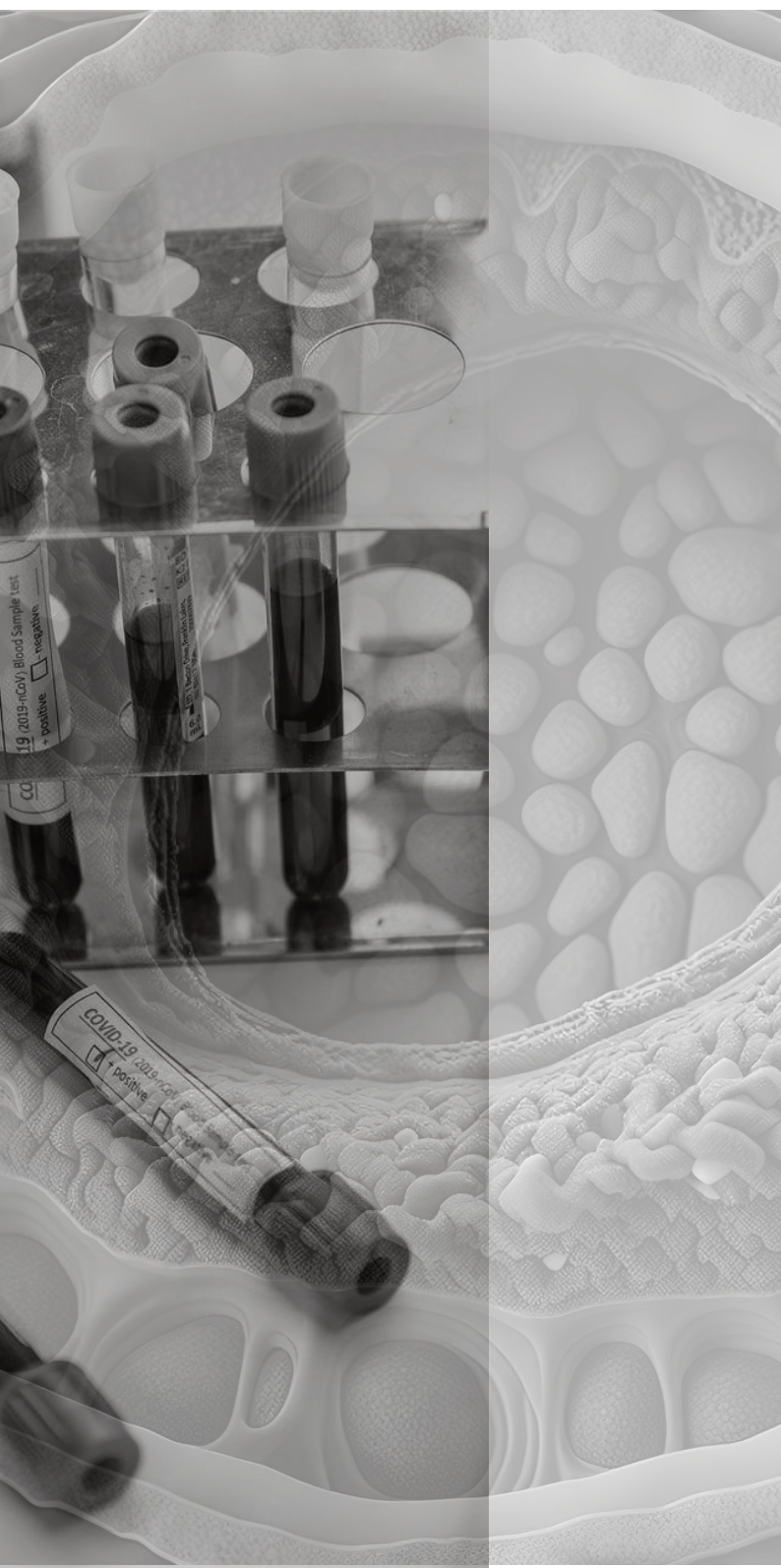
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

ESPECIES DEL GÉNERO *STAPHYLOCOCCUS*
RESISTENTES A LOS ANTIBIÓTICOS EN AGUAS DE
BALNEARIOS MINEROMEDICINALES DEL ECUADOR
UN ENFOQUE DESDE “ONE HEALTH”
FÉLIX ANDUEZA, FRANCISCO VITERI ET AL.

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA
DE GELES CON EXTRACTO ETANÓLICO DE
BACCHARIS MACRANTHA (CHILCO)
GABRIELA FERNANDA CASTELO

NOTICIAS

FÁRMACOS NOVEDOSOS AUTORIZADOS RECIENTEMENTE
POR EMA Y FDA (3º TRIMESTRE DE 2024)
SANTIAGO CUÉLLAR RODRÍGUEZ



Revista 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 DOI:<https://doi.org/10.53519/analesranf>.

Esta publicación está subvencionada por el Ministerio de Ciencia,
Innovación y Universidades.



Presidente Comité Editorial

Doadrio Villarejo, Antonio L.
Universidad Complutense de Madrid.

Directora Ejecutiva

Salices Sánchez, Mercedes.
Universidad Autónoma de Madrid.

Editor Científico

Menéndez Ramos, José Carlos
Universidad Complutense de Madrid.

Consejo Editorial

Avendaño López, Carmen.
RANF
Ribas Ozonas, Bartolomé.
RANF
Villar del Fresno, Ángel María.
RANF
Lacadena Calero, Juan Ramón.
RANF
González Bueno, Antonio I.
UCM
Salinas Sánchez, Antonio J.
UCM

Editor online - web

Manuel Tirado Juárez
RANF

Diseño

ARP Producciones

Consejo Asesor

Abelló Gallo, Juan. Alcaliber
Adolfo Pérez Miravete. Inst. Pol. Nac. (México)
Alonso Fernández, María José. USC
Arancibia Orrego, Aquiles. U. de Chile (Chile)
Badimon Maestro, Lina. U. Barcelona
Badimon, Juan José. Mount Sinai. School Medicine (USA)
Barcina Angulo, Yolanda. U. Navarra
Basante Pol, Rosa. UCM
Blasco Marhuenda, María. CNIO
Cabezas Fernández del Campo, J. Antonio. RANF
Cuervo, Ana María. Albert Einstein Institute (USA)
Sánchez Mata, Daniel P. UCM
del Castillo García, Benito. RANF
Domínguez-Gil Hurlé, Alfonso. RANF
Elguero Bertolini, José. RACEFYN
Esteban Rodríguez, Mariano. CNB-CSIC
Ganellín, Robin. Univ. Coll. London (UK)
García Asuero, Agustín. U. Sevilla
García Sacristán, Albino. UCM
García Sastre, Adolfo. Icahn - Mount Sinai (USA)
Girbes Juan, Tomás. U. Valladolid
Gómez-Serranillos Cuadrado, M^a Pilar. UCM
González Bueno, Antonio I. UCM
Guinovart Cirera, Joan J. IRB.
Imai, Kazuhiro. U. Musashino (JAPAN)
Izpisúa Belmonte, J.C. San Diego Institute of Science
Ley, Steven. U. Cambridge (UK)
Manzanares Robles, Jorge. U. Alicante
Marcos Sánchez, Ascensión. ICTAN-CSIC
Martínez Fernández, Antonio Ramón. RANF
Martínez Hernández, José Alfredo. IMDEA
Martínez Lanao, José. U. Salamanca
Martínez, Jean. U. Montpellier (France)
Mayor Zaragoza, Federico. RANF
Medina Jiménez, José M^a. RANF
Molina Martín, María. UCM
Moro Sánchez, M^a Ángeles. CNIC
Ortega Ortiz de Apodaca, Fidel. U. de Alcalá
Ortiz Melón, José Miguel. U. Cantabria
Pace, Vittorio. U. Torino (Italy)
Pedraz Muñoz, José Luis. U. País Vasco
Portha, Bernard. Paris Diderot Univ. (France)
Puerto Samiento, Javier. RANF - RAH
Ribeiro, J. Alexandre. U. de Lisboa (PT)
Rodríguez Artalejo, Antonio. UCM
Sánchez Muniz, Francisco José. UCM
Sanz Pérez, Bernabé. RANF
Sentandreu Ramón, Rafael. RANF
Simmons, Ulf. U. Aarhus (Denmark)
Tamargo Menéndez, Juan. UCM
Vallet Regí, María. UCM
Vilas Sánchez, Vicente. RANF
Zimmermann, Herbert. U. Frankfurt (Germany)

ÍNDICE

P. 299

LA MAGIA DE LA FARMACOBIOTECNOLOGÍA: DE LAS MAGISTRALES A LOS VIRUS RECOMBINANTES EN TERAPIA GÉNICA

ANTONIO LIRAS MARTÍN

P. 313

DINÁMICA DE LOS RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS EN LA MEMBRANA CELULAR

MARIO MELLADO GARCÍA

P. 329

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE GELES CON EXTRACTO ETANÓLICO DE BACCHARIS MACRANTHA (CHILCO)

GABRIELA FERNANDA CASTELO-GUEVARA, GISELLA ABIGAIL PAREDES-IZA, ALEJANDRO PATRICIO GALÁRRAGA-MACÍAS, MIRIAN FERNANDA AUQUI-GUAMÁN Y ELIANA PATRICIA SOLIS-AUCANCELA

P. 339

ESPECIES DEL GÉNERO STAPHYLOCOCCUS RESISTENTES A LOS ANTIBIÓTICOS EN AGUAS DE BALNEARIOS MINEROMEDICINALES DEL ECUADOR UN ENFOQUE DESDE “ONE HEALTH”

FÉLIX ANDUEZA, FRANCISCO VITERI, ANDREA CHÁVEZ, RAMIRO GUERRON, LUIS VILLACÍS JUDITH ARAQUE, MARCO GONZÁLEZ, SANDRA ESCOBAR-ARRIETA, ANA GONZÁLEZ-ROMERO, GERARDO MEDINA-RAMIREZ, EVELIN ALVIAREZ Y CARMINA RODRIGUEZ-FERNÁNDEZ

P. 355

BIOCATÁLISIS: UNA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA FASCINANTE EN EL CSIC

ANTONIO BALLESTEROS OLMO

P. 369

FÁRMACOS NOVEDOSOS AUTORIZADOS RECIENTEMENTE POR EMA Y FDA (3º TRIMESTRE DE 2024)

SANTIAGO CUÉLLAR RODRÍGUEZ

ARTÍCULO DE REVISIÓN

La magia de la Farmacobiotechnología: De las magistrales a los virus recombinantes en terapia génica

The magic of Pharmacobiotechnology: From magistral to recombinant viruses in gene therapy

Antonio Liras Martín

Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología, Universidad Complutense de Madrid. España.

ORCID: 0000-0002-3581-0391

e-mail: aliras@ucm.es

Discurso de ingreso como Académico Correspondiente de la RANF

Recibido el 7 de mayo de 2024; aceptado el 15 de junio de 2024

Disponible en Internet el 1 de octubre de 2024

PALABRAS CLAVE

Avances en
Biomedicina
Historia
Biotecnología
Terapias avanzadas
Enfermedades raras

RESUMEN

En la historia de las sociedades, en general, se produce una evolución progresiva, que va en paralelo a los avances de la ciencia y en concreto de la Medicina. Quizás haya que plantearse, sin miedo a equívoco, que la Farmacología ha permitido que se viva más y mejor. Si echamos la vista atrás y más los que hemos tenido la suerte de tener muy de cerca una botica de las muy antiguas, en que quizás el bisabuelo era farmacéutico, el de toda la vida, en un pueblo casi perdido de la antes Castilla La Vieja, hacia la segunda mitad del siglo XIX, podemos valorar creo, en mejor medida, los avances que se han producido. Pero, además, si el biznieto en cuestión optó por seguir una tradición familiar de ser boticario, la cosa ya toma otra dimensión, máxime cuando su vocación ha sido de boticario docente universitario y de investigador en Biotecnología. A sabiendas de que estamos ante una realidad farmacológica extraordinariamente novedosa, pareciera que nos movemos en el mundo de la magia y la sorpresa. Porque, los fines terapéuticos que se persiguen en el momento presente, eran hace décadas inimaginables, y menos a través de las técnicas, formas farmacéuticas y procedimientos actuales que son una combinación de la actividad multidisciplinar de muchos especialistas. En este camino que va desde las fórmulas magistrales, de utilidad empírica, hasta las nuevas terapias avanzadas, han nacido áreas que son la combinación de distintos saberes como así es la Farmacobiotechnología. También controlamos, en parte, a la Biología en su “alma” más íntima que es el genoma y somos capaces de crear modelos animales con una determinada patología para estudiar nuevos fármacos. La Farmacobiotechnología ha permitido obtener proteínas terapéuticas recombinantes en el laboratorio; anticuerpos recombinantes mono y biespecíficos para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades y, a través de las nuevas terapias, terapia génica y terapia celular, se pueden corregir alteraciones en los genes que dan lugar a muchas enfermedades hereditarias. Pero, en este nuevo mundo de la Farmacología moderna, que será, en gran parte, individualizada, se deberá tener presente la bioética de la sanación, no sea que los nuevos procedimientos —de alto coste— puedan incrementar más la inequidad social.

DOI: <https://doi.org/10.53519/analesranf>.

ISSN: 1697-4271 E-ISSN: 1697-428X/Derechos Reservados © 2024 Real Academia Nacional de Farmacia.

Este es un artículo de acceso abierto

**KEYWORDS**

Advances in
Biomedicine
History
Biotechnology
Advanced therapies
Rare diseases

ABSTRACT

In the history of societies, in general, there is a progressive evolution, which runs parallel to the progress of science and, in particular, of Medicine. Perhaps it is necessary to consider, without fear of misunderstanding, that Pharmacology has allowed us to live longer and better. If we look back, especially those of us who have had the good fortune of having a very old apothecary's shop, where perhaps our great-grandfather was a pharmacist, a lifelong pharmacist, in an almost lost village in the former Castilla La Vieja, around the second half of the 19th century, we can better appreciate the progress that has been made. But, in addition, if the great-grandson in question chose to follow a family tradition of being an apothecary, things take on a different dimension, especially when his vocation has been of university professor in Pharmacy and of researcher in Biotechnology. Knowing that we are facing an extraordinarily novel pharmacological reality, it would seem that we are moving in the world of magic and surprise. Because the therapeutic purposes that are being pursued at the present time were unimaginable decades ago, and even less so with the current techniques, pharmaceutical forms and procedures that are a combination of the multidisciplinary activity of many specialists. In this evolution that goes from magistral formulas, of empirical utility, to new advanced therapies, areas have been born that are the combination of different knowledge, such as Pharmacobiotechnology. We also control, in part, biology in its most intimate "soul", which is the genome, and we are able to create animal models with a specific pathology to study new drugs. Pharmacobiotechnology has made it possible to obtain recombinant therapeutic proteins in the laboratory; recombinant mono- and bispecific antibodies for the treatment of cancer and other diseases and, through new therapies, gene therapy and cell therapy, it is possible to correct alterations in the genes that give rise to many hereditary diseases. However, in this new world of modern pharmacology, which will be largely individualized, the bioethics of healing must be kept in mind, lest the new high-cost procedures can further increase social inequity.

1. INTRODUCCIÓN

Antes de nada, se ha de justificar la elección del tema del discurso [La magia de la Farmacobioteología: De las magistrales a los virus recombinantes en terapia génica]. En la historia de las sociedades, en general, se produce una evolución progresiva, que va en paralelo precisamente a los avances de la ciencia y en concreto de la Medicina. Quizás nos podamos plantear sin miedo a equívoco, que la farmacología ha permitido que se viva más y mejor. Pero, además, nuestras propias vidas, a veces, siguen, como puede ser en este caso, un paralelismo con estos avances.

Partiendo de estas premisas, la elección del argumento de mi discurso se ha potenciado más si cabe, por la circunstancia en mi caso de tener un origen, un transcurso y unos fines íntimamente relacionados con los avances en la Biomedicina. Historia, enfermedad y vocación investigadora, serían las palabras clave definitorias.

Y... ¿por qué lo de "magia"? Estamos en una realidad en que la farmacología es extraordinariamente novedosa, y pareciera que nos movemos en el mundo de la magia y la sorpresa. Porque, los fines terapéuticos que se persiguen en el momento presente, eran hace décadas inimaginables, y menos a través de las técnicas, formas farmacéuticas y procedimientos actuales que son una combinación de la actividad multidisciplinar de muchos especialistas (1). En este camino que va desde las fórmulas magistrales, de práctica muchas veces empírica, hasta las nuevas terapias avanzadas, han nacido áreas que son la combinación de distintos saberes como así es la Farmacobioteología o Bioteología Farmacéutica. Somos capaces de controlar, en parte, a la Biología en su "alma" más íntima que es el genoma y somos capaces de crear modelos animales con una determinada patología para estudiar nuevos fármacos. ¡Si nuestros antepasados levantarán la cabeza! ¿No pareciera



que todo esto tiene algo de mágico? Curar modificando el genoma de nuestras células mediante terapia génica. Pareciera que se cerrara un círculo desde las prácticas mágicas de la Prehistoria hasta la “magia” de la biotecnología de nuestro siglo XXI.

2. EL PRINCIPIO DE LA HISTORIA

El principio de la historia podría comenzar y de hecho así fue, en una botica de las muy antiguas de finales del S. XIX (2) (como la de Fortunata y Jacinta) en que un farmacéutico, D. Gabriel Herrero Tejedor (el bisabuelo del que ahora habla) en un pueblo perdido de la antes Castilla La Vieja, Navas de Oro, preparaba fórmulas magistrales que dispensaba en forma de papelinás y de obleas. Estos momentos de finales del S. XIX y principios del S. XX fueron el núcleo de cristalización de los avances científicos y de la farmacología que después vendrían. Pero también lo fue aquel farmacéutico, en sus últimos años de su vida, como inductor de una vocación farmacéutica en el biznieto en cuestión que optó por seguir la tradición familiar de ser boticario, pero, además, docente universitario e investigador en Biotecnología.

El siglo XIX supuso un cambio, una transformación única y abismal en el medicamento

y, por ende, para la profesión del boticario que pasaría a denominarse farmacéutico. Ese paso vino acompañado del avance de la química, de la enseñanza en universidades, del desarrollo de la botánica y de la obtención de los primeros principios activos (3).

Las formulaciones más o menos empíricas como fórmulas magistrales individuales dejaban atrás la célebre y conocida fórmula verbal “hágase según arte” utilizada en las reboticas, para dar paso a la especialidad farmacéutica industrial. El boticario trabajaba con los denominados productos simples y otros medicamentos compuestos que elaboraba con arte, ciencia y cierta dosis de misterio y magia. La Triaca Magna (4) (Figura 1), un anti venenos secreto, con un total de 60 ingredientes que se encontraba plasmada en las Concordias desde el S. XVI, dejaba de ser la estrella a finales de ese S. XIX. Aquellos tiempos lo eran de preparaciones sencillas como: mantecas, enjundias, médulas preparadas, los simples, infusiones...; y otras preparaciones como: aceites, jabones, aguas destiladas, gargarismos y lavativas, supositorios o calas.... A mediados de 1800 se incorporarían, además, formas farmacéuticas más novedosas como las cápsulas de gelatina, las grageas, los comprimidos o los inyectables.

Aquel farmacéutico (Figura 2), el de toda la vida, D. Gabriel Herrero Tejedor nacido en Aldea

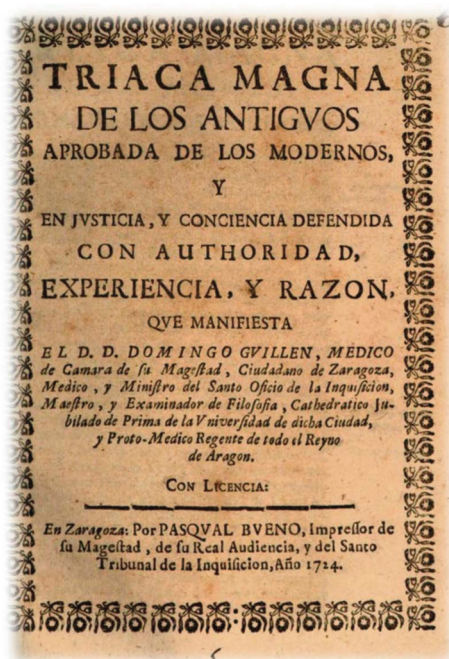


Figura 1. Triaca Magna de los antiguos aprobada de los modernos y en justicia y conciencia defendida con autoridad, experiencia y razón, manifestado por D. Domingo Guillén, médico de cámara de su Majestad. Impresión de la Real Audiencia y del Santo Tribunal de la Inquisición, Año 1724.



Aldea del Rey , 1873



Universidad Central de Madrid, 1894



Navas de Oro , 1917

Figura 2. D. Gabriel Herrero Tejedor nacido en Aldea del Rey (Segovia) en 1873, licenciado en Farmacia por la Universidad Central de Madrid en 1894 y farmacéutico en Navas de Oro (Segovia) desde 1917.

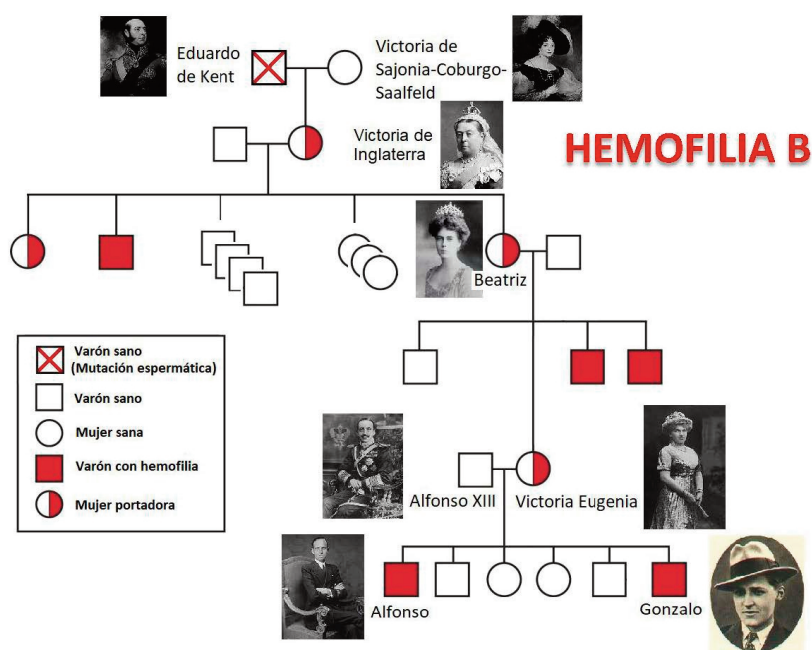
del Rey (hoy Aldea Real), provincia de Segovia, en 1873, se licenció en Farmacia por la Universidad Central de Madrid en 1894 y ejerció en la farmacia de calle Carretas 33 (ya desaparecida) y paradójicamente hoy establecimiento de cannabis; también en Villadiego (Burgos); Otero de Herreros y finalmente en Navas de Oro en Segovia desde 1917. Casi 30 años de farmacéutico en esta última localidad sanando a ricos y pobres (a los que regalaba los remedios). Recibió el reconocimiento de esta última localidad con una calle dedicada con su nombre a su labor farmacéutica y por el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Segovia a sus 100 años de edad.

3. HASTA AQUÍ LOS ORÍGENES

A partir de ahora, la historia de una enfermedad, de una vocación científica y la revolución biomédica. Para ello, es necesario concretar dentro del amplio espectro de la biomedicina. Nos vamos a centrar en un tipo de patologías que son las coagulopatías congénitas. Y nos encontramos ya en los albores del S. XX. Puestos así en contexto podemos decir, en general, que aquel siglo XX dio lugar a la primera revolución farmacéutica, aunque en sus primeras décadas las cosas iban algo despacio.

La hematología empezaba a florecer y ya se hablaba de personajes importantes en la materia (5). Estos son los momentos en que la hemofilia irrumpía en España, en la Casa Real Española (6) (**Figura 3**) a partir de la Reina Victoria de Inglaterra, portadora espontánea de la enfermedad, hemofilia B, por una mutación espermática en su padre Eduardo de Kent. Su hija Beatriz también portadora, introduce directamente la enfermedad a través de su hija Victoria Eugenia que desposa con Alfonso XIII Rey de España en ese momento. Dos hijos de este matrimonio, Alfonso y Gonzalo sufren la enfermedad.

Pero... ¿cuál era la situación médica en esos momentos entre 1900 y 1940? Con respecto a la hemofilia el desconocimiento era pleno, ni se conocían las causas y ni mucho menos el tratamiento. Un ilustre médico hematólogo italiano, Gustavo Pittaluga (7), fue nombrado médico personal de la Casa Real para hacerse cargo de la enfermedad. Los tratamientos: veneno de serpiente, clara de huevo, extracto de cacahuete, transfusiones de sangre, apósitos, inmovilización y aplicación de frío. Las consecuencias: mínima integración social, artropatía hemofílica invalidante y muerte a edad temprana. El Príncipe de Asturias, Alfonso, a los 31 años y el Infante Gonzalo a los 19.



HEMOFILIA B

Figura 3. La hemofilia B en la Casa Real Española a partir de la Reina Victoria de Inglaterra, portadora espontánea de la enfermedad por una mutación espermática en su padre Eduardo de Kent. Su hija Beatriz también portadora, introduce directamente la enfermedad a través de su hija Victoria Eugenia que desposa con Alfonso XIII Rey de España. Dos hijos de este matrimonio, Alfonso y Gonzalo sufren la enfermedad.

Y ¿qué pasaba fuera de la Casa Real? Pues más o menos lo mismo, hemofilias por mutaciones espontáneas en muchas familias que padecerían la enfermedad. Vamos a tierras segovianas, por poner un ejemplo. Nuestro farmacéutico Gabriel se desposa con Mamerta en 1900; su primera hija Ana María nace en 1901; ésta desposa con Timoteo y su hija Carmen nace en 1930 (portadora de hemofilia en este caso hemofilia A por una mutación espontánea en los espermatozoides de su padre Timoteo), todo igual, pero sin ser Reina de Inglaterra, porque... las enfermedades no entienden de estirpes ni rangos. En 1955 nacería Antonio, aquí presente, con hemofilia A grave.

En la cronología temporal, un punto de inflexión se dio en 1937 con los estudios de Patek y Taylor (8) en donde se describía la fracción que llamaron globulina antihemofílica que, obtenida a partir de plasma humano de personas sanas, podía neutralizar los procesos hemorrágicos. Más tarde en 1946 Jessica Lewis y sus colaboradores (9) ensayaron los primeros derivados concentrados de proteínas de plasma para el tratamiento de los pacientes con trastornos hemorrágicos.

Y.. estamos ya sin darnos cuenta a mediados del S. XX en el inicio de la revolución farmacéutica (10) y de la medicina, una revolución en los diagnósticos, en la definición y clasificación de las

enfermedades y además en la Farmacología. Se produce el paso de las drogas químicas y de origen vegetal a los fármacos que se denominan biológicos, o lo que es lo mismo aquellas moléculas grandes proteicas que se obtienen de un organismo, o se adecúan en un laboratorio, para que tengan efectos beneficiosos. Así, en la década de los 60' se comenzaban a utilizar los llamados crioprecipitados de muy baja eficacia pero que solventaban en parte los problemas de sangrado.

Aun así, en aquellos años (y volvemos a Segovia como ejemplo) el diagnóstico de un niño hemofílico se solía realizar por los síntomas clínicos de sangrado a los pocos días desde el nacimiento hasta los dos años de edad con las primeras denticiones. Además, los crioprecipitados no tenían la suficiente potencia terapéutica como para evitar una artropatía hemofílica en los pacientes.

Pero la verdadera revolución en coagulopatías congénitas se dio en la segunda mitad del S. XX. Los genes codificantes de los factores de la coagulación se empezaron a clonar en especial el del factor VIII y el del factor IX cuya alteración da lugar a hemofilia A y B respectivamente. El diagnóstico molecular de las mutaciones comenzaba a dar sus primeros pasos y aparecían en los años 70' los factores plasmáticos de pureza intermedia y después los de alta eficacia.



Mientras, en Segovia, 1973, D. Gabriel Herrero recibía el homenaje a toda una vida de farmacéutico por el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Segovia. Un año más tarde casi coincidiendo con el final de su vida, 1974, su biznieto (cosas del azar o vete tu a saber), iniciaba en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid sus estudios de farmacéutico, por vocación y por consejo de su padre Antonio que pensaba en una profesión tranquila en la rebotica para su hijo con hemofilia (nada más lejos de la realidad que fue).

Los tiempos prometían. Aparecían noticias alentadoras sobre los nuevos factores plasmáticos, que padres y madres de pacientes hemofílicos buscaban y leían en la prensa. Ese mismo año de 1974 los pacientes aprendíamos la autoadministración intravenosa de aquellos factores plasmáticos de alta eficacia que nos devolverían la esperanza de vivir de otra forma, más y mejor.

Pero, cómo no siempre todo es de color de rosa, esos mismos factores plasmáticos que nos habían dado la esperanza de vivir, arrebatában la vida en los años 80'. La infección por el VIH (11) entró en la vida de los pacientes hemofílicos y casi el 80% de los pacientes no vivió para disfrutarlo.

Los años 90' ofrecían un momento clave de revolución biomédica para las coagulopatías congénitas y para otras enfermedades, que fue el paso de los medicamentos biológicos a los biotecnológicos que son aquellos que, en base a los biológicos, se obtienen por técnicas generalmente de ingeniería genética. La era recombinante estaba servida (12-14) y los pacientes empezaban a disfrutar de medicamentos altamente eficaces y seguros. Los pacientes en su domicilio tenían su producto recombinante a su disposición para el autotratamiento.

Coincidiendo precisamente con esta revolución farmacológica, en las últimas décadas del S. XX, se dio un cambio en la forma de relacionarse los médicos y los enfermos desde un modelo paternalista a uno autonomista. Se empezó a introducir el concepto de tratar, no una enfermedad, sino a una persona que padecía su enfermedad. El sujeto tomaba un papel relevante en el arte de curar. Los aspectos sociales, psicológicos y personales tomaban peso en la

práctica médica. Así, en 1973 la Asociación Americana de Hospitales aprobó la primera Carta de Derechos del Paciente (15), que suponía el reconocimiento oficial del derecho del enfermo a recibir una completa información sobre su situación clínica y a decidir entre las distintas opciones terapéuticas, como adulto autónomo y libre que era. Esto abrió las puertas al movimiento asociativo, y las asociaciones de pacientes fueron un hito en la historia de la medicina y la terapéutica.

Derivado de la posibilidad de diagnosticar un mayor número de enfermedades, aparece el concepto, a mediados de los años 80', de enfermedad rara y ultra rara (16, 17) en base a la casuística de frecuencia en la incidencia (inferior a 1 de cada 2000 individuos o inferior a 1 de cada 50000). En coagulopatías congénitas hablamos de enfermedad rara, como, por ejemplo, la hemofilia A o la B y de ultra rara como el déficit de factor V. Esto que pareciera algo irrelevante a simple vista, se convierte en un inconveniente inesperado, como más adelante comentaré.

Pero cambiamos de siglo, al XXI, el que iba a ser el del fin del Mundo, aunque todavía estamos a tiempo. Nos seguimos sorprendiendo con los avances biomédicos, y si pensábamos que todo estaba ya conseguido o medio conseguido, surgen los medicamentos biotecnológicos mejorados de mayor vida media; surgen las llamadas nuevas terapias avanzadas (18), la terapia celular basada en células, la medicina regenerativa basada en trasplantes de órganos o tejidos y la terapia génica basada en corregir o sustituir genes alterados. Y si esto pareciera poco, surge la inmunoterapia (19), las terapias basadas en ARN mensajero y el CAR-T (20). En el diagnóstico, la biopsia líquida (21) por la que se pueden detectar y analizar distintas biomoléculas circulantes en fluidos biológicos como enzimas, proteínas, ácidos nucleicos o factores angiogénicos, representa una gran novedad ya que se trata de una técnica de alta especificidad y mínimamente invasiva porque se puede realizar en muestras, fundamentalmente en sangre, con aplicación en el diagnóstico prenatal y en el diagnóstico precoz del cáncer. La secuenciación masiva (22) de última generación por su parte complementa esta técnica y permite la secuenciación rápida y precisa del genoma.

4. ¿A DÓNDE NOS PUEDE LLEVAR TODO ESTO?

En general, seremos capaces, por ejemplo, de corregir un defecto hereditario en los genes; reproducir una enfermedad genética en un organismo; curar el cáncer mediante inmunoterapia y CAR-T; lograr, por ejemplo, que los niños con inmunodeficiencia combinada severa salgan de sus burbujas o que se devuelva el color de la vida a aquellas personas que padecen acromatopsia. También, que podamos controlar a largo plazo el sangrado en aquellos pacientes con coagulopatías congénitas mediante las terapias avanzadas, terapia celular o terapia génica.

El gran avance en el tratamiento de las coagulopatías congénitas y en concreto en hemofilia A y B ha sido la incursión de los fármacos biotecnológicos de origen recombinante en base a los plasmáticos. Presentan una larga vida media, gracias a la modificación en su estructura, por pegilación por ejemplo o por coexpresión con albúmina o inmunoglobulinas; son más eficaces y con menos efectos adversos; son el tratamiento óptimo y el de elección para hemofilia A y B; permiten una mejor inserción laboral y social; una alta calidad de vida; una muy buena adherencia y no tienen efectos secundarios ni riesgos de infección por patógenos. Además, presentan una muy baja inmunogenicidad ya que se obtienen y se modifican postraduccionalmente en células de origen humano.

Pero realmente la novedad farmacológica de este siglo XXI para la hemofilia ha sido el establecimiento de los nuevos protocolos de terapias avanzadas. Son procedimientos factibles tanto para enfermedades monogénicas como poligénicas y se justifican claramente en patologías graves o crónicas, cuando no existe un tratamiento o si lo hay este es tedioso, incómodo o con graves efectos secundarios adversos.

En hemofilia las células pluripotentes inducibles (iPSCs) son las células estrella para terapia celular, y en terapia génica, los vectores adenoasociados y lentivirales son los de mayor potencial clínico, en protocolos de terapia génica *in vivo* en que se inyecta en el torrente sanguíneo el propio vector que porta el gen terapéutico de factor VIII o de factor IX.

Así, el año pasado se aprobaron el Roctavian para hemofilia A (23) y el Hemgenix (24) para hemofilia B, basados ambos en vectores virales adenoasociados que se administran por vía intravenosa.

La pregunta clave es si mediante estos procedimientos se curará la hemofilia. La respuesta, hoy por hoy, es que no. No se corrige la causa endógena mutacional y en consecuencia se produce la expresión de la proteína durante unos pocos años y con fenotipos leves o moderados. Hay estudios muy interesantes, entre los que se encuentra la colaboración de nuestro grupo de investigación con la Dra. Follenzi de la Universidad de Piamonte en Novara (Italia) y la Dra. M^a José Sánchez de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla, en que intentamos corregir precisamente mediante técnicas de terapia celular y edición génica con CRISPR la mutación en hemofilia A en los estadios embrionario y fetal (25, 26).

¿Cuáles son los inconvenientes actuales de estos protocolos de terapia génica que hay que solventar? En primer lugar, la alta variabilidad individual en la respuesta. Esto hace que al existir ya un tratamiento recombinante actual muy eficaz y seguro para los pacientes con hemofilia, la terapia génica no representa, hoy por hoy, un tratamiento de primera línea. La segunda cuestión es que se alcanzan fenotipos moderados o leves (39 al 50% del valor de referencia). Tanto el decaimiento de la expresión de la proteína con el tiempo como los niveles alcanzados, se pueden explicar primero porque el virus no es integrativo de genoma, pero fundamentalmente por la alta inmunogenicidad que presenta la cápside de este tipo de virus adenoasociados que se deriva en una importante hepatotoxicidad con un aumento en las transaminasas. Esto obliga al uso concomitante de inmunosupresores, como son los corticoides, con sus bien conocidos efectos adversos. Y, por último, y no menos importante, es su coste que ronda los 3 millones de euros por inyección, lo que hace desconfiar de su eficiencia en la relación coste-beneficio, teniendo en cuenta que tampoco representan estos protocolos la cura de la enfermedad.

Las terapias avanzadas si funcionan bien serán un hito, pero atención porque vamos, hoy por hoy, por caminos empíricos en lo que respecta a sus

efectos adversos y desconocemos muchas cosas, y los resultados pueden ser fatales, como así se notificó a finales del año pasado (27).

Otra desconfianza que nos puede surgir es la relativa a si estos procedimientos incrementarán aún más, si cabe, las brechas de inequidad que ya se dan en el momento presente en el Mundo con los tratamientos convencionales. Pensemos que, de los 400.000 pacientes con hemofilia en el Mundo, tan solo 100.000 se tratan adecuadamente. No se nos puede olvidar que la justicia y la equidad son pilares básicos para la bioética de la asistencia sanitaria.

En otro orden de cosas, otra cuestión puede ser si todas las enfermedades tienen la misma prioridad en sus tratamientos. Aquí inevitablemente tenemos que volver al concepto de enfermedad rara y ultra rara. No hace falta indagar demasiado para comprender que las prioridades de una enfermedad común, rara y ultra rara son obviamente muy diferentes. Si estudiamos, por ejemplo, la cadena de valor de traslación clínica entre la hemofilia A que es una enfermedad rara y el déficit de factor V que es una ultra rara (**Figura 4**), existen importantes diferencias por no decir que son dos mundos diferentes. En el caso de la hemofilia el proceso,

desde los incipientes y empíricos procedimientos ya comentados, pasando por los medicamentos biológicos como el plasma y derivados, hasta llegar a los fármacos biotecnológicos y ahora a la terapia génica, ha seguido una evolución casi natural en base al avance de los conocimientos en biomedicina. Si nos fijamos en el déficit de factor V se puede decir que no ha habido ningún avance en su tratamiento que sigue siendo a base de plasma fresco congelado, como en aquel niño segoviano de 1960.

Pero no es que no se haya investigado sobre factor V, más bien todo lo contrario. En los años 70' y 80' se purificó y caracterizó; en 2014 se obtuvo el primer factor V recombinante (28); en 2016 se estudió su estabilidad, seguridad farmacológica y sus propiedades farmacocinéticas (29), y en 2022, antes de ayer, se estableció su indicación no solo para el déficit de factor V sino también para otras situaciones como la coagulopatía traumática aguda (30). Pero... todavía no hay un factor V recombinante comercializado. Las razones económicas, en base a la mayor o menor incidencia de una enfermedad ¿pueden condicionar las prioridades?

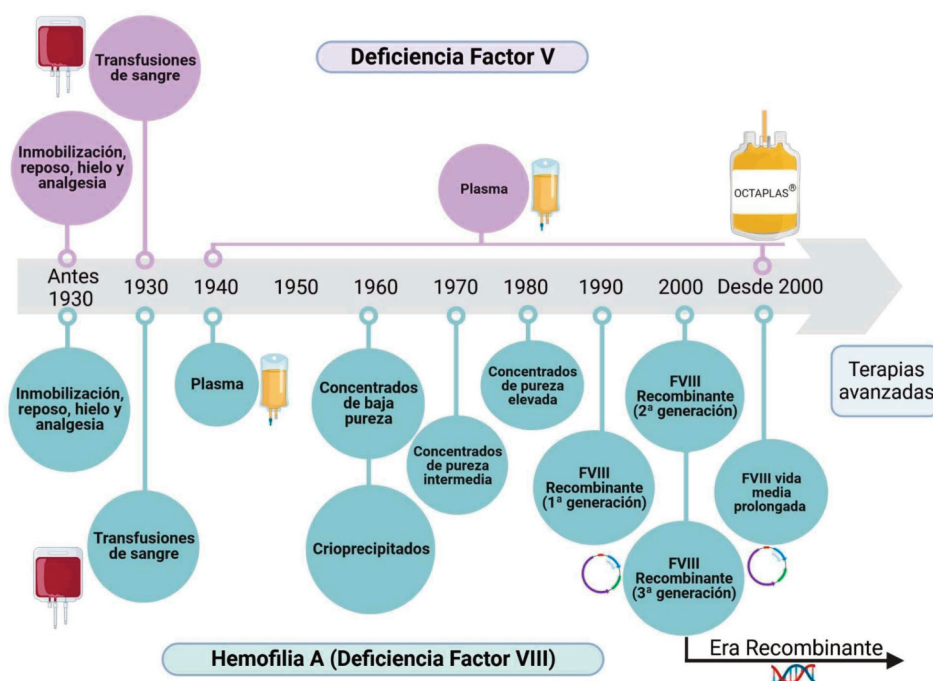


Figura 4. Cadena de valor de traslación clínica en hemofilia A y en el déficit de factor V, desde los incipientes y empíricos procedimientos de tratamiento, pasando por los medicamentos biológicos como el plasma y derivados, hasta llegar a los fármacos biotecnológicos (recombinantes) y la terapia génica.



5. NUESTRO GRUPO DE INVESTIGACIÓN: APORTACIONES AL CONOCIMIENTO

5.1. Los comienzos, circunstancias y desafíos

Hasta aquí la historia, ahora toca “arremangarnos” para contribuir a la generación del conocimiento y al desarrollo científico. Hace ahora 10 años, en 2013, nuestro grupo de terapias avanzadas: génica y celular del Campus de Excelencia Internacional de la Universidad Complutense de Madrid, para el tratamiento de las coagulopatías congénitas, se encontraba desarrollando un ambicioso proyecto sobre terapia génica no viral para la hemofilia B (31). Nuestra metodología era muy novedosa y, sobre todo, muy segura para los pacientes, ya que utilizábamos vectores no virales, como la nucleofección, para introducir el gen codificante de factor IX de la coagulación en células madre derivadas de tejido adiposo. Estas células se aislaban a partir de liposucciones y en gradientes de densidad y se caracterizaban por inmunocitometría de flujo y por diferenciación celular: adipogénica, osteogénica y condrogénica. Aunque los niveles de expresión eran muy bajos, estos estudios representaban el inicio de un protocolo seguro de terapia génica no viral. Pero la falta de financiación en ese momento, que nos impedía competir con grandes grupos de investigación en terapia génica viral para hemofilia B, hizo que el proyecto no pudiera continuar y se tuviera que cambiar el rumbo de las investigaciones.

Los momentos de cambio, en general, se producen por distintas circunstancias. En nuestro caso fueron las descritas de vía muerta, pero también se dieron otras que tienen que ver, precisamente, con las enfermedades ultra raras.

En 2013, en Jaén, M^a José y Manolo, aquí presentes, padres de Celia que presenta un déficit grave de factor V de la coagulación, buscaban ayuda y acudieron a la Federación Mundial y a la Española de Hemofilia para solicitar información sobre qué grupos investigaban en esa patología. No se encontraron grupos. Se afilian entonces a la Asociación Andaluza de Hemofilia, cuya presidenta en esos momentos, Lola Camero (aquí presente), se interesa por el tema y se convierte en la impulsora del proyecto. Contacta con el entonces presidente de la Comisión Científica de la Real

Fundación Victoria Eugenia que era el que ahora habla, e iniciamos la búsqueda de información sobre investigaciones en factor V y tan solo un grupo italiano y otro de La Jolla hacían algo sobre ello. En 2014 se toma una decisión relevante de reorientación del grupo de investigación hacia factor V. En 2015, se organiza el primer evento de crowdfunding para el proyecto de factor V: RETO “Por la investigación en el déficit de factor V, con V de Victoria”, y en noviembre de ese mismo año se registra el proyecto en Orphanet. 2016, se consigue para Celia, como medicamento extranjero, el Octaplas® (32), que permite una mejor dosificación de los factores de la coagulación. 2017, se obtiene la primera ayuda de financiación por una empresa farmacéutica, y el que ahora os narra, después de 30 años en la investigación, y por primera vez, ponía cara y la máxima relevancia a su labor investigadora.

Pero aparte de las circunstancias que dieron lugar a este ambicioso proyecto, nos encontrábamos frente a muchos desafíos. Era un proyecto de gran envergadura en el que partíamos de cero (porque no había nada descrito) e íbamos hacia lo desconocido. Había que afrontar la muy alta responsabilidad que suponía, y se necesitaba para ello una colaboración multidisciplinar para abordarlo. A favor teníamos el apoyo y la esperanza de la sociedad que era de forma directa, de la propia paciente, de sus familiares, y de otras personas que creían en la causa. Todo esto canalizado a través de la creación de una muy joven asociación, la Asociación para la Investigación y Cura del Déficit de Factor V, Una Esperanza para Celia (Figura 5), cuya presidenta es la propia madre de Celia.

5.2. La consolidación y los apoyos. Objetivos

Nuestro grupo se fue consolidando con la colaboración de muchos investigadores y centros de investigación que apostaban por el proyecto porque..., las enfermedades olvidadas también debían ser investigadas.

Así, el objetivo general de nuestro proyecto es encontrar un tratamiento para el déficit de factor V mediante terapias avanzadas, terapia celular y terapia génica. Los objetivos específicos han sido y son la producción de factor V en hepatocitos obtenidos a partir de células madre mesenquimales de decidua de placenta humana; el estudio mutacional completo de la paciente y



Figura 5. Asociación para la Investigación y Cura del Déficit de Factor V. Una Esperanza para Celia, que financia el proyecto de investigación sobre terapias avanzadas para el déficit de factor V. Disponible en: <https://unaesperanzaparacelia.org/>.

de sus progenitores, y la obtención de un modelo animal patológico en ratón y de un modelo celular, ambos deficitarios en factor V. Con la consiguiente estandarización de la medida de los niveles de factor V en ratón. Todos estos objetivos se han cumplido.

Son tres todavía las pruebas de inicio (de concepto) que nos hemos planteado: una la corrección de la mutación en el modelo celular *in vitro* mediante edición génica con CRISPR que ha sido exitosa, y mediante vectores lentivirales en que se han obtenido resultados positivos preliminares. Tenemos pendientes las otras dos, una de terapia celular mediante microtrasplante de hepatocitos funcionales mediante andamiajes o scaffolds que se encuentra en progreso, y la segunda de terapia génica mediante vectores lentivirales, con resultados preliminares positivos, ambas en el modelo patológico animal *in vivo*. Recientemente (ahora mismo se encuentra Juan Andrés de Pablo en Estados Unidos) hemos iniciado una colaboración con el grupo de la Dra. Drygalski del Centro de Tratamiento de Hemofilia y Trombosis de la Universidad de California en San Diego, con el objeto de ensayar su factor V recombinante en nuestro modelo patológico de ratón, mediante perfusión intravenosa.

5.3. La difusión de los resultados

Los resultados obtenidos hasta ahora por el grupo de investigación han dado lugar a distintas

publicaciones, todas ellas en revistas de alto impacto y Q1.

Respecto a los estudios de terapia celular, se publicaron en la revista *Biomedicine & Pharmacotherapy* (33), donde se describió la obtención de células madre mesenquimales a partir de decidua de placenta humana y su diferenciación a hepatocitos que expresaban factor V.

Los estudios genéticos y hematológicos de la paciente y de sus progenitores se publicaron en la revista *International Journal of Molecular Sciences* (34), donde se describieron las mutaciones y su segregación, referenciándose, además, una nueva mutación en factor V, en el padre, que nunca se había descrito, la c.3279G.

La estandarización de los niveles de factor V, tiempo de protrombina y de tromboplastina parcial activada en ratón, que hasta ese momento no estaba descrita, se publicó en la prestigiosa revista *Frontiers in Veterinary Science* (35).

La obtención del modelo celular deficitario en factor V mediante CRISPR, se publicó también en la revista *International Journal of Molecular Sciences* (36) donde se describió la producción del modelo *knock-out* y la propia corrección de la mutación (que emulaba la misma que presenta nuestra paciente) mediante la misma técnica de edición génica. Se obtuvo, además, la patente del método de recuperación de la mutación mediante edición génica (37).

Respecto al modelo patológico animal en ratón deficitario en factor V, en este caso *knock-in*, obtenido también mediante CRISPR y técnicas de reproducción asistida *in vitro*, se ha obtenido la patente (38) y la publicación, enviada a la revista *Thrombosis Research*, se encuentra actualmente en revisión editorial.

6. CONCLUSIONES

Para finalizar, hay que decir que estamos, en general y también en nuestro grupo de investigación en particular, en un momento de euforia, gracias a las nuevas terapias avanzadas que permitirán una farmacología individualizada y personalizada.

Llegaremos a curar algunas enfermedades; a paliar otras, que no curar, durante un largo periodo de tiempo, que pudiera ser toda una vida para algunos pacientes; y en definitiva incrementaremos la esperanza y calidad de vida de las personas.



Todo ello gracias a la “magia” de la Farmacobioteología, porque somos capaces de actuar sobre el genoma y sobre los mecanismos más íntimos de la etiopatogenia.

Esperemos que la “magia” consiga también superar ese gran escollo que es la óptima traslación clínica desde los modelos animales al humano, y ya puestos a pedir, a que no veamos noticias como las que a veces se leen en la prensa (39).

Agradecimientos

Excelentísimos señores presidente, vicepresidente y secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia, Excelentísimas señoras y Excelentísimos señores Académicos, señoras y señores, y otros más jóvenes y muy jóvenes. El inicio de mi disertación debe ser de profundo agradecimiento y admiración hacia la Real Academia Nacional de Farmacia y a quienes han depositado en mí su confianza al haberme acogido como Académico Correspondiente electo de esta noble corporación. Es un altísimo honor para mí. Mi especial gratitud a la Excm. Sra. Dña. María Molina Martín por haber accedido gustosamente a mi presentación en este acto.

Quiero recordar, hoy y aquí, a mis maestros de aquellos inolvidables años de promoción 1974-79 en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, profesores todos ellos de una muy alta categoría humana y académica, y, en especial, a aquel profesor de Bioquímica, el Dr. Ángel Jiménez Solves, a veces exigente, pero que me inculcó la vocación por la Bioquímica y el poder de la fuerza de voluntad, y los que lo conocieron entenderán por qué digo esto. También a aquellos maestros en el “arte” de la Bioquímica y Biología Molecular de los que me nutrí de su sabiduría, en los primeros momentos de mi carrera investigadora predoctoral en la Universidad Autónoma de Madrid. El Dr. Alberto Sols y la Dra. Gertrudis de la Fuente, ya fallecidos, que lograron en mí el “enamoramiento” por hacer ciencia, por la enzimología, por la patología molecular, por la bioquímica y la biología molecular. De mi etapa postdoctoral en el Instituto Neurológico “Carlo Besta” de Milán, guardo recuerdo muy especial y nostálgico. Allí, en la maravillosa Milán de la Italia, el Dr. Stefano DiDonato, también fallecido hace unos años, y el Dr. Gaetano Finocchiaro, me abrieron los ojos a nuevas perspectivas y mundos

en la investigación biomédica, y siempre reconocieron mis estudios y logros allí en tierras lejanas.

También, hoy y aquí, recordar y agradecer a esas otras personas que de forma indirecta han hecho posible esta extraordinaria circunstancia del día de hoy, mis padres Carmen y Antonio, sin los cuales no estaría aquí; al equipo médico de la Unidad de Hemofilia y al Servicio de Farmacia del Hospital Universitario La Paz de Madrid, sin los cuales tampoco estaría hoy aquí; a D. Antonio Camero y a Dña. Carmen Melero que, desde su extensa experiencia de vida y su interés por la cultura, siempre han creído en mi actividad profesional y siempre la han valorado como los que más; a la familia de Celia, nuestra paciente en estudio que padece deficiencia severa de factor V de la coagulación, que ha dejado en nuestras manos, con confianza plena, el llegar a una futura terapia avanzada para su enfermedad y que ha dado sentido y una nueva perspectiva a nuestra labor investigadora, y también, por qué no decirlo, a una muy alta responsabilidad; a nuestros hijos que son el relevo generacional, en base a lo que mejor o peor les hemos inculcado, y, en fin, y en especial, a Lola, mi mujer y compañera, aquí presente, que ha sido mi “motor” durante los últimos años, en momentos duros y especiales, y que revitalizó mi persona y mi actividad profesional. Desde el punto de vista profesional e investigador, agradecer a la Real Fundación Victoria Eugenia por concedernos dos premios de investigación que sirvieron de estímulo para proseguir con el proyecto en terapias avanzadas para el tratamiento de coagulopatías congénitas, y también como no, a aquellos investigadores que han colaborado y colaboran en nuestro proyecto de investigación, los Dres. Damián García-Olmo y Mariano García-Arranz de la Fundación Jiménez Díaz; Ana Isabel Flores del Instituto de Investigación 12 de Octubre; Sara Bernal del Hospital Sant Pau; José Carlos Segovia y Luis Javier Serrano del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas; Pablo Bermejo del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria; Luis Revuelta de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y a los incansables predoctorales Juan Andrés de Pablo y Andrea Miguel, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.



7. REFERENCIAS

1. Pérez-Porto J, Gardey A. (2022) Multidisciplinariedad. Disponible en: <https://definicion.de/multidisciplinariedad/>.
2. Muñoz-González MR. (2021). Momentos estelares de la historia de la farmacia durante el siglo XIX. (Trabajo Fin de Grado Inédito). Universidad de Sevilla, Sevilla. Disponible en: <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/133052/MU%c3%91OZ%20GONZALEZ%20MARIA%20ROS A.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
3. Carmel Ferragud (2021). El nacimiento del medicamento industrial. Disponible en: <https://sabersenaccio.iec.cat/es/el-nacimiento-del-medicamento-industrial/>.
4. Francisco J Puerto Sarmiento (2009). La Triaca Magna. Disponible en: <https://ranf.com/wp-content/uploads/academicos/discursos/numero/puerto.pdf>.
5. Burgeta-Alonso de Ozalla C. La especialidad de Hematología-Hemoterapia: Antecedentes. Desarrollo asistencial y científico y Perspectivas futuras. Rev Inv Edu Ciencias Salud (RIECS) 2023; 8: 1; doi: <https://doi.org/10.37536/RIECS.2023.8.1.366>.
6. Ojeda-Thies C, Rodríguez-Merchan EC. Historical and political implications of haemophilia in the Spanish royal family. Haemophilia 2003; 9(2): 153-6; doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.2003.00732.x>.
7. Tomás F, Tamaro E. Biografía de Gustavo Pittaluga Fattorini. In: Biografías y Vidas. La enciclopedia biográfica en línea 2004. Disponible en: https://www.biografiasyvidas.com/biografia/p/pittaluga_fattorini.htm.
8. Patek AJ Jr., Taylor FHL. Hemophilia. II. Some Properties of a Substance Obtained from Normal Human Plasma Effective in Accelerating the Coagulation of Hemophilic Blood. J Clin Invest 1937; 16(1): 113-24; doi: <https://doi.org/10.1172/JCI100829>.
9. Lewis JH, Soulier JP, Taylor FHL. Chemical, Clinical and Immunological Studies on the Products of Human Plasma Fractionation. XXXIII. The Coagulation Defect in Hemophilia: The Effect in Vitro and in Vivo on the Coagulation Time in Hemophilia of a Prothrombin and Fibrinogen-Free Normal Plasma and its Derived Protein Fractions. J Clin Invest 1946; 25(6): 876-9; doi: <https://doi.org/10.1172/JCI101775>.
10. Zhang YHP, Sun J, Ma Y. Biomanufacturing: history and perspective. J Ind Microbiol Biotechnol 2017; 44(4-5): 773-84; doi: <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1863-2>.
11. Levine PH. The acquired immunodeficiency syndrome in persons with hemophilia. Ann Intern Med 1985; 103(5): 723-6; doi: <https://doi.org/10.7326/0003-4819-103-5-723>.
12. Stryjewska A, Kiepusa K, Librowski T, Lochyński S. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. Pharmacol Rep 2013; 65(5): 1075-85; doi: [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(13\)71466-x](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(13)71466-x).
13. Adrio JL, Demain AL. Recombinant organisms for production of industrial products. Bioeng Bugs 2010; 1(2): 116-31; doi: <https://doi.org/10.4161/bbug.1.2.10484>.
14. Ropers HH, Wieringa B. The recombinant DNA revolution: implications for diagnosis and prevention of inherited disease. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1989; 32(1): 15-23; doi: [https://doi.org/10.1016/0028-2243\(89\)90119-6](https://doi.org/10.1016/0028-2243(89)90119-6).
15. Declaración de los Derechos del Paciente Asociación Norteamericana de Hospitales; 6 de febrero de 1973. Asociación Americana de Hospitales. Disponible en: <https://www.codem.es/Adjuntos/CODEM/Documentos/Informaciones/Publico/f044efef-58a7-40e4-bb7b-91605df12553/B4694157-ADF7-4DD2-A221-229B18C518C7/18fb7dc6-1d99-4c69-a0f9-7d09b99f12de/18fb7dc6-1d99-4c69-a0f9-7d09b99f12de.pdf>.
16. Smith CIE, Bergman P, Hagey DW. Estimating the number of diseases - the concept of rare, ultra-rare, and hyper-rare. iScience 2022; 25(8): 104698; doi: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104698>.
17. Klimova B, Storek M, Valis M, Kuca K. Global View on Rare Diseases: A Mini Review. Curr Med Chem 2017; 24(29): 3153-8; doi: <https://doi.org/10.2174/092986732466617051111803>.
18. Liras A. Biological therapies for inherited diseases: social and bioethical considerations. Hemophilia as an example. Expert Opin Biol Ther 2015; 15(5): 713-22; doi: <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1029451>.
19. Bergman PJ. Cancer Immunotherapy. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2024; 54(3): 441-68; doi: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2023.12.002>.
20. Mitra A, Barua A, Huang L, et al. From bench to bedside: the history and progress of CAR T cell therapy. Front Immunol 2023; 14: 1188049; doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1188049>.
21. Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. J Hematol Oncol 2022; 15(1): 131; doi: <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01351-y>.



22. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol* 2021; 82(11): 801-11; doi: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
23. Blair HA. Valoctocogene Roxaparvovec: First Approval. *Drugs* 2022; 82(14): 1505-1510; doi: <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01788-y>.
24. Heo YA. Etranacogene Dezaparvovec: First Approval. *Drugs* 2023; 83(4): 347-352; doi: <https://doi.org/10.1007/s40265-023-01845-0>.
25. Merlin S, Akula S, Cottonaro A, et al. Therapeutic potential of fetal liver cell transplantation in hemophilia A mice. *Haematologica* 2023; 108(6): 1544-54; doi: <https://doi.org/10.3324/haematol.2022.282001>.
26. Serrano LJ, Cañete A, Garcia-Leal T, et al. Searching for a Cell-Based Therapeutic Tool for Haemophilia A within the Embryonic/Foetal Liver and the Aorta-Gonads-Mesonephros Region. *Thromb Haemost* 2018; 118(8): 1370-81; doi: <https://doi.org/10.1055/s-0038-1661351>.
27. Lek A, Wong B, Allison Keeler A, et al. Death after High-Dose rAAV9 Gene Therapy in a Patient with Duchenne's Muscular Dystrophy. *N Engl J Med* 2023; 389(13): 1203-10; doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2307798>.
28. von Drygalski A, Bhat V, Gale AJ, et al. An engineered factor Va prevents bleeding induced by anticoagulant wt activated protein C. *PLoS One* 2014; 9(8): e104304; doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104304>.
29. Gale AJ, Bhat V, Pellequer JL, et al. Safety, Stability and Pharmacokinetic Properties of (super)Factor Va, a Novel Engineered Coagulation Factor V for Treatment of Severe Bleeding. *Pharm Res* 2016; 33(6): 1517-26; doi: <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1895-3>.
30. Joseph BC, Miyazawa BY, Esmon CT, et al. An engineered activated factor V for the prevention and treatment of acute traumatic coagulopathy and bleeding in mice. *Blood Adv* 2022; 6(3): 959-69; doi: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021005257>.
31. Olmedillas S, Garcia-Arranz M, Garcia-Olmo D, Liras A. Preliminary study on non-viral transfection of F9 (factor IX) gene by nucleofection in human adipose-derived mesenchymal stem cells. *PeerJ* 2016; 4: e1907; doi: <https://doi.org/10.7717/peerj.1907>.
32. Biesert L, Suhartono H. Solvent/detergent treatment of human plasma—a very robust method for virus inactivation. Validated virus safety of OCTAPLAS. *Vox Sang* 1998; 74 (Suppl 1): 207-12; doi: <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1998.tb05474.x>.
33. Serrano LJ, de la Torre P, Liras A, Flores AI. Cell therapy for factor V deficiency: An approach based on human decidua mesenchymal stem cells. *Biomed Pharmacother* 2021; 142: 112059; doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112059>.
34. Bernal S, Pelaez I, Alias L, et al. High Mutational Heterogeneity, and New Mutations in the Human Coagulation Factor V Gene. Future Perspectives for Factor V Deficiency Using Recombinant and Advanced Therapies. *Int J Mol Sci* 2021; 22(18): 9705; doi: <https://doi.org/10.3390/ijms22189705>.
35. De Pablo-Moreno JA, Liras A, Revuelta L. Standardization of Coagulation Factor V Reference Intervals, Prothrombin Time, and Activated Partial Thromboplastin Time in Mice for Use in Factor V Deficiency Pathological Models. *Front Vet Sci* 2022; 9: 846216; doi: <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.846216>.
36. Serrano LJ, Garcia-Arranz M, De Pablo-Moreno JA, et al. Development and Characterization of a Factor V-Deficient CRISPR Cell Model for the Correction of Mutations. *Int J Mol Sci* 2022; 23(10): 5802; doi: <https://doi.org/10.3390/ijms23105802>.
37. Patente “Método in vitro para recuperar la expresión del gen F5 que codifica el factor V de la coagulación”. Ref. ES2785323B2. Titulares: Universidad Complutense de Madrid y Fundación Institut de Recerca de L'hospital de La Santa Creu I Sant Pau. Inventores: Liras Martín, Antonio; Serrano Ramos, Luis Javier; Bernal Noguera, Sara. Boletín Oficial de la Propiedad Industrial (18-12-2020) Vol. 2: Invenciones. p. 9. Disponible en: https://consultas2.oepm.es/pdf/ES/0000/000/02/78/53/ES-2785323_B2.pdf.
38. Patente “Mouse model, deficient in factor V”. Ref. ES2948817B2. Titulares: Universidad Complutense de Madrid y Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Inventores: Liras Martín, Antonio; De Pablo Moreno, Juan Andrés; Revuelta Rueda, Luis; Miguel Batuecas, Andrea; Bermejo Alvarez, Pablo y González Brusi, Leopoldo. Boletín Oficial de la Propiedad Industrial (21-02-2024) Vol. 2: Invenciones. p. 8. Disponible en: https://consultas2.oepm.es/pdf/ES/0000/000/02/94/88/ES-2948817_B2.pdf.
39. La falta de impulso a los biosimilares impide el ahorro de 431 millones de gasto farmacéutico en España. *Diario Público* (sep 2023). Disponible en: <https://www.publico.es/sociedad/falta-impulso-biosimilares-impide-ahorro-431-millones-gasto-farmacaceutico-espana.html>.

Si desea citar nuestro artículo:
**La magia de la Farmacobiotechnología: De las
magistrales a los virus recombinantes en terapia génica**
Antonio Liras Martín
An Real Acad Farm (Internet).
An. Real Acad. Farm. Vol. 90. nº 3 (2024) · pp. 299-311
DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2023.90.03.01>



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Dinámica de los receptores de quimioquinas en la membrana celular

Chemokine receptor dynamics at the cell membrane

Mario Mellado

Grupo de Señalización por quimioquinas, Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología/CSIC, Campus de Cantoblanco, E-28049, Madrid, España. C/Darwin, 3 - Campus de Cantoblanco 20049-Madrid. Tfno. (+34)915854660
ORCID: 0000-0001-6325-1630

e-mail: mmellado@cnb.csic.es

Discurso de ingreso como Académico Correspondiente de la RANF

Recibido el 30 de julio de 2024; aceptado el 11 de septiembre de 2024

Disponible en Internet el 1 de octubre de 2024

PALABRAS CLAVE

Quimioquinas
Receptores de
quimioquinas
Conformaciones
Dinámica molecular
Señalización.

RESUMEN

Las quimioquinas son citoquinas quimiotácticas que controlan los patrones migratorios y el posicionamiento de muchas células, entre ellas de las inmunitarias. Aunque inicialmente se consideró que las quimioquinas eran importantes mediadores de la inflamación aguda, ahora sabemos que este complejo sistema de ligandos y receptores es fundamental para la generación de respuestas inmunitarias adaptativas primarias y secundarias, tanto celulares como humorales. Además, desencadenan también otras respuestas biológicas que van desde la polarización celular o el movimiento, a la prevención de la infección por VIH-1. La activación celular mediada por quimioquinas se creía debida a la unión de una quimioquina monomérica a su receptor monomérico. Sin embargo, la biología de estos mediadores es más compleja de lo inicialmente previsto, ya que varios estudios indican que las quimioquinas dimerizan. El uso de nuevas técnicas de imagen óptica avanzada ha permitido observar que también los receptores forman dímeros, homo y heterodímeros, e incluso oligómeros de orden superior en la superficie celular. Son estructuras/conformaciones muy dinámicas y plásticas, influenciadas por la presencia de los ligandos, la coexpresión de otros receptores y proteínas en la membrana celular, la composición lipídica de la misma o del entorno donde la célula realiza su función.

KEYWORDS

Chemokines
Chemokine receptors
Receptor conformation
Molecular dynamics
Signaling

ABSTRACT

Chemokines are chemotactic cytokines that control the migratory patterns and positioning of many cells, including immune cells. Although chemokines were initially considered to be important mediators of acute inflammation, we now know that this complex system of ligands and receptors is essential for the generation of primary and secondary adaptive cellular and humoral immune responses. In addition, they also trigger other biological responses ranging from cell polarization or movement or the prevention of HIV-1 infection. Chemokine-mediated cell activation was believed to be due to the binding of a monomeric chemokine to its monomeric receptor. However, the biology of these mediators is more complex than initially anticipated, as several studies indicate that chemokines dimerize. In addition, the use of new advanced optical imaging techniques have made possible to determine that the receptors also form dimers, homo- and heterodimers, as well as higher order oligomers at the cell surface. These are very dynamic and plastic structures/conformations, influenced by the presence of ligands, the co-expression of other receptors and proteins, the lipid composition of the cell membrane or the environment where cells perform their function.

DOI: <https://doi.org/10.53519/analesranf>.

ISSN: 1697-4271 E-ISSN: 1697-428X/Derechos Reservados © 2024 Real Academia Nacional de Farmacia.

Este es un artículo de acceso abierto



1. INTRODUCCIÓN

Los seres vivos reaccionamos e interactuamos con el entorno, recibiendo estímulos que procesamos y convertimos en respuestas para adaptarnos al mismo. Todas esas reacciones son fruto de la complejidad de células que se organizan en tejidos y órganos y que se comunican activando y reprimiendo armónicamente miles de moléculas. Si descendemos al mundo de la unidad biológica mínima de la vida, la célula, descubriremos de nuevo la complejidad de componentes, orgánulos, moléculas, reacciones químicas que de manera coordinada en tiempo y espacio permiten a las células responder a los estímulos y realizar sus funciones, dividirse, modular su metabolismo, promover o reprimir su expresión génica, organizar su citoesqueleto o incluso moverse. Desde un mar de células en división, la coordinación temporal y espacial del movimiento de células y moléculas permite la generación de un embrión (1), la formación de un tubo neural, los procesos de mitosis (2), la modificación de la forma celular (3) o el cerramiento de heridas (4) entre otras muchas funciones. Sin embargo, quizás sea el sistema inmunológico el paradigma del movimiento celular. Su funcionamiento requiere del continuo tráfico leucocitario en labor de patrulla a través del torrente circulatorio y los diferentes órganos y tejidos. Esta capacidad permite extender la respuesta inmunológica por todo el organismo. Así garantiza una respuesta ubicua, contra agentes extraños procedentes del exterior y frente a células del propio organismo que han sufrido alguna alteración patológica (5).

2. EL MOVIMIENTO CELULAR ES CLAVE PARA LA FUNCIÓN DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO

Las células del sistema inmunológico se generan en la médula ósea de los organismos adultos y deben salir a circulación periférica para alojarse en los órganos linfoides secundarios, bazo, ganglios linfáticos, estructuras linfoides asociadas a mucosas, donde tendrá lugar el inicio de la respuesta inmunológica (6,7). Dentro de los órganos linfáticos secundarios, los leucocitos siguen en continuo movimiento. Por ejemplo, las células B, en los folículos linfoides de los ganglios linfáticos, se mueven para facilitar la captura de antígenos que en forma soluble o presentados por

macrófagos, les permitirá activarse. Las células T y las células dendríticas en los ganglios, gracias a su movimiento constante aumentan las posibilidades de encontrarse y así hacen posible que un antígeno presentado por una célula presentadora de antígeno sea reconocido específicamente por el TCR de una célula T. Se establece entonces una sinapsis inmunológica que será responsable de la activación y proliferación de la célula T, generando clones de células hijas con una especificidad de antígeno determinada (8).

Las células ya activadas que reconocen un determinado antígeno, salen a circulación periférica y se distribuyen por el organismo. Sin embargo, los vasos sanguíneos son estructuras cerradas y en su mayor parte no son permeables a la salida de leucocitos. En consecuencia, cuando en un tejido existe una infección, las diversas poblaciones leucocitarias necesitan ser reclutadas desde el torrente circulatorio hacia el foco inflamatorio; es el proceso de extravasación y permite la infiltración tisular de las células del sistema inmunológico de forma específica, ordenada y secuencial (9,10) para luchar eficazmente contra la infección.

La extravasación celular es un proceso complejo y en él participan de forma orquestada muchas proteínas, selectinas y sus ligandos, integrinas, moléculas de adhesión, quimioquinas y sus receptores, entre otras. Del correcto entendimiento entre ellas y de la sucesión temporal de eventos se consigue la salida ordenada de los leucocitos, y su llegada en tiempo y espacio adecuado al tejido donde la respuesta inmunológica es necesaria (10). Es importante además considerar que el movimiento no se limita a un mero desplazamiento en dos dimensiones, sino que las células sufren cambios estructurales para conseguir avanzar y superar las barreras que en forma de matriz extracelular y de otras células presentes en el entorno dificultan su avance (11-13).

La señalización generada por la combinación de la unión de integrinas y sus ligandos, las moléculas de adhesión, y la exposición a quimioquinas inmovilizadas por glicosaminoglicanos sobre la superficie de las células endoteliales, induce cambios en la morfología de los leucocitos. Esto provoca una distribución asimétrica del contenido celular (14), originando un eje antero-posterior en la célula. Los leucocitos extienden un frente rico en actina polimerizada, F-actina, denominado



lamelipodio, el cual constituye el frente de avance, mientras que en el extremo opuesto, se forma el urópodo, una zona más delgada que se eleva sobre la célula endotelial. En el urópodo se acumulan moléculas de adhesión como ICAM1, ICAM2 o CD44, que facilitan la interacción con otras células y que además interaccionan con las proteínas ERM (erzina, ranexina y monensina), organizando así toda la red de microtúbulos y filamentos intermedios implicados en los procesos de retracción de la célula durante la migración (15). Mientras, en el lamelipodio se redistribuyen los receptores de quimioquinas actuando como una “nariz celular” para detectar el gradiente quimioatrayente y dirigir el movimiento. En el lamelipodio también se acumulan moléculas señalizadoras que posibilitan la polimerización de actina dependiente de GTPasas, Rac, RhoA y cdc42 (16). Todo ello se traduce finalmente en la generación de un acúmulo asimétrico de lípidos fosforilados y de F-actina que permite una polarización celular estable y orientada a la trayectoria (Figura 1).

3. QUIMIOQUINAS: MOLÉCULAS CLAVES EN LA GENERACIÓN DE GRADIENTES QUIMIOATRAYENTES

Las citoquinas quimioatrayentes o quimioquinas son una familia de proteínas de bajo peso molecular (7-12 kDa), con un alto grado de homología, que originalmente fueron identificadas por su capacidad de atraer poblaciones leucocitarias específicas (17). Estructuralmente, las aproximadamente 50 quimioquinas descubiertas hasta la fecha en humanos, son proteínas muy relacionadas entre sí que en un principio fueron clasificadas con criterios estructurales, en base a la posición de cuatro residuos de cisteína altamente conservados, en quimioquinas CC, CXC, C y CX₃C (18). Sin embargo, en la actualidad la clasificación más extendida atiende al tipo de proceso biológico en el que participan, lo que está directamente relacionado con que su expresión sea constitutiva o inducible (19). Las primeras juegan un papel relevante en la homeostasis del sistema inmunológico, entre ellas cabe destacar CXCL12, CCL19, o CCL21. El segundo grupo se relaciona con procesos inflamatorios, entre ellas las quimioquinas CCL2, CCL3, CCL5 o CXCL8, por ejemplo.

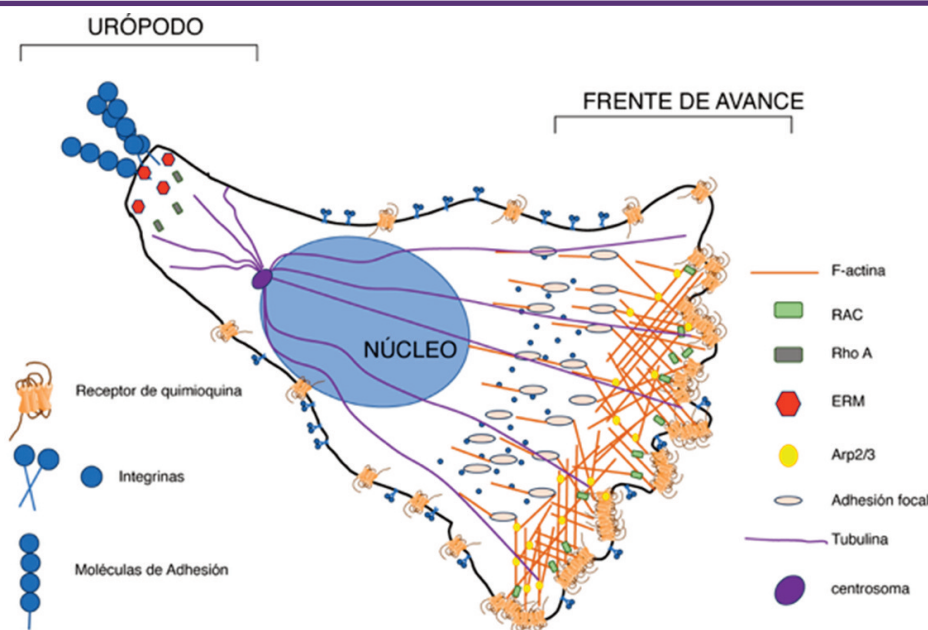


Figura 1. Polarización durante la migración de células T. Representación esquemática de la polarización de las células T en migración, que implica la reorganización orquestada del citoesqueleto de actina y de la red de microtúbulos. En la parte frontal de la célula, frente de avance, la estimulación por quimioquinas induce la polimerización de la actina, proceso en el que participa la GTPasa Rac-1 y el complejo efector Arp2/3 que conduce a la ramificación necesaria para la extensión del lamelipodio. Los receptores de quimioquinas de la zona del frente de avance se organizan formando oligómeros lo que facilita el reconocimiento del sentido del gradiente quimioatrayente. Se produce también, mediado por las quimioquinas, la activación de las integrinas que se unen a las moléculas de adhesión presentes en el sustrato formando adhesiones focales. En la parte posterior, la fosforilación dependiente de RhoA de las proteínas ERM induce su segregación selectiva al urópodo, donde reclutan moléculas de adhesión transmembrana. En el proceso, la red de tubulina facilita la polarización de los orgánulos celulares y la generación de fuerzas de tracción que posibilitan el movimiento. Figura modificada de las publicadas por Mastrogianni y col. (100) y Kenific y col. (101).

Las quimioquinas ejercen sus acciones por unión a receptores presentes en la membrana de la célula diana. Estos receptores, aproximadamente 20 en humanos, pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G, GPCRs (G Protein-Coupled Receptors) (Figura 2A, B). Constan de una única cadena polipeptídica que cruza siete veces la membrana celular e inician su ruta de señalización activando proteínas G, proteínas que unen nucleótidos de guanina (20), mayoritariamente G_i aunque también se han asociado a proteínas G_q y $G_{11/12}$ (21).

Atendiendo al ligando que unen, los receptores se clasifican en cuatro grupos denominados CCR, CXCR, CX3CR y XCR. El sistema es complejo pues existe una alta promiscuidad entre las quimioquinas y los receptores que las unen, de hecho, una quimioquina puede unirse a distintos receptores con similar afinidad (CCL5, por ejemplo, une CCR1, CCR3 y CCR5), y un mismo receptor puede interaccionar con varias quimioquinas como es el caso de CCR2 que interacciona con CCL2, CCL7, CCL8 y CCL13. Sin embargo, también existen pares ligando/receptor

altamente específicos como es el caso de CXCL12 y su receptor CXCR4 (22) (Figura 2A, B). La complejidad es mayor si consideramos que una misma célula puede expresar sobre su superficie a lo largo de su vida o incluso simultáneamente más de un receptor (23). El resultado final es una compleja red de interacciones que gobierna el correcto funcionamiento del sistema. Además, existen receptores denominados atípicos capaces de unir quimioquinas de las familias CC y CXC y que no activan una proteína G, su señalización está ligada a la activación de β -arrestinas y no inducen migración celular, aunque si son internalizados en respuesta al ligando (Figura 2C). Su función se relaciona con el control de los niveles de quimioquinas en el entorno extracelular (24) y con la modulación de la función de los receptores quimioatrayentes (25,26). Por último, algunos virus codifican receptores de quimioquinas (citomegalovirus (CMV) o *Herpesvirus saimirii* (HHV8)) e incluso quimioquinas (i.e. *Moluscum contagiosum*) (27). El significado biológico de estos receptores y ligandos codificados por virus está relacionado con la manipulación del sistema inmunológico durante la infección viral de las células huésped.

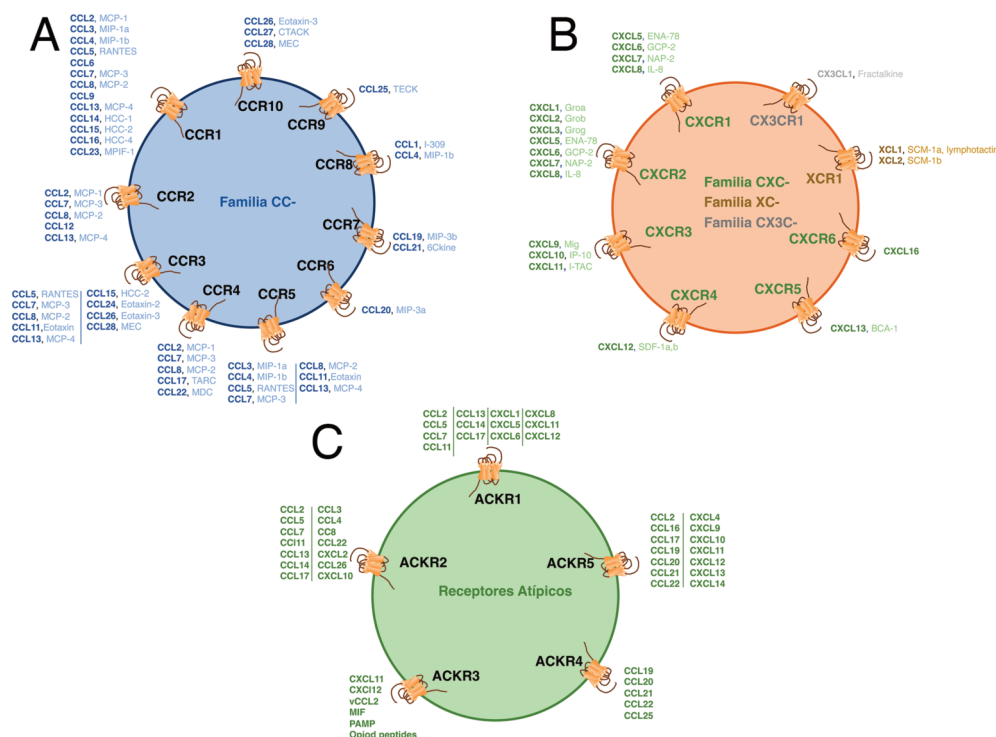


Figura 2. Las redes de señalización de quimioquinas humanas son muy promiscuas. Hay 23 receptores y aproximadamente 50 ligandos en la red de señalización de quimioquinas humanas, incluidos diez miembros de la familia CCR (A), seis CXCR (B), un CX3CR (B) y un XCR (B). Las quimioquinas CCL se muestran en tonos azules, CXCL en tonos verdes, CX3CL en gris y XCL en marrón. En todos los casos en negrilla se expresa la nueva nomenclatura de las quimioquinas y en tono normal la antigua denominación. Además hay cinco AKCR caracterizados (C) que regulan los niveles extracelulares de algunas quimioquinas y modulan la función de los receptores de quimioquinas convencionales. Figura modificada de Bogacka y col. (102).

Tomando como ejemplo la unión de CXCL12 a su receptor CXCR4, se ha propuesto que la unión del ligando sigue un modelo en dos pasos (28,29). Primero se produce la interacción del cuerpo central de la quimioquina con el N-terminal de CXCR4, es el “*Chemokine Recognition Site 1*” (30) (CRS1). Esta interacción hace que el ligando se posicione en una orientación óptima sobre el receptor y permite que su región N-terminal penetre profundamente en el receptor y se una a la región CRS2, “*Chemokine Recognition Site 2*”. Este CRS2 se localiza en el interior del barril que forman las siete α -hélices transmembranas incluidas en la bicapa lipídica. La estructura de la quimioquina puede variar si hablamos de monómeros o de dímeros de ligando y también depende de la concentración de ligando en el medio. Además, se han descrito dímeros no disociables de CXCL12 que se unen a CXCR4, inducen la movilización de Ca^{2+} , pero no median la migración celular *in vitro* (31), lo que sugiere funciones específicas de los ligandos asociadas a la estabilización de distintas conformaciones del receptor. En todo caso, la unión del ligando a los receptores promueve cambios conformacionales en los dominios transmembrana de estos, que son transmitidos por una cadena de residuos “señalizadores” presentes a lo largo de las α -hélices transmembrana (30) y cuya función es conectar los cambios conformacionales iniciados por la unión del ligando con la unión y activación de moléculas señalizadoras, como la proteína G, con los bucles intracelulares y región C-terminal del receptor.

La mayoría de las quimioquinas, son de carácter básico, lo que explica que se unan tanto a los dominios extracelulares de los receptores, como a glucosaminoglicanos (GAGs) presentes en la superficie del endotelio (32). De hecho, los GAGs actúan a modo de moléculas presentadoras, ya que poseen un elevado número de residuos ácidos. La interacción quimioquina-GAGs, facilita la retención de las quimioquinas en la superficie celular y además produce el efecto de aumentar su concentración local, de manera que, por ejemplo, permanezcan asociadas en presencia de corrientes provocadas por el flujo sanguíneo en los capilares, facilitando de ese modo su reconocimiento por los leucocitos (33).

4. LOS RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS ADOPTAN DISTINTAS CONFORMACIONES EN LA MEMBRANA CELULAR.

Los métodos más tradicionales para el estudio de la función de las quimioquinas (34,35) han generado una visión demasiado estática de los sistemas. Debemos recordar que el movimiento celular es un proceso dinámico que se realiza a favor de gradiente de concentración de moléculas quimioatrayentes y las células deben decidir en fracciones de segundo sobre la presencia de diferentes gradientes para continuar avanzando. Además, es un proceso influido por muchos factores de la propia célula y de su entorno. En la actualidad el uso de técnicas de microscopía óptica avanzada nos proporciona una visión mucho más dinámica que nos permite abordar y analizar con otra perspectiva todos estos procesos (36). Por ejemplo, la transferencia de energía resonante (RET), basada en fluorescencia (FRET) o en luminiscencia (BRET), que tiene su fundamento en que una molécula (fluorescente o luminiscente) excitada ceda energía a otra que se encuentra suficientemente cerca siempre que pueda excitarse con la longitud de onda de la energía emitida por la primera, nos permite detectar y evaluar las interacciones proteína-proteína o proteína lípido en células vivas de manera dinámica (37,38) (Figura 3A-C). Gracias a ello, hoy sabemos que los receptores de quimioquinas además de monómeros forman dímeros en la membrana celular; homodímeros si son complejos formados por el mismo receptor o heterodímeros si los complejos los forman receptores diferentes (39). Algunos autores han indicado que estos complejos se forman durante la síntesis y maduración de los receptores en el aparato de Golgi y así alcanzan la membrana celular (40). Gracias a estas tecnologías de imagen sabemos también que las conformaciones de estos receptores no son estáticas, sino muy dinámicas, modulándose por la presencia de los ligandos y la expresión de los propios receptores (41). Este concepto dinámico concuerda con el modelo que explica la función de los GPCRs, según el cual las conformaciones del receptor sin ligando están en equilibrio entre estados activos e inactivos y que es la unión del ligando quien estabiliza una conformación activa, desplazando el equilibrio (42,43). Los dímeros de receptores de

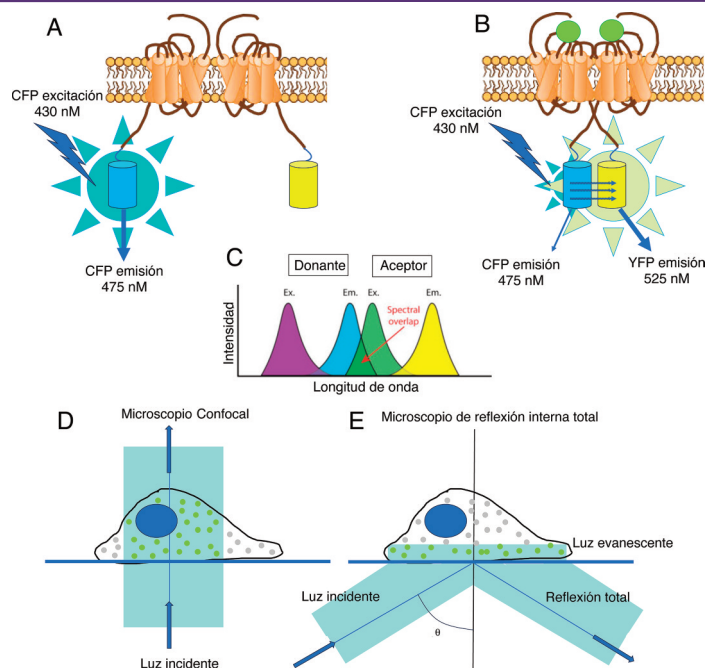


Figura 3. Esquema de funcionamiento de técnicas para evaluar conformaciones de receptores: FRET Y TIRF-M. (A-C) Tecnología FRET: (A, B) La transferencia de energía resonante entre fluorocromos se basa en el hecho de que una molécula fluorescente donante (por ejemplo, “Cyan Fluorescent protein, CFP”) en un estado excitado puede transferir una parte de su energía por acoplamiento dipolo-dipolo no radiante a una molécula fluorescente aceptora (por ejemplo “Yellow fluorescent protein, YFP”) si la distancia entre ellas es menor de 10 Å, indicando entonces que las proteínas acopladas a los fluorocromos interaccionan. La tecnología implica la fusión de proteínas fluorescentes donantes y aceptoras a moléculas de interés. La coexpresión de constructos de fusión en células vivas permite estudiar su interacción en tiempo real de manera cuantitativa. (C) Es imprescindible que exista solapamiento entre la longitud de onda a la que emite el fluorocromo dador y la que necesita el aceptor para excitarse. Tecnología TIRF (D,E): (D) Los microscopios tradicionales de campo amplio iluminan toda la profundidad de una muestra. (E) La microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF) se utiliza para adquirir imágenes de una sección muy fina con alta resolución. Para ello se utiliza un rayo láser que se coloca con precisión en el plano focal posterior de los objetivos. De este modo se crea un ángulo ideal para la reflexión interna total del haz láser, de modo que también pueda ser recogido por la lente del objetivo. Por lo tanto, el rayo láser nunca se transmite a través de una muestra durante el TIRF, y en su lugar sólo una pequeña área de aproximadamente 200 nm del cubreobjetos es iluminada por un campo evanescente. Este campo evanescente está causado por la diferencia de índices de refracción entre la muestra y el cubreobjetos de vidrio sobre el que se asienta, y es responsable de la elevada relación señal-ruido de las imágenes TIRF.

quimioquinas existen en ausencia de ligando y algunos estudios muestran que los valores de eficiencia de FRET y BRET no están afectados por los ligandos específicos, sugiriendo que las conformaciones de los receptores no son moduladas por la unión del ligando (44). Por ejemplo, se ha descrito que CCL2 no promueve cambios conformacionales en los heterodímeros CXCR4/CCR2 (45). Sin embargo, otros estudios sí detectan variaciones en la eficiencia FRET o BRET tras la adición del ligando. Es el caso de CXCL12 que aumenta la eficiencia de BRET entre homodímeros CXCR4 (45) o CXCL8 que suprime la eficiencia FRET para los heterodímeros CXCR1/CXCR2 mientras que estabiliza los valores de FRET para ambas formas homodiméricas (41). Los ligandos no desencadenan la dimerización del receptor pero parecen estabilizar la conformación activa del mismo, como se ha descrito para CCL2 y CCL11 en CCR2 (41,46).

Muchos autores han demostrado el impacto de estos complejos diméricos en las funciones de las quimioquinas (47-51). Hauser y *col.* asociaron los tetrámeros de CCR7 con la activación de Src y la integración de distintas vías de señalización necesarias para una migración celular eficaz (52). La dimerización/oligomerización de los receptores de quimioquinas afecta a diferentes aspectos de la fisiología del receptor, como la transducción de señales o los procesos de internalización mediados por ligando, que a su vez influyen en procesos como la activación y migración celular (53). Los complejos de receptores se acumulan en estructuras celulares especializadas, como el frente de avance de una célula en migración o la sinapsis inmunológica (54-56). Por lo tanto, es posible que la agregación de receptores facilite, en lugares específicos de la célula, el acoplamiento eficiente del receptor con moléculas de señalización (57) o incluso la modulación de la actividad de otros receptores también presentes (58).

Otra observación interesante es la diversidad farmacológica asociada a estos complejos de receptores. Mientras que AMD3100, un antagonista específico de CXCR4, bloquea la unión de ligandos específicos de otro receptor como CCR2, TAK779, el antagonista de CCR2 y CCR5 (59), inhibe potentemente la unión de CXCL12 en células que coexpresan CXCR4 (60), proporcionando un excelente ejemplo de inhibición alostérica entre heterodímeros de receptores de quimioquinas (55).

5. OLIGOMERIZACIÓN DE RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS: UN PASO MÁS EN LA COMPLEJIDAD DE ESTOS MEDIADORES INFLAMATORIOS

Otra tecnología de imagen óptica avanzada es la microscopia de reflexión interna total de la fluorescencia, del inglés “*Total internal reflection fluorescence microscopy*” (TIRF-M). El TIRF-M permite la visualización y el análisis de moléculas individuales en células vivas y es por lo tanto de máximo interés para estudiar la dinámica de proteínas y lípidos en la membrana celular. Se utiliza la observación de la interfaz (61,62) entre dos medios con diferentes índices de difracción, como son el agua y el vidrio. La técnica depende de la iluminación de la muestra con un ángulo de incidencia tal que permita la reflexión total de la luz y la consecuente creación de un campo electromagnético, denominado “campo evanescente”, que excita los fluoróforos cerca de la interfaz mientras el resto de la célula permanece en oscuridad. Como resultado, el TIRF-M reduce la profundidad de excitación a unos 50-100 nm en la célula, lo que permite analizar los parámetros dinámicos y cinéticos de las proteínas y lípidos en la interfaz célula-sustrato, es decir en el contexto de la membrana plasmática de una célula viva en contacto con un sustrato depositado sobre el cristal (Figura 3D, E). El uso de esta tecnología aplicado al campo de las quimioquinas ha revelado que los receptores evaluados hasta la fecha pueden formar homo- y heterodímeros, pero también oligómeros de mayor orden (52,63,64). La caracterización *in silico* de la estructura de CXCR4 no sólo confirma la existencia de dímeros de receptores, sino que también nos muestra que existen interacciones entre dímeros de CXCR4 en complejos de mayor orden (65,66) y localiza en las regiones transmembrana los dominios implicados en estas interacciones.

En 1972, basado en principios termodinámicos de organización de lípidos y proteínas, se definió el modelo mosaico fluídico de la estructura de las membranas celulares (67). Se trata de un modelo dinámico y que explica que los componentes de la membrana están en continuo movimiento debido sobre todo a energías térmicas. El modelo incluye que los componentes proteicos y lipídicos están limitados en su movilidad rotacional y lateral en el plano de la membrana, lo que influye en las interacciones lípido-lípido, proteína-proteína y lípido-proteína, algo que también se ve afectado por las interacciones célula-matriz extracelular o célula-célula. El citoesqueleto celular resulta crítico en la dinámica de las membranas (68,69) pues el equilibrio polimerización/despolimerización de actina crea regiones donde las proteínas pueden estar temporalmente confinadas y permite que proteínas que tienen una interacción directa con la actina puedan dificultar la difusión de otras proteínas que se mueven en el entorno (70). También influye la formación de dominios lipídicos específicos fuertemente empaquetados que condicionan el movimiento de las proteínas embebidas en ellos (71,72).

De hecho muchos receptores, también los miembros de la familia de GPCRs, se integran en esos dominios lipídicos densamente empaquetados. Este es el caso de los receptores muscarínicos M1 y M2 (73), del receptor de bradiquina (74), del receptor β -adrenérgico (75), del receptor de Angiotensina 1 (76) y también de algunos de receptores de quimioquinas como CCR5 y CXCR4 (77). Aunque el término balsa lipídica del inglés “*lipid raft*” es controvertido pues su descripción se basa en el uso de técnicas de fraccionamiento de membranas y en la resistencia al tratamiento con detergentes de lípidos y proteínas, la existencia de interacciones lípido-lípido que se organizan lateralmente en las membranas como dominios con diferente estructura y composición está fuera de toda duda (78). En este contexto, los experimentos de TIRF-M han demostrado que en situación basal, sin estimular, los receptores de quimioquinas se organizan en entidades no agrupadas (monómeros y dímeros) y en pequeños *nanoclusters* (grupos de ≥ 3 receptores) y que la unión del ligando promueve la agrupación de los receptores en complejos de mayor tamaño, que contienen hasta 10-18 receptores, con una reducción significativa

del porcentaje de monómeros y dímeros, y un aumento proporcional del porcentaje de oligómeros que además son, en gran medida, inmóviles (64) (Figura 4). Este comportamiento dinámico está controlado por la expresión del propio receptor, la disponibilidad del ligando y la generación de dominios de confinamiento temporal por el citoesqueleto de actina. Además, la dinámica de estos receptores está modulada por la coexpresión de otras proteínas en la superficie celular (68) y por la composición lipídica de la membrana (79). Por ejemplo, la expresión de CD4 en la membrana de células T modula el tamaño de los oligómeros de CXCR4 (64) y en último término también su función; la depleción de esfingomielinas, por efecto de esfingomielinasas, y el incremento de las correspondientes ceramidas, bloquea la capacidad de CXCL12 de promover oligomerización de CXCR4 e imposibilita a las células detectar correctamente los gradientes quimioatrayentes (79). Se ha demostrado que los oligómeros de CCR7 en el frente de avance de células dendríticas involucra la activación de la quinasa Src, un efecto que

depende de los niveles de colesterol en la membrana. De hecho, la presencia de un mediador inflamatorio como la prostaglandina (PG) E_2 que reduce los niveles de colesterol (80), provoca mayor oligomerización de CCR7 y una migración más eficiente (52). Todos los datos hasta la fecha sugieren que la oligomerización de receptores de quimioquinas en la membrana celular regula la sensibilidad celular a los gradientes quimioatrayentes (81), a la vez que proporciona la base para una propagación eficiente y robusta de la señalización mediada por estos ligandos (82,83). La trascendencia de este hecho puede entenderse fácilmente al indicar que una determinada célula, con un patrón de receptores de quimioquinas concreto, puede ver afectado su comportamiento funcional dependiendo del entorno en que se encuentre en cada momento, sin modificar su patrón de receptores (52,64,79); la dinámica en la membrana celular juega pues un papel clave en la regulación de las respuestas celulares.

La unión de una quimioquina a su receptor también provoca la agregación de los receptores en la membrana celular como paso previo a la

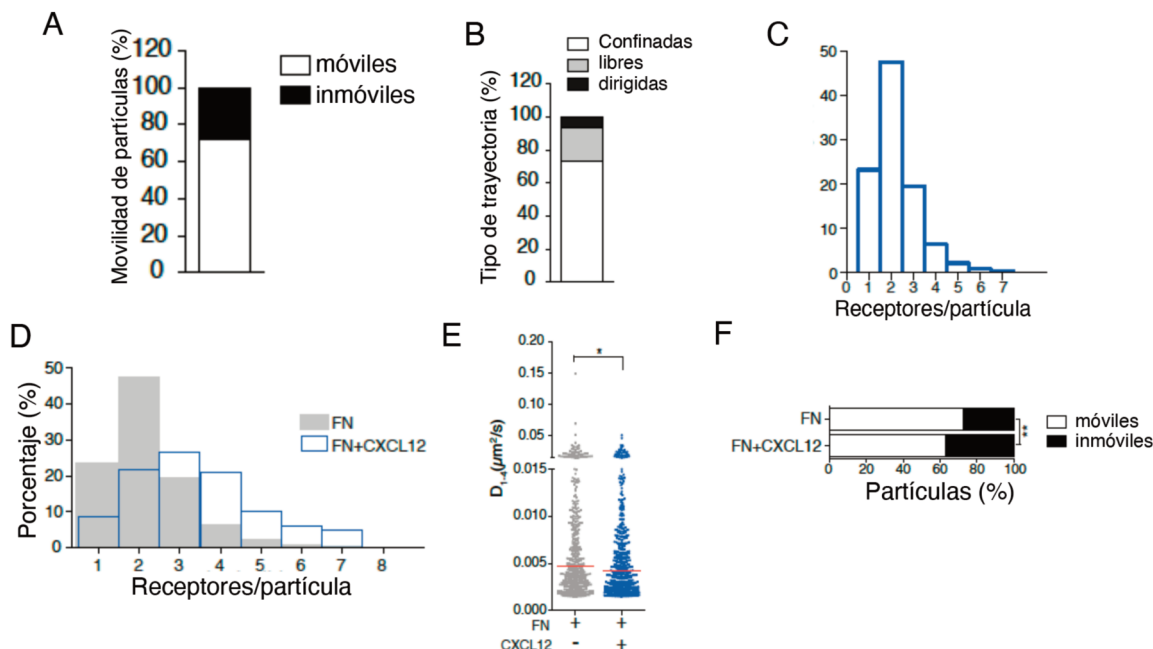


Figura 4. El receptor CXCR4 forma oligómeros en la superficie celular que aumentan en presencia de CXCL12. (A) Porcentaje de trayectorias móviles e inmóviles de CXCR4-AcGFP en la membrana de células T sin estimular. (B) porcentaje de trayectorias individuales de CXCR4-AcGFP con movimiento confinado, de difusión libre o transporte dirigido, clasificadas en función de su MSS, "Moment Scaling Spectrum". Los datos corresponden a las células no estimuladas. (C) Porcentaje del número de receptores/partícula detectados según se extrae de análisis de la distribución de la intensidad en las trayectorias individuales de CXCR4-AcGFP en células sin estimular. (D) Porcentaje del número de receptores/partícula detectados como en C). Se comparan los datos de las células sin activar (barras grises) frente a los de células activadas con el ligando CXCL12 (barras azules). (E) Análisis del coeficiente de difusión (D_{1-4}) de las trayectorias individuales de CXCR4-AcGFP en células no estimuladas (gris) y activadas con CXCL12 (azul). En rojo se señala la media detectada. (F) Porcentaje de trayectorias móviles e inmóviles de CXCR4-AcGFP en la membrana de células T sin estimular y estimuladas con CXCL12. Figura modificada de Martínez-Muñoz y col. (64).



generación de vesículas de internalización ricas en clatrina, un proceso que involucra a dinamina y a otras proteínas adaptadoras como β -arrestinas y adaptina-2 (AP-2) (84,85). Es pues relevante determinar si la oligomerización de los receptores mediada por el ligando y determinada por TIRF-M corresponde, como hemos indicado, a un evento de señalización o se trata de complejos de internalización del receptor. Experimentos realizados con CXCR4 como modelo demostraron que en presencia de agentes inhibidores de la internalización como Pit-Stop2 (86), la oligomerización del receptor promovida por CXCL12 se mantiene. Además, el receptor mutante CXCR4^{K239E/V242A/L246A}, que se expresa en la membrana igual que el receptor CXCR4 salvaje y no presenta diferencias en la unión de CXCL12, se internaliza normalmente pero no genera oligómeros detectables por TIRF-M ni promueve migración celular (64). Los datos experimentales indican pues que el proceso de oligomerización y el de agregación previo a la internalización del receptor son procesos independientes.

Varios datos experimentales remarcan el papel esencial de la dinámica del citoesqueleto de actina en la oligomerización de los receptores de quimioquinas promovidas por ligando. El tratamiento de las células con Latrunculina A, un inhibidor de la polimerización de actina por secuestro de monómeros de G-actina (87), bloquea por completo la oligomerización de CXCR4 mediada por CXCL12 y aumenta la difusión libre de los receptores embebidos en la membrana celular (64). Por otro lado, los datos obtenidos utilizando TIRF-M en un mutante natural de CXCR4, CXCR4^{R334X}, que se asocia al síndrome de WHIM, una inmunodeficiencia hereditaria grave (88), indican que, en la membrana celular, este mutante es incapaz de oligomerizar en presencia de CXCL12 y de hecho las células que lo expresan tampoco se orientan a favor de gradiente (89). CXCR4^{R334X} presenta una delección de los últimos 19 aminoácidos en su región C terminal (90) que le impide, en presencia de CXCL12, ser fosforilado por quinasas asociadas a receptores acoplados a proteínas G (GRKs) y por lo tanto unir β -arrestina y ser internalizado (91) lo que le convierte en un mutante de ganancia de función. Sin embargo, β -arrestina también juega un papel importante como plataforma que asocia otras moléculas señalizadoras. En concreto, su papel es crítico para conectar estos receptores con el

citoesqueleto de actina (92). Su presencia condiciona la dinámica de fosforilación/desfosforilación de cofilina, una proteína de unión a actina que cataliza sus procesos de polimerización/despolimerización (93).

La dinámica de la actina es un proceso complejo y en él intervienen muchas proteínas y reguladores, entre ellas las GTPasas Rac, Rho y Cdc42 y multitud de GEFs (*guanosin exchange factors*) y GAPs (*GTPase-activating proteins*) que regulan la actividad de las referidas GTPasas (94,95). Aunque la ruta exacta de señalización no está completamente dilucidada, las evidencias indican que también en el caso de los receptores de quimioquinas la dinámica del citoesqueleto de actina controla los procesos de oligomerización y por ende la difusión en la membrana (64,68).

El proceso de oligomerización se inicia una vez que el ligando se une al receptor, es por lo tanto un proceso asociado a la activación del mismo. Así, el bloqueo de la señalización de CXCR4 por tratamiento con toxina de pertussis (PTx), un agente que bloquea la actividad de la proteína Gi, conlleva la eliminación de la oligomerización. El proceso también requiere una correcta dinámica del citoesqueleto de actina, lo que implica directamente la asociación de β -arrestinas al receptor (96). La oligomerización de CXCR4 se bloquea en células deficientes en β -arrestina 1 y, como se ha comentado anteriormente, también en receptores mutantes que no pueden asociar/activar β -arrestinas. Por otro lado, implica a cofilina, una proteína que regula la polimerización y despolimerización de actina y que conecta el proceso con β -arrestinas y por ende con el propio receptor. La participación de la GTPasa Rac en la oligomerización de los receptores de quimioquinas ha sido asimismo propuesta en células dendríticas, donde su presencia se detecta en el frente de avance (97). La falta de oligomerización se ha asociado con la falta de orientación de la célula en los gradientes quimioatrayentes. Si bien es razonable que la célula que no oligomeriza sus receptores en el frente de avance no detecte correctamente el gradiente, el frente de avance celular es una zona rica en actina polimerizada (98) que puede favorecer la oligomerización. La realidad es que la formación de un frente de avance es un proceso dirigido en el que participan muchas proteínas y lípidos que también pueden condicionar la respuesta final de la célula (99).



6. CONCLUSIONES

En los últimos años se ha avanzado notablemente en el conocimiento de la función de las quimioquinas y sus receptores. Gracias a nuevas técnicas de cristalización y al desarrollo de la criomicroscopía conocemos la estructura de algunos de estos receptores, como se regula su expresión, como se produce la unión del ligando, los cambios estructurales que se generan y las rutas de señalización que se activan. Además, el uso de nuevas tecnologías, entre ellas las de imagen óptica avanzada y el desarrollo de algoritmos para su cuantificación, nos ha permitido determinar que los receptores pueden adoptar distintas conformaciones dinámicas en la membrana celular, que también condicionan las respuestas funcionales de estos mediadores inflamatorios. Entender esa dinámica en la membrana y como se modifica por la composición lipídica de la misma, la expresión de otras proteínas que condicionan la difusión de los receptores y/o la dinámica del citoesqueleto de actina es crítico para tener una visión completa del sistema si queremos intervenir terapéuticamente en su función.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (PID2020-114980RB-I00 apoyado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER, UE) y por el Programa de Biomedicina de la Comunidad de Madrid, España (S2022/BMD-7274 RETAR-A-COVID-CM). Muchas gracias a los miembros actuales y anteriores del grupo de señalización por quimioquinas del Centro Nacional de Biotecnología/CSIC por su excelente trabajo que ha inspirado esta revisión.

7. REFERENCIAS

1. Franz CM, Jones GE, Ridley AJ. Cell Migration in Development and Disease. *Dev Cell*. 2002 Feb 1;2(2):153-8.
2. Yang H, Ganguly A, Cabral F. Inhibition of Cell Migration and Cell Division Correlates with Distinct Effects of Microtubule Inhibiting Drugs. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Oct 10 [cited 2024 Jul 1];285(42):32242. Available from: /pmc/articles/PMC2952225/
3. Maeda YT, Inose J, Matsuo MY, Iwaya S, Sano M. Ordered Patterns of Cell Shape and Orientational Correlation during Spontaneous Cell Migration. *PLoS One* [Internet]. 2008 Nov 17 [cited 2024 Jul 1];3(11):e3734. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0003734>
4. Dubey S, Jaiswal B, Gupta A. TIP60 acts as a regulator of genes involved in filopodia formation and cell migration during wound healing. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2024 Jul 1];298(7):102015. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925822004550/fulltext>
5. Delgado M, Lennon-Duménil AM. How cell migration helps immune sentinels. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Oct 4;10.
6. Takihara Y, Higaki T, Yokomizo T, Umemoto T, Ariyoshi K, Hashimoto M, et al. Bone marrow imaging reveals the migration dynamics of neonatal hematopoietic stem cells. *Communications Biology* 2022 5:1 [Internet]. 2022 Aug 2 [cited 2024 Jul 1];5(1):1-10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s42003-022-03733-x>
7. Hampton HR, Chtanova T. Lymphatic migration of immune cells. *Front Immunol* [Internet]. 2019 May 28 [cited 2024 Jul 1];10(MAY):451736. Available from: www.frontiersin.org
8. Worbs T, Förster R. T cell migration dynamics within lymph nodes during steady state: an overview of extracellular and intracellular factors influencing the basal intranodal T cell motility. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2009 [cited 2024 Jul 1];334(1):71-105. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19521682/>
9. Vestweber D. Relevance of endothelial junctions in leukocyte extravasation and vascular permeability. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2012 [cited 2024 Jul 1];1257(1):184-92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22671605/>
10. Nourshargh S, Alon R. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity*. 2014 Nov 20;41(5):694-707.
11. Yamada KM, Sixt M. Mechanisms of 3D cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2019 20:12 [Internet]. 2019 Oct 3 [cited 2024 Jul 1];20(12):738-52. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41580-019-0172-9>
12. Bodor DL, Pönisch W, Endres RG, Paluch EK. Of Cell Shapes and Motion: The Physical Basis of Animal Cell Migration. *Dev Cell* [Internet]. 2020 Mar 9 [cited 2024 Jul 1];52(5):550-62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32155438/>



13. Bergert M, Chandradoss SD, Desai RA, Paluch E. Cell mechanics control rapid transitions between blebs and lamellipodia during migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 Sep 4 [cited 2024 Jul 1];109(36):14434-9. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1207968109>
14. Sánchez-Madrid F, Del Pozo MA. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J* [Internet]. 1999 Feb 1 [cited 2024 Jul 2];18(3):501-11. Available from: <https://www.embopress.org/doi/10.1093/emboj/18.3.501>
15. Serrador JM, Alonso-Lebrero JL, Del Pozo MA, Furthmayr H, Schwartz-Albiez R, Calvo J, et al. Moesin Interacts with the Cytoplasmic Region of Intercellular Adhesion Molecule-3 and Is Redistributed to the Uropod of T Lymphocytes during Cell Polarization. *Journal of Cell Biology* [Internet]. 1997 Sep 22 [cited 2024 Jul 2];138(6):1409-23. Available from: <http://www.jcb.org>
16. Steffen A, Ladwein M, Dimchev GA, Hein A, Schwenkmezger L, Arens S, et al. Rac function is crucial for cell migration but is not required for spreading and focal adhesion formation. *J Cell Sci* [Internet]. 2013 Oct 15 [cited 2024 Jul 2];126(20):4572-88. Available from: <https://dx.doi.org/10.1242/jcs.118232>
17. Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2024 Jul 2];285(16):2944-71. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/febs.14466>
18. Nomiya H, Osada N, Yoshie O. Systematic classification of vertebrate chemokines based on conserved synteny and evolutionary history. *Genes Cells* [Internet]. 2013 Jan [cited 2024 Jul 2];18(1):1-16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23145839/>
19. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2014 [cited 2024 Jul 2];32:659-702. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24655300/>
20. Schulz O, Hammerschmidt SI, Moschovakis GL, Förster R. Chemokines and Chemokine Receptors in Lymphoid Tissue Dynamics. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2016 May 20 [cited 2024 Jul 2];34:203-42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26907216/>
21. Shi G, Partida-Sánchez S, Misra RS, Tighe M, Borchers MT, Lee JJ, et al. Identification of an alternative G α q-dependent chemokine receptor signal transduction pathway in dendritic cells and granulocytes. *J Exp Med* [Internet]. 2007 Oct 29 [cited 2024 Jul 3];204(11):2705-18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17938235/>
22. Horuk R. Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2001 [cited 2024 Jul 2];12(4):313-35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11544102/>
23. Coughlan CM, McManus CM, Sharron M, Gao ZY, Murphy D, Jaffer S, et al. Expression of multiple functional chemokine receptors and monocyte chemoattractant protein-1 in human neurons. *Neuroscience*. 2000 May 1;97(3):591-600.
24. Haraldsen G, Rot A. Coy decoy with a new ploy: Interceptor controls the levels of homeostatic chemokines. *Eur J Immunol* [Internet]. 2006 Jul 1 [cited 2024 Jul 2];36(7):1659-61. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.200636327>
25. Levoe A, Balabanian K, Baleux F, Bachelier F, Lagane B. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood* [Internet]. 2009 Jun 11 [cited 2024 Jul 2];113(24):6085-93. Available from: <https://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-12-196618>
26. Sierro F, Biben C, Martínez-Muñoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, et al. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Sep 11 [cited 2024 Jul 2];104(37):14759-64. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0702229104>
27. Alcami A. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2003 Jan [cited 2024 Jul 2];3(1):36-50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12511874/>
28. Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana-Seisdedos F, et al. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J* [Internet]. 1997 Dec 1 [cited 2024 Jul 2];16(23):6996-7007. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9384579/>
29. Gupta SK, Pillarisetti K, Thomas RA, Aiyar N. Pharmacological evidence for complex and multiple site interaction of CXCR4 with SDF-1 α : implications for development of selective CXCR4 antagonists. *Immunol Lett* [Internet]. 2001 Aug 1 [cited 2024 Jul 2];78(1):29-34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11470148/>



30. Wescott MP, Kufareva I, Paes C, Goodman JR, Thaker Y, Puffer BA, et al. Signal transmission through the CXCR4 chemokine receptor 4 (CXCR4) transmembrane helices. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2016 Aug 30 [cited 2024 Jul 2];113(35):9928-33. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1601278113>
31. Veldkamp CT, Seibert C, Peterson FC, De La Cruz NB, Haugner JC, Basnet H, et al. Structural Basis of CXCR4 Sulfotyrosine Recognition by the Chemokine SDF-1/CXCL12. *Sci Signal* [Internet]. 2008 Sep 16 [cited 2024 Jul 2];1(37):ra4. Available from: <https://pmc/articles/PMC2692298/>
32. Thompson S, Martínez-Burgo B, Sepuru KM, Rajarathnam K, Kirby JA, Sheerin NS, et al. Regulation of Chemokine Function: The Roles of GAG-Binding and Post-Translational Nitration. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 Aug 3 [cited 2024 Jul 2];18(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28771176/>
33. Proudfoot AEI, Johnson Z, Bonvin P, Handel TM. Glycosaminoglycan Interactions with Chemokines Add Complexity to a Complex System. *Pharmaceuticals* 2017, Vol 10, Page 70 [Internet]. 2017 Aug 9 [cited 2024 Jul 2];10(3):70. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-8247/10/3/70/htm>
34. Trettel F, Di Bartolomeo S, Lauro C, Catalano M, Ciotti MT, Limatola C. Ligand-independent CXCR2 dimerization. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Oct 17 [cited 2024 Jul 2];278(42):40980-8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12888558/>
35. Vila-Coro AJ, Rodríguez M, Rodríguez-Frade R, Martín A, Martín M, Ana DE, et al. The chemokine SDF-1 α triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *The FASEB Journal* [Internet]. 1999 Oct 1 [cited 2024 Jul 2];13(13):1699-710. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fasebj.13.13.1699>
36. Harrison C, van der Graaf PH. Current methods used to investigate G protein coupled receptor oligomerisation. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2006 Jul 1;54(1):26-35.
37. Pfleger KDG, Eidne KA. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat Methods* [Internet]. 2006 [cited 2024 Jul 2];3(3):165-74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16489332/>
38. Pfleger KDG, Seeber RM, Eidne KA. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions. *Nat Protoc* [Internet]. 2006 Jun [cited 2024 Jul 2];1(1):337-45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406254/>
39. Muñoz LM, Holgado BL, Martínez-A C, Rodríguez-Frade JM, Mellado M. Chemokine receptor oligomerization: a further step toward chemokine function. *Immunol Lett* [Internet]. 2012 Jul 30 [cited 2024 Jul 2];145(1-2):23-9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22698180/>
40. Wilson S, Wilkinson G, Milligan G. The CXCR1 and CXCR2 Receptors Form Constitutive Homo- and Heterodimers Selectively and with Equal Apparent Affinities. *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Aug 5;280(31):28663-74.
41. Martínez Muñoz L, Lucas P, Navarro G, Checa AI, Franco R, Martínez-A. C, et al. Dynamic Regulation of CXCR1 and CXCR2 Homo- and Heterodimers. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2009 Dec 1 [cited 2024 Jul 2];183(11):7337-46. Available from: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0901802>
42. S.-H. Park P. Ensemble of G protein-coupled receptor active states. *Curr Med Chem* [Internet]. 2012 Feb 10 [cited 2024 Jul 2];19(8):1146-54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22300048/>
43. Weis WI, Kobilka BK. The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2018 Jun 20 [cited 2024 Jul 2];87:897-919. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29925258/>
44. Babcock GJ, Farzan M, Sodroski J. Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Jan 31 [cited 2024 Jul 2];278(5):3378-85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12433920/>
45. Percherancier Y, Berchiche YA, Slight I, Volkmer-Engert R, Tamamura H, Fujii N, et al. Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Mar 18 [cited 2024 Jul 2];280(11):9895-903. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15632118/>
46. Wang J, Norcross M. Dimerization of chemokine receptors in living cells: key to receptor function and novel targets for therapy. *Drug Discov Today* [Internet]. 2008 Jul [cited 2024 Jul 2];13(13-14):625-32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18598920/>
47. Barroso R, Martínez Muñoz L, Barrondo S, Vega B, Holgado BL, Lucas P, et al. EBI2 regulates CXCL13-mediated responses by heterodimerization with CXCR5. *The FASEB*



- Journal [Internet]. 2012 Dec 1 [cited 2024 Jul 2];26(12):4841-54. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fj.12-208876>
48. Choi WT, Tian S, Dong CZ, Kumar S, Liu D, Madani N, et al. Unique ligand binding sites on CXCR4 probed by a chemical biology approach: implications for the design of selective human immunodeficiency virus type 1 inhibitors. *J Virol* [Internet]. 2005 Dec 15 [cited 2024 Jul 2];79(24):15398-404. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16306611/>
49. Del Prete A, Sozio F, Schioppa T, Ponzetta A, Vermi W, Calza S, et al. The atypical receptor CCRL2 is essential for NK cell-dependent resistance against lung cancer. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2019 Nov 11 [cited 2024 Jul 2];7(11):1775. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31717648/>
50. Ge B, Lao J, Li J, Chen Y, Song Y, Huang F. Single-molecule imaging reveals dimerization/oligomerization of CXCR4 on plasma membrane closely related to its function. *Scientific Reports* 2017 7:1 [Internet]. 2017 Dec 4 [cited 2024 Jul 2];7(1):1-9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-16802-7>
51. Sohy D, Yano H, de Nadai P, Urizar E, Guillabert A, Javitch JA, et al. Hetero-oligomerization of CCR2, CCR5, and CXCR4 and the Protean Effects of "Selective" Antagonists. *J Biol Chem* [Internet]. 2009 Nov 11 [cited 2024 Jul 2];284(45):31270. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19127815/>
52. Hauser MA, Schaeuble K, Kindinger I, Hauck CR, Boyman O, Legler Correspondence DF. Inflammation-Induced CCR7 Oligomers Form Scaffolds to Integrate Distinct Signaling Pathways for Efficient Cell Migration. *Immunity* [Internet]. 2016 [cited 2024 Jul 2];44:59-72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.12.010>
53. Kramp BK, Sarabi A, Koenen RR, Weber C. Heterophilic chemokine receptor interactions in chemokine signaling and biology. *Exp Cell Res* [Internet]. 2011 [cited 2024 Jul 2];317(5):655-63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21146524/>
54. Cascio G, Martín-Cófreces NB, Rodríguez-Frade JM, López-Cotarelo P, Criado G, Pablos JL, et al. CXCL12 Regulates through JAK1 and JAK2 Formation of Productive Immunological Synapses. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2024 Jul 2];194(11):5509-19. Available from: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1402419>
55. Kallikourdis M, Trovato AE, Anselmi F, Sarukhan A, Roselli G, Tassone L, et al. The CXCR4 mutations in WHIM syndrome impair the stability of the T-cell immunologic synapse. *Blood* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2024 Jul 2];122(5):666-73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23794067/>
56. Nieto M, Frade JMR, Sancho D, Mellado M, Martínez-A C, Sánchez-Madrid F. Polarization of Chemokine Receptors to the Leading Edge during Lymphocyte Chemotaxis. *J Exp Med* [Internet]. 1997 Jul 7 [cited 2024 Jul 2];186(1):153. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/198956/>
57. Wu CY, Tsai YY, Chen SY, Lin YP, Shin JW, Wu CC, et al. Interaction of Zap70 and CXCR4 receptor at lamellipodia that determines the directionality during Jurkat T cells chemotaxis. *Mol Immunol*. 2017 Oct 1;90:245-54.
58. Fernández-Arenas E, Calleja E, Martínez-Martín N, Gharbi SI, Navajas R, García-Medel N, et al. B-arrestin-1 mediates the TCR-triggered re-routing of distal receptors to the immunological synapse by a PKC-mediated mechanism. *EMBO Journal* [Internet]. 2014 Mar 18 [cited 2024 Jul 3];33(6):559-77. Available from: <https://www.embopress.org/doi/10.1002/emboj.201386022>
59. Baba M, Nishimura O, Kanzaki N, Okamoto M, Sawada H, Iizawa Y, et al. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999 May 11 [cited 2024 Jul 12];96(10):5698-703. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.96.10.5698>
60. Sohy D, Parmentier M, Springael JY. Allosteric transinhibition by specific antagonists in CCR2/CXCR4 heterodimers. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Oct 12 [cited 2024 Jul 3];282(41):30062-9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17715128/>
61. Sako Y, Uyemura T. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy for Single-molecule Imaging in Living Cells. *Cell Struct Funct*. 2002 Oct;27(5):357-65.
62. Schneckenburger H. Total internal reflection fluorescence microscopy: Technical innovations and novel applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2005;16(1 SPEC. ISS.):13-8.
63. Martínez-Muñoz L, Barroso R, Dyrhaug SY, Navarro G, Lucas P, Soriano SF, et al. CCR5/CD4/CXCR4 oligomerization prevents HIV-1 gp120IIIB binding to the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 May 13 [cited 2024 Jul 3];111(19):E1960-9. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1322887111>



64. Martínez-Muñ Oz L, Miguel Rodríguez-Frade J, Sá Nchez-Madrid F, García-Parajo MF, Mellado Correspondence M. Separating Actin-Dependent Chemokine Receptor Nanoclustering from Dimerization Indicates a Role for Clustering in CXCR4 Signaling and Function. *Mol Cell* [Internet]. 2018 [cited 2024 Jul 3];70:106-19. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.034>
65. Di Marino D, Conflitti P, Motta S, Limongelli V. Structural basis of dimerization of chemokine receptors CCR5 and CXCR4. *Nature Communications* 2023 14:1 [Internet]. 2023 Oct 13 [cited 2024 Jul 3];14(1):1-16. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-023-42082-z>
66. Wu B, Chien EYT, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, et al. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* [Internet]. 2010 Nov 19 [cited 2024 Jul 3];330(6007):1066-71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20929726/>
67. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* [Internet]. 1972 [cited 2024 Jul 3];175(4023):720-31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4333397/>
68. Mattila PK, Batista FD, Treanor B. Dynamics of the actin cytoskeleton mediates receptor cross talk: An emerging concept in tuning receptor signaling. *Journal of Cell Biology* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2024 Jul 3];212(3):267-80. Available from: www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201504137
69. Bezanilla M, Gladfelter AS, Kovar DR, Lee WL. Cytoskeletal dynamics: A view from the membrane. *J Cell Biol* [Internet]. 2015 May 5 [cited 2024 Jul 3];209(3):329. Available from: <http://pmc/articles/PMC4427793/>
70. Bethani I, Skånland SS, Dikic I, Acker-Palmer A. Spatial organization of transmembrane receptor signalling. *EMBO Journal* [Internet]. 2010 Aug 18 [cited 2024 Jul 3];29(16):2677-88. Available from: <https://www.embopress.org/doi/10.1038/emboj.2010.175>
71. Kusumi A, Koyama-Honda I, Suzuki K. Molecular Dynamics and Interactions for Creation of Stimulation-Induced Stabilized Rafts from Small Unstable Steady-State Rafts. *Traffic* [Internet]. 2004 Apr 1 [cited 2024 Jul 3];5(4):213-30. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-0854.2004.0178.x>
72. Kusumi A, Suzuki K. Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2005 Dec 30;1746(3):234-51.
73. Feron O, Smith TW, Michel T, Kelly RA. Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 1997 Jul 11 [cited 2024 Jul 3];272(28):17744-8. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925818392548/fulltext>
74. De Weerd WFC, Leeb-Lundberg LMF. Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galpha subunits Galphaq and Galphai in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J Biol Chem* [Internet]. 1997 [cited 2024 Jul 3];272(28):17858-66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9211942/>
75. Dupree P, Parton RG, Raposol G, Kurzchalia T V, Simons K. Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J* [Internet]. 1993 Apr [cited 2024 Jul 3];12(4):1597. Available from: <http://pmc/articles/PMC413373/?report=abstract>
76. Ishizaka N, Griendling KK, Lassè B, Alexander RW. Angiotensin II Type 1 Receptor Relationship With Caveolae and Caveolin After Initial Agonist Stimulation. 1998 [cited 2024 Jul 3]; Available from: <http://ahajournals.org>
77. Mañes S, Lacalle RA, Gómez-Moutón C, Del Real G, Mira E, Martínez-A C. Membrane raft microdomains in chemokine receptor function. *Semin Immunol* [Internet]. 2001 [cited 2024 Jul 3];13(2):147-57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11308298/>
78. Levental I, Levental KR, Heberle FA. Lipid Rafts: Controversies Resolved, Mysteries Remain. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2024 Jul 3];30(5):341-53. Available from: <http://www.cell.com/article/S0962892420300313/fulltext>
79. Gardeta SR, García-Cuesta EM, D'Agostino G, Soler Palacios B, Quijada-Freire A, Lucas P, et al. Sphingomyelin Depletion Inhibits CXCR4 Dynamics and CXCL12-Mediated Directed Cell Migration in Human T Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2022 Jul 12 [cited 2024 Jul 3];13:925559. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimm.2022.925559/full>
80. Krone W, Klass A, Nagele H, Behnke B, Greten H. Effects of prostaglandins on LDL receptor activity and cholesterol synthesis in freshly isolated human mononuclear leukocytes. *J Lipid Res*. 1988 Dec 1;29(12):1663-9.



81. Bray D. Protein molecules as computational elements in living cells. *Nature* 1995 376:6538 [Internet]. 1995 Jul 27 [cited 2024 Jul 3];376(6538):307-12. Available from: <https://www.nature.com/articles/376307a0>
82. Cho W, Stahelin R V. Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* [Internet]. 2005 [cited 2024 Jul 3];34:119-51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15869386/>
83. Gurry T, Kahramanoğlu O, Endres RG. Biophysical Mechanism for Ras-Nanocluster Formation and Signaling in Plasma Membrane. *PLoS One* [Internet]. 2009 Jul 9 [cited 2024 Jul 3];4(7):e6148. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0006148>
84. Neel NF, Schutyser E, Sai J, Fan GH, Richmond A. Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005 Dec 1;16(6):637-58.
85. Marchese A. Endocytic trafficking of chemokine receptors. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2014 Apr [cited 2024 Jul 3];27(1):72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25542758/>
86. Morinelli TA, Walker LP, Velez JCQ, Ullian ME. Clathrin-dependent internalization of the angiotensin II AT₁A receptor links receptor internalization to COX-2 protein expression in rat aortic vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2015 Feb 5 [cited 2024 Jul 5];748:143-8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25542758/>
87. Fujiwara I, Zweifel ME, Courtemanche N, Pollard TD. Latrunculin A Accelerates Actin Filament Depolymerization in Addition to Sequestering Actin Monomers. *Curr Biol* [Internet]. 2018 Oct 8 [cited 2024 Jul 5];28(19):3183-3192.e2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30270183/>
88. Zmajkovicova K, Pawar S, Maier-Munsa S, Maierhofer B, Wiest I, Skerlj R, et al. Genotype-phenotype correlations in WHIM syndrome: a systematic characterization of CXCR4WHIM variants. *Genes & Immunity* 2022 23:6 [Internet]. 2022 Sep 12 [cited 2024 Jul 5];23(6):196-204. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41435-022-00181-9>
89. García-Cuesta EM, Rodríguez-Frade JM, Gardeta SR, D'Agostino G, Martínez P, Palacios BS, et al. Altered CXCR4 dynamics at the cell membrane impairs directed cell migration in WHIM syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2022 May 24 [cited 2024 Jul 3];119(21):e2119483119. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.2119483119>
90. Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, et al. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet* [Internet]. 2003 May 1 [cited 2024 Jul 3];34(1):70-4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12692554/>
91. McCormick PJ, Segarra M, Gasperini P, Gulino AV, Tosato G. Impaired Recruitment of Grk6 and B-Arrestin2 Causes Delayed Internalization and Desensitization of a WHIM Syndrome-Associated CXCR4 Mutant Receptor. *PLoS One* [Internet]. 2009 [cited 2024 Jul 3];4(12):e8102. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0008102>
92. Min J, DeFea K. B-arrestin-dependent actin reorganization: Bringing the right players together at the leading edge. *Mol Pharmacol*. 2011 Nov;80(5):760-8.
93. Borroni EM, Cancellieri C, Vacchini A, Benureau Y, Lagane B, Bachelier F, et al. B-arrestin-dependent activation of the cofilin pathway is required for the scavenging activity of the atypical chemokine receptor D6. *Sci Signal* [Internet]. 2013 Apr 30 [cited 2024 Jul 3];6(273). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.2003627>
94. Spiering D, Hodgson L. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adh Migr* [Internet]. 2011 [cited 2024 Jul 3];5(2):170-80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21178402/>
95. Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* [Internet]. 2007 Jun 1 [cited 2024 Jul 5];129(5):865-77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17540168/>
96. D'Agostino G, Artinger M, Locati M, Perez L, Legler DF, Bianchi ME, et al. B-Arrestin1 and B-Arrestin2 Are Required to Support the Activity of the CXCL12/HMGB1 Heterocomplex on CXCR4. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Sep 18 [cited 2024 Jul 3];11:550824. Available from: www.frontiersin.org
97. Laufer JM, Hauser MA, Kindinger I, Purvanov V, Pauli A, Legler DF. Chemokine Receptor CCR7 Triggers an Endomembrane Signaling Complex for Spatial Rac Activation. *Cell Rep* [Internet]. 2019 Oct 22 [cited 2024 Jul 29];29(4):995-1009.e6. Available from: <http://www.cell.com/article/S2211124719312197/fulltext>



98. Wittmann T, Bokoch GM, Waterman-Storer CM. Regulation of leading edge microtubule and actin dynamics downstream of Rac1. *J Cell Biol* [Internet]. 2003 Jun 6 [cited 2024 Jul 5];161(5):845. Available from: [/pmc/articles/PMC2172968/](https://pmc/articles/PMC2172968/)
99. Ridley AJ. Life at the leading edge. *Cell* [Internet]. 2011 Jun 24 [cited 2024 Jul 3];145(7):1012-22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21703446/>
100. Mastrogianni M, Juzans M, Alcover A, Di Bartolo V. Coordinating Cytoskeleton and Molecular Traffic in T Cell Migration, Activation, and Effector Functions. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2020 Oct 21 [cited 2024 Jul 18];8:591348. Available from: www.frontiersin.org
101. Kenific CM, Wittmann T, Debnath J. Autophagy in adhesion and migration. *J Cell Sci* [Internet]. 2016 Oct 15 [cited 2024 Jul 18];129(20):3685-93. Available from: <https://dx.doi.org/10.1242/jcs.188490>
102. Bogacka J, Pawlik K, Ciapała K, Ciechanowska A, Mika J. CC Chemokine Receptor 4 (CCR4) as a Possible New Target for Therapy. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 1;23(24).

Si desea citar nuestro artículo:
Oligomerización de receptores de quimioquinas
Mario Mellado
An Real Acad Farm (Internet).
An. Real Acad. Farm. Vol. 90. nº 3 (2024) · pp. 313-328
DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2023.90.03.02>



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Evaluation of the anti-inflammatory activity of gels with ethanolic extract of *baccharis macrantha* (Chilco)**Evaluación de la actividad antiinflamatoria de geles con extracto etanólico de *baccharis macrantha* (Chilco)**

Gabriela Fernanda Castelo-Guevara¹, Gisella Abigail Paredes-Iza², Alejandro Patricio Galárraga-Macías³, Mirian Fernanda Auqui-Guamán⁴ y Eliana Patricia Solis-Aucancela⁵

¹Master's student at the University of Cadiz, Spain; ²Priority care group center, Orellana, Ecuador; ³Departament of technosurveillance of the Enrique Garcés Hospital, Quito, Ecuador; ⁴Graduate of Escuela Superior Polytechnic de Chimborazo; ⁵BIO - LABSEG Clinical and Microbiology Laboratory

e-mail: gabya.1008@outlook.com

Recibido el 30 de julio de 2024; aceptado el 11 de septiembre de 2024
Disponible en Internet el 1 de octubre de 2024

KEYWORDS

baccharis macrantha
Inflammation
Gel
Ethanolic extract
Anti-inflammatory
Carrageenan-induced
plantar edema

ABSTRACT

In the present research, the anti-inflammatory activity of gels with ethanolic extract of *baccharis macrantha* collected in the community of Llacud Alto, Chimborazo Province, Ecuador was evaluated. The maceration method was used to obtain the ethanolic extract, executing the phytochemical screening with it and determining the secondary metabolites that produced the anti-inflammatory property. Consequently, the concentrated extract was obtained through the lyophilizer, which was used for the preparation of the gels at 10%, 15%, and 18.75%, to which quality control was performed, determining physicochemical characteristics and microbiological control. The anti-inflammatory determination was evaluated by measuring the plantar edema induced with 0.5% carrageenan in 36 male mice, separated into 6 groups of 6 mice, where they were then treated with positive groups (1% diclofenac and 5.5% naproxen) and the prepared gels, making measurements every hour for 6 hours. For the statistical analysis, the ANOVA test of the Minitab program was used, in which a significant difference was identified among the 6 groups. Therefore, due to this difference, the Tukey test was used, resulting in the 18.75% gels and 5.5% naproxen having a difference with the other groups, having greater anti-inflammatory power. It is concluded that certain secondary metabolites of the leaves of *baccharis macrantha* are responsible for the anti-inflammatory property of the prepared gels, with the 18.75% gel having a high anti-inflammatory power.

PALABRAS CLAVE

baccharis macrantha
Inflamación
Gel
Extracto etanólico
Antiinflamatorio
Edema plantar por
carragenina

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó la actividad antiinflamatoria de geles con extracto etanólico de *baccharis macrantha* recolectada en la comunidad Llacud alto, provincia de Chimborazo, Ecuador. Se utilizó el método de maceración para la obtención del extracto etanólico, ejecutando con el mismo el tamizaje fitoquímico y determinando los metabolitos secundarios que produjeron la propiedad antiinflamatoria, por consiguiente, se obtuvo el extracto concentrado por medio del liofilizador que fue utilizado para la elaboración de los geles a 10%, 15%, y 18,75%, a los cuales se realizó el control de calidad, determinando características fisicoquímicas y control microbiológico. La determinación antiinflamatoria se evaluó por medio de la medición del edema plantar inducido con carragenina al 0,5% en 36 ratones machos, separados en 6 grupos de 6 ratones, donde

DOI: <https://doi.org/10.53519/analesranf>.

ISSN: 1697-4271 E-ISSN: 1697-428X/Derechos Reservados © 2024 Real Academia Nacional de Farmacia.

Este es un artículo de acceso abierto



luego se los trató con los grupos positivos (Diclofenaco al 1% y Naproxeno al 5,5%) y los geles elaborados, realizando mediciones cada hora por 6 horas. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de ANOVA del programa Minitab, en el cual se identificó una diferencia significativa entre los 6 grupos, por ende, al haber esta diferencia se utilizó el test de Tukey, dando como resultado que los geles al 18,75% y Naproxeno al 5,5%, tuvieron diferencia con los demás grupos, teniendo un mayor poder antiinflamatorio. Se concluye que ciertos metabolitos secundarios de las hojas de *baccharis macrantha* son los responsables de la propiedad antiinflamatoria a los geles elaborados, teniendo el gel de 18,75% un alto poder antiinflamatorio.

1. INTRODUCCIÓN

The *Baccharis* genus contains around 400 species and is found only in the American continent, mainly in Brazil and the Andes. Around 35 species of this genus have been identified in Ecuador, where very few can be found below 1000 meters altitude, with the majority found at 2400 meters altitude, making the species *baccharis macrantha* a subject of research (1,2).

The *baccharis macrantha* species is native to Colombia and Ecuador, and is commonly known as “Chilco”, “Chilca”, “Chilco” or “Ciro”, depending on the region where it is found. However, it has been determined that the name “Chilca” corresponds to the *Baccharis latifolia* species, and “Chilco” to *baccharis macrantha* (3). In Ecuador, it is found in provinces such as Azuay, Bolívar, Carchi, Cotopaxi, Chimborazo, Imbabura and Tungurahua, and has been used in traditional medicine to treat fungal and bacterial infections, inflammation, menstrual and renal problems, among other ailments, using different preparations such as infusions or poultices, mainly using the leaves (4). It grows vigorously in open terrain with a lot of light, including native shrubs, steep slopes with compact soil, tolerating droughts and extremely cold climates at an altitude of 1800 to 2000 meters above sea level (5).

In 2022, it was evaluated the anti-inflammatory and antioxidant activity of *baccharis macrantha* species by obtaining the total content of flavonoids and polyphenols, and conducting the evaluation through the red blood cell membrane stabilizer method using only the plant extract. However, a complete phytochemical screening was not carried out for the determination of secondary metabolites. On the other hand, several studies of related species have found secondary metabolites that confer different pharmacological properties, including terpenes, phenols, flavonoids, and coumarins, which are the main metabolites of

interest for anti-inflammatory activity (3). In 2008, designed a topical anti-inflammatory formulation based on *Baccharis latifolia*, which was developed in two main stages: obtaining, identifying, and evaluating the anti-inflammatory activity of the hydroalcoholic extract, and evaluating the anti-inflammatory activity of a topical pharmaceutical form. It was concluded that the pharmaceutical form designed as a gel cream presents a greater anti-inflammatory effect than the effect observed in the hydroalcoholic extract (6).

Since there are not enough studies on the species *baccharis macrantha*, the aim was to evaluate the anti-inflammatory activity of a gel with different concentrations of ethanol extract from this plant in mice using the carrageenan-induced plantar edema method (7). Anti-inflammatory activity is important because inflammation is a common pathology in society, mainly restricting mobility and dexterity, making it more difficult to perform daily activities, and also aiming to identify the important metabolites in this activity.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant Material

Leaves of the *baccharis macrantha* plant were collected in the Llacud Alto community in the Chambo canton, because as previously mentioned, this species tends to grow in very cold climates with steep slopes and compact soils, and this community has the ideal characteristics for the growth of this species, as it is located on the slopes of the El Altar volcano, belonging to the province of Chimborazo, Ecuador, at an altitude of approximately 1700 to 2100 meters above sea level, with temperatures of 10 degrees Celsius below zero, considered a cold climate with compact soils, and its collection is difficult during rainy seasons.

2.2. Experimental animals

Thirty-six male mice of the *Mus musculus* species, weighing approximately between 30 and 45 grams, were used and divided into 6 groups of 6 mice, each group with similar weight. They were subjected to a 12-hour fast to ensure greater absorption during the administration of treatments, and kept at appropriate temperatures in the animal facility of the Faculty of Sciences of the Polytechnic School of Chimborazo for their respective conservation. This species of mice was selected because it is considered a common organism in *in vivo* experimentation, due to its short generation time, easy breeding, and visible phenotypic characteristics. Therefore, induced inflammation could be observed with the naked eye, making it optimal for measurement. It is worth noting that the guidelines of the National Institutes of Health (NIH Publications No. 8023, revised 1978) were used for animal experimentation.

2.3. Design type

An experimental design was used to evaluate the anti-inflammatory activity of 3 concentrations of gels at 10%, 15%, and 18.75% of the ethanolic extract of *baccharis macrantha*. These concentrations were chosen because in previous studies with similar species, it was noted that gels above 20% generated adverse reactions and were toxic to experimental animals. Therefore, gels

lower than 20% were selected. Additionally, these concentrations were compared with commonly used commercial gels, with Diclofenac at 1% and Naproxen at 5.5% as dependent variables in mice. Carrageenan at 0.5% was induced in the mice using the plantar edema method.

2.4. Preparation of the ethanolic extract

Principio del formulario

The ethanolic extraction was carried out with leaves from the whole and crushed plant, in which a weight of 152,39 grams of dry leaves was obtained, and upon crushing them, a weight of 183,33 grams. Then, extraction by maceration was performed, where the crushed plant leaves were placed in an amber flask of 5000 mL with 400 mL of 96° ethanol; consequently, two macerations were performed, the first for the initial 7 days. For the second maceration, the same leaves were placed, filtered with 380 mL of 96° ethanol for 7 days, filtering in each of the macerations, obtaining a total of 599 mL of ethanolic extract, placing it in another amber flask.

2.5. Fitochemical screening

The phytochemical screening of the ethanol extract was carried out, which included reactions to identify the presence or absence of metabolites such as flavonoids, coumarins, quinones/antraquinones, alkaloids, triterpenes, saponins, and tannins/phenolic compounds, where

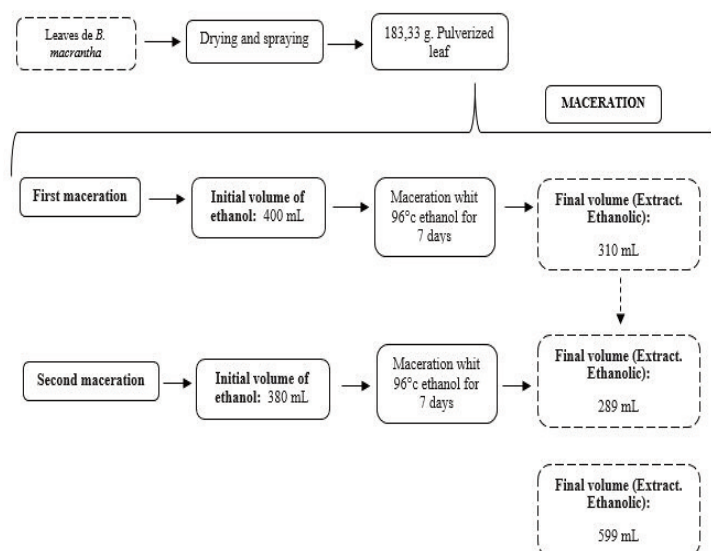


Figure 1. Scheme for the preparation of ethanolic extract

the quantification of flavonoids and phenols was also carried out by the “Folin Ciocalteu method” (7), to determine the exact amount of these metabolites in the extract.

2.6. Preparation and quality control of gels

For the formulation and preparation, first, the concentrated ethanol extract was obtained, for which approximately 550 mL of liquid ethanol extract was placed in the flask of the rotary evaporator, the base of the equipment was heated, trying not to take much pressure, until it is seen that the 96° ethanol has been completely distilled, then the extract was removed from the flask using a spatula, placing it in a Petri dish previously weighed without a sample, from which approximately 4g of concentrated ethanol extract was obtained. Therefore, the 3 gels were prepared, where first, 4g of Carbopol 940 was

dissolved in 1000 mL of distilled water with stirring by means of the magnetic stirrer, in a 1000 mL beaker. Next, the beaker was placed in the gel mixer, and depending on the formulation, the mL of glycerin was added with constant agitation, by means of the gel mixer, then the mL of Triethanolamine (TEA) was added depending on its formulation with slow movements. Finally, the concentrated extract of *baccharis macrantha* was incorporated into the mixture in respective concentrations (10%, 15%, and 18.75%), it was stirred with the help of the gel mixer until the mixture was uniform, and then it was packaged and labeled. Finally, quality control was performed, determining physicochemical characteristics (pH, greasiness, viscosity, and stability) and microbiological control such as total coliforms described in Figure 2, mesophilic aerobes as shown in Figure 3, and fungi and yeasts in Figure 4.

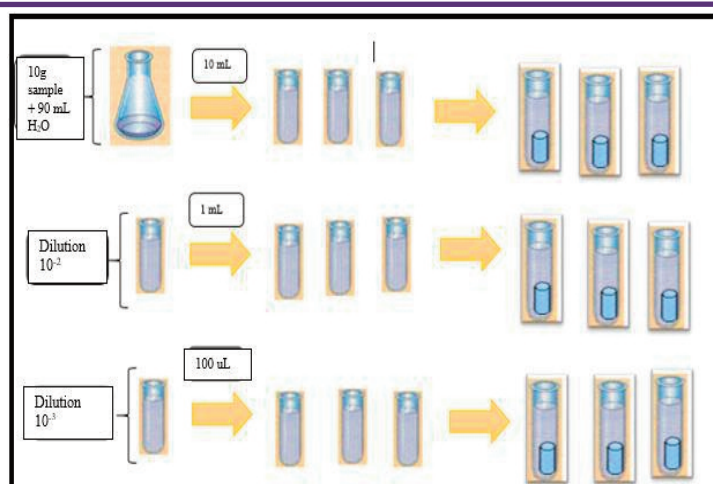


Figure 2. Scheme for total coliform count

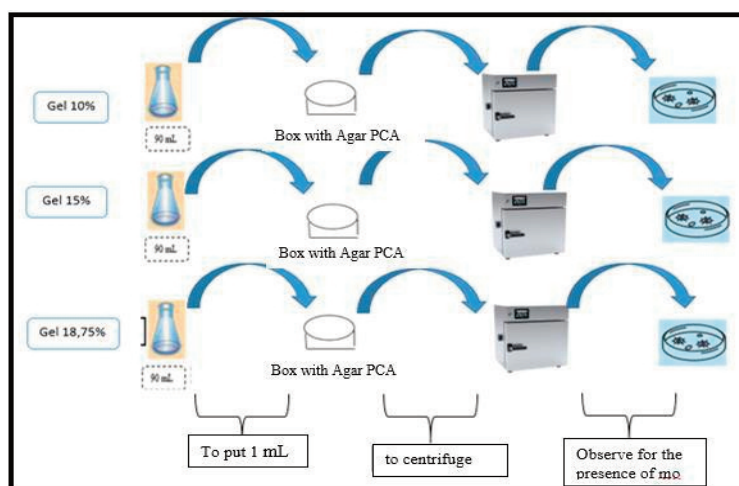


Figure 3. Diagram for counting mesophilic aerobes

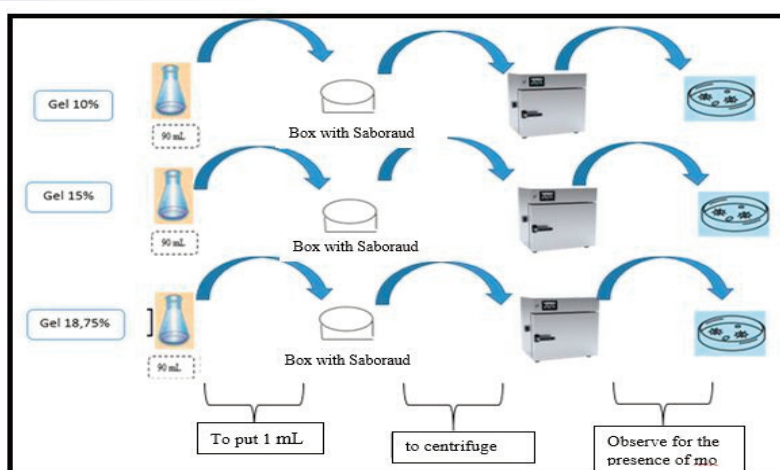


Figure 4. Diagram for counting fungi and yeasts

2.7. Evaluation of the anti-inflammatory activity of the gels

For the evaluation of the anti-inflammatory activity, 36 mice were handled under the conditions mentioned above. Afterwards, 6 mice with similar weight were divided into 6 different groups: the first group called “control group”, whose mice were only injected with carrageenan, the “positive groups” being the commercial gels, and finally the remaining 3 groups belonging to the gel with 10%, 15% and 18.75% ethanol extract, respectively. Then, the mice were labeled with a marker in some part of their tails to correctly distinguish them at the time of application of the treatments or gels. Therefore, the different treatments were administered to the mice through the method of carrageenan-induced plantar edema at 0.5%, which is based on subcutaneously injecting a 0.5% carrageenan solution in the mouse’s paw, and the times for data collection were determined. The first time was at the moment carrageenan was placed (0’), then measurements were taken at 30 minutes after the carrageenan application (30’), at which point the treatment was applied, either the Positive group treatment (1% diclofenac and 5.5% naproxen) or the gels (10%, 15%, and 18.75%). The swelling was then evaluated every hour for 6 hours using a caliper that provides millimetric measurements, and finally the data obtained from the 6 groups was tabulated and replaced in the formula to calculate the percentage of inflammation. For the statistical analysis, the MINITAB version 2019 program was used, using the one-way ANOVA test,

where the p-value was taken into account. Thus, if $p \geq 0.05$, the null hypothesis (H_0) is accepted and it is concluded that there is no significant difference between the treatments. However, if $p < 0.05$, the alternative hypothesis (H_1) is accepted, and the Tukey test is performed to determine where there may be a significant difference between all groups or treatments.

3. RESULTS

3.1. Phytochemical screening

In the respective phytochemical screening of the ethanol extract of the leaves of the *baccharis macrantha* plant presented in Table 1, the presence of flavonoids such as flavones and flavonols, saponins, tannins, and triterpenes was indicated due to the presence of different colorations for each assay. Additionally, saponins showed violet coloration for triterpenoidal saponins, and condensed tannins showed green coloration, both of which are important in the anti-inflammatory activity. The presence of coumarins was also determined through an ultraviolet light chamber. Regarding the quantification of phenols, it was observed that the total phenol content present in the *baccharis macrantha* leaves was 113 mg equivalents of gallic acid/g of dry extract, which is 11.30 g equivalents of gallic acid/100 g of dry extract. As for the quantification of total flavonoids, it was 53 mg equivalents of gallic acid/g of dry extract, that is, 5.3 g equivalents of gallic acid/100 g of dry extract.



Table 1. Phytochemical screening of the ethanol extract of the *baccharis macrantha* plant.

| METABOLITE | DESCRIPTION | RESULT |
|----------------------------|---|---------------------------|
| Flavonoids | Orange coloration | ++ Flavones |
| | Brown to orange coloration | ++ Flavonols |
| Coumarins | Presence of blue-violet under ultraviolet the light | ++ |
| Quinones/Anthraquinones | Absence of coloration | - |
| Alkaloids | Absence of precipitate | - |
| Triterpenes y/o steroids | Red coloration | Triterpenes ++ |
| Saponins | Violet coloration | Triterpenoidal Sapogenins |
| Tannins/phenolic compounds | White precipitate formation | +++ Tannins |
| | Green coloration | +++ Tannins condensed |

3.2. Elaboration and quality control of gels

During the quality control of the gel formulations, their physicochemical characteristics were determined and presented in Table 2. It was observed that they have an acidic pH, with the 10% gel having a pH of 6.79, the 15% gel 6.92, and the 18.75% gel 6.43. Smooth consistency was determined by absence of lumps or any foreign objects during tactile assessment of unctuousity. Viscosity of the three gels was found to be proportional to their concentration. The three concentrations were found to have similar extensibility, and no foreign matter was observed. Microbiological control revealed absence of mesophilic aerobes, total coliforms, fungi, and yeast, as shown in Table 3 for the 10%, 15%, and 18.75% concentrations respectively, indicating the safety of the manufactured gels.

3.3. Anti-inflammatory evaluation

When conducting the anti-inflammatory evaluation, we noted several important aspects, such as the times at which noticeable inflammation reduction occurred, as well as the anti-inflammatory percentage, as shown in Figure 5. We observed that there was greater inflammation reduction in the group that used the 18.75% gel, as after 40 minutes of carrageenan and gel application, there was already inflammation reduction in the mouse paw. However, we also noted that the positive control group (5.5% Naproxen) had a similar anti-inflammatory effect, as there was a decrease in the percentage of inflammation after 50 minutes of treatment. It is worth noting that the other *baccharis macrantha*-based gels at 10% and 15% also had mild anti-inflammatory activity, but it took longer to visualize their inflammation reduction.

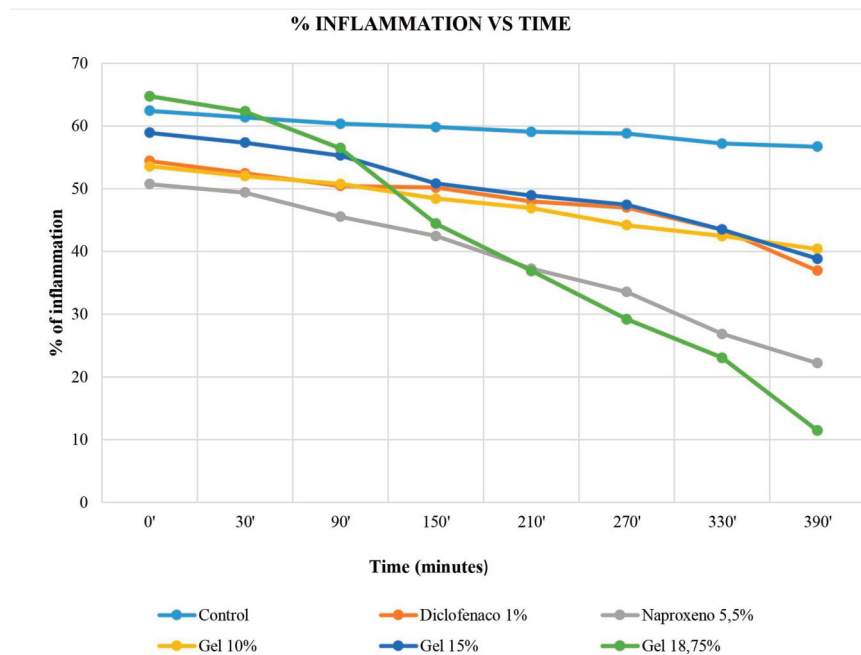


Figure 5. Comparison of the percentage of inflammation vs time

Table 2. Physicochemical Characteristics of Gels

| PSHYSCOCHEMICAL CHARACTERISTICS | | | |
|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| CONCENTRATIONS | | | |
| PARÁMETERS | Gel 10 % | Gel 15 | Gel 18,75% |
| pH | 6.79 | 6.92 | 6.43 |
| Unctuousness | Absent of grumos | Absent of grumos | Absent of grumos |
| Viscosity | 27771 cP - 46,2% | 1205 cP - 50,2% | 3318 cP - 55,3% |
| Extensibility | 3,95 cm | 4,10 cm | 4,10 cm |

Table 3. Microbiological control of gels

| MICROBIOLOGIC CONTROL | | | | |
|--|----------|----------|-------------|-------------------------|
| CONCENTRATIONS | | | | |
| PARÁMETERS | Gel 10 % | Gel 15 % | Gel 18,75 % | MAXIMUM ACCEPTED LIMITS |
| Mesophilic aerobic count | Absent | Absent | Absent | 10.000 UFC/g |
| Determination of total coliform microorganisms | Absent | Absent | Absent | <10 a 100 UFC/g |
| Determination of yeast and fungi | Absent | Absent | Absent | < 100 UFC/g |



3.4. Statistical analysis

When performing the statistical analysis using analysis of variance (ANOVA) with a 95% confidence level as shown in Table 4, the p-value obtained was 0.002, which means that $p < 0.05$, thus rejecting the null hypothesis and accepting the alternative hypothesis. Therefore, it was concluded that one of the treatment group means was different, and a Tukey test was performed with a 95% confidence level as shown in Table 5. It was found that the 18.75% gel and 5.5% Naproxen had a significant difference, meaning that these groups had higher anti-inflammatory activity than the 1% Diclofenac and the other gels based on the ethanol extract of *baccharis macrantha*. The 18.75% gel was the maximum concentration used, and the fact that the group doesn't share a letter means that it shows a significant difference as shown in Table 4. For verification purposes, a simultaneous Tukey's 95% confidence interval plot was also created, where the difference was visualized better through whiskers. If the whisker does not contain zero, it means that they are significantly different, which confirms that the 18.75% gel and 5.5% Naproxen have higher anti-inflammatory activity, as shown in Figure 6.

4. DISCUSSION

As there were no previous investigations on phytochemical screening of *baccharis macrantha* species, the results were compared with other similar species of the same genus (6), on *Baccharis latifolia*, being like this, several secondary metabolites were detected, with emphasis on the important metabolites for anti-inflammatory activity, such as phenolic compounds, tannins, saponins, and triterpenoid compounds, particularly monoterpenoids, mainly limonene, all of which were found in abundant quantities. In terms of coumarins on *Baccharis genistelloides*, detected abundant amounts of this metabolite in the ethanol extract, as well as high amounts of tannins. As the same metabolites were detected in *baccharis macrantha* species in high quantities, it was determined that the species has significant anti-inflammatory activity (9).

Regarding the quantification of phenols and flavonoids using the Folin Ciocalteu method, the results showed that this plant species had a higher amount of total phenols and flavonoids, with values of 113 and 53 mg, respectively (1), quantification of phenols in *baccharis macrantha* determined 80.1 mg EQ/g of dry extract and 21 mg EQ/g of dry extract for flavonoids.

Table 4. ANOVA statistical analysis of the inflammation percentages of the groups in the anti-inflammation evaluation

| Fountain | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Value F | Value p |
|-----------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Treatment | 5 | 2029 | 405.86 | 4.55 | 0.002 |
| Mistake | 42 | 3749 | 89.26 | | |
| Total | 47 | 5778 | | | |

Table 5. Tukey Test analysis of inflammation percentages of groups in anti-inflammatory evaluation

| Treatment | N | Medium | Grouping | |
|---------------|---|--------|----------|---|
| Control | 8 | 59.531 | A | |
| Diclofenac 1% | 8 | 47.87 | A | B |
| Naproxen 5,5% | 8 | 40.01 | | B |
| Gel 10% | 8 | 47.34 | A | B |
| Gel 15% | 8 | 50.13 | A | B |
| Gel 18,75% | 8 | 40.73 | | B |

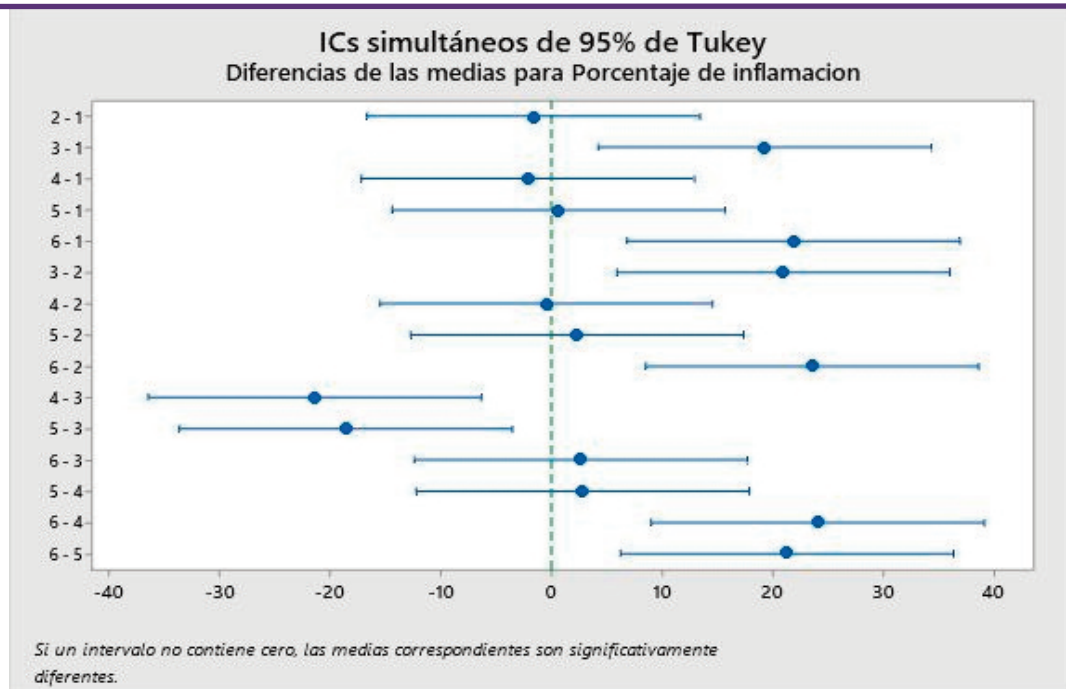


Figure 6. Simultaneous Tukey confidence intervals of inflammation percentages of treatment groups in anti-inflammatory evaluation

Regarding the physicochemical characteristics of the gels, they had an acidic pH within the established range (10), which states that gels should be within a pH range of 4-7. Regarding viscosity, there is no specific value, as they have their own characteristics. Regarding extensibility, indicated that the value should be a maximum of 5 cm for the average radius, and all concentrations were within normal values (11). For microbiological control there should be a maximum limit of 10,000 CFU/g for mesophilic aerobes and >100 for fungi and yeasts, and the gels produced were within the required range (12). The absence of total coliforms, mesophilic aerobes, fungi, and yeasts in the *Baccharis latifolia* gel (13).

In the study of *Baccharis*, the highest concentration formulation (7 mg/g or 7%) showed a greater anti-inflammatory effect, and statistical analysis using ANOVA indicated a significant difference, with the 7% gel showing greater anti-inflammatory activity than the other treatments. It had the same anti-inflammatory power as its control group. Therefore, both species, *Baccharis latifolia* and *baccharis macrantha*, have anti-inflammatory activity, with different concentrations, but still possessing anti-inflammatory properties. Also evaluated the anti-inflammatory activity of the same species, but using the red blood cell stabilization method

with only the ethanol extract (3).

5. CONCLUSIONS

In the present research, important metabolites were identified in the anti-inflammatory activity such as flavonoids, tannins, saponins, and coumarins, which are crucial for the anti-inflammatory property and are of great importance for the evaluation of various important pharmacological activities for the treatment of other pathologies, since there are no studies that determine such activity with the ethanolic extract of *baccharis macrantha*, making it innovative and interesting to conduct more research on the treated species. Gels based on the leaves of the ethanolic extract of *baccharis macrantha* showed anti-inflammatory activity when evaluated in mice, using the plantar edema method induced by 0.5% carrageenan. Regarding the three gels formulated, it was demonstrated that the gel formulation at 18.75% has a greater anti-inflammatory effect, confirmed by the ANOVA statistical analysis and the Tukey Test, which also complied with all the physicochemical and microbiological quality controls established by the USP. Therefore, by complying with all the parameters and proving its anti-inflammatory activity, the gels could be used as a treatment in humans with acute and possibly severe inflammatory processes, providing quick and



effective improvement. It is also recommended to give more importance to developing pharmacological products based on plants, since they are less toxic and rescue ancestral traditions in the use of plants for the treatment of pathologies.

It is funded by the participating authors

7. REFERENCIAS

1. Prada J, Ordúz-Díaz LL, Coy-Barrera E. *Baccharis latifolia*: una Asteraceae poco valorada con potencialidad química y biológica en el neotrópico. *Rev Fac Cienc Básicas*. 2016;12(1):92-105. Available at: (<http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.1858>)
2. Andes Tress (página de inicio de Internet). *Baccharis L.*; 2008. Disponible en: (http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=103317)
3. Rosero, S., Del Pozo, F., Simbaña, W., Álvarez, M., Quinteros, M. F., Carrillo, W., & Morales, D. Polyphenols and flavonoids composition, anti-inflammatory and antioxidant properties of andean *baccharis macrantha* extracts. *Plants (Basel)*. 2022; 11(12), 1555. <https://doi.org/10.3390/plants11121555>
4. LADERA SUR (página de inicio de Internet). El chilco y sus singulares beneficios para la naturaleza.; 2018. Disponible en: (<https://laderasur.com/articulo/el-chilco-y-sus-singulagres-beneficios-para-la-naturaleza/>)
5. Flickr (página de inicio de Internet). *Ciro, camiseta (baccharis macrantha).*; 2007. Available at: (<https://www.flickr.com/photos/16895199@N04/32591621671/in/photostream>)
6. Hoyos Vargas, K. M., & Yep Chu, M. Y. Design of a topical application formulation based on *Baccharis latifolia* (Chilca), with anti-inflammatory effect., Universidad Nacional Mayor de San Marcos (2018) Available at: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/1615>
7. Vargas Maji, N. Determination of the Anti-inflammatory Activity of *Campyloneuron amphotense* by Inhibition of Carrageenan-Induced Plantar Edema in *Rattus norvegicus* Rats, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (2017). Available at: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/6692/1/56T00708.pdf>
8. Muñoz-Bernal, Ó. A., Torres-Aguirre, G. A., Núñez-Gastélum, J. A., de la Rosa, Laura A., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J. F., & Álvarez-Parrilla, E. Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de folin-ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *TIP. Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 20(2), 23-28, (2017). Available at: (<https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.003>)
9. Herrera Fuentes, Ingrid A., Quimis Ponce, Katty L., Sorroza Rojas, Nancy A., García Larreta, Frelia S., Mariscal, Walter, Sorroza Rojas, Nancy A., & Mariscal García, Raisa S. (2017). Determinación de Taninos y Cumarinas presente en la planta tres filos. *Polo del Conocimiento*. 2017; 2(7). <https://doi.org/10.23857/pc.v2i7.257>
10. United States Pharmacopeia Convention USP XXV. 25ed. Rockville. US. United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2002.
11. United States Pharmacopeia Convention USP XXVIII. 28ed. Rockville. US. United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2005.
12. United States Pharmacopeia Convention USP XXIX. 29ed. (Microbial Limit. United States Pharmacopeial convention. 2006.
13. Aragadway Yungan, Sandra Piedad. Elaboration and quality control of dye and healing and anti-inflammatory gel based on chilca (*Baccharis latifolia*) and Hierbamora (*Solanum nigrum*). [Undergraduate thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (2009). Available at: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/216/1/56T00190.pdf>

Si desea citar nuestro artículo:

Evaluation of the anti-inflammatory activity of gels

Gabriela F. Castelo, Gisella A. Paredes et al.

An Real Acad Farm (Internet).

An. Real Acad. Farm. Vol. 90. n° 3 (2024) · pp. 329-338

DOI:<http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2023.90.03.03>



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Especies del género *Staphylococcus* resistentes a los antibióticos en aguas de balnearios mineromedicinales del Ecuador un enfoque desde “one health”

Species of *Staphylococcus* resistant to antibiotics in waters of mineralmedicinal spas of Ecuador an approach from “one health”

^{1,7,8} Félix Andueza; ¹Francisco Viteri; ¹Andrea Chávez; ¹Ramiro Guerrón; ¹Luis Villacís; ²Judith Araque; ³Marco González; ⁴Sandra Escobar-Arrieta; ⁵Ana González-Romero; ⁶Gerardo Medina-Ramírez; ⁷Evelin Alviarez; ⁸Carmina Rodríguez-Fernandez

¹FIGEMPA, Universidad Central del Ecuador, (UCE), Quito, Ecuador; ²Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Central del Ecuador, (UCE), Quito, Ecuador; ³Facultad de Odontología, Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador; ⁴Escuela Superior Politécnica del Chimborazo (ESPOCH), Riobamba, Ecuador; ⁵Universidad Nacional del Chimborazo, (UNACH), Riobamba, Ecuador; ⁶Universidad Regional Autónoma de los Andes (UNIANDES), Ambato, Ecuador; ⁷Universidad de los Andes, (ULA), Mérida, Venezuela; ⁸Doctorado en Ciencias Biológicas Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

e-mail: fdandueza@uce.edu.ec

Recibido el 30 de julio de 2024; aceptado el 11 de septiembre de 2024
Disponible en Internet el 1 de octubre de 2024

PALABRAS CLAVE

Staphylococcus
Agua mineromedicinal
Balnearios
Resistencia antibióticos
Resistomas
One Health

RESUMEN

Introducción: Las aguas mineromedicinales se han utilizado como medicamentos desde hace siglos, sin embargo, aún hay aspectos que se deben estudiar utilizando nuevos enfoques como el “One Health” para asegurar su inocuidad sanitaria. **Objetivo:** Conocer la diversidad de especies de *Staphylococcus* y sus resistencias a los antibióticos en el agua de balnearios mineromedicinales del Ecuador. **Metodología:** Se analizaron muestras de agua de 3 balneario ubicados en las provincias de Imbabura, Napo y Tungurahua, Ecuador. El aislamiento de las especies de *Staphylococcus* se realizó por la técnica de siembra en profundidad y por filtración en membrana, utilizando como medio de cultivo el agar Baird Parker, agar manitol salado y las placas CompactDry para *Staphylococcus*. Las colonias bacterianas se identificaron siguiendo los esquemas de MacFaddin (2003) complementadas con pruebas de las galerías Microgen. La resistencia a los antibióticos se determinó por el método de difusión en placas de Kirby y Bauer (1966) interpretándose según el CLSI (2022). **Resultados:** Se lograron identificar 66 cepas del género *Staphylococcus* pertenecientes a 11 especies. Los perfiles de resistencia a los antibióticos muestran diferentes patrones para cada una de las especies, aunque prevalecen las especies multirresistentes a los antibióticos gentamicina, oxacilina y penicilina. **Conclusiones:** Se demuestra la presencia de diversas especies de *Staphylococcus* en el agua de balnearios mineromedicinales del Ecuador con perfiles de resistencias y multirresistencia a los antibióticos, lo cual evidencia la existencia de resistomas y de la necesidad de utilizar el enfoque “One Health” para el estudio de la resistencia a los antibióticos.

KEYWORDS

Staphylococcus
Mineralmedicinal water
Spas
Antibiotic resistance
Resistomas
One Health

ABSTRACT

Introduction: Mineralmedicinal waters have been used as medicines for centuries, however, there are still aspects that must be studied using new approaches such as “One Health” to ensure their health safety. **Objective:** know the diversity of *Staphylococcus* species and their resistance to antibiotics in the water of mineralmedicinal spas in Ecuador. **Methodology:** Water samples from 3 spas located in the provinces of Imbabura, Napo and Tungurahua, Ecuador, were analyzed. The isolation of *Staphylococcus* species was carried out by the deep seeding technique and by membrane filtration, using Baird Parker agar, mannitol salt agar and CompactDry plates for *Staphylococcus* as culture medium. The bacterial colonies were identified following the schemes of MacFaddin (2003) supplemented with the Microgen galleries. Antibiotic resistance was determined

DOI: <https://doi.org/10.53519/analesranf>.

ISSN: 1697-4271 E-ISSN: 1697-428X/Derechos Reservados © 2024 Real Academia Nacional de Farmacia.

Este es un artículo de acceso abierto



by the plate diffusion method of Kirby and Bauer (1966) and interpreted according to the CLSI (2022). Results: 66 strains of the genus *Staphylococcus* belonging to 11 species were identified. Antibiotic resistance profiles show different patterns for each of the species, although species multiresistant to the antibiotic's gentamicin, oxacillin and penicillin prevail. Conclusions: The presence of various species of *Staphylococcus* is demonstrated in the water of mineralmedicinal spas in Ecuador with resistance and multi-resistance profiles to antibiotics, which shows the existence of resistomes and the need to use the "One Health" approach for the study of antibiotic resistance.

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace varios años se conoce la relación entre las características ambientales y la conformación de la biodiversidad microbiana en los ecosistemas acuáticos, sobre todo en ecosistemas como las aguas de los manantiales mineromedicinales (1,2). Se han realizado diversos estudios sobre la biodiversidad microbiana en el agua de manantiales mineromedicinal en varias partes del mundo, los cuales han señalado la presencia de una gran variedad de especies bacterianas en estos ecosistemas (3,4,5,6,7,8).

De igual forma, se ha venido observando que los ecosistemas acuáticos pueden albergar una microbiota bacteriana con resistencias naturales y adquiridas a los antibióticos, así como participar en la diseminación de los genes de resistencias a los antibióticos (9,10,11,12,13,14,15,16), lo cual ha permitido desarrollar el concepto de "Una Salud" o "One Health", de manera de resaltar la importancia del medioambiente en los problemas de salud, como es el caso de la creciente resistencia y multiresistencia a los antimicrobianos por parte de las bacterias, situación que nos está afectando causando muchas muertes y que nos puede llevar a una próxima pandemia (17,18,19,20,21,22).

En este sentido, se ha acuñado el término de resistomas ambientales, para describir la población microbiana resistente a los antibióticos (23). Los resistomas ambientales incluyen una gran variedad de especies bacterianas presentes en diferentes tipos de ecosistemas (24,25,26). Entre los géneros de bacterias encontrados cabe señalar a especies del género *Staphylococcus*, las cuales están presente principalmente en la superficie de animales y personas, pero también se les ha encontrado en los alimentos, el agua y el medioambiente (8,27,28,29,30,31,32).

Las bacterias del género *Staphylococcus* son células Gram positivas con forma de cocos dispuestas en racimos irregulares. Son anaerobios facultativos, catalasa positivos, inmóviles,

fermentadores de azúcar, no formadores de esporas, capaces de crecer en altas concentraciones de NaCl y productores de pigmentos, que pueden variar de una especie a otra (33). La mayoría de los miembros del género *Staphylococcus* pueden sobrevivir en condiciones desfavorables. Son capaces de tolerar un amplio rango de temperaturas de 7 a 40 °C y baja actividad de agua, razón por la cual se encuentran ampliamente distribuidos y persisten en el medio ambiente, sobre todo el acuático (34).

Varias especies del género *Staphylococcus* son considerados patógenos de animales y humanos en donde pueden causar diversos tipos de infecciones y toxiinfecciones. La infección ocurre a menudo después del contacto con superficies contaminadas o por el consumo de alimentos y aguas contaminadas (28,35,36).

La resistencia a diversos grupos de antibióticos es otra característica resaltante de las especies de *Staphylococcus* aisladas principalmente de muestras clínicas animales y humanas, aunque también en muestras ambientales (37,38,39).

La mayoría de los estudios sobre la detección de genes de resistencia a antibióticos en especies del género *Staphylococcus* se han limitado a la especie *Staphylococcus aureus*, provenientes de muestras de alimentos y de muestras clínicas (40,41).

Entre las bacterias resistentes a los antimicrobianos, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) es la segunda causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (42).

Se han descrito altas tasas de resistencia a antibióticos como la oxacilina, penicilina, eritromicina, gentamicina y la vancomicina (40,43,44,45), lo cual ha llevado a que se señalen a cepas de *Staphylococcus aureus*, como una gran amenaza para la salud humana (37).

La incidencia de resistencia a los antibióticos en aislados acuáticos de especies de *Staphylococcus* se ha investigado muy poco, por lo que las implicaciones del contacto humano con aguas contaminadas con cepas de especies de *Staphylococcus* son desconocidas.



En Ecuador, las aguas mineromedicinales termales son frecuentemente utilizadas por un amplio sector de la población, quienes acuden a ellas con fines recreativos y en muchos casos con fines curativos. En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue determinar la diversidad de especies de *Staphylococcus* y sus perfiles de resistencia a los antibióticos en aguas de balnearios mineromedicinales del Ecuador, de manera de conocer si existe en estos ecosistemas resistomas ambientales relacionados con las especies del género *Staphylococcus* que pudieran ser un riesgo para la salud del público que acude a estos sitios.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Sitios de muestreos

Uno de los sitios donde se realizó parte de la investigación fue el balneario de aguas mineromedicinales de “Santagua de Chachimbiro” ubicado en el suroeste de la parroquia Tumbabiro, en el cantón Urququí, provincia Imbabura, en la Cordillera Occidental Andina ecuatoriana (Figura 1) a una altitud de 2672 m.s.n.m. y con una temperatura ambiente que varía entre los 16 y 22

°C. Las aguas termo minerales de Chachimbiro en el complejo Santagua, provienen de un acuífero hidrotermal profundo. El agua termal de este balneario se ha determinado que es de tipo clorurada sódica e hipertermal ya que la temperatura media del agua es de 55 °C (46).

Otro de los sitios donde se desarrolló el estudio fue en el balneario mineromedicinal de “Termas de Jamanco”, localizado al Nororiente de Ecuador, provincia de Napo, Cantón Quijos, parroquia Papallacta, Ecuador (Figura 2), a una altitud de 3400 m.s.n.m, con una temperatura ambiental promedio de 8 °C y una precipitación media anual mayor a 1000 mm. (47). Las aguas de este balneario han sido clasificadas de tipo cloruradas sódicas con temperaturas de 49,8 °C, consideradas como hipertermales (47).

El último de los sitios donde se llevó a cabo la investigación fue en el balneario de aguas mineromedicinales “Termas de Santa Ana”, ubicado en el cantón de Baños de Agua Santa de la Provincia de Tungurahua, Ecuador (Figura 3), a una altitud de 2031 m.s.n.m, con una temperatura ambiental promedio de 20 °C. Las aguas mineromedicinales termales del Balneario “Santa Ana”, son de tipo sulfatadas, magnésicas e hipertermales por tener una temperatura promedio de 35 °C (47).

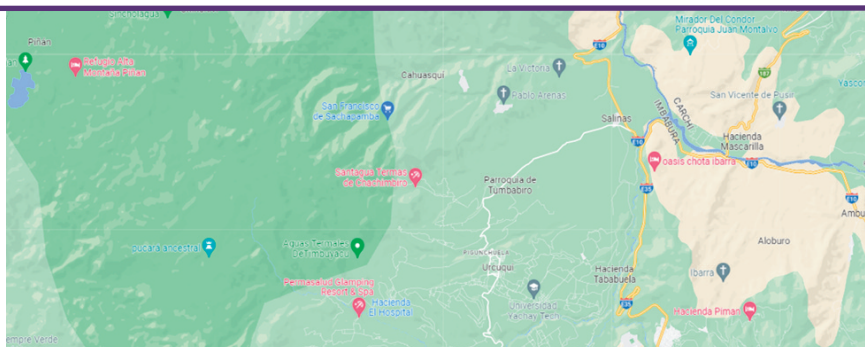


Figura 1. Ubicación geográfica del Balneario “Santagua de Chachimbiro. Imbabura. Ecuador (Google Map, 2023).

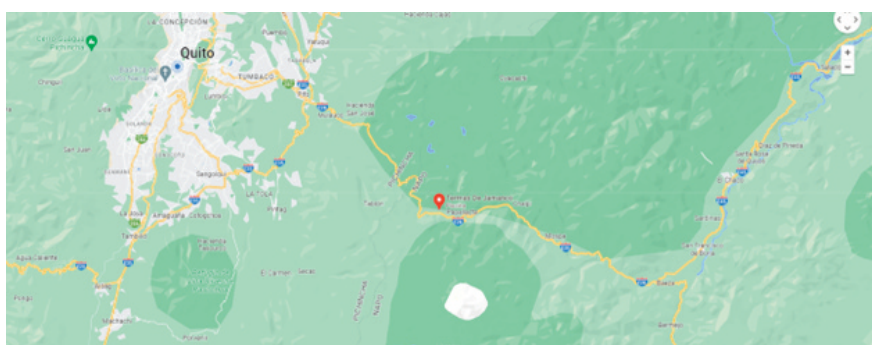


Figura 2. Ubicación geográfica del Balneario “Termas de Jamanco”. Napo. Ecuador (Google Map, 2023).

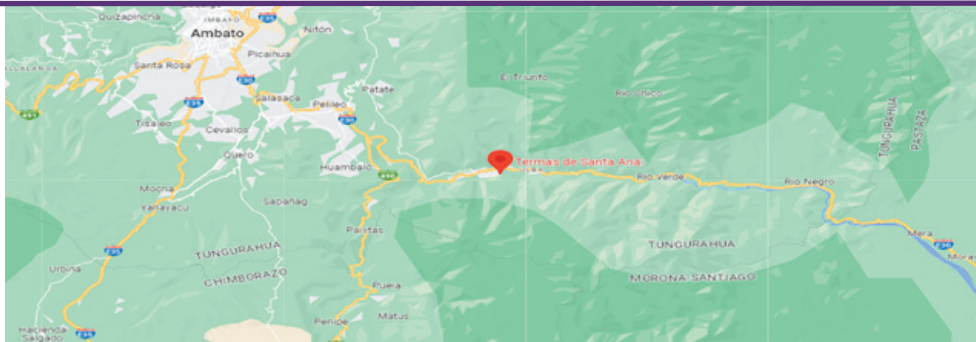


Figura 3. Ubicación geográfica del Balneario “Termas de Santa Ana”. Tungurahua. Ecuador (Google Map, 2023).

2.1.2. Muestras

En el balneario de “Santagua de Chachimbiro” los puntos de la toma de muestra fueron cuatro. El primero, fue en la vertiente u ojo de agua. El segundo, en el tanque de almacenamiento. El tercer y cuarto punto fueron del agua de las piscinas termales del balneario. En todos los casos se tomó un volumen de 1 litro de muestras de agua, por duplicado en cada ocasión. Se realizaron dos muestreos en cada punto establecido, con un total de 16 muestras.

Para el balneario “Termas de Jamanco” los sitios de muestreos fueron 6. Las tres piscinas termales del complejo, el tanque de almacenamiento y las dos vertientes o nacientes de donde se toma el agua para el balneario. El volumen de muestra en cada sitio fue de 1 litro de muestras de agua, recolectadas por duplicado. Se realizaron dos muestreos, con un total de 24 muestras.

Respecto al balneario “Termas de Santa Ana”, se seleccionaron 3 sitios de muestreos, la naciente o vertiente del agua que ingresa al balneario, el tanque de almacenamiento del agua y la piscina termal del balneario. El volumen de muestra en cada sitio de muestreo fue de 1 litros de agua, recolectadas por duplicado. Se realizaron dos muestreos, con un total de 12 muestras.

En todos los casos los muestreos se realizaron de acuerdo con la norma ecuatoriana sobre muestras de agua (48), transportándose las muestras hasta el laboratorio de análisis según lo indicado en la normativa (49).

3. METODOLOGÍA

3.1. Siembra y aislamiento

Para el aislamiento de las colonias de *Staphylococcus* presentes en las muestras de agua, se utilizaron 2 técnicas. La primera técnica fue la

de siembra en profundidad (50) utilizando diluciones seriadas hasta 10^{-4} de cada una de las muestras en solución fisiológica, y posteriormente de cada una de las diluciones y de la muestra sin diluir, se realizaron siembras de un volumen de 1 mL en los agares Baird Parker y Manitol Salado, así como en placas Compact Dry X-SA para *Staphylococcus*, incubándose a 30°C durante un tiempo de 48 a 72 horas. Posteriormente se purificaron las colonias crecidas en agar soya tripticasa para su posterior identificación.

La segunda técnica fue la de filtración por membrana (51). De cada una de las muestras recolectadas de agua se filtraron un volumen de 100 mL, utilizando filtros de $0,45\ \mu\text{m}$ de diámetro y un tamaño de poro de $0,45\ \mu\text{m}$ (Millipor). Posteriormente, las membranas se colocaron sobre placas de Petri con los agares Baird Parker y Manitol Salado, así como en placas de Compact Dry X-SA para *Staphylococcus*. Las placas con los filtros se incubaron a una temperatura de 30°C durante 48-72 horas. Finalizado el tiempo de incubación las colonias amarillas fueron seleccionadas y purificadas en agar soya tripticasa para su posterior identificación.

3.2. Identificación de las colonias de *Staphylococcus* aisladas

Cada una de las colonias aisladas fueron purificadas en placas de Petri con agar soya tripticasa. Seguidamente se les realizó la coloración de Gram y la prueba de la oxidasa. Las cepas presuntivas de *Staphylococcus*, purificadas en el agar Tripticasa-Soya, fueron sometidas a pruebas bioquímicas individuales, a fin de lograr su identificación a nivel de especie (52,53). De igual forma, se utilizó adicionalmente el método de identificación comercial de las galerías Novacyt-Microgen™ para *Staphylococcus* (54).

3.3. Perfiles de resistencia a los antibióticos

La susceptibilidad a los antibióticos fue determinada a cada una de las cepas de *Staphylococcus* identificadas, a través del método de difusión en discos de Kirby-Bauer (55). Se utilizaron como cepas controles, la cepa ATCC 25922 de *Escherichia coli* y la cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*. Se ensayaron los siguientes antibióticos: Eritromicina (ERY; 15 µg), gentamicina (GEN; 10 µg), oxacilina (OXA; 1 µg), penicilina (PEN; 10 U) y vancomicina (VAN; 30 µg). Para la interpretación de los resultados de los antibiogramas se utilizó el manual del CLSI (56).

4. RESULTADOS

4.1. Diversidad de especies de *Staphylococcus*

Al observar los datos señalados en la Tabla 1, se puede indicar que para el balneario de aguas mineromedicinales “Santagua de Chachimbiro” se logró identificar 25 cepas del género *Staphylococcus* pertenecientes a las especies: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdenensis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus spp* *Staphylococcus warneri* y *Staphylococcus xylosus* (Ver Tabla 1).

En el caso del agua del balneario mineromedicinal “Termas de Jamanca” se pudo identificar un total de 23 cepas del género *Staphylococcus* perteneciente a las especies, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus spp*, *Staphylococcus warneri* y *Staphylococcus vitulis* (Ver Tabla 1).

Para el agua del balneario minero medicinal de “Termas de Santa Ana”, se pudo identificar una tola de 18 cepas del género *Staphylococcus*, correspondiendo a las especies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus cohnii subsp urealyticum*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus klosii* y *Staphylococcus spp* (Ver Tabla 1).

Al analizar los datos de la Tabla 1, se observa que las especies con mayor frecuencia de aislamiento, considerando los tres balnearios analizados, fueron *Staphylococcus aureus* (%), y *Staphylococcus warneri* (%).

4.2. Perfiles de resistencia a los antibióticos

En la Tabla 2 se resumen los resultados obtenidos en la determinación de los perfiles de resistencia y sensibilidad a los antibióticos de las especies del género *Staphylococcus* identificadas en los tres balnearios de agua mineromedicinal estudiados. En la presente investigación se observaron las mayores resistencias para el caso de los antibióticos eritromicina, oxacilina y penicilina (Ver tabla 2).

Los antibióticos más efectivos contra las cepas de las diferentes especies de *Staphylococcus*, fue el antibiótico vancomicina, resultados que corresponde a la susceptibilidad que se ha indicado para este género en diferentes muestras de origen ambiental, animal y humano (Ver tabla 2).

5. DISCUSIÓN

Desde hace varios años los estudios microbiológicos realizados en diferentes tipos de ecosistemas acuáticos han puesto en evidencia la presencia de cepas bacterianas pertenecientes a diversas especies del género *Staphylococcus* en estos ambientes, inclusive en las aguas minerales envasadas (3,27,34,57,58,59,60,61,62).

El género *Staphylococcus* alberga un gran número de especies cuyos miembros poseen un variado repertorio de características biológicas y bioquímicas que le han permitido sobrevivir y ocupar ambientes con diferentes condiciones fisicoquímicas y químicas (63,64,65).

Entre estos ambientes destaca los manantiales de aguas termales, denominados mineromedicinales por sus notorias propiedades y usos como medicamentos (66). Estudios microbiológicos realizados en manantiales mineromedicinales de varias partes del mundo han puesto en evidencia la presencia de especies de *Staphylococcus* en estos ecosistemas, denominado también ecosistemas extremófilos por sus condiciones extremas en el aspecto fisicoquímico y químico (1,3,4,5,8,67,68,69). En este sentido, los resultados del presente trabajo son similares respecto a la presencia de varias especies de este género (Ver tabla 1) en las aguas mineromedicinales estudiadas, aunque difieren en el aspecto de las especies identificadas y sus porcentajes de aislamientos.



Tabla 1. Diversidad de especies bacterianas del género *Staphylococcus* en aguas mineromedicinales de balnearios ecuatorianos

| Lugar | Número de especies de <i>Staphylococcus</i> identificadas | Número de cepas identificadas | Especies identificadas |
|-------------------------------------|---|-------------------------------|--|
| Balneario "Santagua de Chachimbiro" | 6 | | |
| | | 5 | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| | | 5 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| | | 3 | <i>Staphylococcus lugdenensis</i> |
| | | 3 | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> |
| | | 3 | <i>Staphylococcus spp</i> |
| | | 3 | <i>Staphylococcus warneri</i> |
| | | 3 | <i>Staphylococcus xylosus</i> |
| Subtotal | | 25 | |
| Balneario "Termas de Jamanco" | 4 | | |
| | | 4 | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| | | 4 | <i>Staphylococcus sciuri</i> |
| | | 7 | <i>Staphylococcus spp</i> |
| | | 4 | <i>Staphylococcus vitulis</i> |
| | | 4 | <i>Staphylococcus warneri</i> |
| Subtotal | | 23 | |
| Balneario "Termas de Santa Ana" | 4 | | |
| | | 5 | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| | | 3 | <i>Staphylococcus cohnii subsp urealyticum</i> |
| | | 2 | <i>Staphylococcus intermedius</i> |
| | | 4 | <i>Staphylococcus klosii</i> |
| | | 4 | <i>Staphylococcus spp</i> |
| Subtotal | | 18 | |
| Total | 14 | 66 | |

De igual forma, en Ecuador existen varios estudios sobre el aislamiento y caracterización de este género bacteriano en muestras de aguas de balnearios mineromedicinales (24,70,71,72). Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos en la presente investigación con los observados en otros balnearios de aguas mineromedicinales de otras provincias del Ecuador, se puede señalar que especies del género *Staphylococcus* se han aislados en estos tipos de ecosistemas, aunque existen variaciones en las especies identificadas y en la frecuencia de aislamiento, ratificando lo que han señalado diversos investigadores sobre la

microbiota de los ecosistemas acuáticos, en el sentido de que es específica y que depende de las condiciones fisicoquímicas, geológicas y química de cada ecosistema (1,73).

En la mayoría de los estudios realizados en ecosistemas acuáticos mineromedicinales (3,4,53,74), las especies prevalente han sido *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, resultados muy similares a los obtenidos en la presente investigación (Ver tabla 1), aunque la variedad de especies aisladas e identificadas ha sido mayor, muy probablemente debido a que estos ambiente son frecuentados por

Tabla 2. Perfiles de resistencia a los antibióticos de las especies bacterianas del género *Staphylococcus* aisladas en el agua mineromedicinales del balneario del Ecuador.

| Origen de aislamiento | Código | ERY | GEN | OXA | PEN | VAN |
|--|---------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Balneario “Santagua de Chachimbiro” | | | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | BSC-1 | S | S | R | R | S |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | BSC-2 | R | S | S | R | S |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | BSC-4 | R | S | R | R | S |
| <i>Staphylococcus lugdenensis</i> | BSC-6 | S | S | S | S | S |
| <i>Staphylococcus lugdenensis</i> | BSC-7 | R | S | R | R | S |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | BSC-10 | R | S | R | R | S |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | BSC-11 | S | S | S | S | S |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | BSC-15 | R | S | R | S | S |
| <i>Staphylococcus warneri</i> | BSC-17 | R | R | R | S | S |
| <i>Staphylococcus warneri</i> | BSC-19 | S | S | R | R | S |
| <i>Staphylococcus warneri</i> | BSC-20 | R | S | S | R | S |
| <i>Staphylococcus xylosus</i> | BSC-21 | R | S | R | S | S |
| Balneario “Termas de Jamanco” | | | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | BTJ-2 | S | S | R | S | S |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | BTJ-3 | R | S | R | R | S |
| <i>Staphylococcus sciuri</i> | BTJ-5 | S | S | S | S | S |
| <i>Staphylococcus sciuri</i> | BTJ-7 | S | S | R | R | S |
| <i>Staphylococcus vitulis</i> | BTJ-19 | R | S | S | R | S |
| <i>Staphylococcus vitulis</i> | BTJ-21 | S | S | R | S | S |
| <i>Staphylococcus warneri</i> | BTJ-23 | R | S | R | S | S |
| Balneario “Termas SANTA ANA” | | | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | BTSA-2 | R | S | S | R | S |
| <i>Staphylococcus cohnii subsp urealyticum</i> | BTSA-7 | S | R | S | R | S |
| <i>Staphylococcus intermedius</i> | BTSA-9 | R | S | R | R | S |
| <i>Staphylococcus klopii</i> | BTSA-10 | S | S | S | S | S |
| <i>Staphylococcus klopii</i> | BTSA-11 | S | S | R | S | S |



un gran número de personas que pueden ser portadoras de diferentes especies y cepas de *Staphylococcus*, las cuales pueden diseminarse en el agua mineromedicinal permaneciendo viables dada la resistencia de los miembros de este género a las condiciones de alta salinidad que presentan las aguas mineromedicinales, y además, por su capacidad de formar *biofilm* en diversos tipos de ecosistemas (15,75,76,77).

Los resultados respecto a los perfiles de sensibilidad y resistencia a los antibióticos por parte de las distintas cepas de las especies de *Staphylococcus* identificadas se resumen en la Tabla 2.

Las cepas de *Staphylococcus* presentan un perfil típico de susceptibilidad/resistencia a antibióticos (78,79), destacando la multiresistencia a 2 antibióticos en la mayoría de las cepas, así como la resistencia a los antibióticos eritromicina y a la oxacilina, además de la sensibilidad de todas las cepas analizadas a la vancomicina (Ver tabla 2)

Los resultados obtenidos en la presente investigación indican la presencia de una variada gama de perfiles de resistencia/sensibilidad a los antibióticos por parte de las cepas de las distintas especies de *Staphylococcus* analizadas, los cuales varían con respecto a otras investigaciones llevadas a cabo en otros tipos de ecosistemas acuáticos (12,80,81).

Los miembros del género *Staphylococcus* son bacterias ambientales ubicuas, capaces de colonizar rápidamente y causar infecciones oportunistas en humanos y animales, que también pueden promover el intercambio de genes de resistencia a los antibióticos entre las bacterias autóctonas y las alóctonas presentes en los ambientes naturales, tales como los ecosistemas acuáticos (30,39).

Los resultados muestran que el mayor porcentaje de las cepas de las distintas especies de *Staphylococcus* fueron resistentes a los antibióticos eritromicina, oxacilina y penicilina (Ver tabla 2).

La penicilina es un antibiótico de la familia de los β -lactámicos. Se introdujo en la práctica clínica en 1941 y, sólo un año después, se describió la resistencia a la penicilina en algunas cepas de *Staphylococcus aureus*. Diez años después, más de la mitad de los aislamientos en grandes hospitales ya eran resistentes a la penicilina (82). La necesidad de crear compuestos resistentes a la

acción de las β -lactamasas producidas por las células de *Staphylococcus* resistentes, llevó al desarrollo de otros antimicrobianos como la meticilina. Sin embargo, poco después de la introducción de este antibiótico, se aislaron también cepas resistentes al mismo (MRSA) (83). Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce a las cepas de *Staphylococcus* resistentes a la meticilina como un patógeno de alta prioridad, ya que se ha observado la aparición de estas cepas en muestras alimentarias, ambientales, de animales y de humanos (37).

El mecanismo de resistencia a la meticilina se basa en la síntesis de la proteína PBP, con poca afinidad por la meticilina y otros β -lactámicos, que bloquea la llegada del antibiótico a su sitio diana y crea así resistencia (84). El gen *mecA*, que se encuentra en los loci genéticos llamados cromosomas en cassette estafilocócicos *mec* (SCC*mec*), es el principal gen responsable de la resistencia a la meticilina (85).

Con respecto al antibiótico eritromicina, el cual pertenece al grupo de los macrólidos de primera generación, pocos años después de su introducción en el tratamiento de infecciones por bacterias Gram positivas, aparecieron las primeras cepas de *Staphylococcus* resistentes a estos antibióticos. Hoy en día, la resistencia a los macrólidos está muy extendida en todo el mundo y un gran número de bacterias son resistentes a este tipo de antimicrobiano (86). La creciente resistencia a los macrólidos entre las cepas de *Staphylococcus*, sobre todo de origen clínico, es consecuencia de su uso en el tratamiento de infecciones por bacterias Gram positivas y generalmente se asocia con resistencia a los antibióticos lincosamida y estreptogramina B (87).

Los tres mecanismos principales de resistencia a los macrólidos en *Staphylococcus* son: (1) modificación del ribosoma bacteriano, (2) salida de macrólidos de la célula bacteriana/protección del ribosoma a través de proteínas de la familia de unión al ATP (ABC-F), e (3) inactivación enzimática (88,89). La modificación del sitio objetivo en el ribosoma causa una resistencia de amplio espectro a los macrólidos, mientras que el eflujo y la inactivación enzimática son de menos importancia. Los genes de resistencia a macrólidos se encuentran en plásmidos, transposones e islas genómicas y pueden transferirse fácilmente horizontalmente entre cepas y especies (88,89).



Otros de los resultados obtenidos en la investigación fue que una gran proporción de las cepas de *Staphylococcus* estudiadas resultaron sensibles al antibiótico gentamicina y todas fueron sensibles a la vancomicina (Ver tabla 2) .

La gentamicina es un antibiótico del grupo de los aminoglucósidos, utilizado como antibiótico de amplio espectro y acción bactericida para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* o *Enterococcus faecalis* (90).

Se ha indicado que las bacterias del género *Staphylococcus* generan resistencia a través de diversos mecanismos, entre ellos las mutaciones en el sistema de permeabilidad membranal, a diferencia de las bacterias Gram negativas cuyo principal mecanismo de resistencia a la gentamicina es mediante la presencia de enzimas mediadas por plásmidos que alteran los aminoglucósidos (91).

En el caso de la vancomicina, el cual es un antibiótico del grupo de los glucopéptidos que se utiliza en casos de las cepas resistentes a la meticilina, se ha indicado que su efecto bactericida es a través de la inhibición de la síntesis de la pared celular, gracias a su gran afinidad por los precursores de esta, lo cual permite alterar la acción de la transglucosidasa por diversos impedimentos estéricos (90).

Recientemente se ha visto que la resistencia de bacterias Gram positivas a la vancomicina se encuentra asociada con la transferencia de genes *van* de enterococos (90). La resistencia a la vancomicina también puede deberse a la heterorresistencia de las células bacterianas (92).

Dado a que aún no se encuentra generalizada la resistencia a la gentamicina y vancomicina en las cepas de *Staphylococcus*, estos antibióticos se utilizan en los casos de las cepas resistentes a la meticilina (93), aunque en los últimos años ha ido aumentando la detección de cepas resistentes a los mismos (94).

En diversos estudios realizados en los últimos años en diferentes tipos de ecosistemas acuáticos, como glaciares, aguas de lagos volcánicos y los manantiales de aguas termales (16,74,95,96,97,98), han dejado al descubierto que en estos ambientes existen una diversidad de microorganismos con resistencias naturales a los antibióticos que han sobrevivido y se han adaptado

a las condiciones extremas reinantes en esos ambientes, constituyendo un reservorio natural de bacterias y de genes asociados con la resistencia a los antibióticos denominados resistomas ambientales, los cuales han sido poco estudiados (10,99,100). Las escasas investigaciones realizadas sobre los resistomas ambientales han puesto en evidencia que antes de haberse descubierto y utilizados los antibióticos, las comunidades bacterianas han interactuado con los microorganismos productores de antibióticos y desarrollados mecanismos de resistencia que le han permitido su adaptación y proliferación en distintos ambientes acuáticos y terrestres, como una estrategia adaptativa creando nuevos nichos para sobrevivir ante la competencia con los microorganismos productores de sustancias antimicrobianas (101,102).

Tomando en consideración lo señalado en el párrafo anterior, es importante evaluar el problema de la resistencia a los antibióticos desde una perspectiva más global, como la que propone el enfoque “One Health” (103), donde el componente ambiental debe analizarse y monitorearse para estudiar las resistencias naturales detectadas, ya que representan una fuente importante de transmisión y dispersión, tanto de los microorganismos resistentes, como de sus genes (9,12,104). Recientemente se ha señalado que la resistencia a los antibióticos en cepas de bacterias ambientales se encuentra en la interfaz del “One Health” y que deben hacerse un mayor número de investigaciones para entender esta dinámica (11,105,106).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden ser el reflejo probablemente de la existencia de presiones selectivas naturales en los ecosistemas investigados, tales como la elevada concentración de sales y metales pesados presentes en este tipo de aguas, así como la temperaturas e incidencia de radiaciones solares elevadas, dada la situación altitudinal de los balnearios estudiados que se encuentran por encima de los 2000 metros sobre el nivel del mar. De igual forma, se debe considerar también como una presión selectiva, la posible presencia de microorganismos productores de antimicrobianos en estos ambientes, así como la presencia de especies de bacterias patógenas proveniente de fuentes externas que pudieran haber ayudado a la diseminación de los genes de resistencia, ello si se



considera que estas aguas son utilizadas por una gran parte de la población que acude a ellas para buscar alivio a una variada gama de enfermedades.

En el caso de Ecuador, el presente trabajo sería el primero en señalar la presencia de especies del género *Staphylococcus* resistentes a diversos antibióticos en muestras de agua de manantiales mineromedicinales termale de las provincias de Imbabura, Napo y Tungurahua.

6. CONCLUSIONES

Se evidencia que en el agua mineromedicinal del balneario “Santagua de Chachimbiro”. están presentes una mayor variedad de especies de *Staphylococcus* en comparación a la observada en el agua de los otros balnearios estudiados.

Los resultados obtenidos en los perfiles de resistencia a los antibióticos de las distintas especies de *Staphylococcus* encontradas, indican la presencia de especies resistentes y multirresistentes a por lo menos 2 antimicrobianos, lo que evidencia el papel de las especies del género *Staphylococcus* en la diseminación y reservorios de los genes de resistencias a antibióticos en el ambiente y su posible papel en el establecimiento de resistomas ambientales.

Este trabajo señala la necesidad de estudiar y comprender la importancia de las aguas minerales naturales, como lo son las aguas mineromedicinales de uso público, como reservorios de la diversidad bacteriana y de resistomas ambientales siendo una línea base para futuras investigaciones desde el enfoque “One Health”, ya que es necesario tomar en cuenta la microbiota ambiental si se quiere combatir y mitigar el problema de la resistencia a los antibióticos.

Conflicto De Intereses

Los autores dejan constancias que no existe ningún tipo de conflicto de intereses con la investigación realizada y los resultados expresados en el presente artículo.

Agradecimientos

A la Dirección de Investigación de la Universidad Central del Ecuador por el financiamiento otorgado a través de los proyectos avanzados

senior DI-011-2017 y DI-045-2022 que han permitido el desarrollo de una línea de investigación a la cual pertenece la presente investigación, así como a la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo (ESPOCH), la Universidad Nacional del Chimborazo (UNACH), la Universidad Autónoma regional de los Andes (UNIANDES), la Universidad Politécnica Salesiana, la Universidad de los Andes de Venezuela (ULA) y la Universidad Complutense de Madrid, España por la ayuda, colaboración y asesoramiento prestado.

7. REFERENCIAS

1. De la Rosa MC, Mosso MA. Diversidad microbiana de las aguas minerales termale. En: Panorama actual de las aguas minerales y mineromedicinales de España, pp. 153-158. Ed. A. López y J.L. Pinuaga. Instituto Tecnológico Geominero de España. Madrid. España. 2000.
2. Barton L & McLean R. Environmental Microbiology and Microbial ecology. First edition. Wiley & Sons. Inc. NJ. USA. 2019.
3. De la Rosa MC, Andueza F, Sánchez M, Rodríguez C, Mosso M. Microbiología de las aguas mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2004; 70 (Extraordinario): 51-74.
4. De la Rosa MC, 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.
5. Gutiérrez MG, Andueza F, Araque J, Lugo A, Chacón Z. Caracterización microbiológica y potencial biotecnológico de microorganismos aislados de las aguas termale de la Musuy, Municipio Rangel del Estado Mérida. Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2018; 38 (1): 27-32.
6. Valcheva N & Ignatov I. Physicochemical and microbiological characteristics of thermal healing spring waters in the district of Varna. Journal of Medicine, Physiology and Biophysics. 2019; 59: 10-16.
7. Fang S & Yan J. Analysis of prokaryotic microbial diversity in hot spring water from Bantang (China) using the targeted amplicon analysis. All Life. 2022; 15(1): 325-339.
8. Andueza-Leal FD, Araque-Rangel J, González-Escudero M, Sacoto D, León-Leal A, Gutiérrez MG, Flores S, Escobar-Arrieta S, & Medina-Ramírez G. Biodiversidad bacteriana en aguas de balnearios mineromedicinales de Ecuador y Venezuela. FIGEMPA: Investigación y Desarrollo, 2023; 15(1): 56-77.



9. Baquero F, Martínez J, Cantón R. Antibiotics, and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*. 2008; 19 (3): 260-265.
10. Ishii S. Ecology of Pathogens and Antibiotic-resistant Bacteria in Environments: Challenges and Opportunities. *Microbes Environ*. 2019; 34(1): 1-4.
11. Rivera-Chavira BE, Palacios OA, Adame-Gallegos JR, Virginia G. La Resistencia Bacteriana a Antibióticos: Un Problema Ambiental y Multisectorial Microbial Antimicrobial Resistance: An Environmental and Multidisciplinary Problem. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 2020; 12(24).
12. Hu Y, Jiang L, Sun X, Wu J, Ma L, Zhou Y, Cui C. Risk assessment of antibiotic resistance genes in the drinking water system. *Science of the Total Environment*. 2021; 800: 149650.
13. Zou HY, He LY, Gao FZ, Zhang M, Chen S, Wu DL, Ying GG. Antibiotic resistance genes in surface water and groundwater from mining affected environments. *Science of the Total Environment*. 2021; 772: 145516.
14. Cohen T. The Next Pandemic: A Pragmatic and Ethical Discussion About the Looming Threat of Antibiotic Resistance. *Voices in Bioethics*. 2022; 8. <https://doi.org/10.52214/vib.v8i.9509>.
15. Yin H, Cai Y, Li G, Wang W, Wong PK, An T. Persistence, and environmental geochemistry transformation of antibiotic-resistance bacteria/genes in water at the interface of natural minerals with light irradiation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2022; 52(13): 2270-2301.
16. Andueza F, Acuña J, Escobar J, González-Escudero M, Araque J, Escobar-Arrieta S, González-Romero, Medina-Ramírez G. *Pseudomonas* species and their profiles of resistance to antibiotic in aquatic ecosystems of Ecuador. *Revista de la Facultad de Farmacia*. 2023; 65(1): 9-17.
17. FAO-OIE-OMS-UNICEF-BM- UNSIC. Contributing to One World, One Health: a strategic framework for reducing risks of infectious diseases at the animal-human-ecosystems interface. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, la Organización Mundial de Sanidad Animal, la Organización Mundial de la Salud, el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia, el Banco Mundial y el Coordinador del Sistema de las Naciones Unidas para la Gripe. París. Francia. 2008. https://www.preventionweb.net/files/8627_OWOH14Oct08.pdf
18. De Kraker MEA, Stewardson AJ, Harbarth S. ¿Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? *PLoS Med*. 2016;13: e1002184.
19. Leandro AS, Lopes RD, Martins CA, Rivas AV, da Silva I, Galvão SR, De Freitas RM. The adoption of the One Health approach to improve surveillance of venomous animal injury, vector-borne and zoonotic diseases in Foz do Iguaçu, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2021;15(2): e0009109. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009109>.
20. Murray Christopher JL, Shunji Ikuta K, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, Han C et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 2022; 399 (10325): 629 - 655.
21. Ogunseitan OA. One Health and the Environment: From Conceptual Framework to Implementation Science, Environment: Science and Policy for Sustainable Development. 2022; 64:2, 11-21. DOI: <https://doi.org/10.1080/00139157.2022.2021792>
22. Elnaïem A, Mohamed-Ahmed O, Zumla A, Mecskey J, Charron N, Abakar MF & Dar O. Global and regional governance of One Health and implications for global health security. *The Lancet*; 2023; 401(10377): 688-704.
23. Dante G, Sommer M. Genética de la resistencia microbiana. *Investigación y Ciencias*. 2014; Agosto: 28-34.
24. Medina-Ramírez G, Naranjo C, Escobar S, Araque J, Djabayan P, Andueza F. Microbiota extremófila y resistomas ambientales de la fuente termal “Termas La Merced” Quito-Ecuador. *FIGEMPA: Investigación y Desarrollo*. 2016; 1(2): 33-37.
25. Paun VI, Lavin P, Chifiriuc MC. & Purcarea C. First report on antibiotic resistance and antimicrobial activity of bacterial isolates from 13,000-year old cave ice core. *Sci. Rep*. 2021; 11: 514. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79754-5>.
26. Hanna N, Tamhankar AJ & Lundborg CS. Antibiotic concentrations and antibiotic resistance in aquatic environments of the WHO Western Pacific and South-East Asia regions: a systematic review and probabilistic environmental hazard assessment. *The Lancet Planetary Health*. 2023; 7(1): e45-e54.
27. Abdel-Gawad FK, Eweda WE, El-Taweel GE, Shehata SF, Abdel Tawab MA. Detection of *Staphylococcus aureus* from fish and water samples collected from Lake Qarun. *International Journal of Scientific & Engineering Research*. 2015; 6(8): 366-372.
28. Haag AF, Fitzgerald JR, Penadés JR. *Staphylococcus aureus* in Animals. *Microbiology Spectrum*. 2019; 7(3): 7-3.



29. Kozajda A, Jeżak K, Kapsa A. Airborne *Staphylococcus aureus* in different environments—a review. *Environmental Science and Pollution Research*. 2019; 26(34): 34741-34753.
30. Zieliński W, Korzeniewska E, Harnisz M, Hubeny J, Buta M, Rolbiecki D. The prevalence of drug-resistant and virulent *Staphylococcus spp.* in a municipal wastewater treatment plant and their spread in the environment. *Environment International*. 2020; 143: 105914.
31. Abdeen EE, Mousa WS, Abdelsalam SY, Heikal HS, Shawish RR, Nooruzzaman M, Abdeen A. Prevalence, and characterization of coagulase positive *Staphylococci* from food products and human specimens in Egypt. *Antibiotics*. 2021; 10(1): 75.
32. Organji SR, Abulreesh HH, Elbanna K, Osman GE, Almalki MH. Diversity and characterization of *Staphylococcus spp.* in food and dairy products: a foodstuff safety assessment. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2021; 586-593.
33. Bangieva D & Rusev V. Risk from *Staphylococcus aureus* in informally marketed raw cow milk. *Food Sci Appl Biotechnol*. 2019; 2:74-80.
34. Faria C, Vaz-Moreira I, Serapicos E, Nunes OC, & Manaia CM. Antibiotic resistance in coagulase negative *Staphylococci* isolated from wastewater and drinking water. *Science of the total environment*. 2009; 407(12): 3876-3882.
35. Cheung GY, Bae JS, Otto M. Pathogenicity, and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*. 2021; 12(1): 547-569.
36. Howden BP, Giulieri SG, Wong Fok Lung T, Baines SL, Sharkey LK, Lee JY & Stinear TP. (2023). *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. *Nature Reviews Microbiology*. 2023; 1-16.
37. World Health Organization (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1
38. Algammal AM, Hetta HF, Elkelish A, Alkhalifah DHH, Hozzein WN, Batiha GES, Mabrok MA. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): one health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. *Infection and Drug Resistance*. 2020; 13: 3255.
39. Rossi CC, Pereira MF, Giambiagi de Marval M. Underrated *Staphylococcus* species and their role in antimicrobial resistance spreading. *Genetics and Molecular Biology*. 2020; 43.
40. Idrees M, Sawant S, Karodia N, Rahman A. *Staphylococcus aureus* biofilm: Morphology, genetics, pathogenesis, and treatment strategies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021; 18(14): 7602.
41. Dos Santos IR, da Silva INM, de Oliveira Neto JR, de Oliveira NRL, de Sousa ARV, de Melo AM & Bailão EFLC. The presence of antibiotics and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* reservoir in a low-order stream spring in central Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2023; 54(2): 997-1007.
42. Antimicrobial Resistance Collaborators. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022; 12;399(10325):629-655. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
43. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, Fowler VG. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology*. 2019; 17(4): 203-218.
44. Bruce SA, Smith JT, Mydosh JL, Ball J, Needle DB, Gibson R & Andam CP. Shared antibiotic resistance and virulence genes in *Staphylococcus aureus* from diverse animal hosts. *Scientific Reports*. 2022; 12(1): 4413.
45. Selim S, Faried OA, Almuhayawi MS, Saleh FM, Sharaf M, El Nahhas N, & Warrad M. Incidence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains among patients with urinary tract infections. *Antibiotics*. 2022; 11(3): 408.
46. Carrera Villacrés D & Guevara García P. Fuentes termales del Ecuador. Escuela Superior Politécnica del Ejército (ESPE). Quito. Ecuador. 2017 <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/11739>.
47. Burbano N, Becerra S, Pasquel E. Aguas termo minerales en el Ecuador. INAMHI. Quito. Ecuador. 2013. <https://issuu.com/inamhi/docs/termalismo>
48. Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). NTE INEN 2 176-98 Agua. Calidad del agua. Muestreo. Técnicas de muestreo. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Quito-Ecuador. 1998a.
49. Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). NTE INEN 2 169-98 Agua. Calidad del agua. Muestreo. Manejo y conservación de muestras. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Quito-Ecuador. 1998b.
50. Rice EW, Baird RB, Eaton AD. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23 Edition. American Public Health Association.



- American Water Works Association. Water Environment Federation. Washington. USA. 2017.
51. United Nations Environment Programme-World Health Organization (UNEP-WHO). Determination of *Staphylococcus aureus* in sea water and sewage by the membrane filtration (MF) culture method. Reference methods for marine pollution. Studie 28. Rev. I. UNEP-WHO. Athens. Greece. 1995.
52. MacFaddin J. Pruebas Bioquímica individuales. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3a ed. Editorial Médica Panamericana Buenos Aires. Argentina. 2003.
53. Andueza F. Diversidad Microbiana de las Aguas Mineromedicinales de los Balnearios de Jaraba. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España. 2007.
54. Microgen Bioproducts. Microgen® Staph-ID. identification system for *Staphylococci* of clinical, veterinary, and environmental importance. UK. 2017. <https://microgenbioproducts.com/wp-content/uploads/sites/8/2017/11/Microgen-Bioproduts-Flier-Staph-ID-LOW-REZ.pdf>
55. 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.
56. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA. 32 edition. USA. 2022.
57. Meldrum R. Survey of *Staphylococcus aureus* contamination in a hospital's spa hydrotherapy pools. Commun. Dis. Public Health. 2001; 4: 205-208.
58. Andueza F. Calidad bacteriológica del agua mineral envasada expendida en la ciudad de Mérida, Venezuela. Perspectiva (Cajamarca). Facultad de Farmacia y Bioquímica. UPAGU. 2013; 14 (16): 41-49.
59. Plano LRW, Shibata T, Garza AC, Jonathan Kish, Jay M. Fleisher, Christopher D. Sinigalliano, Maribeth L. Gidley, Kelly Withum, Samir M. Elmir, Suzanne Hower, Charlene R. Jackson, John B. Barrett, Timothy Cleary, Maureen Davidson, Johnnie Davis, Sampa Mukherjee, Lora E. Fleming & Helena M. Solo-Gabriele (2013). Human-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a subtropical recreational marine beach. Microb Ecol 2013; 65:1039-51.
60. Araque J. Microbiota bacteriana heterótrofa aerobia mesófila del agua envasada. Tesis de Maestría. Postgrado de Microbiología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de los Andes. Mérida. Venezuela. 2014.
61. Gómez P., Lozano C., Benito D., Estepa V., Tenorio C., Zarazaga M., & Torres C. Characterization of *Staphylococci* in urban wastewater treatment plants in Spain, with detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398. Environmental pollution, 2016, 212, 71-76.
62. Oladipo AO, Oladipo OG, Bezuidenhout CC. Multi-drug resistance traits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcal* species from clinical and environmental sources. J Water Health 2019; 17:930-43.
63. Kloos WE. Natural Populations of the Genus *Staphylococcus*. Annual Review of Microbiology, 1980; 34:559-592.
64. Götz F, Bannerman T, Schleifer KH. The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. The Prokaryotes. 2006:5-75. doi: https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_1
65. Liebeke M & Lalk M. *Staphylococcus aureus* metabolic response to changing environmental conditions-a metabolomics perspective. International Journal of Medical Microbiology. 2014; 304(3-4), 222-229.
66. Armijo M & San Martín J. Curas Balnearias y Climáticas. Talasoterapia y Helioterapia. Ed. Complutense. Madrid. España. 1994.
67. Baker GC, Gaffar S, Cowan DA, Suharto AR. Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. FEMS. Microbiol. Lett. 2001; 200: 103-109.
68. Mosso MA, Sánchez M, De la Rosa MC. Microbiología del agua mineromedicinal de los balnearios de Alhama de Granada. An. R. Acad. Nac. Farm. 2002; 68: 381-405.
69. Shahina J, Sandhiya D, Rafiq S. Bacteriological quality assessment of groundwater and surface water in Chennai. Nat Environ Pollut Technol 2020;19.
70. Andueza F, Jácome A, Cortez S, Medina G, Arciniegas S, Parra Y, Araque J. Microbiota of the thermal water of the spa "Piscinas El Cachaco", Calicali, Province of Pichincha, Ecuador. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2018; 84(4): 247-254.
71. Sacoto D & Andueza F. Microbiología del agua termal del balneario Ilalo. Pichincha. Ecuador. FIGEMPA: Investigación y desarrollo. 2020;1 (1): 18-25. <https://doi.org/10.29166/revfig.v1i1.2178>.
72. Andueza Leal F, Araque J, Parra Y, Arciniegas S, Guaila R, Escobar S, Medina G. (2020). Diversidad bacteriana en aguas mineromedicinales del balneario "Urauco". Pichincha. Ecuador. An. Real Acad. Farm. 2020; 86 (1): 9 - 18. <http://dx.doi.org/10.15568/anranf.2020.89.or01>



73. Norton DC & LeChevallier WM. A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66:268-76.
74. Andueza F, González, Ibáza D, Vásquez P, Viteri F, Villacís L, Araque J, Escobar-Arrieta S, González-Romero A, Medina-Ramírez G, Alviarez E. Diversity and profiles of resistance to antibiotic in species of the genus *Aeromonas* isolated from the aquatic ecosystems of Ecuador. *Anales de la Real Academia de Farmacia.* 2022; 88 (4): 713-720.
75. Vaish M, Price-Whelan A, Reyes-Robles T, Liu J, Jereen A, Christie S & Krulwich TA. Roles of *Staphylococcus aureus* Mnh1 and Mnh2 antiporters in salt tolerance, alkali tolerance, and pathogenesis. *Journal of Bacteriology.* 2018; 200(5), 10-1128.
76. Schilcher K & Horswill AR. *Staphylococcal* biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2020; 84(3): 10-1128.
77. François P, Schrenzel J, & Götz F. Biology and Regulation of *Staphylococcal* Biofilm. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023; 24(6), 5218.
78. Mamani E., Luján D., & Pajuelo G. Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*: Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. In *Anales de la Facultad de Medicina*, 2006; Vol. 67 (2), 120-124.
79. Assouma F. F., Sina H., Dossou A. D., Socohou A., Hounsou M. C., Avogbe P. H., Boya B, Mousse W, Adjanooun A, & Baba-Moussa, L. (2023). Antibiotic resistance profiling of pathogenic *Staphylococcus* species from urinary tract infection patients in Benin. *BioMed Research International*, 2023, 6364128. <https://doi.org/10.1155/2023/6364128>
80. Abimbola Olumide Adekanmbi, Olubukola Funmi Soyoye, Olawale Olufemi Adelowo. Characterization of methicillin-resistance gene *mecA* in coagulase negative *Staphylococci* (CoNS) recovered from wastewater of two healthcare facilities in Niger. *Gene Reports.* 2019; 17: 100541.
81. Mamman GP, Angulu CN, Musa G, & Angulu S. Identification and antibiotic susceptibility profile of methicillin and erythromycin resistant genes in clinical and environmental strains of *Staphylococcus aureus* in Minna Nigeria. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences.* 2022; 15(1): 195-201.
82. Shlaes DM & Projan SJ. Antimicrobial resistance versus the discovery and development of new antimicrobials. In: Mayer's DL (ed). *BT—Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance*. Totowa, NJ: Humana Press, 2009, 43-50.
83. Stapleton PD & Taylor PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci Prog.* 2002; 85:57-72.
84. Fishovitz J., Hermoso J. A., Chang M., & Mobashery S. (2014). Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *IUBMB life*, 2014; 66(8), 572-577.
85. Shore A. C., Deasy E. C., Slickers P., Brennan G., O'Connell B., Monecke S., Ehrich R, & Coleman, D. C. Detection of *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2011, 55(8), 3765-3773.
86. Van Hoek AHAM, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJM. Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. *Front. Microbiol.* 2011; 2: 203.
87. Yao W, Xu G, Li D, Bai B, Wang H, Cheng H, Zheng J, Sun X, Lin Z, Deng Q & Yu Z (2019). *Staphylococcus aureus* with an *erm*-mediated constitutive macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotype has reduced susceptibility to the new ketolide, solithromycin. *BMC Infect. Dis.* 2019; 19: 175.
88. Feßler AT, Wang Y, Wu C, Schwarz S. Mobile macrolide resistance genes in *Staphylococci*. *Plasmid.* 2018; 99: 2-10.
89. Mikłasińska-Majdanik M. Mechanisms of Resistance to Macrolide Antibiotics among *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* 2021; 10: 1406. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111406>
90. Rodríguez-Carranza (2015). Gentamicina: Antimicrobianos. In: Rodríguez Carranza R. eds. *Vademécum Académico de Medicamentos*. McGraw-Hill Education; 2015. Accessed mayo 12, 2024. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1552§ionid=90370876>
91. Młynarczyk-Bonikowska B., Kowalewski C., Krolak-Ulinska A., & Marusza W. (2022). Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. *International journal of molecular sciences*, 2022, 23(15), 8088.
92. Nunes A. P. F., Teixeira L. M., Iorio N. L. P., Bastos C. C. R., de Sousa Fonseca L., Souto-Padrón T., & Dos Santos K. R. N. (2006). Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterisation of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. *International*



- journal of antimicrobial agents, 2006; 27(4), 307-315.
93. Hope R., Livermore D. M., Brick G., Lillie M., & Reynolds R. (2008). Non-susceptibility trends among *Staphylococci* from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008; 62 (suppl 2), ii65-ii74.
94. Szmajda M., Glajner P. & Sienkiewicz M. Decreased susceptibility to vancomycin and other mechanisms of resistance to antibiotics in *Staphylococcus epidermidis* as a therapeutic problem in hospital treatment. *Sci Rep* 2023, 13, 13629. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40866-3>
95. Rafiq M, Hayat M, Anesio AM, Jamil SUU, Hassan N, Shah AA. Recovery of metallo-tolerant and antibiotic resistant psychrophilic bacteria from Siachen glacier, Pakistan. *PLoS ONE*, 2017; 12(7): e0178180. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178180>
96. González M, Viteri F, Villacis L, Escobar J, Araujo L, González A, Medina G, Araque J, Andueza F. Perfiles de susceptibilidad a los antibióticos en cepas del género *Bacillus* aisladas de ambientes acuáticos extremos del Ecuador. *An. Real Acad. Farm.* 2021; 87 (1): 27-34.
97. Nawaz S., Rafiq M., Pepper I. L., Betancourt W. Q., Shah A. A., & Hasan F. Prevalence and abundance of antibiotic-resistant genes in culturable bacteria inhabiting a non-polar passu glacier, karakorum mountains range, Pakistan. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2023; 39(4), 94. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03532-4>
98. Sajjad W., Ali B., Niu H., Ilahi N., Rafiq, M., Bahadur A. & Kang, S. High prevalence of antibiotic-resistant and metal-tolerant cultivable bacteria in remote glacier environment. *Environmental Research*, 2023; 239, 117444.
99. Nimaichand S., Philip, J. S., Prasad, R., Nori, S. R. C., Divakaran, S. J., Ramaraj, S. K. & Nelson-Sathi, S. Shotgun Metagenomics Unravels the Bacterial Diversity, Resistome Profile and Genetic Exchange in a Tropical Urban Environment, 2023, Preprint (Version 1) available at Research Square. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3169772/v1>.
100. Zhang Z. & Ju F. Future Climate Scenarios Aggravate Health Risks of Soil Microbiome by Reshaping Resistome and Pathogenome. *bioRxiv*, 2024, 2024-01.
101. Letten AD, Hall AR, Levine JM. Using ecological coexistence theory to understand antibiotic resistance and microbial competition. *Nat. Ecol. Evol.* 2021; 5: 431-441 <https://doi.org/10.1038/s41559-020-01385-w>.
102. Malard LA, & Guisan A. Into the microbial niche. *Trends in Ecology & Evolution*. 2023; <https://doi.org/10.1016/j.tree.2023.04.015>
103. World Health Organization (WHO). A health perspective on the role of the environment in One Health Copenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe. 2022.
104. Bengtsson-Palme J., Abramova A., Berendonk T. U., Coelho L. P., Forslund S. K., Gschwind R. & Zahra R. Towards monitoring of antimicrobial resistance in the environment: For what reasons, how to implement it, and what are the data needs? *Environment international*, 2023, 108089.
105. Aslam B., Khurshid M., Arshad M. I., Muzammil S., Rasool M., Yasmeen N. & Baloch, Z. Antibiotic resistance: one health one world outlook. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2021, 11, 771510.
106. Ahmad N., Joji R. M. & Shahid, M. Evolution and implementation of One Health to control the dissemination of antibiotic-resistant bacteria and resistance genes: A review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2023, 12, 1065796.

Si desea citar nuestro artículo:
Especies del género *Staphylococcus* resistentes a los antibióticos en aguas de balnearios mineromédicinas del Ecuador un enfoque desde “one health”
Félix Andueza; Francisco Viteri et al.
An Real Acad Farm (Internet).
An. Real Acad. Farm. Vol. 90. n° 3 (2024) · pp. 339-353
DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2023.90.03.04>



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Biocatálisis: Una investigación científica fascinante en el CSIC
Biocatalysis: A fascinating scientific research at the CSIC

Antonio Ballesteros Olmo

Instituto de Catálisis y Petroquímica, CSIC, 28049 Madrid, Spain

e-mail: a.ballesteros@icp.csic.es

Recibido el 30 de julio de 2024; aceptado el 11 de septiembre de 2024
Disponible en Internet el 1 de octubre de 2024**PALABRAS CLAVE**Catálisis
Enzimas
Catálisis biológica
Trabajo en equipo
Afán de saber
Poder de la mente
Suerte**RESUMEN**

Se describe la impresionante aventura que fue fundar desde cero —en la Sección de Catálisis del Instituto de Química-Física Rocasolano, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,— un grupo de biocatálisis con enzimas.

Antes de desarrollar la fundación de esta línea, hablaré de seis antecedentes: A1 Los Pedroches. A2 Pozoblanco. A3 Mis raíces. A4 Catalizadores. A5 Mi formación. A6 Llegó el amor.

Y, para terminar, daré unas pinceladas sobre el importante y apasionante futuro de la Biocatálisis.

KEYWORDSCatalysis
Enzymes
Biocatalysis
Team Work
Eagerness for
Knowledge
Mind Power
Serendipity**ABSTRACT**

The impressive adventure of founding from scratch —in the Catalysis Section of the Rocasolano Institute of Chemistry-Physics at CSIC— a research group working on biocatalysis with enzymes is described.

Prior to this, the following six antecedents are discussed: A1 Los Pedroches. A2 Pozoblanco. A3 My roots. A4 Catalysts. A5 My training. A6 Love has arrived.

And, to finish, a few touches on the important and exciting future of Biocatalysis are given.



1. ANTECEDENTES

1.1. El Valle de los Pedroches

Este viaje personal empieza en esta comarca norte de la provincia de Córdoba, que a modo de punta de lanza, se introduce entre las provincias de Badajoz y Ciudad Real. Viniendo desde la capital, y una vez pasada la Sierra Morena y el puerto del Calatraveño, —al cual dio fama el marqués de Santillana—, se extiende una zona en la que abunda el granito, y está formada por 17 pueblos. Una característica importante de la historia del valle ha sido su aislamiento de la Meseta, hecho que se certificó cuando en tiempos de Carlos III se eligió Despeñaperros como el camino de la conexión de Madrid con Córdoba y Sevilla.

Debido a la presencia de grandes dehesas, el jamón ibérico de Los Pedroches es una de las 4 denominaciones de origen que tenemos en España.

1.2. Pozoblanco

Este trayecto personal comienza en el pueblo de Pozoblanco, de 18.000 habitantes, el mismo número que hace un siglo. Fundado hace 7 siglos, en el siglo XVIII la Corona lo declara capital de la comarca de Los Pedroches. Es un pueblo agricultor-ganadero, a pesar de las difíciles condiciones climáticas para estas actividades; estas dificultades han marcado impronta en el modo de ser de sus habitantes. Durante dos siglos simultaneó con una floreciente industria textil (paños y bayetas), hasta que ésta desapareció en

el siglo pasado. Pozoalbense ilustre es Juan Ginés de Sepúlveda, cronista del Emperador Carlos. Pozoblanco es un pueblo de hondo espíritu cristiano; fue una suerte que hace 90 años los Salesianos de Don Bosco decidieran fundar un Colegio.

1.3. Mis Raíces

Estoy muy orgulloso de toda mi familia y de su trayectoria. Empezando por mis abuelos Ballesteros Jiménez y Fernández Cabrera, y Olmo García y Cabrera Redondo. Y después, mis padres: Francisco y Francisca. Todos con sus familias muy numerosas, y muy religiosas. Deseo agradecer el ejemplo y esfuerzo de mis padres. Mi familia supo prever la importancia de permitir a los hijos realizar estudios secundarios, que luego podrían conducir a la Universidad, y así, —siguiendo las sugerencias y posterior ayuda de 2 dos curas salesianos, a quienes estoy muy agradecido,— empecé el Bachillerato. Y, posteriormente, cursé Química en la Universidad de Sevilla.

Siempre recibí amor y seguridad por parte de toda mi familia. Por otra parte, tuve unos excelentes profesores. Pasando los años, a mis padres les concederían en Córdoba el Primer Premio a la Promoción Familiar, por haber posibilitado que sus once hijos, —con la ayuda de muchísimas becas,— alcanzaran niveles de enseñanza muy superiores a los suyos.

Con el tiempo vendría nuestro emparentamiento con la familia García Herruzo.

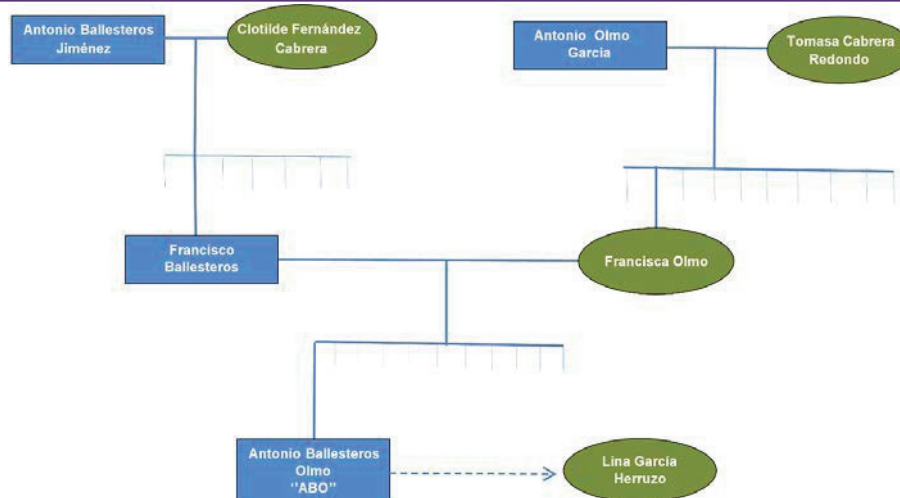


Figura 1. Mis raíces.

2. CATALIZADORES

Ya Berzelius en 1835 describió procesos catalíticos en plantas y animales, y también usando platino metal y ácidos. La palabra catálisis viene del griego (katalysis, que significa disolución; acabamiento). Según la Real Academia Española “un catalizador es una sustancia que en pequeña cantidad incrementa la velocidad de una reacción química y se recupera sin cambios esenciales al final de la reacción”. Además, en los últimos años la RAE le ha añadido una nueva acepción “dicho de una persona o cosa que estimula el desarrollo de un proceso”.

Esta es la gráfica que compara una reacción no catalizada con la misma reacción catalizada (Figura 2). Al pasar de los sustratos a productos, vemos, — en un esquema muy simplificado,— la representación de los cambios de energía libre de la reacción al progresar la transformación. La energía libre de Gibbs es aquella que puede transformarse en trabajo; la energía calorífica no es energía libre. La menor energía de una reacción en presencia de un catalizador hace que la transformación sea infinitamente más rápida: en algún caso se ha demostrado que es más de un trillón de veces. Pero un valor más normal podría ser alrededor de mil millones de veces más rápida (—diez elevado a nueve—) que la reacción sin catalizador.

Como farmacéutico, me voy a permitir esta tarde dispensarles unas cuantas recetas:

Receta Primera

Tradicionalmente, la catálisis se ha dividido en homogénea y heterogénea. La catálisis puede realizarse empleando bien catalizadores inorgánicos (p.ej. metales en el catalizador de un coche, o las zeolitas), bien catalizadores orgánicos. En química, casi todas las reacciones son catalíticas.

De los catalizadores orgánicos, desde hace un siglo se conoce que son un tipo de proteínas, “proteínas catalíticas” llamadas fermentos o enzimas. Sin la acción de los enzimas, no es posible la vida.

Las proteínas son polímeros lineales de aminoácidos, que se enlazan, —con pérdida de una molécula de agua—, formando enlaces amida (peptídicos). Se cree que un mal plegamiento posterior de esta estructura primaria podría ser responsable del Alzheimer y del Parkinson.

3. MI FORMACION

Estudié Química en la Universidad de Sevilla, de la que tengo buenos recuerdos de profesores y compañeros. Y de mi trabajo de laboratorio para la Tesina de Licenciatura. Al año siguiente el Jefe del Estado entregaría los premios Fin de carrera a las diversas titulaciones, en mi caso representando obviamente a Ciencias Químicas.

Pronto me di cuenta de que la parte que más me atraía era la Bioquímica; cosa que tuve ocasión de ratificar cuando marché a Granada para cursar estudios de Farmacia.

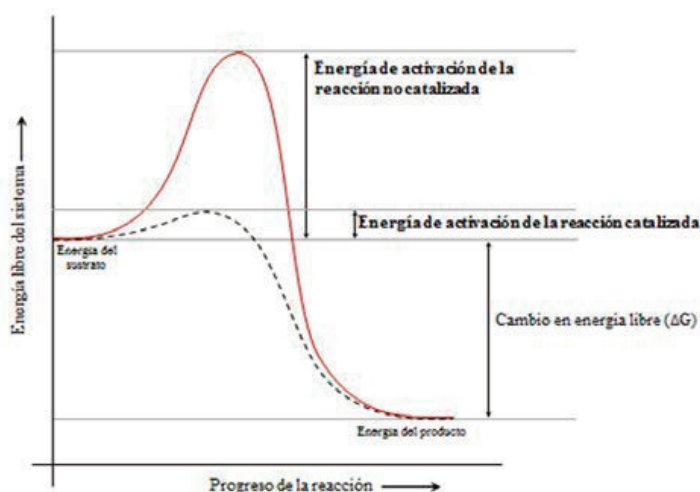


Figura 2. Comparativa reacción no catalizada vs reacción catalizada.



Dos años más tarde me vine a Madrid, al Instituto Rocasolano, del CSIC, para hacer el doctorado en Química. Elegí el tema “catálisis”, por lo que pasé al grupo del Prof. García Banda. Mi tema de trabajo fue continuar los estudios sobre catalizadores de sílice-alúmina empleados comúnmente a 400° Celsius en el craqueo de petróleo; mi Tesis fue dirigida por los Dres. Hermana y Banda. Conseguimos demostrar que la formación de agua en la reacción iba cambiando las propiedades ácidas del catalizador, noción que hoy es fundamental en catálisis.

Es importante que el soporte sólido sobre el que se va a inmovilizar el catalizador tenga una gran cantidad de microporos, para que así su área específica sea muy alta (centenares de m² por gramo), lo que se traduce para la catálisis en una mayor concentración de centros activos. También es crucial la mayor o menor hidrofilia o hidrofobia del soporte.

Durante el Doctorado me di cuenta de que mi vocación era la investigación.

4. LLEGÓ EL AMOR

Estando aún con la Tesis, Lina, —que no ha podido llegar a este acto, pero que está presente—, cambió mi vida. Ella, una esposa corcho, ha sido amante, compañera, apoyo, maestra, motor, empuje... Y es a quien dedico este parlamento. Y también a nuestros maravillosos 4 hijos, + 3 hijos políticos (por cierto, los siete, muy buenas personas). Y también a nuestros 12 nietos. Y, nuevamente a mis hermanos; y también a mi familia política. Y en todas las épocas, fundamentales los amigos, “la familia que uno elige”.

Sigamos.

El Dr. Banda ya nos decía que le gustaría iniciar una nueva línea de investigación usando catalizadores biológicos. La idea de dedicarme a investigar en biocatálisis me fascinó, por eso en el momento oportuno le comuniqué que a mí me gustaría en el futuro desarrollar esa nueva línea de catálisis biológica.

Una vez planteado este abordaje, tuve que pensar en elegir un científico de prestigio: se trataba de hacer una larga estancia postdoctoral conducente a aprender el máximo de enzimología/catálisis enzimática, con la idea de a mi vuelta montar un buen grupo de biocatálisis. Entonces, consultando el Chemical Abstracts, elegí al Prof. Christian Anfinsen, —de un sitio de excelencia, los National Institutes of Health, junto a Washington DC—. Tuve la suerte de conseguir una de las pocas becas del Public Health Service de EE. UU., y permanecí en USA 24 fructíferos meses. Poco después de mi regreso, a Anfinsen le concederían el Premio Nobel en Química por sus investigaciones sobre un enzima. (Durante mi estancia, Cuatrecasas, Wilchek y Anfinsen publicarían el famoso método de la affinity chromatography, por el que aún podrían conceder el Nobel a Wilchek).

Y después de estos antecedentes, ahora empiezo el núcleo de lo que hoy quiero tratar:

La fundación del Departamento de Biocatálisis en el Instituto de Catálisis y Petroquímica del C.S.I.C.

Mi estrategia fue entonces ir reclutando sucesivamente a los mejores, para poner en marcha y desarrollar lo que en el futuro debería ser un prestigioso Departamento de Biocatálisis; para ello periódicamente enviaba a las diversas

Investigadores en mi Grupo (I)

VICTOR FERNÁNDEZ
JOSÉ M. GUISÁN
CRISTINA OTERO
EITEL PASTOR
FRANCISCO PLOU
MIGUEL ALCALDE
MANUEL FERRER

Figura 3. Investigadores en mi grupo.

Investigadores en mi Grupo (II)

| | | |
|----------------------|--------------------|--------------------------|
| R. Martín del Río | M. Barandiarán | Pamela Torres |
| A. Rguez-Tébar | Iqbal Gill | Ana Beloqui |
| Julián Serrano | Oscar Nuero | Lucía Fernández |
| Carlos Montuenga | M. Teresa Martín | Adi Kunamneni |
| Fátima Morais | M. Ángeles Cruces | C. García-Burgos |
| Mirta Barate | A. Gómez de Segura | Roseri de Beer |
| M. Ángeles Fernández | Gloria Fuentes | B. Rguez-Colinas |
| Vicente Torres | D. Reyes-Duarte | Agnes Viatte |
| Presentación Reyes | H. García-Arellano | Paloma Santos |
| Carmen Cruzado | M. Pérez-Boada | Noa Míguez |
| Emilio Álvarez | N. López-Cortés | Fadia Cervantes |
| M. Luisa Rúa | Clodoaldo Machado | José L. González-Alfonso |
| M. Visitación Calvo | Iraj Ghazi | David Fernández Polo |

Figura 4. Otros investigadores de mi grupo.

Facultades españolas ofertas para hacer la Tesis doctoral. A lo largo de muchos años puse el listón muy alto para integrarse en mi grupo, y así fueron llegando excelentes colaboradores especializados en Química, Farmacia, Biología, Medicina, Bioquímica o Biotecnología. Después, procuré ayudarles a todos para que hicieran estancias posdoctorales en los mejores laboratorios extranjeros.

Prueba de lo buenos que eran es que, de ellos, siete obtuvieron plaza de investigador en plantilla en el Departamento de Biocatálisis: los Dres. Víctor Fernández, José Manuel Guisán, Eitel Pastor, Cristina Otero, Francisco Plou, Miguel Alcalde, y Manuel Ferrer, quienes han formado los cimientos y estructura del Departamento. Casi todos han ascendido ya a Profesor de investigación y continúan actualmente dándole relevancia internacional y nacional. Fue decisivo el apoyo del Dr. Banda.

El resto de los que han trabajado en mi laboratorio (Figura 4) engloba también a magníficos investigadores, desde profesores de universidad e instituciones españolas y extranjeras a otros procedentes de empresas. Los que aún eran Licenciados cuando llegaron, hicieron su Doctorado. Así, hace meses estaban realizando su Tesis doctoral en nuestro Grupo: Noa Míguez, Fadia Cervantes, José Luis González Alfonso y David Fernández Polo.

Estas listas son muy incompletas, refiriéndonos al Departamento, ya que, a lo largo de los años, muchos otros investigadores fueron llegando a trabajar directamente con mis colaboradores, que ya se iban independizando científicamente. Todos han ido aumentando el potencial del Departamento, que en la actualidad cuenta con un bien ganado prestigio dentro y fuera de España, de lo que me siento orgulloso.

Hay en la actualidad un gran interés en conocer más sobre los enzimas; así no es de extrañar que, de un libro de divulgación, “La enzima prodigiosa” (2013), escrito por el doctor Shinya, un conocido cirujano colonoscopista en Estados Unidos, haya sido un best-seller, aunque su definición y concepto de los enzimas es muy raro y totalmente heterodoxo. Por el contrario, en 2016 el CSIC publicó una aproximación ortodoxa al tema “Las enzimas”, por el Dr. Francisco Plou.

Los enzimas suelen llamarse con el nombre del sustrato, seguido del sufijo “asa” (ejemplo, de

lípidos: lipasas; de lactosa, lactasas...). Por ser un campo multidisciplinar, la biocatálisis requiere un gran esfuerzo del investigador; en biocatálisis tratamos de encontrar soluciones biológicas para problemas químicos, y también sintetizar productos químicos novedosos. Puede realizarse de varias maneras: Utilizar células enteras como reservorio de enzimas, las cuales se ponen en contacto con los sustratos; o bien romper el material vivo, y usar la proteína que efectuará luego la catálisis (en este segundo caso, se puede utilizar bien un extracto celular conteniendo todas las proteínas, o bien purificar nuestra enzima en cuestión). Como los enzimas son caros, para poder re-utilizarlos hay que inmovilizarlos, por ejemplo fijándolos a un soporte: así queda en fase heterogénea y se recupera fácilmente para ser usado sucesivamente durante periodos largos.

Mi primer tema de trabajo fue -continuando mis investigaciones en USA- sobre los enzimas que perteneciendo al operón de la histidina forman parte de la ruta de biosíntesis de este aminoácido en las enterobacterias *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, tanto desde el punto de vista microbiológico-genético como de la aplicación de muy diversas técnicas físicas.

El siguiente tema de investigación fue la Inmovilización y estabilización de diversas nucleasas en soportes porosos muy variados; en ellos se eliminó primeramente la difusión externa y luego se trató el papel que la difusión interna en los poros podía tener en la velocidad de reacción. El objetivo de estas investigaciones era -para poder utilizar las proteínas de organismos unicelulares para paliar el hambre en el mundo-, hidrolizar y eliminar los ácidos nucleicos para que al comerlas no provocasen la enfermedad de la gota.

El Investigador se la juega al elegir sus temas a estudiar

A título de ejemplo, me referiré a dos de los míos: 1º Hidrogenasas; 2º Lipasas. (en los que se sigue investigando en el Instituto).

1) La guerra árabe-israelí de 1973 hizo subir 4 veces el precio del petróleo. El Prof. Kaplan, de la Universidad de California, había conseguido la producción de hidrógeno acoplado in vitro hidrogenasa bacteriana y cloroplastos de espinaca: siguiendo el esquema zeta de la fotosíntesis en los dos fotosistemas de los cloroplastos, los electrones



procedentes de la rotura del agua, si se desviaban in vitro con una hidrogenasa, originaban hidrógeno (en vez de producir hidratos de carbono, lo normal en la fotosíntesis). Las hidrogenasas son los enzimas necesarios para conseguir la (bio)fotólisis del agua para obtener hidrógeno, que podría ser uno de los combustibles del futuro, ya que al quemarse no se forman subproductos indeseados (sólo se forma agua). Rápidamente preparé un sabático con Kaplan, con el que aprendí a manejar hidrogenasas en condiciones de anaerobiosis total. A mi vuelta, incorporé a mi laboratorio este tema (para el que conseguí una enorme financiación por los Acuerdos de Cooperación España- EE.UU.).

Por supuesto que el abordaje biológico para la fotoproducción de hidrógeno sigue compitiendo con el abordaje químico, que utiliza catalizadores de metales nobles inmovilizados sobre óxidos semiconductores como el dióxido de titanio.

2) Lipasas. Después de estudiar la bibliografía y consultar después a colegas científicos de universidades y empresas extranjeras, elegí este grupo de enzimas -poco estudiados entonces: sólo en un grupo universitario francés, en algunos grupos universitarios en Japón y en alguna empresa europea (Unilever, UK)-, por la mala reproducibilidad de su actividad catalítica sobre sustratos insolubles en agua. Decidí trabajar con estos enzimas inmovilizados, tan interesantes para la industria. Fue un tema que posteriormente fue marcado por la Unión Europea como prioritario para ser financiado.

3) Uno de mis abordajes estrella en biocatálisis es la modificación química: para mejorar el enzima; y/o para mejorar el sustrato, es decir,

bien para preparar biocatalizadores mejores y/o más estables -como cuando la proteína se PEGuila- bien para conseguir biotransformaciones novedosas y/o más eficientes. Estos abordajes los incorporó el Dr Francisco Plou después de sus investigaciones postdoctorales. Hemos estabilizado enzimas con PEG polietilenglicol, con lo que obteníamos enzimas artificiales.

Este abordaje general de la modificación de moléculas sustrato (bien sea enzimática o químicamente) lo hemos usado en el laboratorio principalmente para la modificación enzimática (concretamente: acilación con lipasas; y glicosilación con carbohidratasas) de antioxidantes y otros compuestos. Otra modificación interesante (presente en muchos medicamentos) es la acetilación ---p.ej. N-acetil salicílico, y la N-acetil cisteína. (Además, recuérdese lo importante que es el porcentaje de hemoglobina glicada, y su relevancia en la diabetes 2).

Dentro de otros temas, tenemos:

4) La evolución dirigida, con el objetivo de obtener enzimas con propiedades mejores o inéditas: los cientos de miles de años que puede tardar una mejora de un enzima en la evolución, se acelera in vitro a una escala de meses sometiendo el enzima a condiciones específicas (ej. estables en disolventes orgánicos o capaces de catalizar una reacción nueva). Esta tecnología fue incorporada por el Dr. Miguel Alcalde tras su postdoctorado en California sobre evolución molecular dirigida.

5) Metagenómica para biocatálisis. Se trata de explotar -para obtener enzimas novedosos, inéditos- aquellos hábitats extremos en

AGRADECIMIENTOS

Dr. Francisco PLOU

Modificación química de enzimas.

Mecanismos enzimáticos (con Dr. K. Brocklehurst, Univ. Londres).

Enzimas activos sobre carbohidratos.

Biotransformaciones.

Modificación enzimática de polifenoles.

Prebióticos

Dr. Miguel ALCALDE

Síntesis de ciclodextrinas y dextranos.

Evolución molecular dirigida (con Dr. F. Arnold, EE UU, Premio Nobel 2018)

Comparación de tamaños

➤ Célula de hígado (dimensión principal): 20 μm

➤ Bacteria : 1 x 1 x 4 μm

➤ Virus: de 20 a 300 nm

➤ Enzimas: CGTasa : 10 x 12 x 11 nm

Lipasa : 4 x 5 x 3 nm

➤ Enlace entre dos C : ej. 1,5 Å = 0,15 nm

Figura 5. Doctores Plou y Alcalde y sus principales líneas de investigación.

Figura 6. Comparación de tamaños.



temperatura, pH... como son fondos marinos, glaciares, fuentes termales, etc. Los enzimas de esta procedencia se tienen que producir por técnicas de ingeniería genética ya que sólo sabemos cultivar y crecer el 2% de todos los microorganismos existentes en el mundo. En esta línea tan novedosa se formó el Dr. Manuel Ferrer durante su largo y fructífero postdoctorado en el GBF, el Instituto Alemán de Biotecnología.

En la sucesión temporal de estos (y otros) temas de investigación propia puede verse claramente cómo ha ido avanzando la biocatálisis en más de cuarenta años, desde la inmovilización en soportes -tema básico y casi único en los años 70- a los temas hoy nueva-frontera, que incluyen, por ejemplo, la evolución dirigida, la modificación química o la metagenómica.

En los últimos años estoy muy agradecido a mis Colegas colegas Drs. Plou y Alcalde (Figura 5), con los que colaboro dentro de sus respectivos grupos de investigación.

El Dr. Plou es experto en modificación química, en mecanismos enzimáticos (estudios postdoctorales en la Universidad de Londres), en biotransformaciones, en modificación enzimática de productos naturales (p.ej. resveratrol) y en prebióticos. El Dr. Alcalde empezó trabajando en enzimas para la síntesis de ciclodextrinas y de dextranos; y hace más de 15 años hizo su postdoctorado sobre Evolución evolución dirigida con la Prof^a Frances Arnold, en California, Premio Nobel de Química 2018.

En el apartado de colaboraciones, fundamentales en mi trayectoria:

Colegas de la Universidad de Córdoba (Drs. Marinas y Sinisterra, y la Dra. Heras) querían iniciar investigaciones en biocatálisis, para lo que contactaron conmigo; con el mismo motivo lo hizo el Dr. Cepeda, de la Facultad de Farmacia de Vitoria. Y muchos años más tarde, la Dra. Fernández Lobato, del Centro Severo Ochoa, UAM-CSIC. Todos estos contactos, y también con los Drs. Reyes y Martínez, y los Dres. Martín-Lomas, Bernabé y Jiménez-Barbero -todos del CSIC- dieron lugar a muy buenas y largas colaboraciones durante muchos años; muchas continúan en la actualidad.

Bien, llegados a este punto, retrocedamos, ampliemos y recapitemos:

Catálisis con proteínas catalíticas o enzimas (término que viene de “en zymos” = en la levadura). Los enzimas son sustancias que

producen las levaduras y todos los seres vivos, y que actúan en todas las reacciones bioquímicas de los organismos. No se entiende la vida sin ellos. En biocatálisis se trata de investigar sobre enzimas con potencial para convertirse en catalizadores que podrán ser usados en situaciones distintas de las que se dan en el ser vivo (así: enzimas para su uso en la industria, en sanidad, en alimentación, etc.). Otro objetivo es aumentar la estabilidad de las proteínas enzimáticas en las condiciones del proceso.

Los sustratos (o reactantes) de los enzimas suelen ser moléculas mucho más pequeñas que ellas. Algunos ejemplos de tamaños moleculares pueden verse y compararse en la Figura 6.

Tenemos el tamaño de una célula humana, y el de una bacteria intestinal (*Escherichia coli*). Todas en el rango de los micrómetros o micras. Cuando hace siglos se inventó el microscopio, se vio que existían microbios... y nació la Microbiología. Desde hace décadas, la tecnología nos ha permitido detectar magnitudes en el rango de los nanómetros (diez elevado a menos nueve: tamaño de los virus o dimensiones de los enzimas (ej. una lipasa de la levadura *Candida*, y una ciclodextrina glucosil transferasa de una bacteria). Con estos tamaños estamos de lleno en la Nanotecnología, que está teniendo unos desarrollos impresionantes: Podemos pensar en los enzimas como en unas nano-máquinas (para dimensiones aún más pequeñas, como las de los enlaces, se usa la décima parte del nanómetro: el Angström).

Me referiré ahora brevemente a una serie de temas en los que también he trabajado:

6) Enzimas activos en medios no convencionales.

Antiguamente era un axioma que los enzimas eran únicamente activos en medios acuosos. Sin embargo, Klivanov, ya en los años 70s, desarrolló y demostró que los enzimas también son activos en medios orgánicos, aunque con menor eficiencia catalítica (el polaco Sym en los años 30s ya había descrito esa acción en medios orgánicos, pero no había tenido financiación para difundir sus hallazgos). Además, disponemos de muchos más medios no convencionales para que los enzimas actúen (por ejemplo, CO₂ supercrítico o líquidos iónicos). Lo importante es cómo sea la actividad de agua en ellos.

7) Ácidos grasos

La margarina se fabrica por hidrogenación catalítica (con paladio como catalizador) de aceites vegetales insaturados de bajo precio; esta

operación origina ácidos grasos saturados trans, que no son saludables -en la naturaleza, los enlaces dobles de los ácidos grasos insaturados son de tipo cis-. También se usa la interesterificación química.

Los ácidos grasos saturados originan colesterol LDL o no según la longitud de su cadena. El esteárico C18:0, presente en el jamón, no, porque el cuerpo humano tiene enzimas desaturasa, que lo convierten en ácido oleico C18:1, muy saludable. En cambio, sí aumentan el colesterol los ácidos grasos de cadena más corta: ácidos láurico C12:0, mirístico C14:0 y palmítico C16:0.

8) Jarabes de fructosa

Es el caso más exitoso -por su volumen total- del empleo de la biocatálisis. Se trata de producir jarabes con mucha fructosa, partiendo de hidratos de carbono (maíz, celulosa, etc.). Este proceso pudo despegar económicamente porque en el bloqueo de Cuba subió mucho el precio del azúcar de caña. y entonces aparecieron los jarabes de fructosa, que entonces ya sí eran competitivos. La producción de glucosa a partir de maíz se hacía antes en medio ácido, a altas temperaturas y presiones: ahora se hace con enzimas que rompen el glúcido, dando finalmente glucosa. El enzima más importante en el proceso es la glucosa isomerasa, que convierte la glucosa en fructosa, originando -debido a la constante de equilibrio de la reacción- una mezcla de glucosa y fructosa en cantidades similares. Se han utilizado procesos en gran escala que utilizaban, bien este enzima inmovilizado en distintos soportes, bien las células microbianas enteras.

La facilidad de dispensación de estos jarabes en bebidas, ha hecho que su uso se haya

generalizado, ...con lo que una botella de dos litros puede contener enormes cantidades de fructosa. Hace años que los bioquímicos llevan pidiendo medida en el consumo del azúcar de frutas, fructosa, pues no hay experiencia de cómo se comportaría el cuerpo humano con consumos grandes de la misma y por tiempos largos. Además, no se conoce todavía el papel que puede tener en el aumento de la obesidad en muchos países.....

9) Enzimas que actúan sobre hidratos de carbono (también llamados glúcidos o sacáridos).

Hace 25 años y siguiendo los temas que periódicamente la Unión Europea iba financiando, comencé estas investigaciones con un enzima muy versátil e interesante: la ciclodextrina glucosil transferasa o CGTasa, y cuyo sustrato es almidón soluble; su producto normal es formar ciclodextrinas, una especie de donuts formados por la unión de 6 a 8 moléculas de glucosa formando un ciclo (Figura 7); Las ciclodextrinas son muy útiles para solubilizar ---en su parte interna--- sustancias de por sí insolubles en agua: p.ej. quitarle la cafeína al café; o quitarle moléculas tóxicas al agua contaminada.

En la Figura 8 vemos la representación de la estructura de este enzima, en la que se aprecia las hélices-alfa (en morado), las láminas beta (en azul), y los trozos de cadena al azar (en gris).

En la Figura 9 vemos, a la izquierda, una representación de todo el enzima mostrando cada enlace; se trata de una proteína monomérica, compuesta de 5 dominios. A la derecha vemos los tres aminoácidos -y su posición en la cadena- Aspártico230, Glutámico258 y Aspártico329, que quedan .

Ciclodextrinas.

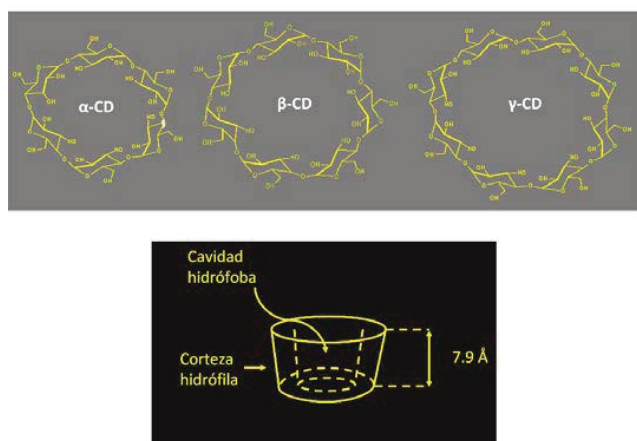


Figura 7. Ciclodextrinas.

Ciclodextrin glucanotransferasa de *Thermoanaerobacter*



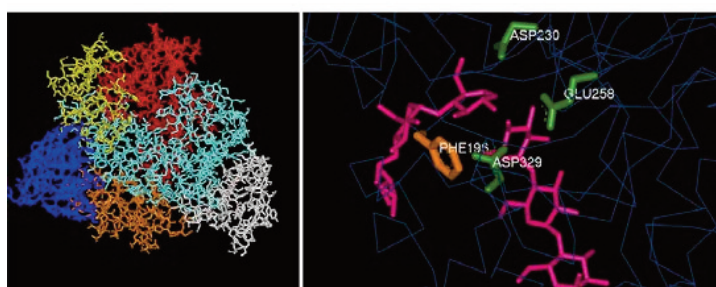
Figura 8. Estructura de la CGTasa

Además de enzimas como ésta que transfieren grupos glicosilo, también estudiamos enzimas hidrolasa, que hidrolizan, enlaces entre dos restos monosacárido, por ejemplo, los disacáridos sacarosa o lactosa (Figura 10). El enlace entre los monosacáridos fructosa y glucosa (caso de la sacarosa) es del tipo beta 2 \rightarrow 1; y el enlace entre glucosa y galactosa (caso de la lactosa) es beta 1 \rightarrow 4. Ambos son fáciles de hidrolizar por los enzimas correspondientes presentes en humanos.

Dentro de los alimentos funcionales (es decir, beneficiosos para la salud), los prebióticos (Figura 11) son hidratos de carbono cuyos enlaces glicosídicos son uniones inusuales, por lo que no pueden ser rotos (hidrolizados) por los enzimas humanos, pero sí pueden serlo por carbohidratasa de la microbiota intestinal beneficiosa, la cual crece alimentándose con los monosacáridos resultantes.

Después de intensas investigaciones sobre probióticos en los últimos 15 años, se admite hoy que existe un eje cerebro-microbioma. Se considera que la toma de prebióticos y probióticos es la panacea de la mejor salud, siendo remedios beneficiosos, por ejemplo, en biodispepsias del aparato digestivo, contra la hipertensión arterial, en el cáncer de colon, en la mejora de las defensas inmunitarias etc. La microbiota se está convirtiendo en un nuevo paradigma para mejorar nuestra salud en el futuro. Algunas publicaciones recientes señalan que una buena microbiota mejora algunas enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer y la ELA. Una hipótesis reciente culpa a algunos componentes del microbioma de llegar al cerebro y originar así un tipo de esclerosis (la ELA). (En el microbioma tenemos un próximo Premio Nobel).

Características de las CGTasas



Bolsillos de unión de maltosa, canal de amilosa
Sitio activo: triada catalítica y eje de ciclación

Figura 9. Estructura de la CGTasa y su bolsillo catalítico.

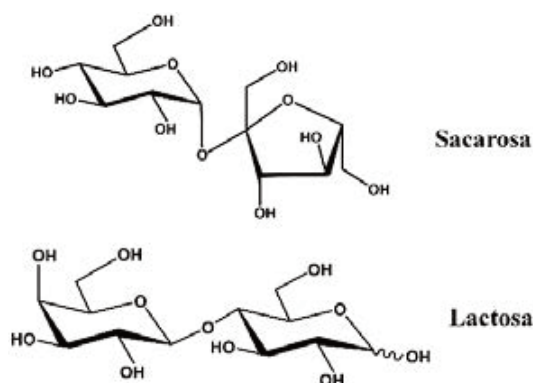


Figura 10. Estructura molecular de dos disacáridos: la sacarosa y la lactosa.

PREBIÓTICOS

Son **HIDRATOS DE CARBONO** usualmente de tamaño oligosacárido, conteniendo 3 o más moléculas de hexosa. **NO SON** hidrolizables (digeribles) por los enzimas humanos.

PROBIÓTICOS

Son **MICROORGANISMOS VIVOS** beneficiosos (ej. Lactobacilos, bifidobacterias...) presentes en el cuerpo humano –fundamentalmente en el colon–. Constituyen la Microbiota.

Sus enzimas hidrolizan los enlaces raros/difíciles de los prebióticos: la mezcla resultante servirá de alimento a dichos probióticos.

Figura 11. Definiciones de prebióticos y probióticos.

Receta Segunda

Además de tomar prebióticos, es importantísimo reforzarse con probióticos, sobre todo, después de tratamiento con antibióticos. Los probióticos más usados hoy día son los lactobacillus y las bifidobacterias. Lo más novedoso hoy es añadir posbióticos, es decir, metabolitos secundarios.

11) Transformaciones de antioxidantes.

Los antioxidantes son compuestos con electrones desapareados. Protegen a otros compuestos de que se oxiden: para ello, se oxidan ellos antes, actuando como reductores fuertes; de esta manera bloquean la propagación en cadena de los radicales. El principal causante del envejecimiento son los radicales oxigenados (en inglés ROS, o especies de oxígeno reactivas). (Una hipótesis mía es que la modificación química de proteínas por la reacción de Maillard entre proteínas e hidratos de carbono reductores, también interviene).

Introduciendo grupos acilo (con lipasas), o grupos glicosilo (con carbohidratasas) se consigue alterar el balance hidrófilo-lipófilo del nuevo compuesto, lo que puede redundar en que mejore su accesibilidad, su disponibilidad en los tejidos del cuerpo humano. Por ejemplo, la glicosilación del resveratrol del vino tinto.

En la obtención de medicamentos, además de utilizar las herramientas de la síntesis orgánica, deberíamos conocer y aprovechar las ventajas de la Medicina Ayurvédica oriental.

Tenemos constituido el consorcio GlicoEnzimas, colaboración con dos grupos del CSIC (Dra. Julia Sanz del Instituto Rocasolano (Madrid), y Dr. Julio Polaina del IATA (Valencia)) y uno de la Univ. Autónoma de Madrid (Dra. María Fernandez Lobato). Es como un laboratorio europeo sin paredes. El éxito se debe a que la pericia de los grupos individuales se complementa muy bien.

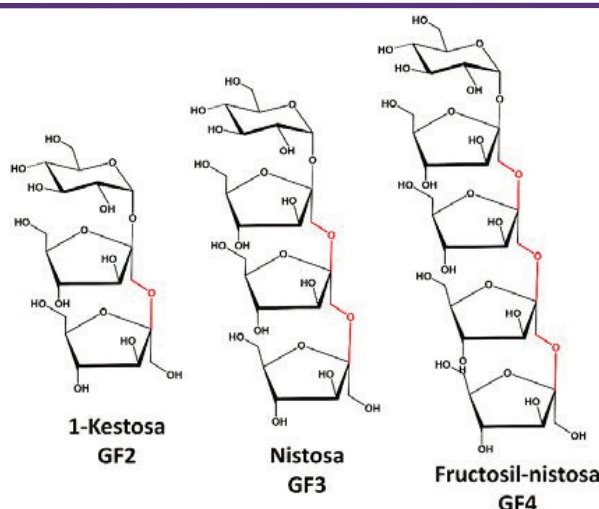


Figura 12. Fructooligosacáridos con actividad prebiótica.

Agradecimientos

•A muchísimos colegas: del Instituto...; a españoles; y a extranjeros. En España he tenido la suerte de colaborar con excelentes científicos del CSIC y de otras Instituciones, incluyendo; las Universidades de Alcalá, Complutense, Córdoba, Murcia, País Vasco, Politécnica de Madrid, Salamanca y la UNED.

•A los Directores del Instituto de Catálisis: Dres. Banda, Krèmenic, Cortés, Soria, Pérez Pariente, Conesa y Sastre.

•Y a los sucesivos Presidentes del Consejo, y a la actual Presidenta.

He recibido financiación de:

Public Health Service EE UU. Y acuerdos culturales España- EEUU.

Becas (Fulbright, March, y otras)

Proyectos:

De la Unión Europea

De los Ministerios respectivos

De la Comunidad de Madrid

De Empresas

De Fundaciones

Hablemos ahora sobre otros temas:

12) Sostenibilidad y medio ambiente.

A finales del siglo XIX había crecido tanto la población en Londres que los transportes se hacían fundamentalmente con carros tirados por caballerías. Los excrementos constituían un verdadero problema medioambiental en las calles, por lo que se prohibió el tráfico en las calles importantes. El problema se resolvió cuando décadas más tarde, y gracias a la investigación y a la tecnología, estos transportes pasaron a ser hechos con automóviles.

Los problemas actuales del cambio climático deben resolverse con más ciencia. Pero también los humanos debemos ser hoy más austeros, más frugales: nada de consumismo salvaje.

13) Alimentación/nutrición.

En España tenemos que potenciar la dieta mediterránea, pero sin cambios que realmente la anulan. Es fundamental que en nuestra sociedad aumente el conocimiento de esta dieta, en otras palabras, que sepamos mucho más de ortonutrición en esta época que nos ha tocado vivir, que incluye comida rápida, comida muy elaborada. Hay que luchar contra el sobrepeso y la obesidad, a ello ayuda la dieta paleolítica. Hay que procurar que, en los carbohidratos consumidos, menos del 5% de las calorías sean

“azúcares libres”. Lo saludable son los hidratos de carbono contenidos en alimentos naturales intactos, en los cuales la liberación de glucosa y similares es lenta (o sea, alimentos con índice glicémico bajo, entre 0 y 50%).

Ya lo dijo Hipócrates. “Que la alimentación sea tu mejor medicina, y la medicina tu alimentación”. Y en este campo los enzimas tienen mucho que decir.

Como químico, aconsejo no tener miedo a la química: a veces es necesario tomar ciertos suplementos.

14) Nuevos biocatalizadores.

Además de las tradicionales proteínas catalíticas como base de los biocatalizadores, en los últimos cuarenta años se ha demostrado actividad catalítica en otras dos clases de sustancias:

I.- En algunos ácidos nucleicos (RNAs), y II.- también anticuerpos especialmente preparados con un análogo del estado de transición de la reacción (llamados abzymas o anticuerpos catalíticos). En ambos casos se cumplen todos los requerimientos para ser considerados como verdaderos catalizadores. A las investigaciones sobre ácidos nucleicos catalíticos (ribozimas) hace años les fue concedido el Premio Nobel; podría decirse que en la historia de la evolución primero aparecieron los ácidos nucleicos -que actuaban a la vez como portadores de información y como catalizadores. Por otra parte, se demostró que los abzymas podían acelerar reacciones, pero mucho más lentamente que los enzimas: los anticuerpos catalíticos sí eran muy eficaces en su función principal, la reacción con su hapteno.

Hace años consideré empezar a trabajar con anticuerpos catalíticos pero, después de consultar con muchos colegas, incluidos dos investigadores Premio Nobel, decidí no hacerlo.

15) El Método científico

En Ciencias (y en Letras) el hacer una Tesis doctoral siempre se ha considerado como un periodo de iniciación a la investigación, en el que se aprende la metodología de la ciencia: ...Se aprende a ser crítico, a perfeccionarse en las herramientas técnicas, a tener buenos cuadernos de laboratorio. Newton y Marie Curie tenían unos cuadernos impresionantemente buenos (por cierto, también tenían un diario personal, muy detallado). Y siguiendo el ejemplo de estos científicos, les dejo mi tercera receta.



Tercera Receta

Los científicos, cuidemos los cuadernos de laboratorio. Y todos, tengamos un diario personal (Y y los mayores, además, un diario de salud/enfermedad).

Pero hoy también quería hablar -dentro del método científico y como novedad/contribución mía- de un segundo aspecto que considero que debemos aprender, que debemos cuidar los investigadores: Las herramientas mentales. Se trata de -al avanzar en nuestra carrera buscando la verdad y el saber- ser constantes, optimistas, e ir desarrollando la inteligencia emocional, el gran poder de la mente, el aprender a luchar contra el estrés, el aplicar la resiliencia etc., cualidades muy importantes siempre.

“Cuantas más personas conozcan el método científico, mejor le irá a un país”.

16) La ciencia

Los descubrimientos científicos deben ser la base de las decisiones del curso que sigue un país. EE.UU. o Reino Unido llevan siglos aplicando esta norma, de ahí la pujanza de su ciencia y la importancia que le dan a la hora de invertir en investigación. La ciencia y la sociedad no deben permitir que instituciones o asociaciones tuerzan el curso del avance de la misma, y estoy pensando en un ejemplo: cómo algunos movimientos ecologistas en el mundo pueden impedir o retrasar el empleo de los organismos genéticamente modificados (después de que los científicos creyentes y no creyentes hayamos dado el visto bueno, y se haya comprobado su inocuidad...). Es algo que ya se daba en la naturaleza, pero a un ritmo ultra- súper-lento; y en el laboratorio se acorta drásticamente la duración.

Hay veces que la ciencia inventa una nueva herramienta, o soluciona un problema que hay, pero a medio o largo plazo pueden aparecer nuevos desajustes en forma de problemas más pequeños, pero aunque importantes (por ej. empleo lo ocurrido con los plásticos, con los que -por su uso excesivo e inapropiado- nos hemos pasado de frenada). El nuevo ajuste se debe arreglar siempre con más ciencia, y los enzimas tienen mucho que aportar a solucionar este problema.

La financiación que hizo España al proyecto de Colón de encontrar un camino más corto a las Indias, es el paradigma de lo que España tiene que hacer en la actualidad.

LOS CIENTIFICOS SOLEMOS SOÑAR CON NUESTRO TRABAJO....

Y ahora paso a la 3ª y última parte de mi disertación citando algunas investigaciones futuras en biocatálisis.

En biocatálisis tratamos de dar soluciones biológicas a problemas químicos; y también sintetizar productos químicos novedosos. Como botones de muestra podemos citar algunos:

a) La inmovilización por enlace covalente de proteínas catalíticas en un soporte, que empezó en los años 60 siendo al azar, ahora se trabaja mucho en que sea una inmovilización orientada: de esta manera en muchos casos se consigue una mejor transferencia de los electrones, o el centro activo del enzima queda mejor situado para que la catálisis sea óptima.

b) Usando como inspiración la estructura y mecanismo catalítico de enzimas, se está avanzando mucho en el diseño de materiales biomiméticos, en la fotosíntesis artificial etc., muy prometedores en temas de energía y sostenibilidad. Por cierto, y hablando de energía, como científico conocedor de cómo aciertan o no algunos pronósticos de lo que ocurrirá en qué momentos del futuro, las energías renovables serán competitivas mucho más tarde de lo que deseamos y creemos. Por tanto, durante la etapa de transición energética, España debería mantener y ampliar el porcentaje de la energía nuclear dentro de nuestro mix energético. Es lo que vienen haciendo algunos países de nuestro entorno y nivel, como Francia y otros.

c) Además de la producción de hidrógeno por el enzima hidrogenasa, también la nitrogenasa -la responsable de la fijación simbiótica de nitrógeno por los nódulos de las leguminosas- produce H_2 porque un 25% de los electrones implicados se pierden reduciendo a los protones.

Un tema pendiente desde hace años es transferir genes nif desde el genoma de los rhizobium al genoma de cereales, con lo que se podría aumentar enormemente la cantidad de nitrógeno fijada por los cultivos. Apenas se avanza, porque es muy complicado.

d) En la situación actual de este cambio climático presente, se tiende a disminuir la emisión de gases de efecto invernadero (CO_2 y metano, principalmente), y están cobrando cada vez más protagonismo los biocarburantes avanzados. Se está investigando mucho en la captura y transformación del CO_2 .

e) Con el enorme problema surgido por excesivo y mal uso de muchos polímeros (plásticos y microplásticos que no se degradan en los océanos), en el sector químico se abre un importante tema de trabajo para ser abordado con enzimas..., pero con la mente puesta en el cambio climático. Los enzimas líticos de hongos son muy eficientes como comedores/limpiadores de plástico. Además, los bioplásticos serán una buena solución para el futuro.

f) Una estrategia de los últimos años para sintetizar productos nuevos es combinar un catalizador inorgánico y otro enzimático; o emplear una cascada sucesiva de 2 o más enzimas. Y todo ello hacerlo en un único reactor.

g) Como hoy en día se está investigando cada vez más en temas de salud humana, se está descubriendo que algunos procesos cancerígenos están relacionados con el envejecimiento y la longevidad. En ambos casos, la actuación del enzima telomerasa es el paso determinante (estudios con este enzima ya recibieron el Premio Nobel hace 10 años). Recordemos que tenemos una edad cronológica, pero la importante para una persona es su edad biológica.

Y en este campo de la biotecnología roja, tengo otra receta:

Receta Cuarta

Usar “*pe pe emes*” (Personas por Millón). Al hablar de la prevalencia de una enfermedad por defecto de un enzima (p.ej. de cerebrosidasa en la enfermedad de Gaucher) o de otra enfermedad rara en general, se puede decir “se da en 1 persona por cada 4000”. Propongo -siempre que los números no sean ni muy pequeños ni muy grandes- hacer siempre la referencia a un millón, relación que se usa mucho en catálisis. Es decir, sería mejor decir 250 PPMs, personas por millón.

h) Los humanos hemos descubierto que, además del genoma (los cromosomas), tenemos el epigenoma: son las marcas o etiquetas que adquieren algunos genes mediante modificación química o enzimática, p.ej. la metilación de la citosina, una base pirimidínica del DNA (o también llamado ADN, según usemos las siglas en inglés o en español). Genes con grupos metilo significan genes silenciosos, que no se expresan, que no sintetizan proteínas. La ratio relación entre metil-citosina y citosina es influenciada por la

alimentación y por el medio ambiente. Con el envejecimiento esta ratio va disminuyendo, lo que abre la puerta para futuras terapias que proporcionen más citosinas metiladas (por ejemplo, la alimentación con productos que sean buenos “carrriers” de grupos CH_3).

i) Transfusiones de sangre de los distintos tipos 0, A, B, y AB: El tipo A tiene un azúcar inmunodominante (N-acetil-glucosamina), que se puede quitar de estos glóbulos rojos con un enzima que lo hidroliza, eliminándose; igualmente el B (el azúcar es la galactosa), que se elimina con galactosidasa. De esta forma, se está investigando para que en un futuro todos los tipos de sangre se puedan convertir en sangre tipo cero. En el microbioma se han descrito enzimas carbohidratasas muy interesantes para avanzar en este tema.

j) La técnica CRISPeR (así conocida por las siglas en inglés, son “repeticiones palindrómicas agrupadas, cortas y regularmente espaciadas”); necesita “enzimas nucleasa asociados a CRISPeR”). Es la segunda revolución en ingeniería genética. Es una poderosa técnica de inmunidad adquirida que permite editar, cortar y modificar el DNA, con lo cual las bacterias se protegen frente a los virus mediante un solo cambio de base en regiones no codificantes. Y ya sabemos que si se cambia una base en un DNA o en un RNA, esto originará cambios en sus interacciones, o en la posibilidad de que se introduzcan o no modificaciones epigenéticas.

La investigación básica en la que se basa la técnica CRISPeR fue descubierta por el científico español Francisco Mojica, de la Universidad de Alicante, quien también acuñó su nombre. Por sus investigaciones con CRISPeR, a Charpentier y Doudna le han concedido el Premio Nobel de Química 2020. Se ha postulado que esta técnica podría ser la panacea para luchar contra las enfermedades más diversas y terribles que sufrimos los humanos.

k) La mejor patente, por el enorme ingreso de divisas que generó a las arcas del Estado, es la de un enzima -son investigaciones de Margarita Salas en el CSIC-, una DNA polimerasa vírica muy resistente a las altas temperaturas. Este enzima multiplica fragmentos de DNA millones de veces por lo que presta grandes servicios en la investigación criminológica. Esta metodología (reacción PCR -por sus siglas en inglés- o Reacción



en Cadena de la Polimerasa) se ha revelado fundamental en la lucha contra la pandemia por SARS-CoV-2.

En general, y como conclusión, tenemos que hacer que el coste de producir proteínas (enzimáticas o no) sea aún mucho menor que los bajos precios ya conseguidos. Y además, modificarlas o inmovilizarlas de forma que mantengan su actividad por tiempos cada vez más largos.

Miscelánea

Cuando fundé el Departamento de biocatálisis en un instituto que se dedicaba sólo a la catálisis química, era una iniciativa que no se entendía por muchos investigadores en catálisis heterogénea u homogénea. Por eso fue muy inesperada recibir en los años 90 la estancia del Manager de I+D de la Mobile Oil (EE.UU.) en el Instituto de Catálisis y Petroquímica: su empresa quería iniciar investigaciones en biocatálisis..., por lo que venía a conocer de primera mano cómo lo habíamos hecho nosotros, que habíamos empezado 20 años antes.

En los últimos años ha ido apareciendo un movimiento consistente en englobar en un mismo congreso investigaciones en catálisis heterogénea, homogénea, y biocatálisis. Y otro tanto ha ocurrido con la aparición de revistas en las que es normal se publiquen papers artículos de los tres tipos de catálisis. Ahora estamos en condiciones -gracias a las nuevas “tecnologías” y a los nuevos abordajes, como ingeniería metabólica, biología de sistemas, resucitación de paleoenzimas, etc.- de progresar enormemente en la biocatálisis/biotecnología aplicadas a la salud humana, a la industria, la biocatálisis vegetal etc. (las que se denominan -respectivamente- biotecnología roja, biotecnología blanca, biotecnología verde...).

Para concluir, este parlamento sobre biocatálisis, reitero nuevamente mi agradecimiento a todos los que de una forma u otra me han ayudado en mi trabajo.

Y, para terminar, un deseo, Otra Receta, la Quinta.

Quinta Receta

“Que en esta vida todos seamos buenos catalizadores”.
He dicho.

Si desea citar nuestro artículo:
Biocatálisis: Una investigación científica fascinante en el CSIC

Antonio Ballesteros Olmo

An Real Acad Farm (Internet).

An. Real Acad. Farm. Vol. 90. nº 3 (2024) · pp. 355-368

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2023.90.03.05>

Fármacos de nueva aprobación Newly approved drugs

Medicamentos novedosos autorizados recientemente por EMA y FDA (3º trimestre de 2024)

Novel drugs recently authorized by EMA and FDA (Q3, 2024)

Santiago Cuéllar Rodríguez

Académico correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia - <https://orcid.org/0000-0002-8099-9226>

e-mail: santiago.cuellar.rodriguez@gmail.com

Recibido el 30 de septiembre de 2024; aceptado el 30 de septiembre de 2024
Disponible en Internet el 1 de octubre de 2024

(A) TRACTO ALIMENTARIO Y METABOLISMO: Colangitis biliar primaria: Seladelpar (Livdelzi®; FDA). (D) DERMATOLOGÍA: Alopecia areata: Deuruxolitinib (Leqselvi®; FDA). Prurigo nodular: Nemolizumab (Nemludio®; FDA). Eccema crónico de manos: Delgocitinib (Anzupgo®; EMA). (H) PREPARACIONES HORMONALES SISTÉMICAS: Hipoglucemia: Dasiglucagón (Zegalogue®; EMA). (L) AGENTES ANTINEOPLÁSICOS E INMUNOMODULADORES: Cáncer de pulmón no microcítico: Sugemalimab (Cejemly®; EMA). Cáncer de pulmón no microcítico: Lazertinib (Lazcluze®; FDA). Sarcoma sinovial: Afamitresgene Autoleucel (Tecelra®; FDA). Astrocitoma/Oligodendroglioma: Vorasidenib (Voranigo®; FDA). Linfoma folicular: Odronestamab (Ordspono®; EMA). Linfoma de células T: Denileukin Deftitox (Lymphir®; FDA). Enfermedad crónica de injerto contra huésped: Axatilimab (Niktimvo®; FDA). (N) SISTEMA NERVIOSO: Enfermedad de Alzheimer: Donanemab (Kisunla®; FDA); Benzgalantamina (Zunveyl®; FDA). Enfermedad de Niemann-Pick: Arimoclomol (Miplyffa®; FDA). Enfermedad de Niemann-Pick: Levacetilleucina (Aqneursa®; FDA). Esquizofrenia: Cobenfy (Xanomelina/Trospio®; FDA). (S) ÓRGANOS SENSORIALES: Queratitis por Acanthamoeba: Polihexanida (Akantior®; EMA). (V) VARIOS: Diagnóstico por imagen (PET): Galio [68Ga] + Germanio [68Ge] (GalliaFarm®; EMA). Diagnóstico por imagen (PET): Flortaucipir [18F] (Tauvid®; EMA). Diagnóstico por imagen (PET): Flurdipiraz [18F] (Flyrcado®; FDA).



DOI: <https://doi.org/10.53519/analesranf>.

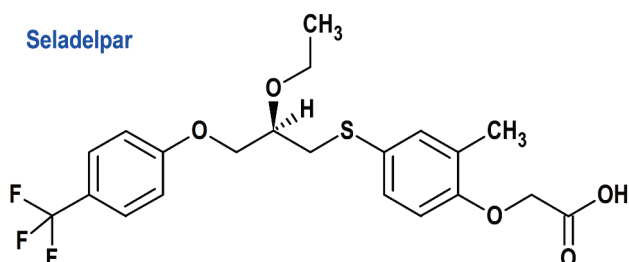
ISSN: 1697-4271 E-ISSN: 1697-428X/Derechos Reservados © 2024 Real Academia Nacional de Farmacia.

Este es un artículo de acceso abierto

(A) TRACTO ALIMENTARIO Y METABOLISMO

SELADELPAR (LIVDELZI®) CYMABAY (FDA, USA)

Seladelpar



Indicación: Tratamiento de la colangitis biliar primaria (CBP) en combinación con ácido ursodesoxicólico (AUDC) en adultos que han tenido una respuesta inadecuada al AUDC, o como monoterapia en pacientes que no pueden tolerar el AUDC.

Tipo: Medicamento sintético estándar constituido por el ácido 2-[4-[(2R)-2-etoxi-3-[4-(trifluorometil)fenoxi]propil]sulfanil-2-metilfenoxi]acético. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 14 de agosto de 2024 como medicamento huérfano (*Orphan drug*), de forma acelerada (*Accelerated Approval*) y mediante revisión prioritaria (*Priority Review*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

Mecanismo: Agonista del receptor activado por el proliferador de peroxisomas delta (PPAR δ). La actividad farmacológica que es potencialmente relevante para los efectos terapéuticos incluye la inhibición de la síntesis de ácidos biliares a través de la activación de PPAR δ , que es un receptor nuclear expresado en la mayoría de los tejidos, incluido el hígado. La activación de PPAR δ por seladelpar reduce la síntesis de ácidos biliares a través de la regulación negativa dependiente del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) de CYP7A1, la enzima clave para la síntesis de ácidos biliares a partir del colesterol.

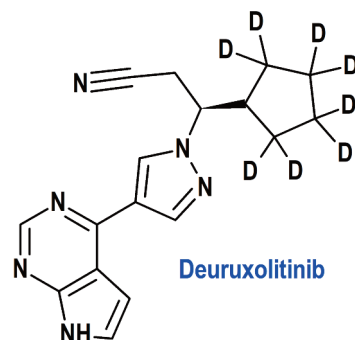
Eficacia clínica: Ensayo aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo de XX semanas de duración, que incluyó a XXX pacientes. La variable principal de eficacia fue la tasa (%) de respuesta bioquímica en el mes 12, definida como lograr una fosfatasa alcalina menor a 1,67 veces el límite superior normal (LSN), una disminución de la fosfatasa alcalina mayor o igual al 15 % desde el inicio y una bilirrubina total (TB) menor o igual al LSN (1,1 mg/dL): 62 vs. 20%. La normalización de la fosfatasa alcalina (menor o igual al LSN: 116

U/L) en el mes 12 fue un criterio de valoración secundario clave: 25 vs 0%.

Eventos adversos: Los más comunes y más frecuentes que con placebo son dolor de cabeza (8% vs 3% con placebo), dolor abdominal (7/2%), náuseas (6/5%), distensión abdominal (6/3%) y mareos (5/2%).

(D) DERMATOLOGÍA

DEURUXOLITINIB (LEQSELVI®) SUN (FDA, USA)



Indicación: Tratamiento de pacientes adultos con alopecia areata severa.

Tipo: Medicamento sintético estándar constituido por (3R)-3-(2,2,3,3,4,4,5,5-octadeuteriociclopentil)-3-[4-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)pirazol-1-il]propanonitrilo, una análogo del ruxolitinib en el que los átomos de hidrógeno (H) del anillo ciclopentánico han sido sustituidos por deuterio (D). Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 25 de julio de 2024; no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

Mecanismo: Inhibidor de la cinasa Janus (JAK). Las JAK median la señalización de una serie de citocinas y factores de crecimiento que son importantes para la hematopoyesis y la función inmunitaria. La señalización de las JAK implica el reclutamiento de STAT (transductores de señales y activadores de la transcripción) a los receptores de citocinas, la activación y posterior localización de los STAT en el núcleo, lo que conduce a la modulación de la expresión génica. Las vías de señalización mediadas por la familia JAK están implicadas en la patogenia de la alopecia areata aunque por el momento no se conoce la relevancia de la inhibición de las enzimas JAK para la eficacia terapéutica.

Eficacia clínica: Dos ensayos clínicos de fase 3, multicéntricos, aleatorizados, doble ciego y controlados con placebo, en un total de 1209

sujetos adultos con alopecia areata que presentaban al menos un 50 % de pérdida de cabello en el cuero cabelludo. El criterio de valoración principal de ambos ensayos evaluó la proporción de sujetos que alcanzaron al menos un 80 % de cobertura capilar en el cuero cabelludo (puntuación SALT ≤ 20) en la semana 24 (29 vs 1% en el primer estudio y 32 vs. 1% en el segundo).

Eventos adversos: Los más comunes ($\geq 5\%$) y con mayor frecuencia que con placebo son cefalea (12,4% vs. 9,4% con placebo), acné (10,0/4,3%), nasofaringitis (8,1/6,7%) y elevación de la creatina fosfocinasa sanguínea (5,3/2,9%).

NEMOLIZUMAB (NEMLUVIO®) GALDERMA (FDA, USA)

Indicación: Tratamiento de adultos con prurigo nodular.

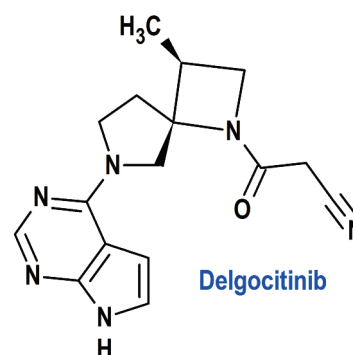
Tipo: Medicamento biológico constituido por una inmunoglobulina G2 (IgG2) modificada humanizada monoclonal de origen recombinante con un peso molecular de 144 kDa. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 12 de agosto de 2024 mediante revisión prioritaria (*Priority Review*) y designado como terapia innovadora (*Breakthrough Therapy*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

Mecanismo: Es un anticuerpo monoclonal humanizado que inhibe la señalización de IL-31 al unirse selectivamente al receptor de IL-31. La IL-31 es una citocina natural que está involucrada en el prurito, la inflamación, la desregulación epidérmica y la fibrosis. El nemolizumab inhibe las respuestas inducidas por IL-31, incluida la liberación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias.

Eficacia clínica: Dos ensayos aleatorizados, doble ciego y controlados con placebo que incluyeron un total de 560 sujetos adultos con prurigo nodular (PN). La eficacia se evaluó con la proporción de sujetos con una mejoría de ≥ 4 desde el inicio en la escala numérica de calificación del prurito máximo (PP-NRS) y con una Evaluación Global del Investigador (EGI) de 0 o 1 (limpio o casi limpio): 22 vs. 2% y 25 vs. 4%, respectivamente; la proporción de sujetos con una EGI de 0 o 1 (limpio o casi limpio): 26/7% y 38/11%; la proporción de sujetos con una mejoría de ≥ 4 puntos desde el inicio (56/16% y 49/16%), y la proporción de sujetos con PP-NRS < 2 (32/4% y 31/7%).

Eventos adversos: Los más comunes ($\geq 1\%$) y con mayor frecuencia que con placebo son dolor de cabeza (6 vs. 3%), dermatitis atópica (4 vs. 0,5%), eccema (4 vs. 2%) y eccema numular (3 vs. 0%).

DELGOCITINIB (ANZUPGO®) LEO (EMA, UE)



Indicación: Tratamiento del eccema crónico de manos (ECM) de moderado a grave en adultos para los que los corticoesteroides tópicos son inadecuados o inapropiados.

Tipo: Medicamento sintético estándar constituido por el 3-[(3S,4R)-3-metil-6-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1,6-diazaspiro[3.4]octan-1-il]-3-oxopropanonitrilo. Autorizado en la Unión Europea (EMA) el 19 de septiembre de 2024; no autorizado previamente en Estados Unidos.

Mecanismo: Inhibidor de las cinasas Janus (JAK) que se dirige a la actividad de los cuatro miembros de la familia JAK de enzimas (JAK1, JAK2, JAK3 y tirosinacinas 2 o TYK2) de una manera dependiente de la concentración. En células humanas, la inhibición de la vía JAK-STAT por delgocitinib atenúa la señalización de varias citocinas proinflamatorias, como las interleucinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-13, IL-21, IL-23, el factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos (FEC-GM) y el interferón (IFN)- α , lo que disminuye la respuesta inmunitaria e inflamatoria en células relevantes para la patología del eccema crónico de manos.

Eficacia clínica: Dos estudios pivotaes aleatorizados, doble ciego, controlados con placebo (vehículo) y de diseño similar que incluyeron a 960 pacientes mayores de 18 años de edad con eccema crónico de manos de moderado a grave, con una puntuación de 3 o 4 según la Investigator's Global Assessment for chronic hand eczema, IGA-CHE, y una puntuación de picor según



la Hand Eczema Symptom Diary, HESD ≥ 4 puntos, y que ha persistido durante más de 3 meses o que ha reaparecido dos o más veces en los últimos 12 meses. La variable clínica primaria de eficacia fue la proporción de pacientes que lograron el éxito del tratamiento (puntuación IGA-CHE de 0, ausente, o 1, prácticamente ausente: eritema mínimamente perceptible; con al menos una mejoría de 2 pasos desde el inicio hasta la semana 16): 19,7 vs. 9,9% en el primer estudio y 29,1 vs. 6,9% en el segundo. Otras variables secundarias de eficacia fueron el Índice de gravedad del eccema de manos (Hand Eczema Severity Index, HECI): la tasa de pacientes que mejorar un 90% fue del 29,5 vs. 12,3% y 31,0 vs. 8,8%, mientras que se registró una mejoría de al menos 4 puntos en el HESD en varios puntos temporales en el 47,2 vs. 24,4% y 44,5 vs. 20,9%.

Eventos adversos: Los más comunes son reacciones en la zona de aplicación (1,0 %), incluyendo dolor, parestesia, prurit y eritema.

(H) PREPARACIONES HORMONALES SISTÉMICAS

DASIGLUCAGÓN (ZEGALOGUE®) ZEALAND (EMA, UE)

Indicación: Tratamiento de la hipoglucemia grave en adultos, adolescentes y niños mayores de 6 años con diabetes mellitus.

Tipo: Medicamento sintético estándar constituido por un análogo del glucagón humano que consta de 29 aminoácidos; contiene siete aminoácidos sustituidos para mejorar la estabilidad física y química en su formulación farmacéutica: (16-(2-metilalanina)(S>X), 17-L-alanina(R>A), 20-L-alfa-glutamil(Q>E), 21-L-alfa-glutamil(D>E), 24-L-lisil(Q>K), 27-L-alfa-glutamil(M>E), 28-L-serina(N>S))glucagón).

Autorizado en la Unión Europea (EMA) el 27 de julio de 2024; autorizado previamente en Estados Unidos (FDA) el 22 de marzo de 2021.

Mecanismo: Análogo agonista del receptor glucagón, que aumenta la concentración de glucosa en sangre al activar los receptores de glucagón hepático, estimulando así la descomposición de glucógeno y la liberación de glucosa del hígado. Dasiglucagón solo es eficaz para el tratamiento de la hipoglucemia si está presente suficiente glucógeno hepático por lo que, para prevenir las recaídas de la hipoglucemia,

deben administrarse carbohidratos orales a fin de restaurar el glucógeno hepático, cuando el paciente haya respondido al tratamiento. Los pacientes en estado de hambruna, con insuficiencia adrenal, abuso crónico de alcohol o hipoglucemia crónica pueden presentar niveles no adecuados de glucógeno hepático para que la administración de dasiglucagón sea eficaz y estos pacientes deben recibir tratamiento con glucosa.

Eficacia clínica: Tres ensayos multicéntricos, aleatorizados, doble ciego y controlados con placebo en pacientes con diabetes de tipo 1, dos ensayos en pacientes adultos y uno en pacientes pediátricos de 6 a 17 años. La variable principal de eficacia en los 3 ensayos fue el tiempo transcurrido hasta la recuperación de la glucosa en plasma (éxito del tratamiento), definido como un aumento de la glucosa en sangre ≥ 20 mg/dl desde el momento de la administración, sin intervención adicional en un plazo de 45 minutos. En los dos ensayos en adultos (170 y 44 pacientes), el tiempo de recuperación fue de 10 minutos con dasiglucagón vs. 40 y 35 minutos con placebo, y de 10 vs. 30 minutos en los pacientes pediátricos (31).

Eventos adversos: Los más comunes son náuseas (63%), vómitos (32%) y dolor de cabeza (10%).

(L) AGENTES ANTINEOPLÁSICOS E INMUNOMODULADORES

SUGEMALIMAB (CEJEMLY®) SFL (EMA, UE)

Indicación: Tratamiento de primera línea, en combinación con quimioterapia basada en platino, de adultos con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) metastásico sin mutaciones sensibilizantes del EGFR ni aberraciones genómicas tumorales ALK, ROS1 o RET.

Tipo: Medicamento biológico constituido por un anticuerpo monoclonal (isotipo IgG4) completamente humano contra el ligando de muerte programada 1 (PD-L1). Autorizado en la Unión Europea (EMA) el 24 de julio de 2024; no autorizado previamente en Estados Unidos (FDA).

Mecanismo: anticuerpo monoclonal inmunoglobulina G4 completamente humano. Se une específicamente al ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1), bloqueando así su unión a la PD-1. El PD-L1, cuando se expresa en las células tumorales y en las células inmunitarias que



infiltran el tumor, puede contribuir a la inhibición de la respuesta inmunitaria antitumoral. La unión del PD-L1 a la PD-1 y a los receptores CD80 (B7.1) que se encuentran en las células T y en las células presentadoras de antígenos suprime la actividad citotóxica de las células T y su proliferación, así como la producción de citocinas. El bloqueo de las interacciones PD-L1/PD-1 y PD-L1/CD80 libera la inhibición de las respuestas inmunitarias sin inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA).

Eficacia clínica: Ensayo de fase 3 aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo en 579 pacientes adultos ≥ 18 años con CPNM escamoso o no escamoso, metastásico (estadio IV), histológica o citológicamente confirmado, sin mutaciones sensibilizantes del EGFR ni fusiones ALK, ROS1 o translocaciones RET. La variable primaria de eficacia fue la supervivencia libre de progresión (9,0 vs. 4,9 meses) y la secundaria fue la supervivencia global (25,4 vs. 16,9 meses).

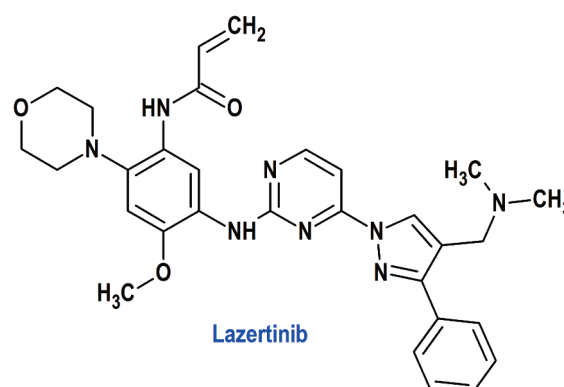
Eventos adversos: Los más frecuentes ($\geq 10\%$) son anemia (78%), aumento de la aspartato aminotransferasa (34%), aumento de la alanina aminotransferasa (32%), erupción cutánea (26%), hiperlipemia (22%), hiperglucemia (18%), hiponatremia (17%), hipopotasemia (16%), proteinuria (14%), dolor abdominal (14%), fatiga (13%), artralgia (12%), hipoestesia (12%), hipotiroidismo (10%) e hipocalcemia (10%). La incidencia de reacciones adversas de grado ≥ 3 es del 33%, siendo las más frecuentes anemia (18%), hiponatremia (4,4 %), hipopotasemia (3,0%), hiperlipemia (2,3%) y aumento de la amilasa (2,1%).

LAZERTINIB (LAZCLUZE®) JANSSEN (FDA, USA)

Indicación: En combinación con amivantamab, está indicado para el tratamiento de primera línea de pacientes adultos con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) localmente avanzado o metastásico con delecciones del exón 19 del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o mutaciones de sustitución del exón 21 L858R.

Tipo: Medicamento sintético estándar constituido por la N-[5-[[4-[4-[(dimetilamino)metil]-3-fenilpirazol-1-il]pirimidin-2-il]amino]-4-metoxi-2-morfolin-4-ilfenil]prop-2-enamida. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 19

de agosto de 2024 mediante revisión prioritaria (*Priority Review*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).



Mecanismo: Inhibidor de la cinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que inhibe las delecciones del exón 19 del EGFR y las mutaciones de sustitución L858R del exón 21 en concentraciones más bajas que el EGFR de tipo salvaje. El tratamiento con lazertinib en combinación con amivantamab aumentó la actividad antitumoral in vivo en comparación con cualquiera de los agentes por separado en CPNM humano con una mutación L858R del EGFR.

Eficacia clínica: Un ensayo multicéntrico, aleatorizado y controlado con placebo de 1074 pacientes con CPNM metastásico o localmente avanzado con mutación de delección del exón 19 o de sustitución L858R del exón 21 y sin terapia sistémica previa para la enfermedad avanzada. La variable principal de eficacia fue la supervivencia libre de progresión (SLP) evaluada mediante una revisión central independiente ciega para la comparación entre lazertinib con amivantamab y osimertinib (23,7 vs. 16,6 meses).

Eventos adversos: Los más comunes ($\geq 20\%$) son erupción cutánea, toxicidad en las uñas, reacción relacionada con la infusión (amivantamab), dolor musculoesquelético, edema, estomatitis, eventos tromboembólicos venosos (ETV), parestesia, fatiga, diarrea, estreñimiento, COVID-19, hemorragia, piel seca, disminución del apetito, prurito, náuseas y toxicidad ocular. Las anomalías de laboratorio de grado 3 o 4 más frecuentes ($\geq 2\%$) fueron disminución de la albúmina, disminución del sodio, aumento de la ALT, disminución del potasio, disminución de la hemoglobina, aumento de la AST, aumento de la GGT y aumento del magnesio. Se produjeron reacciones adversas



graves en el 49%, especialmente ETV (11%) y neumonía (4%). Se produjeron reacciones adversas fatales en el 7%. La interrupción permanente del tratamiento debido a una reacción adversa ocurrió en el 21 % y la interrupción de la dosis debido a una reacción adversa ocurrió en el 72% de los pacientes.

AFAMITRESGENE AUTOLEUCEL (TECELRA®) ADAPTAIMMUNE (FDA, USA)

Indicación: Tratamiento de adultos con sarcoma sinovial irresecable o metastásico que han recibido quimioterapia previa, son HLA-A*02:01P, -A*02:02P, -A*02:03P, 6 o -A*02:06P positivos y cuyo tumor expresa el antígeno MAGE-A4.

Tipo: Medicamento de terapia avanzada (génica), constituido por células T autólogas modificadas genéticamente dirigidas al antígeno A4 asociado al melanoma (MAGE-A4) que consiste en células T CD4 y CD8 positivas transducidas con un vector lentiviral autoinactivante (LV) que expresa un receptor de células T (TCR) con afinidad mejorada específica para el MAGE-A4 humano; TECELRA se prepara a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) del paciente obtenidas mediante leucoféresis. Las PBMC se enriquecen con células T y luego se transducen con un lentivirus (LV) incompetente para la replicación que contiene el transgén TCR MAGE-A4. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 1 de agosto de 2024 como medicamento huérfano (*Orphan drug*), de forma acelerada (*Accelerated Approval*), mediante revisión prioritaria (*Priority Review*) y designado como terapia avanzada de medicina regenerativa (*Regenerative Medicine Advanced Therapy, RMAT*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

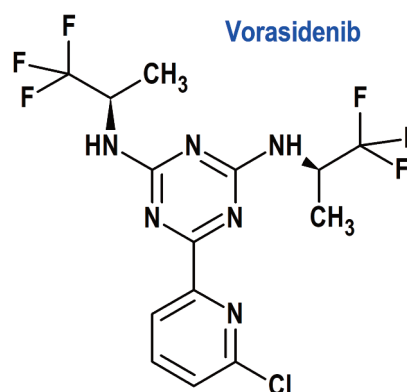
Mecanismo: El receptor de células T (TCR) reconoce un péptido MAGE-A4 restringido por HLA-A*02. MAGE-A4 es un antígeno intracelular de cáncer de testículo que tiene una expresión restringida en tejidos normales y se expresa en el sarcoma sinovial. La activación específica del antígeno de TECELRA a través del complejo TCR-péptido-HLA-A*02 da como resultado la proliferación de células T, la secreción de citocinas y la muerte de células de sarcoma sinovial que expresan MAGE-A4/HLA-A*02.

Eficacia clínica: Ensayo clínico multicéntrico, de un solo brazo y abierto. Hubo 44 pacientes con

sarcoma sinovial que recibieron una única infusión de TECELRA. La principal variable clínica de eficacia fue la tasa de respuesta general evaluada por un comité de revisión independiente (43%; completa en el 4,5% y parcial en el 39%). Adicionalmente, la mediana de la duración de la respuesta fue de 6 meses (≥ 6 meses: 46%; ≥ 12 meses: 39%).

Eventos adversos: Se produjeron reacciones adversas graves en el 52% de los pacientes con sarcoma sinovial. Las reacciones adversas graves más frecuentes ($\geq 5\%$) incluyeron síndrome liberación de citocinas (CRS, 9%) y derrame pleural (7%).

VORASIDENIB (VORANIGO®) SERVIER (FDA, USA)



Indicación: Tratamiento de pacientes adultos y pediátricos de 12 años o más con astrocitoma de grado 2 u oligodendroglioma con una mutación susceptible de isocitrato deshidrogenasa-1 (IDH1) o isocitrato deshidrogenasa-2 (IDH2) después de una cirugía que incluya biopsia, resección subtotal o resección total macroscópica.

Tipo: Medicamento sintético estándar constituido por la 6-(6-cloropiridin-2-il)-2-N,4-N-bis[(2R)-1,1,1-trifluoropropan-2-il]-1,3,5-triazina-2,4-diamina. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 6 de agosto de 2024 como medicamento huérfano (*Orphan drug*), por vía rápida (*Fast Track*), mediante revisión prioritaria (*Priority Review*) y designado como terapia innovadora (*Breakthrough Therapy*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

Mecanismo: Inhibidor de la enzima isocitrato deshidrogenasa-1 y 2 (IDH1 e IDH2), tanto a las variantes de tipo salvaje y mutante de IDH1, incluidas R132H, como las variantes de tipo salvaje y mutante de IDH2. En modelos tumorales in vivo

y basados en células que expresan proteínas mutadas de IDH1 o IDH2, vorasidenib disminuyó la producción de 2-hidroxiglutarato (2-HG) y restauró parcialmente la diferenciación celular. Vorasidenib reduce entre un 64% y un 95% las concentraciones tumorales de 2-HG en pacientes con gliomas con mutación IDH1 o IDH2. Los tumores con alteraciones de IDH1 e IDH2 ocurren en la población pediátrica como los gliomas de grado bajo (grado 2 de la OMS), los gliomas de grado alto (3 y 4), y los oligodendrogliomas con codeleción de 1p y 19q.

Eficacia clínica: Estudio aleatorizado, multicéntrico, doble ciego, controlado con placebo en 331 pacientes con astrocitoma u oligodendroglioma de grado 2 con mutación IDH1 o IDH2, con cirugía previa que incluyó biopsia, resección subtotal o resección total macroscópica. La variable principal de eficacia fue la supervivencia libre de progresión (SLP) evaluada por un comité de revisión independiente ciego (72 vs. 46%). La variable secundaria fue el tiempo hasta la siguiente intervención (tiempo desde la aleatorización hasta el inicio de la primera terapia anticancerosa posterior o la muerte por cualquier causa): la mediana de tiempo no se alcanzó para los pacientes del grupo de vorasidenib y fue de 17,8 meses para los pacientes del grupo placebo.

Eventos adversos: Los más comunes ($\geq 15\%$) fueron fatiga (37%), COVID-19 (33%), dolor musculoesquelético (26%), diarrea (25%) y convulsiones (16%). Las anomalías de laboratorio de grado 3 o 4 ($\geq 2\%$) fueron aumento de ALT (10%), aumento de AST (4,8%), aumento de GGT (3%) y disminución de neutrófilos (2,4%). Se produjeron reacciones adversas graves en el 7 % de los pacientes, y entre ellas las más frecuentes ($\geq 2\%$) de los pacientes fueron convulsiones (3%). La interrupción permanente del tratamiento debido a una reacción adversa se produjo en el 3,6 %, debido mayoritariamente a un aumento de ALT (3%). Se produjeron interrupciones temporales de la dosis debido a una reacción adversa en el 30% de los pacientes.

ODRONESTAMAB (ORDSPONO®) REGENERON (EMA, UE)

Indicación: Tratamiento en monoterapia de pacientes adultos con linfoma folicular en recaída o refractario (LBDCG R/R) después de dos o más líneas

de tratamiento sistémico; también en monoterapia de pacientes adultos con linfoma B difuso de células grandes en recaída o refractario (LBDCG R/R) después de dos o más líneas de tratamiento sistémico.

Tipo: Medicamento biológico constituido por un anticuerpo biespecífico recombinante basado en la inmunoglobulina (Ig)G4 humana que se une a CD20 y CD3. Autorizado en la Unión Europea (EMA) el 22 de agosto de 2024 condicionalmente (*Conditional marketing authorisation*); no autorizado previamente en Estados Unidos (FDA).

Mecanismo: Anticuerpo biespecífico que se une a CD20, un antígeno de superficie de las células B presente en células B normales y malignas, y CD3, un antígeno de las células T asociado al complejo receptor de las células T. La interacción simultánea de los dos brazos de odronextamab da lugar a la formación de una sinapsis entre la célula T y la célula que expresa CD20, lo que provoca la activación de las células T y la generación de respuesta de las células T citotóxicas policlonales, con la consiguiente lisis redirigida de las células diana, incluyendo las células B malignas.

Eficacia clínica: Un estudio abierto, multicéntrico y no aleatorizado de varias cohortes en 128 pacientes con linfoma folicular en recaída o refractario (LF R/R). La variable principal de eficacia fue la tasa de respuesta objetiva (TRO: 80%; 73% completa) y la variable secundaria fue la duración de la respuesta (DR: mediana de 23 meses; 25 en pacientes con respuesta completa) evaluado por un comité de revisión independiente. La eficacia en linfoma B difuso de células grandes en recaída o refractario (LBDCG R/R) se evaluó en dos estudios abiertos, multicéntricos y no aleatorizados de varias cohortes. El primero se hizo en 127 pacientes sin tratamiento previo con T-CAR (TRO: 52%, 31% completa; DR: 11 meses, 18 en pacientes con respuesta completa) y el segundo en 60 pacientes tras un tratamiento con T-CAR (TRO: 48%, 32% completa; DR: 15 meses).

Eventos adversos: Los más comunes son síndrome de liberación de citocinas (54%), neutropenia (41%), pirexia (39%), anemia (38%), trombocitopenia (27%), diarrea (24%) y COVID19 (22%). Los de intensidad grave más frecuentes (grado ≥ 3 según los CTCAE del NCI) son neutropenia (34%), anemia (19%), trombocitopenia (13%), linfopenia (12%), neumonía (10%), leucopenia (9%), COVID-19 (8%), hipopotasemia



(6%) e hiperglucemia (5 %). Las reacciones adversas graves más frecuentes son síndrome de liberación de citocinas (14%), neumonía (9%), COVID-19 (9%) y pirexia (6%). La frecuencia de la interrupción de la infusión IV debido a una reacción adversa es del 16% y la de interrupción del tratamiento debido a una reacción adversa es del 14%, más frecuentemente COVID-19 (2,4%), neumonía (1,3%) y encefalopatía (0,8%).

DENILEUKIN DEFTITOX (LYMPHIR®) CITIUS (FDA, USA)

Indicación: Tratamiento de pacientes adultos con linfoma cutáneo de células T (CTCL) en estadio 4 recidivante o refractario después de al menos una terapia sistémica previa.

Tipo: Medicamento biológico constituido por una proteína de fusión derivada de ADN recombinante compuesta por las secuencias de aminoácidos de los fragmentos A y B de la toxina de la difteria (Met1-Thr387)-His y la secuencia de la interleucina-2 humana (IL-2; Ala1-Thr133); tiene un peso molecular de 58 kD. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 7 de agosto de 2024 como medicamento huérfano (*Orphan drug*), de forma acelerada (*Accelerated Approval*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

Mecanismo: Proteína de fusión diseñada para dirigir la acción citocida de la toxina diftérica (DT) a las células que expresan el receptor IL-2. Después de la captación en la célula, el fragmento DT se escinde y los fragmentos DT libres inhiben la síntesis de proteínas, lo que produce la muerte celular. Denileukin diftitox demostró la capacidad de agotar los linfocitos T reguladores inmunosupresores (Tregs) y la actividad antitumoral a través de una acción citocida directa sobre los tumores que expresan IL-2R.

Eficacia clínica: Un ensayo multicéntrico, de un solo brazo y abierto en 69 pacientes con linfoma cutáneo de células T en estadio I a IV recidivante o refractario, con una expresión de CD25 en $\geq 20\%$ de las células malignas biopsiadas mediante inmunohistoquímica. La variable principal de eficacia fue la tasa de respuesta objetiva (ORR), según la puntuación de respuesta global (GRS) de ISCL/EORTC por parte del Comité de Revisión Independiente: 36% (9% completa y 27% parcial).

Eventos adversos: Los más comunes ($\geq 20\%$), incluidos las anomalías de laboratorio, fueron

aumento de las transaminasas (70%), disminución de la albúmina (53 %), náuseas (40%), edema (35%), disminución de la hemoglobina (34%), fatiga (30%), dolor musculoesquelético (26%), erupción cutánea (23%), escalofríos (22%), estreñimiento (22%), pirexia (21%) y síndrome de extravasación capilar (20%). Se produjeron reacciones adversas graves en el 38%, principalmente síndrome de extravasación capilar (10 %), reacción relacionada con la infusión (9 %), sepsis (7 %), infección cutánea (2,9 %), pirexia (2,9 %) y erupción cutánea (2,9 %). La interrupción permanente del tratamiento debido a una reacción adversa se produjo en el 12% de los pacientes, y las interrupciones de la dosis debido a una reacción adversa ocurrieron en el 38% de los pacientes.

AXATILIMAB (NIKTIMVO®) INCYTE (FDA, USA)

Indicación: Tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped crónica (EICHc) tras el fracaso de al menos dos líneas previas de terapia sistémica en pacientes adultos y pediátricos que pesen al menos 40 kg.

Tipo: Medicamento biológico constituido por un anticuerpo monoclonal humanizado IgG4 (cadena ligera kappa) recombinante con un peso molecular aproximado de 150 kDa. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 14 de agosto de 2024 como medicamento huérfano (*Orphan drug*), por vía rápida (*Fast Track*) y mediante revisión prioritaria (*Priority Review*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

Mecanismo: Anticuerpo monoclonal que se une a los receptores del factor estimulante de colonias 1 (CSF-1R) expresados en monocitos y macrófagos. El bloqueo del CSF-1R con axatilimab reduce los niveles de estos monocitos circulantes proinflamatorios y profibróticos y macrófagos derivados de monocitos, e inhibe la actividad de los macrófagos patógenos en los tejidos.

Eficacia clínica: Ensayo aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo de XX semanas de duración, que incluyó a XXX pacientes. La variable principal de eficacia fue

Eventos adversos: Los más frecuentes ($\geq 15\%$), son aumento de AST, infección, aumento de ALT, disminución de fosfato, disminución de hemoglobina, infección viral, aumento de gamma glutamil transferasa (GGT), dolor musculoesquelético, aumento de lipasa, fatiga,



aumento de amilasa, aumento de calcio, aumento de CPK, aumento de fosfatasa alcalina (ALP), náuseas, dolor de cabeza, diarrea, tos, infección bacteriana, pirexia y disnea. Se produjeron reacciones adversas graves en el 44 % de los pacientes, mientras que la interrupción permanente del tratamiento debido a una reacción adversa ocurrió en el 10% de los pacientes y la reducción de la dosis debido a este motivo en el 8 %. Las interrupciones de la dosis debido a una reacción adversa ocurrieron en el 44 % de los pacientes.

(N) SISTEMA NERVIOSO

DONANEMAB (KISUNLA®) LILLY (FDA, USA)

Indicación: Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. El tratamiento debe iniciarse en pacientes con deterioro cognitivo leve o en etapa de demencia leve de la enfermedad.

Tipo: Medicamento biológico constituido por un anticuerpo monoclonal de inmunoglobulina gamma 1 (IgG1) humanizado dirigido contra el beta amiloide, con un peso molecular de 145 kDa. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 2 de julio de 2024 por vía rápida (*Fast Track*), mediante revisión prioritaria (*Priority Review*) y designado como terapia innovadora (*Breakthrough Therapy*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

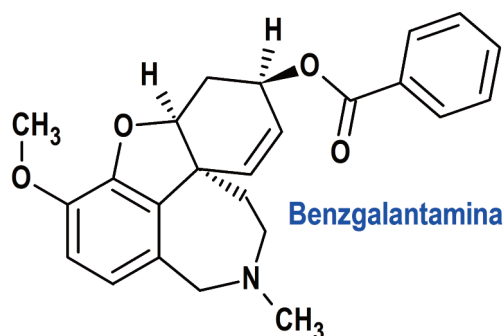
Mecanismo: Anticuerpo monoclonal dirigido contra el beta-amiloide con piroglutamato N-terminal. Las especies de beta-amiloide (Aβ) modificadas con piroglutamato (pE) truncadas en el extremo N (Aβ pE3) tienen un mayor potencial de agregación y una elevada propensión a formar oligómeros tóxicos, supuestamente relacionados con la aparición de la enfermedad de Alzheimer.

Eficacia clínica: Estudio doble ciego, controlado con placebo, de grupos paralelos en 1.736 pacientes con enfermedad de Alzheimer, presencia confirmada de patología amiloide y deterioro cognitivo leve o etapa de demencia leve de la enfermedad. Los pacientes tratados con donanemab demostraron una reducción estadísticamente significativa en el deterioro clínico en la Escala Integrada de Calificación de la Enfermedad de Alzheimer (iADRS) en comparación con el placebo en la Semana 76 en la población general (2,92, $p < 0,0001$), así como en las escalas del componente iADRS, el Escala de evaluación de la enfermedad de Alzheimer-subescala cognitiva

(ADAS-Cog13) (-1,33, $p = 0,0006$), en la escala del Estudio cooperativo de la enfermedad de Alzheimer - actividades instrumentales de la vida diaria (ADCS-iADL) (1,70, $p = 0,0001$) y en el deterioro clínico en la Escala de Calificación Clínica de Demencia - Suma de Cajas (CDR-SB) (-0,70, $p < 0,0001$).

Eventos adversos: Los más comunes son anomalías de imagen relacionadas con amiloide (ARIA), especialmente ARIA-H (con deposición de siderina), siendo ARIA-H con microhemorragia del 25% (donanemab) vs 11% (placebo), ARIA-H con siderosis superficial del 15 vs. 3%; ARIA-E (con edema) en el 24 vs. 2%; cefalea (13 vs. 10%) y reacciones asociadas a la infusión (9 vs. 0,5%). El porcentaje de pacientes que interrumpen el tratamiento debido a una reacción adversa es del 13% (donanemab) vs. 4% con placebo, debido fundamentalmente a reacciones asociadas con el procedimiento de infusión (4 vs. 0%).

BENZGALANTAMINA (ZUNVEYL®) ALPHA COGNITION (FDA, USA)



Indicación: Tratamiento de la demencia leve a moderada del tipo Alzheimer en adultos.

Tipo: Medicamento sintético estándar constituido por un profármaco de galantamina: benzoato de (4aS,6R,8aS)-11-metil-3-metoxi-4a,5,9,10,11,12-hexahidro-6H-[1]benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-ilo. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 26 de julio de 2024 como medicamento huérfano (*Orphan drug*), de forma acelerada (*Accelerated Approval*), por vía rápida (*Fast Track*), mediante revisión prioritaria (*Priority Review*), con bono para la revisión prioritaria de enfermedades pediátricas raras (*Rare Pediatric Disease Priority Review Voucher, RPD*) y designado como terapia innovadora (*Breakthrough Therapy*), designado como terapia avanzada de medicina regenerativa (*Regenerative Medicine Advanced Therapy, RMAT*), designado como producto



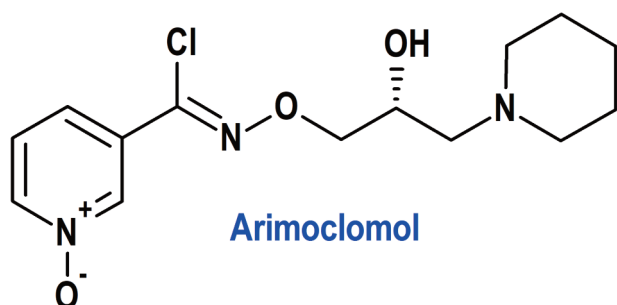
calificado para enfermedades infecciosas (*Qualified Infectious Disease Product*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

Mecanismo: Profármaco de la galantamina, un inhibidor competitivo y reversible de la acetilcolinesterasa. Las neuronas productoras de acetilcolina se degeneran en los cerebros de los pacientes con enfermedad de Alzheimer. El grado de esta pérdida colinérgica se ha correlacionado con el grado de deterioro cognitivo y la densidad de las placas amiloides (una característica neuropatológica de la enfermedad de Alzheimer). Si bien se desconoce el mecanismo preciso de acción de la galantamina, se postula que ejerce su efecto terapéutico al mejorar la función colinérgica. Esto se logra al aumentar la concentración de acetilcolina a través de la inhibición reversible de su hidrólisis por la colinesterasa. Si este mecanismo es correcto, el efecto de la galantamina puede disminuir a medida que avanza el proceso de la enfermedad y menos neuronas colinérgicas permanecen funcionalmente intactas. No hay evidencia de que la galantamina altere el curso del proceso de demencia subyacente.

Eficacia clínica: La eficacia de ZUNVEYL se basa en tres estudios de biodisponibilidad en adultos sanos comparando los comprimidos de liberación inmediata de galantamina y las cápsulas de liberación prolongada de galantamina con ZUNVEYL.

Eventos adversos: Los más comunes ($\geq 5\%$) son náuseas (21 vs 5,5% con placebo), vómitos (10,5 vs. 2,3%), diarrea (7,4 vs. 4,9%), mareos (7,5 vs. 3,4%), dolor de cabeza (7,1 vs. 5,5%) y disminución del apetito (7,4 vs. 2,1%).

ARIMOCLOMOL (MIPLYFFA®) ZEVR (FDA, USA)



Indicación: Tratamiento en combinación con miglustat de las manifestaciones neurológicas de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC) en pacientes adultos y pediátricos de 2 años de edad y mayores.

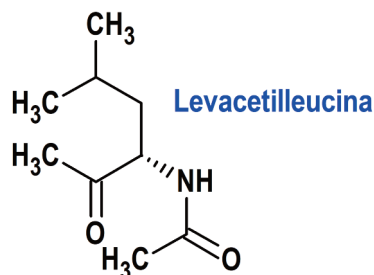
Tipo: Medicamento sintético estándar constituido por el cloruro de N-[(2R,Z)-2-hidroxi-3-(1-piperidil)propoxi]piridina-3-carboximidoilo, 1-óxido. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 20 de septiembre de 2024 como medicamento huérfano (*Orphan drug*), por vía rápida (*Fast Track*), mediante revisión prioritaria (*Priority Review*), con bono para la revisión prioritaria de enfermedades pediátricas raras (*Rare Pediatric Disease Priority Review Voucher, RPD*) y designado como terapia innovadora (*Breakthrough Therapy*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

Mecanismo: Permite tratar los síntomas neurológicos asociados con la NPC, aunque se desconocen los mecanismos por los cuales el arimoclomol ejerce sus efectos clínicos en estos pacientes. La enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC) es una enfermedad genética rara que provoca síntomas neurológicos progresivos y disfunción orgánica. Está causada por cambios en el gen NPC1 o NPC2, que afectan el transporte necesario de colesterol y otros lípidos dentro de una célula. En promedio, las personas afectadas por esta enfermedad solo viven unos 13 años.

Eficacia clínica: Un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, de 12 meses de duración en 50 pacientes de 2 a 19 años de edad que tenían un diagnóstico confirmado molecularmente de NPC. Se realizaron evaluaciones de eficacia, incluida la puntuación de la Escala de gravedad clínica de NPC de 4 dominios (R4DNPCCSS) al inicio y reevaluada cada 3 meses hasta los 12 meses de tratamiento. La R4DNPCCSS es una medida de la progresión de la enfermedad de NPC que consta de los cuatro elementos que evalúan la deambulación, el habla, la deglución y las habilidades motoras más relevantes, donde las puntuaciones más altas representan una mayor gravedad de la enfermedad. A los 12 meses, la variación de la puntuación R4DNPCCSS fue de -0,2 puntos con arimoclomol/miglustat vs. +2,0 con placebo/miglustat.

Eventos adversos: Los más comunes son infección de las vías respiratorias superiores (31 vs 15% con placebo), diarrea (23/23%), pérdida de peso (15/0%), disminución del apetito (12/0%), temblor (12/0%), urticaria (12/0%), dolor de cabeza (12/8%), infección de las vías respiratorias inferiores 3(12/8%) y convulsiones (12/8%).

LEVACETILLEUCINA (AQNEURSA®) INTRABIO (FDA, USA)



Indicación: Tratamiento de las manifestaciones neurológicas de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC) en pacientes adultos y pediátricos con peso ≥ 15 kg.

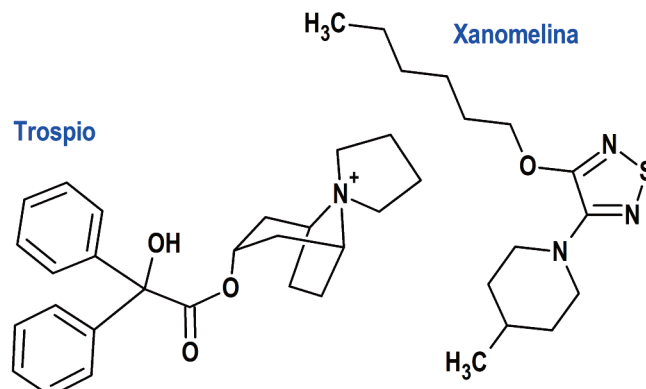
Tipo: Medicamento sintético estándar constituido por el ácido L-2-acetamido-4-metilpentanoico (N-acetil-L-leucina). Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 24 de septiembre de 2024 como medicamento huérfano (*Orphan drug*), por vía rápida (*Fast Track*), mediante revisión prioritaria (*Priority Review*) y con bono para la revisión prioritaria de enfermedades pediátricas raras (*Rare Pediatric Disease Priority Review Voucher, RPD*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

Mecanismo: Desconocido.

Eficacia clínica: Estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, de dos periodos, cruzado, de 24 semanas de duración (12 semanas para cada periodo de tratamiento) en 60 pacientes con 4 años de edad o más y con un diagnóstico confirmado de NPC y al menos síntomas neurológicos leves relacionados con la enfermedad. La variable principal de eficacia fue una versión modificada de la Escala para la Evaluación y Calificación de la Ataxia (SARA), conocida como SARA funcional (fSARA), que consta de los dominios de alteración de la marcha, sedestación, postura y habla. La puntuación media estimada de fSARA por tratamiento fue de 5,1 con AQNEURSA frente a 5,6 con placebo, con una diferencia de tratamiento (IC95%) de -0,4 puntos.

Eventos adversos: Los más comunes son infección del tracto respiratorio superior (17 vs. 3% con placebo), dolor abdominal (7 vs. 0%), disfgia (7 vs. 0%) y vómitos (7 vs. 0%).

XANOMELINA + TROPIO (COBENFY®) BRISTOL MYERS SQUIBB (FDA, USA)



Indicación: Tratamiento de la esquizofrenia en adultos.

Tipo: Medicamento sintético estándar constituido por el ácido 3-hexoxi-4-(1-metil-3,6-dihidro-2H-piridin-5-il)-1,2,5-tiadiazol-(2R,3R)-2,3-dihidrobutanodioico (xanomelina) y por el cloruro de (1alfa,3beta,5alfa)-3-((2-hidroxi-2,2-difenilacetil)oxi)-espiro(8-azoniabiciclo(3.2.1)octano-8,1'-pirrolidinio) (cloruro de trospio). Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 26 de septiembre de 2024 mediante revisión prioritaria (*Priority Review*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

Mecanismo: Agonista de los receptores colinérgicos muscarínicos M1 y M4 del sistema nervioso central. El cloruro de trospio es un antagonista muscarínico que antagoniza los receptores muscarínicos principalmente en los tejidos periféricos, a fin de evitar o paliar los efectos colinérgicos periféricos de la xanomelina.

Eficacia clínica: Dos estudios controlados con placebo con diseños idénticos de cinco semanas, aleatorizados, doble ciego, controlados con placebo y multicéntricos en un total de 470 pacientes adultos con diagnóstico de esquizofrenia según los criterios del DSM-5. La medida principal de eficacia fue el cambio desde el inicio en la puntuación total de la Escala de Síndromes Positivos y Negativos (PANSS) en la Semana 5. La PANSS es una escala de 30 ítems que mide los síntomas de la esquizofrenia; cada ítem es calificado en una escala de siete puntos, desde 1 (ausencia de síntomas) 7 (síntomas extremadamente graves), donde la puntuación total de la PANSS puede variar de 30 a 210 (mayor gravedad). La diferencia (media de mínimos

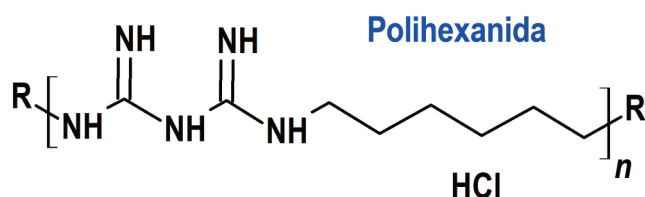


cuadrados) entre el tratamiento activo y el placebo fue de -9,6 y -8,4 puntos en los dos estudios.

Eventos adversos: Los más comunes son náuseas (19 vs. 4% con placebo), dispepsia (18/5%), estreñimiento (17/7%), vómitos (15/1%), hipertensión (11/2%), dolor abdominal (8/4%), diarrea (6/2%), taquicardia (5/2%), mareos (5/2%), enfermedad por reflujo gastroesofágico (5/<1%).

(S) ÓRGANOS SENSORIALES

POLIHEXANIDA (AKANTIOR®) SIFI (EMA, UE)



Indicación: Tratamiento de la queratitis por *Acanthamoeba* en adultos y niños a partir de 12 años de edad.

Tipo: Medicamento sintético estándar constituido por el hidrocloreto de poli(iminocarbonimidodiliminocarbonimidodilimino-1,6-hexanodiilo). Autorizado en la Unión Europea (EMA) el 22 de agosto de 2024 como medicamento huérfano (*Orphan drug*); no autorizado previamente en Estados Unidos (FDA).

Mecanismo: Polímero policatiónico compuesto de unidades de hexametilenobiguanida que actúa tanto sobre los trofozoítos activos como sobre las formas quísticas inactivas de *Acanthamoeba*. La polihexanida altera las membranas celulares de *Acanthamoeba* debido a su carga positiva, uniéndose a la bicapa fosfolípida de la membrana de los trofozoítos, que tiene carga negativa, provocando la lisis de la membrana la muerte y muerte celular; también es capaz de penetrar el ostiolo de *Acanthamoeba* enquistada para ejercer el mismo efecto. Esta acción solo afecta mínimamente a los fosfolípidos neutros de la membrana celular de los mamíferos. Asimismo, la polihexanida se une al ADN lesionando los cromosomas de *Acanthamoeba*; en concreto, interacciona con la estructura de fosfato del ADN para bloquear el proceso de replicación. Este mecanismo se limita a las células de *Acanthamoeba*, ya que polihexanida no es capaz de penetrar el núcleo de las células de los mamíferos.

Eficacia clínica: Un ensayo clínico de fase 3, aleatorizado, con enmascaramiento doble y controlado con tratamiento activo con datos de controles históricos sobre sujetos que no recibieron tratamiento (identificados mediante una revisión bibliográfica sistemática; n = 56); la tasa de resolución clínica sin cirugía en este control histórico fue del 19,6 %, mientras que el 80,4 % restante de los pacientes requirió cirugía. El efecto del tratamiento (porcentaje de pacientes curados sin cirugía) de polihexanida frente a la ausencia de tratamiento (control histórico) fue del 84,8 vs. 19,6%.

Eventos adversos: Los más comunes son dolor ocular (13%) e hiperemia ocular (12%). Las más graves son perforación corneal (1,4%), necesidad de trasplante de córnea (1,4%) y deficiencia visual (1,4%), que también forman parte de la evolución natural de la enfermedad.

(V) VARIOS

GALIO [68GA] + GERMANIO [68GE] (GALLIAFARM®) ECKERT ZIEGLER (EMA, UE)

Indicación: Eluido estéril (solución de cloruro de galio [68Ga]) para el radiomarcaje in vitro de varios kits de preparación radiofarmacéutica desarrollados y aprobados para el radiomarcaje con dicho eluido, que se utilizarán para la obtención de imágenes de tomografía por emisión de positrones (PET). Este generador de radionúclidos no debe utilizarse directamente en los pacientes.

Tipo: Medicamento sintético estándar constituido por un generador de radionúclidos que contiene germanio (68Ge) como núclido original, que se desintegra en el núclido derivado galio (68Ga). El germanio (68Ge) usado para la producción del generador (68Ge/68Ga) no tiene ningún portador añadido. Autorizado en la Unión Europea (EMA) el 1 de agosto de 2024; no autorizado previamente en Estados Unidos (FDA).

Mecanismo: El generador de radionúclidos GalliaPharm 1,11-3,70 GBq es un sistema para la elución de solución de cloruro de galio (68Ga) estéril. Esta solución se eluye de una columna en la que se ha fijado el núclido original germanio (68Ge), que es la sustancia precursora del galio (68Ga). El período de

semidesintegración del germanio-68 [68Ge] es de 270,95 días mediante captura de electrones,

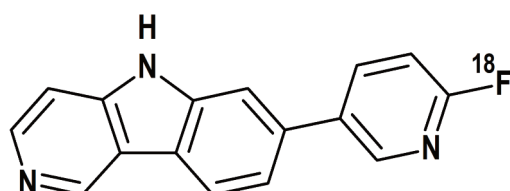


mientras que el del galio-68 [^{68}Ga] es 67,71 minutos, emitiendo positrones, empleándose en las pruebas de diagnóstico por imagen mediante PET (tomografía por emisión de positrones).

Eficacia clínica: Para potencias iniciales en el generador de radionúclidos de 1,11 y 3,70 Gbq, la actividad obtenida mediante elución al final del periodo de validez es no menor de 0,16 y 0,55 GBq, respectivamente.

Eventos adversos: Las posibles reacciones adversas debidas al uso de un radiofármaco marcado con ^{68}Ga dependerán del kit específico para la preparación del radiofármaco específico que se está utilizando. La exposición a la radiación ionizante está relacionada con la inducción de cáncer y la posibilidad de desarrollar anomalías congénitas.

FLORTAUCIPIR [^{18}F] (TAUVID®) LILLY (EMA, UE)



Flortaucipir [^{18}F]

Indicación: Para la obtención de imágenes del cerebro mediante tomografía por emisión de positrones (PET) para evaluar la distribución neocortical de los ovillos neurofibrilares de tau agregado (NFTs, por sus siglas en inglés) en pacientes adultos con deterioro cognitivo que están siendo evaluados por enfermedad de Alzheimer.

Tipo: Medicamento sintético estándar constituido por el 7-(6-[^{18}F]fluoranilpiridin-3-il)-5H-pirido[4,3-b]indol. Autorizado en la Unión Europea (EMA) el 22 de agosto de 2024; autorizado previamente en Estados Unidos (FDA) el 28 de mayo de 2020.

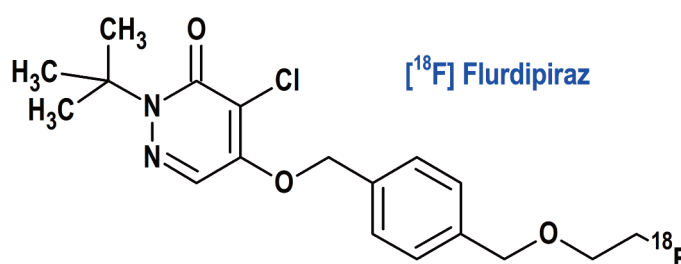
Mecanismo: Flortaucipir (^{18}F) se une a los agregados de la proteína tau. En los cerebros de pacientes con EA, el filamento helicoidal emparejado (PHF) de tau forma agregados que se combinan para formar ovillos neurofibrilares (NFTs), un componente necesario del diagnóstico neuropatológico de la enfermedad de Alzheimer. Flortaucipir (^{18}F) se retiene diferencialmente en áreas neocorticales que contienen agregados de tau y no se une al amiloide. El flúor [^{18}F] decae a

oxígeno [^{18}O] estable con un periodo de semidesintegración de 110 minutos mediante emisión de positrones con una energía máxima de 634 keV, seguida de una radiación de aniquilación de positrones de 511 keV. Los principales fotones útiles para el diagnóstico por imágenes son los fotones gamma de 511 keV, resultantes de la interacción del positrón emitido con un electrón.

Eficacia clínica: Un estudio pivotal de correlación neuropatológica de la EA y otro estudio adicional con lectores, que compararon el rendimiento diagnóstico de la utilización de flortaucipir (^{18}F) para estimar la distribución de los NFTs de tau agregado con el examen post-mortem. En cada estudio, 5 lectores independientes, ciegos a la información clínica, interpretaron las imágenes de flortaucipir (^{18}F) como positivas o negativas. Se evaluó el rendimiento de las imágenes del patrón de flortaucipir (^{18}F) de la enfermedad de Alzheimer para distinguir la patología tau B3 (verdadero positivo) de la B0-B2 (verdadero negativo). El rendimiento diagnóstico del escáner con flortaucipir (^{18}F) en pacientes sometidos a autopsia (B3) mostró una sensibilidad del 89-92% y una especificidad del 76-77%.

Eventos adversos: Los más comunes son dolor de cabeza (0,9%), dolor en el lugar de la inyección (0,6%) y aumento de la presión arterial (0,5%).

FLURDIPIRAZ [^{18}F] (FLYRCADO®) GE HEALTHCARE (FDA, USA)



Indicación: Tomografía por emisión de positrones (PET) y la obtención de imágenes de perfusión miocárdica (MPI) en reposo o estrés (farmacológico o ejercicio) en pacientes adultos con enfermedad coronaria (CAD) conocida o sospechada para evaluar la isquemia y el infarto de miocardio.

Tipo: Medicamento sintético estándar constituido por la 2-terc-butil-4-cloro-5-[[4-(2-(^{18}F)fluoraniletoximetil)fenil]metoxi]piridazin-3-ona. Autorizado en Estados Unidos (FDA) el 27 de



septiembre de 2024 mediante revisión prioritaria (*Priority Review*); no autorizado aún en la Unión Europea (EMA).

Mecanismo: El flurpiridaz [18F] es un análogo del inhibidor del complejo mitocondrial 1 (MC-1), el piridabeno. El flurpiridaz [18F] es extraído por el miocardio de manera proporcional al flujo sanguíneo y se une al tejido cardíaco que tiene mitocondrias biológicamente activas. Por lo tanto, la radiactividad en el miocardio viable es mayor que en el tejido infartado. El flúor [18F] decae a oxígeno [18O] estable con un periodo de semidesintegración de 110 minutos mediante emisión de positrones con una energía máxima de 634 keV, seguida de una radiación de aniquilación de positrones de 511 keV. Los principales fotones útiles para el diagnóstico por imágenes son los fotones gamma de 511 keV, resultantes de la interacción del positrón emitido con un electrón.

Eficacia clínica: Dos estudios clínicos prospectivos, multicéntricos y abiertos en adultos con enfermedad coronaria (CAD) sospechada o conocida. El Estudio 1 evaluó la sensibilidad y la especificidad para la detección de CAD significativa en sujetos con CAD sospechada que estaban programados para una angiografía coronaria invasiva (ACI). En tres lectores de imágenes, las estimaciones de sensibilidad variaron del 74 % al 89 % y las estimaciones de especificidad variaron del 53 % al 70 % para la CAD definida como al menos un 50 % de estrechamiento de una arteria. El Estudio 2 evaluó la sensibilidad y especificidad para la detección de CAD significativa en sujetos con CAD conocida o sospechada que tuvieron una ACI sin intervención dentro de los 60 días previos a la obtención de imágenes o estaban programados para una ACI. En tres lectores de imágenes, las estimaciones de sensibilidad variaron del 63% al 77% y las estimaciones de especificidad variaron del 66% al 86% para la CAD.

Eventos adversos: Los más comunes son disnea (17%), dolor de cabeza (15%), angina de pecho (10%), dolor torácico (8%), fatiga (7%), cambios en el segmento ST (6%) y sofocos (5%).

PROCEDIMIENTOS ESPECIALES DE EVALUACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Tanto la Agencia Europea de Medicamentos (*European Medicines Agency, EMA*), de la Unión Europea, como la Administración de Alimentos y

Medicamentos (*Food & Drug Administration, FDA*), de Estados Unidos, disponen de diversos procedimientos de evaluación y autorización de medicamentos para incentivar el desarrollo de nuevos tratamientos para enfermedades que de otra manera no atraerían el interés de las empresas debido al elevado coste del desarrollo y la imposibilidad de retorno económico comercial, así como para facilitar la mejor y más rápida disponibilidad posible de medicamentos designados como especialmente relevantes atendiendo a las particulares características patológicas de algunos pacientes, así como a la gravedad de las patologías para los que son destinados y a su potencial repercusión social y epidemiológica, valorando si constituyen el primer tratamiento disponible o si presentan ventajas significativas sobre los tratamientos existentes. Estas designaciones y procedimientos son referenciados, en su caso, en las monografías de los medicamentos previamente descritas.

EMA (European Medicines Agency, UE)

Medicamentos Prioritarios (*Priority Medicines; PRIME*): es un esquema de evaluación de la EMA para apoyar el desarrollo de medicamentos que se dirigen a una necesidad médica no cubierta, basándose en una interacción mejorada y un diálogo temprano con los desarrolladores de medicamentos prometedores, para optimizar los planes de desarrollo y acelerar la evaluación para que estos medicamentos puedan llegar antes a los pacientes, empleando para ello el asesoramiento científico y la evaluación acelerada.

Evaluación acelerada (*Accelerated assessment*): reduce el plazo máximo para que el Comité de Medicamentos de Uso Humano (CHMP) revise una solicitud de autorización de comercialización de medicamentos, pasando de 210 a 150 días. Las solicitudes pueden ser elegibles para una evaluación acelerada si el CHMP decide que el producto es de gran interés para la salud pública y la innovación terapéutica.

Autorización de comercialización condicional (*Conditional marketing authorisation*) para solicitudes de medicamentos que presenten datos clínicos menos completos que los normalmente requeridos, siempre que el beneficio de la disponibilidad inmediata del medicamento supere el riesgo inherente al hecho de que todavía se

requieren datos adicionales, tal como aquellos destinados a tratar, prevenir o diagnosticar enfermedades gravemente debilitantes o potencialmente mortales, incluyendo a los medicamentos huérfanos.

Autorización de comercialización en condiciones excepcionales (*Exceptional circumstances*) para medicamentos en los que el solicitante no puede proporcionar datos completos sobre la eficacia y la seguridad en condiciones normales de uso, porque la condición a tratar es rara o porque la recopilación de información completa no es posible o no es ético.

Medicamento huérfano (*Orphan drug*): son designados como tales aquellos destinados a tratar enfermedades raras (en la Unión Europea son aquellas que afectan a menos de 5 de cada 10.000 habitantes), no resultan atractivos a los patrocinadores por su escasa rentabilidad y precisan por ello apoyo adicional para su desarrollo.

FDA (Food & Drug Administration, USA)

Revisión prioritaria (*Priority Review*): evaluación de solicitudes de medicamentos que, de aprobarse, serían mejoras significativas en la seguridad o eficacia del tratamiento, diagnóstico o prevención de afecciones graves en comparación con las solicitudes estándar, considerando mejora significativa a la evidencia de mayor efectividad en el tratamiento, prevención o diagnóstico de la condición; eliminación o reducción sustancial de una reacción farmacológica limitante del tratamiento; mejora documentada del cumplimiento del paciente que se espera que conduzca a una mejora en los resultados graves; o evidencia de seguridad y eficacia en una nueva subpoblación.

Bono para la revisión prioritaria de enfermedades pediátricas raras (*Rare Pediatric Disease Priority Review Voucher, RPD*): la FDA puede otorgar bonos o cupones de revisión prioritaria a los patrocinadores de aplicaciones de productos destinados para enfermedades pediátricas raras que cumplan con ciertos criterios. Este bono es un incentivo que el patrocinador recibe en forma de “cupón especial”, el cual puede ser empleado de dos maneras: para aplicar el sistema de revisión prioritaria de la FDA

en cualquier otro de sus productos o venderlo a otra compañía interesada en que su propio medicamento sea revisado de forma prioritaria.

Terapia innovadora (*Breakthrough Therapy*): medicamentos destinados a tratar una afección grave y cuya evidencia clínica preliminar indica que puede demostrar una mejora sustancial sobre la terapia disponible en una o varias variables clínicamente significativas, como la duración del efecto, la relevancia del resultado clínico observado mostrando una clara ventaja sobre la terapia disponible.

Autorización acelerada (*Accelerated Approval*): medicamentos indicados en afecciones graves que cubran una necesidad médica no satisfecha, que puedan ser autorizados precozmente basándose en una a más variables subrogadas (una medida de laboratorio o signo físico que se usa como sustituto de una variable clínicamente significativa que es una medida directa sobre lo que siente un paciente, sus funciones o su supervivencia y que se espera que prediga el efecto de la terapia).

Vía rápida (*Fast Track*): medicamentos que aborden enfermedades graves en las que puedan tener un impacto significativo sobre la supervivencia, el funcionamiento diario o la probabilidad de que la afección, si no se trata, progrese de una condición menos severa a una más severa, tales como el SIDA, la enfermedad de Alzheimer, la insuficiencia cardíaca y o cáncer.

Medicamento huérfano (*Orphan drug*): designación de un medicamento potencialmente útil para prevenir, diagnosticar o tratar una enfermedad rara; es decir, con menos de 200.000 pacientes/año (los que supone una prevalencia aproximada de 7,5/10.000 habitantes, en la actualidad).

Terapia avanzada de medicina regenerativa (*Regenerative Medicine Advanced Therapy*): cualquier medicamento de terapia celular, de ingeniería tisular, de células y tejidos humanos, o cualquier combinación de dichas terapias o productos, que esté destinado a tratar, modificar, revertir o curar una enfermedad o afección grave o potencialmente mortal; y que la evidencia clínica preliminar indica que el medicamento tiene el potencial de abordar necesidades médicas no cubiertas para dicha enfermedad o afección.

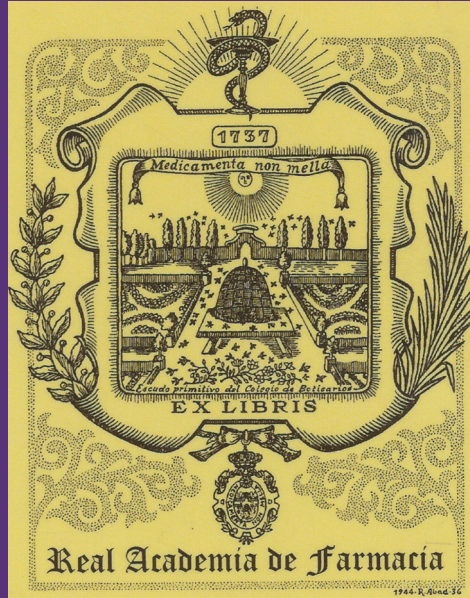
Producto Calificado para Enfermedades



Infecciosas. (*Qualified Infectious Disease Product*): un medicamento antibacteriano o antifúngico para uso humano destinado a tratar infecciones graves o potencialmente mortales, incluidas aquellas causadas por un patógeno resistente a antibacterianos o antifúngicos, incluidos patógenos infecciosos nuevos o emergentes.

Si desea citar nuestro artículo:
Medicamentos novedosos autorizados recientemente por ema y fda (3º trimestre de 2024)

Santiago Cuéllar Rodríguez
An Real Acad Farm (Internet).
An. Real Acad. Farm. Vol. 90. nº 3 (2024) · pp. 369-384
DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2023.90.03.06>



MINISTERIO
DE CIENCIA, INNOVACIÓN
Y UNIVERSIDADES

