

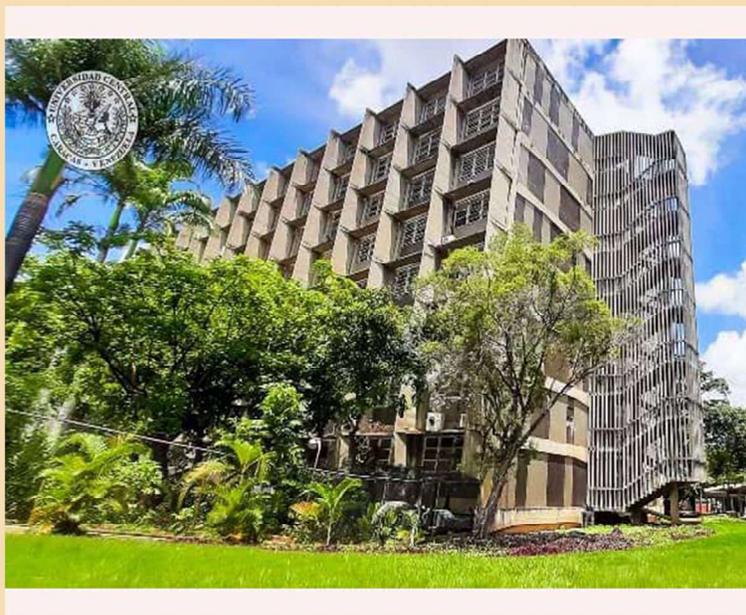
REVISTA FACULTAD DE
FARMACIA

Volumen 87

N^{os} 1 y 2

2024

ISSN: 0041-8307



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

Revista Facultad de Farmacia Universidad Central de Venezuela

Vol. 87 - N^{os} 1 y 2 - 2024
ISSN: 0041-8307
ISSN-e: 2739-0373
Depósito legal: 195902 DF 224
Caracas/Venezuela
Indexada en LILACS, Latindex y Revencyt

Universidad Central de Venezuela

Rector

Dr. Víctor Rago

Vicerrectora Académica

Dra. María Fátima Garcés

Vicerrector Administrativo

Dr. José Balbino León

Secretaria

Dra. Corina Aristimuño

Facultad de Farmacia Decano

Dr. Carlos Ciangherotti

Directora Administrativa

Dra. María Isabel Calderón

Coordinadora Académica

Esp. Dhilcia Astrid Pinto

Directora del Instituto de Investigaciones Farmacéuticas

Dra. María Gabriela Matos

Director de Postgrado

Dr. Michael Mijares

Coordinadora de Extensión

Esp. Marisol Gómez

Revista Facultad de Farmacia Editora

Dra. Anita Stern Israel

Comité Editorial

Dra. María Margarita Salazar-Bookaman

Dra. Alírica Suárez

Dr. Jaime Charris

Dra. Isabel Andueza

Dr. David De Souza

Dra. Miriam Regnault

Diagramación y montaje en línea

Yraiceles Jiménez (yrajimenez@gmail.com)

Dirección

Facultad de Farmacia UCV - Apartado 40.109
Caracas 1040-A - Venezuela

Portada: Facultad de Farmacia, UCV

Contenido

| | |
|--|-----|
| Carta al Editor | 3 |
| MARCO ÁLVAREZ, ELIANA NAVARRO, AURORA BARRIOS | |
| Sistemas CRISPR-CAS: una perspectiva histórica y estructural | 5 |
| CARLA NAVARRO, MARÍA P. DÍAZ, ANDREA DÍAZ, PABLO DURAN, ANA CASTRO, EMMA GUTIÉRREZ, CLÍMACO CANO, ANA-KARINA CARBONELL-ZABAleta, VALMORE BERMÚDEZ | |
| Síntesis y evaluación preliminar como tripanocida y leishmanicida de una serie de análogos del ácido-2-fenil-benzotiazol-6-carboxílico | 39 |
| ALI MIJOBA, ZULEYMA BLANCO, NEREIDA PARRA, FRANCIS GÓMEZ, ESTEBAN FERNANDEZ-MOREIRA, HEGIRA RAMÍREZ, XENÓN SERRANO, JAIME CHARRIS | |
| La dimetilarginina asimétrica y el óxido nítrico en la Aterosclerosis. Su papel como marcador sérico de la aterosclerosis | 48 |
| LETICIA FIGUEIRA, JULIO CÉSAR GONZÁLEZ | |
| On the path to a diabetes cure: a critical appraisal of developments in pancreatic beta cell encapsulation and implantation | 62 |
| MARÍA DÍAZ, OMAR A. ROSS, HELIANA PARRA, CARLA NAVARRO, WHEELER TORRES, RUBÉN CARRASQUERO, ANA-KARINA CARBONELL-ZABAleta, VALMORE BERMÚDEZ | |
| La Unión Europea y los Fondos Europeos | 82 |
| MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO, GINÉS TOCÓN PASTOR | |
| Prevalencia de anemia, leucopenia y trombocitopenia en una población adulta en el servicio de hospitalización de una institución prestadora de servicios de salud de tercer nivel, Sincelejo-Sucre | 105 |
| IRENE TOVÍO-MARTÍNEZ, ALMA LUNA-MANJARREZ, NERLIS PÁJARO-CASTRO, EDGAR VERGARA-DAGOBETH | |
| Caso clínico: Lepra Lepromatosa | 116 |
| VALMORE BERMÚDEZ, MARÍA JOSÉ CALVO, NAILET ARRAIZ, MARICARMEN CHACÍN | |
| Bioética: Una visión general | 126 |
| MARÍA MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN | |
| Normas de publicación | 141 |



Esta Revista se publica bajo el auspicio del
Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico
Universidad Central de Venezuela.



CDCH-UCV



Carta al Editor

MARCO ÁLVAREZ¹, ELIANA NAVARRO², AURORA BARRIOS³

El grupo de investigación, particularmente el del Laboratorio de Microscopia del Instituto Anatómico "José Izquierdo" de la Facultad de Medicina de Universidad Central de Venezuela, a través de esta "Carta al Editor", desea presentar un tema que merece ser divulgado entre toda aquella comunidad de jóvenes y no tan jóvenes investigadores que se adentran en el tortuoso, pero emocionante y gratificante camino de la investigación científica.

El tema se ha titulado: Los modelos animales no convencionales en la investigación biomédica; modelos a ser usados como una alternativa en todos aquellos bioensayos que requieran la valoración en animales. Su uso contribuye con las reglas del Principio de las tres erres (3R) que hacen referencia al Reemplazo, Reducción y Refinamiento, aplicables para el uso de animales en la investigación científica. Nos referimos entonces al modelo adulto y larvario del pez cebra conocido como *Danio rerio* y del increíble modelo de estadio larvario del tan temido mosquito *Aedes aegypti*.

El pez cebra, es un modelo animal emergente que ha ganado popularidad en la investigación biomédica básica. Este

pez posee características que lo hacen atractivo para la investigación, como su alta fecundidad, su rápido desarrollo desde el estadio embrionario hasta el estado adulto, y el bajo costo de los insumos necesarios para su crianza y reproducción. En la investigación toxicológica, el pez cebra ha sido utilizado en distintos estadios de desarrollo, desde embriones hasta adultos, para evaluar la toxicidad y la teratogenicidad de compuestos químicos. Estudios recientes han sugerido que los embriones del pez cebra responden a los compuestos tóxicos de manera similar a los mamíferos, debido a su similitud en desarrollo embrionario, metabolismo, fisiología y vías de señalización. Además, el pez cebra se utiliza como modelo en investigaciones biomédicas, tanto en su estado embrionario y larvario como en su fase adulta por la alta similitud genética que comparte con el genoma humano, hasta en un 70%. Este pez ha surgido como organismo modelo para estudios en genética, biología del desarrollo, bio-monitoreo y toxicidad de sustancias químicas debido a su sensibilidad y capacidad de respuesta. Por su parte, el estadio larvario del mosquito *Aedes aegypti*, ha sido utilizado como un modelo no convencional en la investigación biomédica debido a su importancia en

Sección de Microscopia, Instituto Anatómico José Izquierdo, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. República Bolivariana de Venezuela. Caracas 1040, Distrito Capital. Correspondencia: marco.alvarez@ucv.ve

Orcid: [10000-0002-1781-4532](https://orcid.org/0000-0002-1781-4532)

[20000-0002-4049-061X](https://orcid.org/0000-0002-4049-061X)

[30000-0002-4712-0793](https://orcid.org/0000-0002-4712-0793)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Rev. Fac. Farmacia 87(1y2): 03-04. 2024

la transmisión de enfermedades como el dengue y la fiebre amarilla. Este mosquito, originario de África, se encuentra ahora en regiones tropicales, subtropicales y templadas en todo el mundo. El estadio larvario del *Aedes aegypti* ha sido objeto de investigaciones vinculadas con la proliferación del vector en relación con el aumento de hábitats larvarios por viviendas.

En los últimos años, ambos modelos han permitido contribuir con resultados de experimentación, publicados en prestigiosas revistas nacionales e internacionales, aportando así, nuevos conocimientos al universo de la literatura de la toxicología experimental (Sofyantoro y col., 2019; Álvarez y col., 2021; Barrios Rudas y col., 2022).

Con ellos, al querer indagar sobre la toxicidad de agentes nocivos, hemos podido hacer uso de la gran adaptabilidad que ambos modelos tienen ante los cambios inducidos por factores intrínsecos y extrínsecos de distinta naturaleza; dando así, muestras de su altísimo valor científico en el campo de los estudios simultáneos sobre el eje fisiológico, locomotor-cardíaco, en un mismo animal. Esto ha permitido registrar y analizar respuestas morfo funcionales, a través de protocolos sencillos, pero de gran valor, como el *ZeGlobalTox* y el *AaGlobalTox*.

El *ZeGlobalTox* es un procedimiento experimental novedoso que integra el análisis de cardio, neuro y hepatotoxicidad en un solo procedimiento. Los tres ensayos secuenciales se realizan en las mismas larvas de pez cebra, lo que permite reducir el número de animales utilizados en comparación con evaluaciones paralelas y agilizar el proceso experimental. Además, la alta predictibilidad de *ZeGlobalTox*

permite reducir el uso de mamíferos para la detección de toxicidad en órganos en etapas posteriores de la investigación. Por su parte, *Aa-globalTox* o *Aa-Integral-Tox* es un protocolo innovador para evaluar la neuro-cardiotoxicidad haciendo uso de larvas del mosquito *Aedes egypti*.

De manera que deseamos que ésta breve presentación del tema, a través de las experiencias vividas y publicadas, con los modelos animales no convencionales expuestos, sirva de motivación y promoción para comenzar a pensar en ellos como una alternativa en la experimentación biomédica. Cabe acotar que, además, estos modelos han resultado tener un mínimo costo, que no limita su adquisición ni su mantenimiento, como es el caso de los modelos animales convencionales.

Queda entonces invitarlos a su exploración.

Referencias Bibliográficas

- Sofyantoro F, Nur Indah Septriani NI, Satria Yudha D, Adhi Wicaksono E, Sendi Priyono D, Aristyaning Putri W, Primahesa A, Puji ARaharjeng AR, Purwestri YA, Nuringtyas TR. 2019. Zebrafish as Versatile Model for Assessing Animal Venoms and Toxins: Current Applications and Future Prospects. *Zebrafish* 16(4):379-387.
- Álvarez M, Zanotty Y, Perdomo L, Rodríguez-Acosta A. 2021. Development of an innovative zebrafish (*Danio rerio*) smear/imprint in vitro assay for rapid preliminary inspection of snake venom toxinological effects. *Journal of Experimental and Applied Animal Sciences* 3(3):151-163.
- Barrios Rudas ADV, Álvarez Ochoa MA, Navarro E. 2022. Índices de funcionalidad en las larvas del mosquito *Aedes aegypti* ante la acción del Fipronil: Una aproximación experimental. *Revista de la Facultad de Farmacia* 85(1 y 2): 100-110.



Sistemas CRISPR-CAS: una perspectiva histórica y estructural

CRISPR-CAS systems: a historical and structural perspective

CARLA NAVARRO^{*1}, MARÍA P. DÍAZ^{*2}, ANDREA DÍAZ^{*3}, PABLO DURAN^{*4}, ANA CASTRO^{*5}, EMMA GUTIÉRREZ^{*6}, CLÍMACO CANO^{*7}, ANA-KARINA CARBONELL-ZABAETA^{**8}, VALMORE BERMÚDEZ^{**,**9}

Resumen

Hace 40 años comenzó el viaje de la edición genética a través de las zinc-finger nucleasas (ZFN) y las nucleasas de tipo activador de la transcripción (TALENs). El camino parecía largo y lleno de obstáculos debido a los potenciales efectos secundarios y limitaciones de dichas técnicas. No obstante, en el año 2002, después de años de interrogantes en la comunidad científica con respecto a la existencia de secuencias genéticas repetidas en distintos microorganismos, se nombra a dichas secuencias como *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR). Desde ese momento, no se ha detenido la investigación determinando sus funciones, clasificación y potenciales usos en la edición de material genético de cualquier organismo, proveyendo ventajas con respecto a las técnicas utilizadas con anterioridad. En años recientes, su aporte a la medicina ha ganado cada vez más atención, suscitando el descubrimiento de nuevas aplicaciones siempre en constante actualización. Por ello, es necesario entender qué es el sistema CRISPR-Cas desde sus bases, estando atentos a sus avances en el futuro.

Palabras clave: Sistema CRISPR-Cas, edición génica, tecnología genética

Abstract

Forty years ago, the journey of gene editing through zinc finger nucleasas (ZFNs) and transcription activator-like nucleasas began; the road seemed long and full of obstacles due to these techniques' potential side effects and limitations. However, in 2002, after years of questioning in the scientific community regarding the existence of repeated genetic sequences in different microorganisms, these sequences were named clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR). Since then, their research has not stopped, determining their functions, classification and potential uses in the editing of genetic material of any organism, providing advantages with respect to the techniques previously used. In recent years, its contribution to medicine has gained more and more attention, leading to the discovery of new applications that are constantly being updated. The potential of CRISPR-Cas systems in medicine is immense, inspiring hope and excitement for the future of healthcare. Therefore, it is necessary to understand what the CRISPR-Cas system is from its bases and be attentive to its future advances.

Keywords: CRISPR-Cas system, gene editing, gene technology

*Endocrine and Metabolic Diseases Research Center. School of Medicine. University of Zulia. Maracaibo, Venezuela.**Universidad Simón Bolívar, Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Medicina, Barranquilla, Colombia.***Universidad Simón Bolívar, Facultad de Ciencias de la Salud. Centro de Investigaciones en Ciencias de la Vida. Barranquilla, Colombia.

Correspondencia: cpm24@gmail.com

Orcid: [10000-0002-1321-9568](https://orcid.org/0000-0002-1321-9568)

[20000-0001-6295-0229](https://orcid.org/0000-0001-6295-0229)

[30000-0002-3570-3860](https://orcid.org/0000-0002-3570-3860)

[40000-0002-8030-1780](https://orcid.org/0000-0002-8030-1780)

[50000-0003-0417-0210](https://orcid.org/0000-0003-0417-0210)

[60000-0002-9394-6764](https://orcid.org/0000-0002-9394-6764)

[70000-0002-8103-3714](https://orcid.org/0000-0002-8103-3714)

[80009-0001-3690-9721](https://orcid.org/0009-0001-3690-9721)

[90000-0003-1880-8887](https://orcid.org/0000-0003-1880-8887)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.1-2.2](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.1-2.2)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 15/02/2024

Aprobación: 20/05/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(1y2): 05-38. 2024

Introducción

Los CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas, o *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), son el típico ejemplo de una herramienta que surge inesperadamente de un descubrimiento no dirigido precisamente a su desarrollo en particular (Ishino y col., 1987). Desde sus comienzos como una intrigante repetición de secuencias en el genoma de ciertos organismos, como arqueas y bacterias, aportando resistencia a patógenos específicos (Brouns y col., 2008), hasta el inédito recurso biotecnológico que es actualmente (Moon y col., 2019), CRISPR ha demostrado ser un tema presto a debates científicos y éticos, abriendo paso a novedosas soluciones y sus problemáticas implicaciones a futuro (Brokowski y Adli, 2020).

CRISPR es una naciente herramienta de edición génica que ha ido tomando forma y tracción con el pasar de los años. Su uso no se limita a un único campo de las ciencias, facilitando la ingeniería genética de plantas en la agricultura (Xing y col., 2014; Chen y col., 2019), identificando y validando los mecanismos de enfermedades genéticas y sus blancos terapéuticos, contribuyendo al diseño de modelos animales de enfermedades (Zhou y col., 2014) y en algunos casos llegando hasta el área de lo clínico, con estudios en humanos en curso para el tratamiento de cáncer, VIH y algunos trastornos hematológicos (Institut de Recherche Internationales Servier, 2021; Sangamo Therapeutics, 2021; Vertex Pharmaceuticals Incorporated, 2021).

La necesidad de lograr la mayor exactitud posible con este tipo de herramientas para evitar las complicaciones catastróficas que

podría implicar la edición génica (Baltimore y col., 2015; Check, 2002), ha llevado al desarrollo de sistemas de precisión como lo es el CRISPR/Cas9, por nombrar alguno, haciendo posible señalar y actuar con exactitud sobre los genes blancos reales (Mali y col., 2013). Por supuesto, de la mano con el interés general de comunidad científica y la cantidad astronómica de nuevos estudios al respecto, el uso de CRISPR trae consigo serias limitaciones éticas y técnicas que siguen y seguirán en discusión en los años venideros (Brokowski, 2018; Olson y col., 2016), entrando en los debates morales sobre la experimentación humana en embriones, con comités internacionales conviniendo sobre su uso en células somáticas, mientras que limita su uso en células germinales citando el desconocimiento sobre sus posibles efectos a futuro (Matthews y Iltis, 2019).

El futuro en la biotecnología anuncia grandes cambios enmarcados dentro del contexto de CRISPR, incentivando nuevas líneas de estudio, buscando consolidar los conocimientos ya obtenidos y su aplicación práctica, delineando de manera clara sus limitaciones técnicas y áreas de mejoría. De esta manera, el objetivo de esta revisión es presentar la información actual sobre CRISPR como herramienta desde sus inicios hasta sus nuevos horizontes, haciendo hincapié en la descripción profunda de su funcionamiento y aplicabilidad en el ámbito médico.

CRISPR: DE SECUENCIA INTRIGANTE A HERRAMIENTA POTENCIAL

Durante la década de los 80 surgieron por primera vez tecnologías de edición génica como los *zinc-finger nucleases* (ZFN) o nucleasas de tipo activador de la

transcripción (TALENs) con la finalidad de modificar el material genético. A pesar del gran avance que supuso su descubrimiento en el campo de la genética, la falta de especificidad y con ello el gran margen de efectos secundarios potenciales supuso una gran limitación en su implementación, generando a su vez la necesidad de diseñar nuevas tecnologías más seguras y eficaces (Miller y col., 1985; Miller y col., 2011; Shao y col., 2013).

De esta forma, el descubrimiento de las primeras secuencias CRISPR se remonta a décadas atrás. Ishino y col. (1987) realizaron un trabajo de investigación cuyo objetivo era estudiar el gen *iap* en *E. coli* K12. Durante su desarrollo, los autores reportaron que, cerca del gen *iap*, se encontraban secuencias genéticas desconocidas de ADN de 29 nucleótidos repetidas y separadas por intervalos aleatorios de 32 nucleótidos. Sin embargo, en ese momento no se determinó su importancia biológica. Dos años después, se observaron resultados similares que podrían reproducirse en especies *Shigella* y *Salmonella* (Nakata y col., 1989), mientras que en 1991, estas secuencias fueron identificadas en bacterias Gram positivas como *M. tuberculosis*. Por otro lado, no fue hasta 1993 que Mojica y col. observaron dichas secuencias en archaeas, específicamente, en *H. mediterranei*. Luego en 1995, se descubrió una clase distinta de repeticiones de ADN presente en numerosas archaeas, así como la funcionabilidad de las mismas en estos microorganismos; sin embargo, aún faltó mucho por dilucidar (Mojica y col., 1995).

Los estudios de estas secuencias extrañas fue incrementando, siendo Mojica y col. (2000) quienes evidenciaron que estas secuencias se repetían en gran diversidad de bacterias (>40%) y

archaeas (>90%), además de encontrarse funcionalmente relacionadas. En esta oportunidad, dichas secuencias fueron denominadas repeticiones cortas espaciadas regularmente (SRSR) y se pensaba que poseían funciones biológicas que aún no habían sido esclarecidas. Luego, en el año 2002, Jansen y col. (2002) le acuñaron a esta secuencia desconocida el nombre de CRISPR, aunado a la identificación de los genes asociados a CRISPR (Cas) adyacentes a los elementos repetidos (Cas1-Cas4).

Asimismo, Mojica y col. (2005) demostraron que las secuencias espaciadoras que separaban las repeticiones idénticas coincidían con fragmentos del genoma de fagos, resultados similares a los observados por Pourcel y col., 2005. En este sentido, Bolotin y col. (2005) mediante un estudio en *S. thermophilus*, reveló genes codificadores de Cas distintos a los descritos previamente, en este caso, los genes de una proteína de mayor tamaño que predijeron podría presentar actividad nucleasa, denominada Cas9. A su vez, evidenciaron que en los distintos espaciadores había cierta secuencia ubicada en sus extremos que se repetía, lo que actualmente se conoce como motivo adyacente al protoespaciador (PAM).

A partir de estos hallazgos, comenzaron a desarrollarse las hipótesis de que CRISPR cumplía un papel importante en los sistemas de defensa bacterianos. Sin embargo, no fue hasta 20 años posterior a su descubrimiento que Barrangou y col. (2007) establecieron a CRISPR como un sistema de inmunidad adaptativa bacteriana. En dicho estudio, se evaluó la respuesta de *S. thermophilus* ante el ataque de fagos, una problemática común en las industrias de lácteos, observándose que esta bacteria incorporaba a su locus

CRISPR nuevos espaciadores derivados del ADN extraño proveniente de fagos, sirviendo como memoria para el reconocimiento y ataque de secuencias homólogas en próximas reinfecciones, en las que destacó Cas9 como la única proteína requerida para dicho proceso.

Al año siguiente, se fueron dilucidando los modelos de cómo podía ocurrir este proceso de inmunidad adaptativa y mediante cual maquinaria bacteriana. Así, Brouns y col. (2008), en un modelo de *E. coli* K12, demostraron que las procariontas adquieren resistencia a los virus integrando fragmentos cortos de ácido nucleico viral en grupos de repeticiones palindrómicas cortas regularmente espaciadas (CRISPR). Las proteínas asociadas a CRISPR (Cas) del huésped utilizan las secuencias derivadas de virus contenidas en CRISPR para mediar una respuesta antiviral que contrarresta la infección. Después de la transcripción de CRISPR, un complejo de proteínas Cas denominado Cascade, escinde un precursor de ARN CRISPR (ARNcr) en cada repetición y retiene los productos de escisión que contienen la secuencia derivada del virus. Con la ayuda de la helicasa Cas3, estos ARN CRISPR maduros sirven como pequeños ARN guía que permiten a Cascade interferir con la proliferación del virus. Esto demostró que la formación de ARN guía maduros, por la subunidad de endonucleasa de ARN CRISPR de Cascade, es un requisito mecanicista para la defensa antiviral. Estos autores concluyeron que la transcripción de regiones CRISPR y la escisión del pre-ARNcr en ARNcr maduros mediante proteínas Cas, es la base molecular de la etapa de defensa antiviral del sistema CRISPR/cas, que permite a los procariontas prevenir eficazmente la depredación de fagos. De manera similar, Marraffini y col. (2008) descubren la existencia del sistema CRISPR

subtipo III-A y reportan que la diana de los sistemas CRISPR era el ADN, ya que este interfirió con la transferencia horizontal de secuencias de ADN de plásmidos en un modelo de *S. aureus*. En contraste con estudios previos, Hale y col. (2009), dilucidaron que el ARN también podía ser diana de esta maquinaria de inmunidad adaptativa, y describieron el complejo Cmr del sistema tipo III-B de *P. furiosus*, el cual demostró actividad ARNsa dirigida por ARNcr.

El incremento de la evidencia referente a los sistemas CRISPR vino acompañado de un auge en la investigación sobre los mismos durante la última década. Garneau y col. (2010) demostraron que el sistema *Streptococcus thermophilus* CRISPR1/Cas también puede adquirir espaciadores de forma natural a partir de un plásmido autorreplicante que contiene un gen de resistencia a los antibióticos, lo que provoca la pérdida de plásmido. También mostraron evidencia *in vivo* que el sistema CRISPR1/Cas escinde en sitios específicos el ADN bihelical de plásmidos y bacteriófagos dentro del protoespaciador. Así, describen el mecanismo de interferencia CRISPR-Cas a través de proteínas Cas (*Cas9*, *Cas1*, *Cas2*, y *Csn2*), que cortan el ADN diana en sitios precisos. La unión de la Cas9 requiere la presencia de una secuencia *motif* adyacente al protoespaciador (PAM, *Protospacer Adjacent Motif*) en la secuencia blanco que funciona como una suerte de asa molecular a la que se sujeta la nucleasa. Una vez que la Cas9 se une al sitio blanco con una coincidencia en secuencia entre el crARN y el ADN blanco, corta el ADN tres bases 5' o corriente arriba (*upstream*) del sitio PAM.

Posteriormente, el año 2011 estuvo lleno de sorpresas y descubrimientos

transcendentales, ya que Deltcheva y col. (2011) al realizar una secuenciación del ARN bacteriano de *S. pyogenes*, observaron que aunado al crARN, existía otro ARN pequeño con el que este formaba un dúplex que era necesario para guiar a Cas9 hacia su objetivo, el cual sería llamado ARN trans-activador (ARNtracr). En efecto, el tercer elemento del locus CRISPR es la secuencia tracr ARN (*trans-activating* CRISPR RNA, por sus siglas en inglés) cuyo transcrito representa, sorprendentemente, el tercer ARN más abundante después de rARN y tARN. El transcrito ARNtracr es un pequeño ARN no codificante que posee una secuencia de 24 nucleótidos de casi perfecta complementariedad con las secuencias repetidas del arreglo CRISPR que también son transcritas como un precursor largo pre-crRNA (CRISPR ARN).

En mayo del mismo año, Makarova y col. (2011) propusieron la primera clasificación de los sistemas CRISPR-Cas, basada en las semejanzas y evolución de los mismos, dividiéndose en 3 tipos: sistemas tipo I, II y III, cada uno con diversos subtipos. Dos meses después, Saprunauskas y col. (2011) evidenciaron como los sistemas CRISPR podían funcionar de manera heteróloga entre otras especies, puesto que se clonó el sistema CRISPR de *S. thermophilus* (sistema tipo II) y se transfirió a una especie de *E. coli*, confirmando a ésta resistencia a los plásmidos, considerándose así a los sistemas CRISPR como unidades autónomas y posiblemente manipulables.

No obstante, no fue hasta 2012 que esto pudo ser comprobado por Jinek y col., quienes demostraron como el crARN y el tracrARN podían ser fusionados para crear una única guía sintética para el ataque de los ácidos nucleicos dianas, es decir, dicho sistema podía ser reprogramado. También,

se observó que la alteración de algunos de los genes que codifican Cas9 podían alterar su funcionamiento y caracterizaron los mecanismos de acción bioquímicos y mecánicos de los sistemas CRISPR tipo II; resultados similares fueron reportados por Gasiunas y col. (2012).

Dichos hallazgos fueron la piedra angular para las subsecuentes investigaciones referentes a los sistemas CRISPR como herramienta de edición genética, abriendo así las puertas a una nueva era en este campo. En este sentido, en enero del 2013, diversos equipos de investigación independientes comunicaron la exitosa edición del genoma bacteriano y de mamíferos entre los que destacan Cong y col. (2013), quienes fueron los primeros en adaptar CRISPR-Cas9 para la edición del genoma de las células eucariotas. Para ello, diseñaron 2 ortólogos Cas9 distintos, uno para *S. thermophilus* y otro para *S. pyogenes*, y se demostró que estos podían ser programados para escindir múltiples locus genéticos y reparar secuencias dirigida por homología en células humanas y de ratón *in vitro*. Aunque la reprogramación del sgARN no era un descubrimiento para ese tiempo, dicho artículo y el de Mali y col. (2013) fueron la base que brindó a la comunidad científica el conocimiento acerca de cómo este sistema podía ser implementado fácilmente para la edición del genoma.

Desde ese momento, CRISPR-Cas9 ha sido considerado una nueva herramienta de edición genética, aparentemente para cualquier organismo, capaz de conferir una capacidad inimaginable para editar y controlar el genoma (Xing y col., 2014). La gran aplicabilidad y auge en la utilización de los sistemas CRISPR en comparación con herramientas de edición genéticas previas,

radica en la accesibilidad económica a esta, aunado a su especificidad, simplicidad de ejecución y adaptabilidad (Cox y col., 2015; Fellmann y col., 2017; Adli, 2018). Es por ello que, los sistemas CRISPR han cambiado la investigación en muchas áreas de las ciencias biológicas, ya sea permitiendo la realización de estudios epigenéticos más complejos (Vora y col., 2016; Xie y col., 2018), facilitando la ingeniería genética en las plantas (Raitskin y Patron, 2016), además de utilizarse para el tratamiento de enfermedades genéticas (Papasavva y col., 2019), inmunológicas (Xiong y col., 2016; Ferdosi y col., 2019) infecciosas (Kennedy y Cullen, 2017), así como ser considerado una posible herramienta contra el cáncer (Huang y col., 2018).

Ahora bien, Makarova y col., en el año 2015, actualizaron la clasificación evolutiva de los sistemas CRISPR. Esta nueva clasificación engloba a 2 clases (Clase 1 y 2) – que difieren sustancialmente en el modelo estructural de sus complejos de procesamiento y ataque –, 5 tipos (I, II, III, IV, y V) y 16 subtipos. Sin embargo, Shmakov y col. (2015), mediante un análisis computacional de secuencias, describieron una nueva proteína efectora correspondiente a la Clase 2 (C2n2), dando como resultado la caracterización del sistema CRISPR tipo VI. En diciembre de ese año, la tecnología CRISPR fue designada como “descubrimiento del año” por la revista Science (Travis, 2015), y en el 2016, Emmanuelle Charpentier, Jennifer Doudna, Roudolphe Barrangou, Philippe Horvath y Feng Zhang fueron galardonados con el Premio Internacional Canadá Gardiner, por sus aportes a la investigación relacionada a CRISPR y su impacto en el campo de la medicina (“2016 *Canada Gairdner Award Winners*”). Y en octubre del año 2020, se

le otorgó el premio Nobel de Química a las científicas Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, por haber desarrollado un método para la edición del genoma (*The Nobel Prize in Chemistry* 2020).

Durante los últimos años, los descubrimientos referentes a la evolución, mecanismos, utilidad y clasificación de los sistemas CRISPR siguieron avanzando. Según las últimas actualizaciones relacionadas a la clasificación de dichos sistemas, existen 2 clases, 6 tipos y 33 subtipos (Koonin y col., 2017). A pesar del gran crecimiento de la ciencia con respecto a los sistemas CRISPR y su papel en la edición genética, aún queda un largo camino que recorrer para terminar de explorar la clasificación y mecanismos relacionados a los mismos, así como el desarrollo de estrategias para poner en práctica esta maravillosa herramienta.

CRISPR-CAS: BASES ESTRUCTURALES Y CLASIFICACION

Estructura General de los Sistemas CRISPR-Cas

CRISPR/Cas es un sistema basado en una endonucleasa guiada por RNA que permite llevar a cabo edición génica en numerosos organismos, que está revolucionando el campo de la ingeniería genética y que ha logrado un desarrollo sorprendente de aplicaciones. Con CRISPR/Cas es posible cambiar bases, un gen o incluso varios genes a la vez. CRISPR/Cas, de sus siglas en inglés Repeticiones Palindrómicas Cortas Regularmente Interespaciadas y Agrupadas (CRISPR), y de Asociados a CRISPR (Cas), es un sistema inmune adaptativo de origen bacteriano basado en dos RNA (tracrRNA,

crRNA) y una endonucleasa (típicamente Cas9 o sus ortólogos), con capacidad para rastrear y cortar secuencias de ácidos nucleicos invasores, procedentes de fagos o elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones.

El sistema CRISPR/Cas está formado por las secuencias genómicas que codifican los componentes del nivel efector. Un locus CRISPR/Cas típico contiene una agrupación de secuencias CRISPR (CRISPR array) y los genes asociados Cas. Las CRISPR son secuencias compuestas de repeticiones palindrómicas cortas de ADN que separan regularmente secuencias únicas denominadas espaciadores no homólogos (Haft y col., 2005). Asimismo, las repeticiones van desde los 24 a 48 pares de bases aproximadamente. Estos espaciadores (21-22 bp) derivan de ácidos nucleicos invasores (protoespaciadores) y actúan como huella dactilar que le permiten a un huésped procariótico recordar a qué invasiones ha estado expuesto, las cuales a diferencia de las repeticiones palindrómicas sí poseen homología con genes existentes, en su mayoría derivados de fagos y otros elementos extra cromosómicos (Bolotin y col., 2005). Adicionalmente, el locus CRISPR codifica productos ribonucleicos no codificantes necesarios para las funciones inmunitarias del sistema (Perez-Pinera y col., 2015). Las CRISPR codifican un precrRNA que es procesado para rendir un crRNA. El crARN es una molécula ribonucleica presente en todos los sistemas y complementaria a uno o varios protoespaciadores presentes en el locus, en consecuencia, el crARN actúa como una guía para los elementos proteicos efectores, conduciéndolos hasta el fragmento de material genético complementario a la molécula (Liao y col., 2019). El crRNA, a través de homología de

secuencias, guía a la nucleasa Cas9 hacia los ácidos nucleicos a silenciar. Los genes Cas codifican varias nucleasas implicadas en la adquisición de nuevos espaciadores, en el procesado del precrRNA y en el corte y destrucción de elementos genéticos enemigos. De forma similar el locus CRISPR de algunos sistemas contiene el gen CRISPR ARN transactivador (tracrARN), el cual genera una molécula esencial para el procesamiento de pre-crARN así como su posterior conversión a crARN maduros en sistemas tipo II y tipo VI principalmente (Scott y col., 2019). Generalmente, el crARN-tracrARN se asocian a proteínas Cas, formando un complejo denominado RNP (*Ribonucleoprotein Particle*) (Foster y col., 2018). De la misma manera, adyacente al locus CRISPR se encuentra el operón de los genes Cas, estos loci codifican al segundo componente característico del complejo, las proteínas Cas (Liu y col., 2020). Dichas proteínas poseen funciones y estructuras diversas según su tipo, asimismo, la ausencia o presencia de estos elementos varía según el tipo de CRISPR-Cas específico, siendo esta una de las principales bases para la clasificación de los sistemas (Makarova y col., 2018).

Mas allá de la gran variabilidad de estas moléculas, las proteínas efectoras individuales poseen un modelo canónico compuesto por 2 lóbulos, el lóbulo de reconocimiento alfa helicoidal (REC), compuesto por dominios alfa helicoidales y el lóbulo nucleasa (NUC), el cual a pesar de su gran variabilidad contiene típicamente alrededor de 3 dominios (Jinek y col., 2014), el primero se refiere al HNH, que tiene actividad similar a una endonucleasa, por ende, escinde el ADN de la secuencia de ARN guía; en segundo lugar se encuentra la nucleasa Ruv-c-like, que se encarga

de escindir la hebra de ADN contraria a la hebra complementaria, finalmente, el dominio C-terminal (CTD) que interactúa con PAM (Chen y col., 2014; Sternberg y col., 2014). Asimismo, en algunos tipos el lóbulo NUC posee dominios PI encargados del reconocimiento de secuencias PAM en sistemas cuyo blanco sea ADN o bien RRM en el caso de sistemas orientados a la escisión de ARN (Koonin y Makarova, 2013).

Mecanismo de Adaptación en Sistemas CRISPR-Cas

Las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR) y las proteínas asociadas a CRISPR (Cas) constituyen un sistema inmunológico adaptativo en procariontes. El sistema preserva recuerdos de infecciones anteriores mediante la integración de segmentos cortos de ADN extraño, denominados espaciadores, en la matriz CRISPR en un proceso denominado adaptación.

La mayoría de las arqueas y muchas bacterias codifican sistemas CRISPR-Cas que confieren inmunidad adaptativa contra elementos genéticos móviles (*mobile genetic elements*, MGE) (Makarova y col., 2015). Los mecanismos que participan en la inmunidad dependen de pequeños ARN CRISPR (crARN) que guían a las proteínas Cas para escindir ácidos nucleicos extraños complementarios de una manera específica de secuencia (Barrangou y col., 2007; Brouns y col., 2008; Garneau y col., 2010; Hale y col., 2009; Marraffini y Sontheimer, 2008). El sello distintivo de los sistemas CRISPR-Cas es la matriz CRISPR, que consiste en secuencias cortas repetidas (repeticiones) intercaladas por elementos de secuencia únicos (espaciadores), que

frecuentemente derivan de MGE como plásmidos y virus (bacteriófagos/fagos) (Pourcel y col., 2005; Bolotin y col., 2005). La matriz está precedida por un líder rico en AT que contiene un promotor. La transcripción de la matriz CRISPR genera moléculas de ARN precursoras que se procesan aún más para generar ARNcr maduros. En este contexto, las secuencias espaciadoras proporcionan la especificidad de secuencia para la interferencia con ácidos nucleicos invasores.

Los genes Cas, ubicados proximales a la matriz CRISPR, codifican las proteínas Cas que desempeñan funciones en las diferentes etapas de la inmunidad.

Tras la invasión de un MGE, el sistema CRISPR-Cas actúa en tres fases: (1) adaptación (o adquisición), en la que se inserta un nuevo espaciador derivado de una secuencia invasora en la matriz CRISPR; (2) biogénesis de crARN, en la que se transcribe la matriz CRISPR y el crARN precursor resultante se procesa en crARN maduros; e (3) interferencia, en la que el ácido nucleico extraño es atacado y degradado por un complejo de ribonucleoproteína Cas-ARNcr (Marraffini, 2008).

La fase de adaptación, es el proceso por el cual la bacteria adquiere secuencias protoespaciadoras nuevas (McGinn y Marraffini, 2019). Todo se inicia cuando un motivo PAM es reconocido en una molécula de ADN invasora. Con acción de las proteínas Cas1 y Cas2 en hexámeros, una serie de ataques nucleofílicos, uniones covalentes y el trabajo de una ADN polimerasa que completa las secuencias, se logra la inserción de un nuevo protoespaciador al genoma del procarionte, eximiendo de este a la secuencia PAM (McGinn y Marraffini, 2019). En el caso de que el protoespaciador sea de

ARN, se añade a los pasos una transcripción inversa por una enzima también codificada en el locus CRISPR-Cas para que el ARN sea convertido a ADN (Makarova y col., 2020). La fase dos, que es la fase de expresión, ocurre cuando el locus completo de CRISPR-Cas es transcrito como un solo pre-ARN de CRISPR (pre-ARNcr). En este punto es necesaria la maduración del pre-ARNcr a través de escisiones que culminan en el ARN de CRISPR (ARNcr), que se compone de la secuencia palindrómica complementaria en su conformación secundaria tipo horquilla, y la secuencia protoespaciadora, que será la guía hacia la secuencia del ADN invasor (Makarova y col., 2020). Finalmente, la fase de interferencia se refiere al proceso por el cual el sistema CRISPR-Cas encuentra la secuencia de ácido nucleico foráneo guiado por el ARNcr, al ser reconocido, el ácido nucleico foráneo es escindido e inactivado por complejos proteicos de nucleasas Cas u otras nucleasas, dependiendo del tipo de sistema del cual se trate (Makarova y col., 2020).

Algunos sistemas de CRISPR-Cas pueden escindir ADN y otros ARN (Hale et al., 2009; Marraffini y Sontheimer, 2008). Los sistemas con actividad ADNasa tienen la encomienda de detectar de manera temprana la inserción de una molécula de ADN proveniente, por ejemplo, de un virus. Por otro lado, los sistemas con actividad ARNasa pueden frenar la infección en una fase tardía, cuando el virus ha logrado expandirse al realizar la transcripción a ARN, que posteriormente se pueda traducir a nuevas partículas virales. Los sistemas ARNasa tienen la característica de hacer cortes colaterales, escindiendo las moléculas a su alrededor y no solo aquella inicialmente detectada, y de esta manera pueden cortar todo el ARN viral que se

encuentre a su alrededor (van Beljouw y col., 2023).

Barrangou y col. (2007) fueron los primeros en demostrar la naturaleza adaptativa de la inmunidad CRISPR-Cas, confirmando las hipótesis anteriores que el sistema CRISPR-Cas transmite inmunidad contra MGE (Makarova y col., 2006; Mojica y col., 2005; Pourcel y col., 2005). Desafiar a la bacteria *Streptococcus thermophilus* con fagos dio como resultado la adquisición de espaciadores que se originan en fagos en la matriz CRISPR, lo que proporcionó resistencia a los fagos coincidentes en caso de una infección adicional. La identificación de la absorción del espaciador tras la exposición a fagos demostró ser una medida eficaz para analizar la dinámica de la población. Los experimentos de co-cultivo a largo plazo, combinados con enfoques metagenómicos mostraron que la absorción del espaciador es un factor clave que impulsa la evolución de los fagos (Sternberg y col., 2016) (Figuras 1 y 2).

Se han identificado dos modos de adaptación para los sistemas tipo I: (1) *naive* y (2) *primed*. Durante la adaptación *naive*, el organismo obtiene un espaciador de una fuente de ADN extraña. Por el contrario, la adquisición cebada (*primed*) se basa en un espaciador preexistente (cebado) que permite una captación sesgada y mejorada de nuevos espaciadores. Ambos modelos se basan en la acción de dos proteínas clave, Cas1 y Cas2. La adaptación *naive* requiere solo Cas1 y Cas2, mientras que la adaptación *primed* requiere adicionalmente el complejo de interferencia tipo I Cascade (complejo asociado a CRISPR para la defensa antiviral) y la nucleasa Cas3. Otros tipos de CRISPR-Cas codifican proteínas adicionales que parecen estar involucradas en la adquisición del

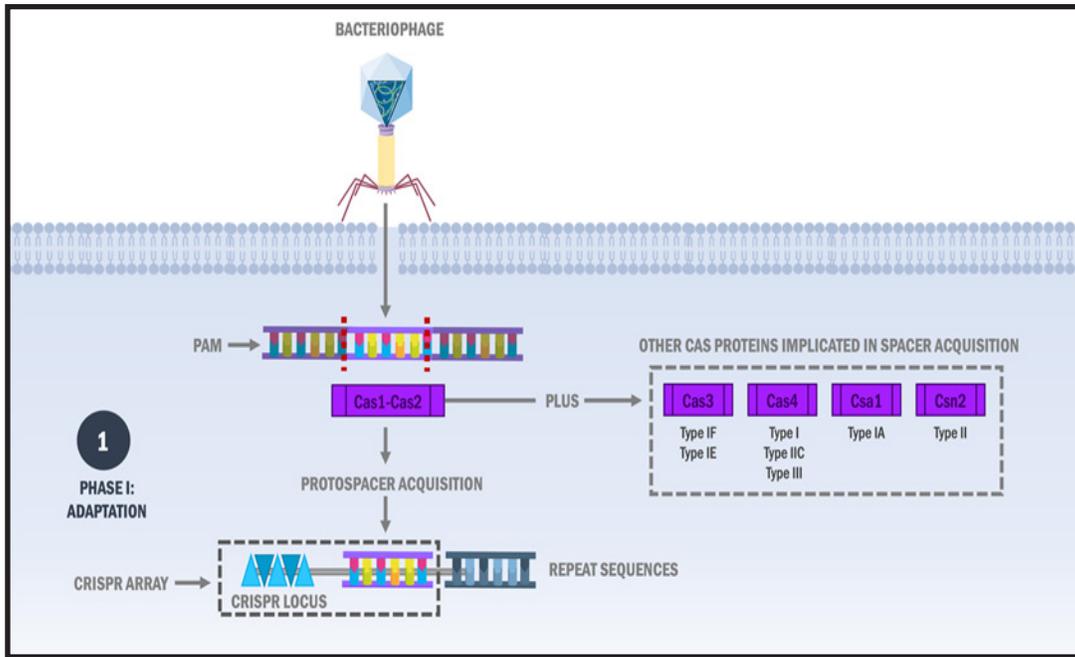


Figura 1. Mecanismo de adaptación en los Sistemas CRISPR-Cas

Posterior a la inclusión de material genético extraño al interior de la bacteria, las proteínas Cas1 y Cas2 se encargan de reconocer y escindir una porción específica de esta: el protoespaciador. Luego, este es incluido dentro de la secuencia CRISPR para llevar a cabo los siguientes pasos de la inmunidad adaptativa bacteriana. Algunos subtipos de CRISPR utilizan otras proteínas Cas para la adquisición de dicho protoespaciador

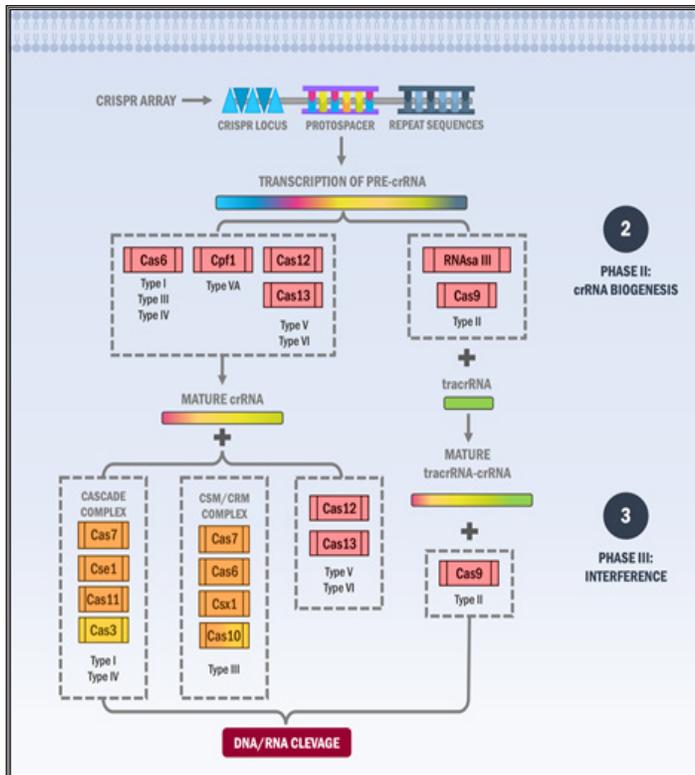


Figura 2. Mecanismo de Biogénesis e Interferencia de los Sistemas de crARN

espaciador. En el sistema tipo I-A de *Thermoproteus tenax*, se demostró *in vitro*, un complejo más grande formado por Cas1, Cas2, Cas4 y Cas1. La adquisición *in vivo* en el sistema tipo I-B de *Haloarcula hispanica* demostró la participación directa de Cas4 en la adaptación. Además de Cas1 y Cas2, las dos proteínas Csn2 y Cas9 desempeñan funciones esenciales para la adquisición tipo II-A de *S. thermophilus* y *Streptococcus pyogenes* (Sternberg y col., 2016) (Figuras 1 y 2).

Clasificación de Sistemas CRISPR-Cas

La clasificación de sistemas CRISPR-Cas ha resultado todo un desafío debido a la gran variabilidad existente entre los complejos, en consecuencia

se ha propuesto una clasificación politética en la cual se definen tipos de sistemas, así como subtipos y ortólogos según criterios filogénicos con respecto a la proteína Cas 1 (la proteínas más conservada de la familia Cas), presencia de genes Cas distintivos y la organización de los genes en el loci CRISPR-Cas, resultando en la clasificación actual de los sistemas que establece en la actualidad 2 grandes clases, 6 tipos y 33 subtipos (Makarova y col., 2018). Los sistemas CRISPR-Cas de clase 1 constan de un conjunto de complejos efectores, mientras que los sistemas de clase 2 contienen una sola proteína. Cada clase incluye tres subtipos: tipo I, III y IV en el sistema de clase 1 y tipo II, V y VI en el sistema de clase 2 (Figura 3).

Sistemas CRISPR-Cas Clase 1

El Sistemas CRISPR-Cas Clase 1 comprende los sistemas tipo I, III y IV, estos se distinguen por la existencia de complejos multiproteicos efectores, comúnmente conocidos como complejos "Cascada", conformados por diversas proteínas Cas, las cuales intervienen principalmente durante la fase de interferencia escindiendo el material genético blanco (Tang, 2019).

Sistema CRISPR-Cas tipo I

El sistema tipo I de CRISPR Cas se reconoce como uno de los primeros en ser descubiertos, así como por ser el sistema a partir del cual diversos tipos de CRISPR han

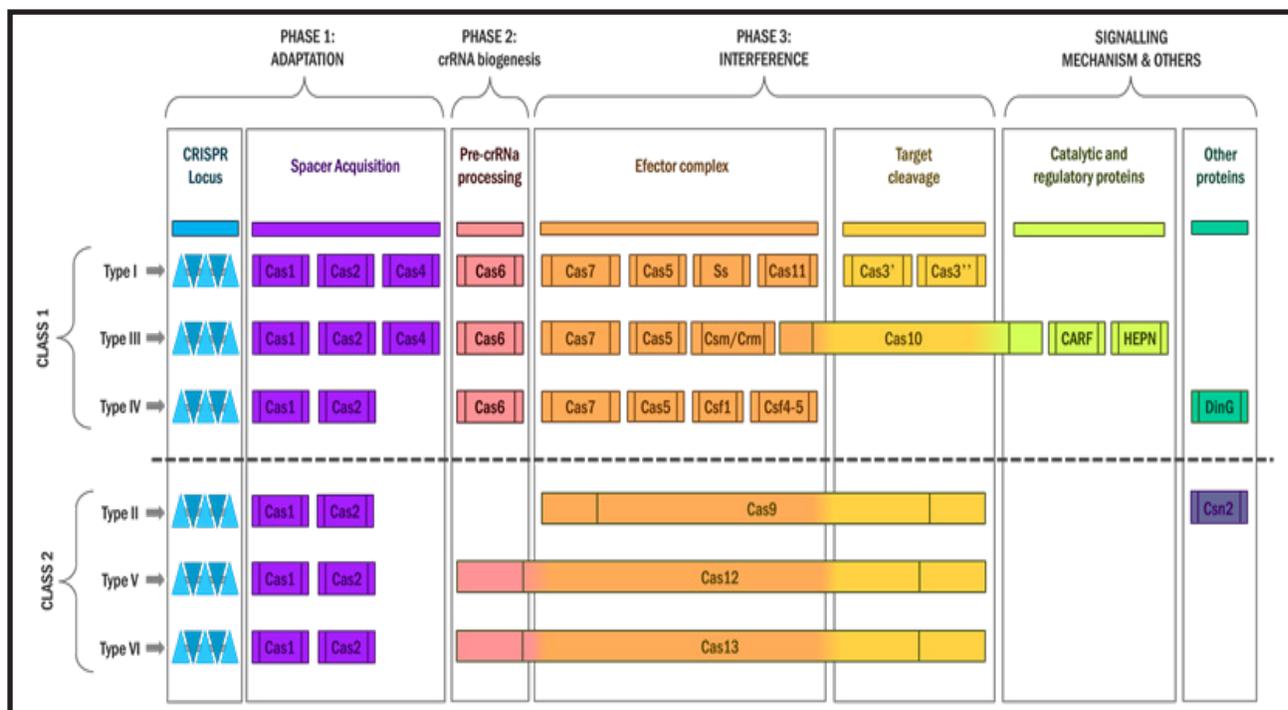


Figura 3. Clasificación de los Sistemas CRISPR-Cas

Los sistemas CRISPR-Cas se pueden clasificar en clase 1 y clase 2 dependiendo de la presencia o ausencia de la proteína Cas1 y otros genes cas distintivos y organización de loci. Los sistemas de clase 1 comprenden CRISPR tipo I, tipo III y tipo IV, que se distinguen por la existencia de complejos efectores multiproteicos o "cascada". Por el contrario, los tipos II, V y VI se clasifican como sistemas de clase 2, caracterizados por un módulo efector más simplista compuesto por una proteína singular (Cas9, Cas12 y Cas13, respectivamente). Además, muchos genes Cas son comunes en múltiples tipos de sistemas (Cas1, Cas2, Cas6 o Cas4, entre otros), mientras que algunos genes son exclusivos de tipos específicos (proteína DinG en sistemas de tipo IV, Csn2 en sistemas de tipo II), en general el módulo La configuración de cada sistema CRISPR-Cas difiere según los tipos, como se observa anteriormente, lo que le da a cada uno sus propias características específicas.

evolucionado. El sistema de clase 1 consisten en un conjunto de complejos efectores con 4 a 7 proteínas Cas y por la presencia de la proteína Cas3 en cada uno de los subtipos (van der Oost y col., 2014). Al ser parte de la clase 1, dicho sistema está compuesto por múltiples componentes proteicos que se encargan de la escisión del material genético, en contraste con la relativa simplicidad y minimalismo que caracteriza a los sistemas clase 2 (Zheng y col., 2020).

De manera general cada sistema perteneciente a esta clasificación posee elementos característicos propios de todo sistema tales como el locus CRISPR, el cual a su vez contiene regiones codificantes al igual que protoespaciadores, esenciales para la generación del crARN, adicionalmente contiene proteínas Cas distintivas que diferencian a los sistemas tipo I y permiten su clasificación (Lander, 2016). Una vez codificada, la molécula guía de estos sistemas consta generalmente de un extremo 5' en forma de asa compuesto por 8-nt destinado a la unión de proteínas efectoras, seguido por una región variable complementaria al ADN foráneo o protoespaciador de 32-nt y alrededor de 20-nt en el extremo 3' de la molécula que forman una estructura tipo "hairpin" para facilitar la unión de proteínas del complejo cascada encargadas del procesamiento de pre-crARN (Chen y col., 2020).

El gen Cas3 es el componente más característico, este codifica una proteína de gran peso molecular perteneciente a la familia de las helicasas, con actividad ADNasa, que produce el desenrollamiento del fragmento de ADN blanco a través de la estimulación de una enzima ATPasa unida a duplas de ADN o bien de ARN-ADN y cuyos dominios nucleasa HD se encargan seguidamente de escindir la pieza de

material genético (Li y col., 2016; Makarova y col., 2018; Cameron y col., 2019). En adición a esta helicasa los sistemas tipo I se diferencian por la presencia de diferentes genes localizados generalmente en la periferia del operón CRISPR que provienen del módulo RAMP (*Repaire-Associated Mysterious Protein*) (Makarova y col., 2002), mas tarde *repeated associated mysterious protein* (Makarova y col., 2006) y que codifican una amplia y variada familia de proteínas denominadas RAMP (Makarova y col., 2011). Esta superfamilia incluye a proteínas como Cas5, Cas6 y Cas7, entre otras, las cuales forman parte del complejo "Cascada" de los sistemas clase 1. El complejo Cascada incluye una proteína RAMP con actividad endonucleasa que cataliza procesamiento del pre-crARN maduro (Brouns y col., 2008; Haurwitz y col., 2010). En la mayoría de los casos esta proteína RAMP es Cas6 o versiones Cas6e y Cas6f. Dada la gran diversidad estructural de las RAMP su funcionalidad varía, entre estas, es notable la acción catalítica ejercida por dichas proteínas en el proceso de síntesis y maduración del crARN (Koonin y col., 2017).

De esta forma, el sistema puede subdividirse en 7 categorías o subtipos según su mecanismo de escisión, arquitectura del complejo efector, así como las combinaciones específicas de genes distintivos ya que no puede un gen singular para cada clasificación (Koonin y col., 2017). Asimismo, cabe destacar la presencia de un operón individual en los subtipos el IC, ID, IE y IF, el cual contiene genes ubicuos en los sistemas CRISPR como Cas1 y Cas2, al igual que el gen distintivo del tipo I Cas3 y los genes que codificarán diferentes componentes del complejo Cascada. En contraste los subtipos IA y IB poseen alrededor de dos o más operones donde

se distribuyen los genes Cas (Makarova y Koonin, 2015).

Sistema CRISPR-Cas tipo III

Los sistemas tipo III poseen cierta similitud estructural con respecto a los sistemas tipo I, ambas moléculas están formadas principalmente por complejos efectores multiproteicos conocidos como "Cascada" y especializados en la escisión del material genético, así como por el crARN maduro cuya función invariable consiste en guiar complejos o unidades proteicas hacia la localización específica de las secuencias blanco. A pesar de estas similitudes fundamentales los sistemas I y III se diferencian en múltiples aspectos tanto mecánicos como estructurales (Whitaker y Vanderpool, 2016; Mulepati y col., 2014).

Por un lado, el locus CRISPR alberga protoespaciadores de longitudes variables (37-53 nt) los cuales se encuentran separados entre sí por secuencias cortas idénticas cuya extensión oscila entre los 24-48 nt (Hatoum-Aslan y col., 2014; Hrle y col., 2013; Staals y col., 2014). La transcripción de dicho locus genera uno de los elementos principales del sistema, conocido como crARN, este fragmento de ARN se caracteriza por contener la secuencia genética derivada de uno de los protoespaciadores contenidos en el locus CRISPR en el extremo 3' (Nickel y col., 2013; Behler y col., 2018). Mientras que el extremo 5' de esta molécula denominado "*psi-tag*" permite la discriminación entre el ADN o ARN del huésped y el invasor, evitando fenómenos autoinmunitarios potenciales gracias a la presencia de 8 nucleótidos provenientes de las repeticiones cortas del genoma huésped (Hrle y col., 2013).

Adyacente al locus CRISPR se localiza el operón de genes Cas, cuyos productos conformarían los complejos efectores que actuarán durante la fase de interferencia además de intervenir en diferentes procesos que permiten la acción del sistema (Samai y col., 2015). Si bien los sistemas tipo III se caracterizan por la presencia del gen Cas10 el cual se encuentra en todos los subtipos, existen diferencias en cuanto al resto de genes Cas que determinan la existencia de 2 subtipos (III-A, III-B). Aunque ciertas investigaciones recientes apuntan al descubrimiento de las variedades III-C y III-D, gran parte de la estructura y mecanismos de estos sistemas permanecen sin dilucidar (Kazlauskiene y col., 2016).

En lo referente al sistema III-A, ampliamente distribuido en bacterias y archaea, este se compone por la molécula de crARN maduro y un complejo RNP, conocido como Csm cuyo blanco es la hebra complementaria del ADN vírico durante la transcripción (Niewoehner y col., 2017). Este complejo efector está formado por 5 tipos de subunidades proteicas (Csm 1- Csm 5) y ocasionalmente una proteína adicional (Csx1/Csm 6) (Numata y col., 2015; Elmore y col., 2016). Análisis realizados mediante micrografías electrónicas han logrado la visualización del complejo, el cual se ha descrito como una estructura elongada por la presencia de dos filamentos entrecruzados que rodea el crARN, uno de los filamentos posee una longitud mayor y está compuesto por múltiples subunidades de la proteína Csm 4, la cual forma una especie de columna o esqueleto de ensamblaje para el complejo de manera similar a la proteína Cas7 en sistemas tipo I (Hale y col., 2009; Zhang y col., 2016). Por otro lado, el filamento de menor longitud está conformado por

subunidades de Csm 2, mientras que la base de la estructura, similar a un pie, se compone por subunidades Csm 1, también conocida como Cas10, finalmente el complejo está coronado por una cabeza conformada por múltiples Csm 5 (Cannone y col., 2013).

Al ser el único complejo cuyo mecanismo de acción no se ha visualizado *in vitro*, las acciones individuales de estas proteínas no se han dilucidado totalmente, sin embargo, estudios recientes indican que, por un lado subunidades como Csm 3, Csm 4, Csm 6 y Csm1 podrían estar directamente involucradas en la fase de interferencia a través de la escisión directa de la hebra complementaria del ADN, degradación del ARNm y actividad de ribonucleolítica, respectivamente (Numata y col., 2015). En adición a estas funciones, la subunidad Csm 3 y proteínas del complejo actúan durante el procesamiento del crARN, de esta forma Csm 3 en conjunto con Csm 2 y Csm 5 se encarga de promover la maduración de la molécula posterior a su unión con la misma mediante inserciones en el dominio RRM (RNA *Recognition Motif*), actuando como un medidor que regula la extensión del extremo 3' del crARN precursor (You y col., 2019).

A diferencia del sistema III-A el subtipo III-B se distingue por ser la única variedad con la capacidad de escindir fragmentos de ARN. El complejo efector, denominado Cmr posee cierta similitud estructural con el Csm, ambos complejos se unen a las moléculas de crARN maduro, poseen una configuración elongada y una subunidad grande con actividad nucleolítica (Cas10), denominada Cmr 2 en el caso de sistemas III-B; asimismo el complejo Cmr está conformado por 6 subunidades proteicas (Cmr 1-6) (Zhang y White, 2015). Múltiples subunidades Cmr

4 y Cmr 5 conforman el dúo de filamentos helicoidales que se dispone alrededor del crARN. Adicionalmente la cabeza de la estructura se compone por las proteínas Cmr 2 y Cmr 3, ubicadas en el extremo 5', mientras que las subunidades Cmr 1 y Cmr 6 se localizan en el extremo 3' (Cannone y col., 2013). Si bien la estructura de ambos complejos tiene cierto grado de homología el complejo Cmr se caracteriza por presentar una configuración más compacta, atribuible a la flexibilidad de los sustratos de ARN en contraste con la rigidez de la doble cadena de ADN (Tamulaitis y col., 2014).

Ciertas interrogantes persisten en cuanto al papel funcional individual de estas proteínas, sin embargo, investigaciones recientes apuntan al papel de Cmr 2, Cmr 3, Cmr 4 y Cmr 5 como moléculas necesarias para el procesamiento del crARN. Adicionalmente Cmr 4, al igual que otras subunidades como Cmr 1, Cmr 6 y Cmr 3, se han asociado al reconocimiento de las secuencias nucleotídicas por la presencia común de un pliegue de ferredoxina característico de la superfamilia de las RAMPs, conocido como RRM, el cual actúa de forma similar al PAM (Estrella y col., 2016). Finalmente, estudios *in vitro* han reportado las acciones de Cmr 2, Cmr 4, Cmr 1 y Cmr 6 en la captura y escisión del ARN blanco, mientras que Cmr 3 se encarga de reconocer el *psi-tag* del crARN, Cmr 4 produce la ruptura de la hebra complementaria, simultáneamente Cmr 1 en conjunto con Cmr 6 median interacciones entre el extremo 3' del crARN y el ARN blanco necesarias para la culminación exitosa de la interferencia (Hale y col., 2014).

Sistema CRISPR-Cas Tipo IV

El sistema CRISPR-Cas tipo IV es una variante minimalista dentro de la Clase

1 de sistemas CRISPR, cuya presencia es infrecuente y se limita a diferentes plásmidos o profagos contenidos en ciertos microorganismos bacterianos y especialmente en aquellos que pertenezcan a especies termofílicas (Faure y col., 2019a; Newire y col., 2020). Debido a su escasa ocurrencia y las numerosas diferencias filogenéticas que presenta con respecto al resto de los sistemas, las características mecánicas y estructurales del mismo no se han esclarecido en su totalidad, lo cual ha llevado a la formulación de hipótesis que proponen la existencia de funciones defectuosas o alteradas en sistemas tipo IV, orientadas al mantenimiento o movilidad de plásmidos en lugar de la defensa adaptativa tradicional (Crowley y col., 2019; Pinilla-Redondo y col., 2020).

La estructura general del sistema está compuesta por un crARN guía y el complejo RNP característico de los sistemas clase 1 (Newire y col., 2020; Özcan y col., 2019). Similar a otros tipos de sistemas la molécula de crARN contiene una etiqueta o *tag* de 7 nucleótidos en su extremo 5', mientras que en el extremo 3' posee una estructura cuya longitud oscila entre los 7-22 nucleótidos, denominada "*hairpin*" debido a la configuración que adquiere al rodear ciertos componentes proteicos del complejo efector (Özcan y col., 2019). En relación a las proteínas Cas, se cree que el complejo efector formado por estas moléculas se ensambla alrededor del crARN, adquiriendo una forma de medialuna y sus dimensiones son comparables a los complejos cascada de otros sistemas (Özcan y col., 2019).

Característicamente los sistemas tipo IV carecen del módulo de adaptación (Cas1 y Cas2), ubicuo en el resto de los sistemas CRISPR-Cas, así como de las proteínas Cas

involucradas en la unión y escisión del blanco (Cas3 y Cas10) (Koonin y Makarova, 2013; Makarova y col., 2017). Por otro lado, el complejo efector está conformado por una subunidad grande denominada Csf1 (Cas-8-like), la cual es considerada formalmente como la proteína distintiva de estos sistemas, no obstante, los niveles elevados de variabilidad de esta subunidad entre los subtipos y variantes ha generado controversias, en consecuencia, se ha propuesto como reemplazo la proteína Csf2 (Cas7) que actúa como una especie columna helical para el ensamblaje del complejo RNP. Finalmente, las subunidades Csf3 (Cas5) forman la cola del complejo (Taylor y col., 2019; Pinilla-Redondo y col., 2020).

Numerosas variaciones estructurales y génicas en este tipo de sistemas han originado la división del mismo en dos subtipos principales: IV-A y IV-B, subtipos secundarios (IV-C, IV-D, IV-E) sobre los cuales no existe información considerable y cuya clasificación no se ha oficializado por completo, así como múltiples subgrupos y variantes que difieren en cuanto a sus arreglos genéticos y orientación del loci Cas (Makarova y col., 2020; Newire y col., 2020). El subtipo IV-A se distingue por la presencia del gen DinG (o RECd en ciertas variantes) que codifica la proteína Csf4, esta actúa como una DEAH-box (*Asp-Glu-Ala-Asp, or DEAD in one-letter code*) helicasa al desacoplar la doble hélice de ácidos nucleicos utilizando energía proveniente de NTP (*nucleotide-triphosphate*, NTP). Adicionalmente, este subtipo contiene diferentes tipos de la proteína Cas6, tales como Cas6e, Cas6f y el subtipo específico del sistema IV-A, Csf5 (Voloshin y col., 2003; Voloshin y Camerini-Otero, 2007). Estas se disponen en el extremo 3' del crARN y su presencia sugiere que estos sistemas son

capaces de procesar su propio crARN a través escisiones mediadas por la acción nucleolítica de Cas 6 (Taylor y col., 2019).

Por último, el sistema IV-B posee una gran diversidad de clados arquitectónicamente similares, aunque filogenéticamente divergentes (Pinilla-Redondo y col., 2020). A diferencia del sistema IV-A, este subtipo no presenta la formación CRISPR adyacente al operón Cas, las subunidades Csf4 o Csf5, en su lugar el operón Cas contiene el gen CysH el cual codifica enzimas de la familia 5-adenosina-fosfosulfato reductasa (PAPS) o bien de la familia ADP-ribosiltransferasa, así como otras proteínas no identificadas que constituyen parte del módulo de transducción puesto que se les atribuyen funciones ancilares que vinculan el sistema CRISPR con redes reguladoras celulares (Faure, y col., 2019a; Makarova y col., 2020).

SISTEMAS CRISPR-CAS CLASE 2

Los sistemas pertenecientes a esta clase se caracterizan por presentar una estructura más simple en comparación a la Clase 1, por el contrario, los miembros de esta clase conformada por CRISPR-Cas tipo II, V y VI, poseen una proteína efectora individual encargada de la escisión de la secuencia de ácidos nucleicos en lugar de complejos multiproteicos (Tang y Fu, 2018).

Sistema CRISPR-Cas Tipo II

El sistema CRISPR-Cas tipo II es reconocido no sólo por el ser el modelo más ampliamente utilizado sino también por poseer una estructura minimalista en comparación con otros sistemas CRISPR (Lee y Bae, 2016). En este sentido los sistemas tipo II se distinguen en gran parte

por la presencia de la proteína Cas 9, la cual constituye el único elemento encargado de la escisión del ADN blanco y procesar el pre-crARN (Gong y col., 2018). El locus CRISPR en estos sistemas se caracteriza por presentar una secuencia líder con abundantes bases nitrogenadas de tipo adenina/timina y múltiples repeticiones en tándem de secuencias cortas que oscilan entre los 25-26 pb. Entre cada secuencia corta se encuentran fragmentos de ADN denominados "protoespaciadores" cuyas bases nitrogenadas son parcial o totalmente complementarias a una porción de "material genético móvil". De esta forma, cada uno de los fragmentos espaciadores proviene de encuentros con elementos génicos extraños y supone la base de la inmunidad adaptativa, así como el sistema de reconocimiento de los sistemas CRISPR (Nicholson y col., 2018).

Los diferentes componentes del locus CRISPR tipo II codifican elementos tales como el crARN, este tipo de ARN presente también en otros sistemas es producto de la transcripción de las secuencias protoespaciadores y tiene por función servir como guía para la maquinaria enzimática hacia el ADN blanco (Ipoutcha y col., 2019). Adicionalmente, el locus codifica otro elemento ribonucleico, el tracrARN responsable de la maduración del crARN y el silenciamiento génico, así como los loci de las proteínas Cas (Ran y col., 2015). El operón de los sistemas tipo II resulta mucho más simple en comparación con otros tipos de sistema, posee genes que codifican a las proteínas universales para los sistemas CRISPR, Cas1 y Cas2 al igual que proteínas distintivas como Cas9, Casn2 y Cas4 (Nishimasu y col., 2014).

Entre estos elementos la proteína Cas9 ejerce un papel clave en el sistema al actuar

de manera individual en la escisión de ácidos nucleicos (Lewis y Ke, 2017). Esta enzima pertenece a la familia de las endonucleasas y se presenta con frecuencia en bacterias, su tamaño es variable y similitud escasa con respecto a otros tipos de CRISPR-Cas. A pesar de esto, todas las Cas9 poseen una arquitectura bilobular común, el lóbulo de reconocimiento α -helical denominado REC y el lóbulo nucleasa o NUC (Wilkinson y col., 2019). A su vez el lóbulo de reconocimiento está compuesto por los dominios REC1 y REC2. Mientras que el lóbulo NUC está compuesto por los dominios NHN, RuvC y el dominio de reconocimiento PAM (Jiang y Doudna, 2015; Skeens y col., 2021). Los dominios NHN y RuvC se encargan de la escisión de la cadena del ADN blanco y la hebra complementaria, respectivamente, utilizando mecanismos catalíticos un-metal-ion en cuanto al dominio NHN y dos-metal-ion en el caso del segundo. Por otra parte, el dominio PAM cuya función consiste en el reconocimiento de la secuencia blanco se localiza en el extremo C del lóbulo NUC (Anders y col., 2014; Nishimasu y col., 2018).

Mas allá de las características comunes, los sistemas CRISPR-Cas tipo II presentan 3 subtipos: II-A, II-B y II-C, los cuales difieren entre sí en cuanto a dimensiones, longitud de repeticiones, orientación y composición del crARN (Fonfara y col., 2014). El subtipo II-A ha sido el más caracterizado en la actualidad gracias a su identificación en microorganismos como *Streptococcus pyogenes* (Spy), *Streptococcus thermophilus* (Sth), o *Staphylococcus aureus* (Meijers y col., 2020; Meshalkina y col., 2020; Sieber y col., 2020). Dichos estudios revelan un crARN de 36-nt de longitud, cuyo inicio o secuencia líder puede definirse con

facilidad gracias a la presencia de bases nitrogenadas degeneradas en el extremo final (Kim y col., 2019).

En lo referente a Cas9 esta puede subdividirse en dos variantes en los sistemas II-A, una corta con una longitud de 1100 aminoácidos de extensión y una larga de 1300 aminoácidos, la arquitectura tridimensional de la proteína corresponde a la estructura general de los sistemas CRISPR-Cas tipo II, no obstante existen variaciones, particularmente en cuanto dominio PI y lóbulo REC, lo cual podría explicar la existencia de diferentes secuencias PAM según el ortólogo específico de Cas9, el más común es la secuencia 5'-NGG-3' reconocida por el ortólogo SpyCas (Guo y col., 2019; Van Orden y col., 2020). Por el contrario, el dominio catalítico, así como el motivo BH (*Bridge Helix*) se encuentran altamente conservados en las diferentes variantes (Briner y Barrangou, 2016). Asimismo, el subtipo II-A se caracteriza por la presencia de la proteína Cns2, a la cual se le atribuyen funciones integradoras a través de su unión a los extremos de la doble cadena de ADN gracias a la formación "P-loop" ATPasa de la proteína capaz inactivar el sitio de unión a ATP para proteger los extremos del dsADN (Ka y col., 2018).

Por otro lado, los subtipos II-B y II-C no se han documentado de forma extensiva hasta la fecha. La longitud del crARN es variable y oscila entre los 36-nt típicos de sistemas tipo II hasta 47-nt, en cuanto a la orientación no puede identificarse mediante la presencia de bases nitrogenadas degeneradas por lo cual deben utilizarse métodos de secuenciación génica (R). El tamaño de Cas9 en estos subtipos es muy variable (1100-1600-nt aproximadamente) según la especie bacteriana (Chylinski y col., 2014).

Cada subtipo puede diferenciarse mediante la presencia o ausencia de ciertos elementos proteicos distintivos (Jiang y Doudna, 2017). De acuerdo a lo establecido previamente la proteína asociada Cns2 es el componente característico de los sistemas II-A y asimismo el sistema II-B cuenta con la presencia de Cas4 como producto distintivo, esta proteína pertenece a la familia de las nucleasas PDxK y su función en los mecanismo de acción de CRISPR-Cas9 no ha sido dilucidada por completo, sin embargo, se cree que esta podría desempeñar un papel importante en la inmunidad asociada a CRISPR-Cas (Shiimori y col., 2018). Finalmente, los sistemas II-C representan el subtipo más minimalista ya que su locus sólo contiene los genes de adaptación Cas1 y Cas2, así como el gen distintivo de los sistemas tipo II Cas9, sin proteínas adicionales asociadas (Mir y col., 2018).

Sistema CRISPR-Cas Tipo V

El sistema tipo V pertenece a la clase II de CRISPR-Cas, caracterizada por la presencia de una proteína efectora individual en lugar de un complejo multiproteico (Wang y col., 2020). En consecuencia, dicho sistema ha sido comparado con CRISPR-Cas9, especialmente en relación al potencial terapéutico de la proteína efectora distintiva Cas12, la cual posee ciertos rasgos tales como la escisión escalonada del fragmento de ADN blanco en contraposición a los cortes abruptos que realiza Cas9, niveles superiores de especificidad con respecto a dicha endonucleasa, así como la ausencia de tracrARN en algunos subtipos, lo cual supone un modelo más minimalista del complejo CRISPR-Cas, que podrían convertir este sistema en una herramienta comparable e inclusive superior al reconocido CRISPR-Cas9 (Dong y col., 2019).

Estructuralmente, los sistemas tipo V son complejos formados por una molécula individual o dual de ARN según el subtipo (Yu y Marchisio, 2020). La secuencia guía crARN se encuentra presente en todas las variedades del complejo y se asocia en algunos subtipos con una molécula de tracrARN que facilita el proceso de maduración de la secuencia guía, mientras que en otros subtipos es notoria la ausencia del mismo. Adicionalmente, las moléculas de ARN se unen a la proteína Cas12, ésta al igual que el resto de las proteínas efectoras clase II presenta una arquitectura bilobulada compuesta por un lóbulo de reconocimiento (lóbulo REC) y un lóbulo nucleasa (lóbulo NUC) el cual posee un dominio Ruv C-like que diferencia este tipo de sistemas de otros integrantes de la clase II; finalmente ambos lóbulos se unen mediante el motivo BH (*bridge helix*), originando una estructura similar a la pinza de un cangrejo, cuya cavidad central aloja el fragmento de ADN blanco durante la fase de interferencia (Liu y col., 2020; Phan y col., 2019; Stella y col., 2017; Yan y col., 2019). Mas allá de estas similitudes, los sistemas tipo V ostentan múltiples diferencias estructurales que han llevado a la clasificación y reconocimiento de 4 subtipos: V-A, V-B, V-C y V-U. Entre los cuales destacan V-A y V-B, debido a la ausencia de información tanto estructural como mecánica de los dos últimos. Asimismo, algunos estudios han reportado la existencia de inclusive 10 subtipos diferentes desde el V-A hasta el subtipo V-K (Paul y Montoya, 2020).

No obstante, el subtipo más estudiado hasta la fecha es el V-A, identificado por primera vez en *Francisella novicida* (Bayat y col., 2018). Este complejo binario está conformado por un crARN guía transcrito a partir de dos porciones de repeticiones y una secuencia espaciadora, el cual

reconoce secuencias PAM ricas en timina, 5" TTTV 3", donde V representa cualquier base nitrogenada diferente a la timina, marcando así otra de las diferencias que distinguen no sólo el subtipo V-A sino todos los sistemas V, puesto que otros sistemas CRISPR reconocen secuencias PAM ricas en guanina (Faure y col., 2019a). Por otro lado, se ha identificado que el crARN posee una longitud y complejidad menores (42-44 nucleótidos) en comparación a otros sistemas clase II lo cual podría atribuirse parcialmente a la ausencia del tracrARN, pues en este subtipo la proteína efectora Cpf1 o Cas12a actúa como una ADNsa así como ARNsa procesando su propio crARN de acuerdo a las características estructurales y secuencia específica del mismo, originando una molécula compuesta por una región en forma de asa o "pseudonudo" en el extremo 5' (20 nucleótidos) y una región guía variable y complementaria al fragmento de ADN blanco (23 nucleótidos) en el extremo 3' (Fonfara y col., 2016; Li y col., 2017; Stella y col., 2018; Zhang y col., 2019; Li y col., 2020).

El otro componente del dúo CRISPR-Cas12a, es la proteína distintiva del subtipo V-A, Cas12a (Cpf1), se presume que tanto Cas12a como Cas9 han evolucionado a partir de un ancestro común, explicándose la similitud estructural y funcional con respecto a otras endonucleasas clase II (Murugan y col., 2020; Li y col., 2021; Vlot y col., 2018). Cpf1 es una proteína monomérica de arquitectura bilobulada, conformada por los lóbulos α -REC y NUC, unidos a través del motivo BH ubicado en el lóbulo NUC (Zhang y col., 2019). Por un lado, el lóbulo de reconocimiento está formado por los dominios REC 1 y REC 2 localizados en el extremo amino terminal de la molécula, mientras que el lóbulo

nucleasa posee los dominios Ruv-C like, PI (PAM interacting), WED y un lóbulo Nuc no identificado (Liu y col., 2017). La existencia de un dominio Ruv-C-like dividido en tres regiones discontinuas al cual se le atribuye la actividad nucleolítica, en lugar de dos, se ha señalado como una característica distintiva de los sistemas tipo V y el subtipo V-A no es la excepción. Se ha sugerido el papel potencial del dominio Nuc no identificado como el segundo dominio efector, sin embargo, dicha hipótesis no ha sido constatada hasta la fecha (Safari y col., 2019; van Aelst y col., 2019). Asimismo, el dominio PI se encarga del reconocimiento de la secuencia PAM, por su parte, el sub-dominio WED-III perteneciente a WED posee actividad ARNasa necesaria la biogénesis del pre-crARN (Paul y Montoya, 2020; Zhang y col., 2019).

De manera similar a otras proteínas efectoras Cpf1 modifica su arquitectura luego de unirse al crARN, pasando de tener una configuración dinámica a una estructura más compacta y triangular, mediante la formación de puentes entre los residuos Arg883 y Arg887 del motivo BH y Glu939 de la región superior de la molécula, lo cual facilita la transición del residuo catalítico Glu925 de cerrado hacia abierto, permitiendo el alojamiento del ADN blanco en la hendidura delimitada por los dominios REC, Ruv-C-like y WED, así como su posterior escisión, la cual a diferencia de sistemas tipo II suele efectuarse de manera gradual o escalonada, dejando un *overhang* de 4-5 nucleótidos distal al PAM (Kim y col., 2020).

Por otra parte, el subtipo V-B es una variedad conformada por la secuencia guía de crARN y la proteína efectora Cas12b, previamente conocida como C2c1 (Stella y col., 2017). Este sistema

posee similitudes con V-A en cuanto a la ausencia del dominio NHN, escisión escalonada de ácidos nucleicos, así como el reconocimiento de secuencias ricas en timina presentes en el PAM. Sin embargo existen ciertas diferencias fundamentales en cuanto al locus CRISPR, este no sólo codifica una secuencia de ARN guía similar a la molécula empleada por el subtipo V-A, sino que también un tracrARN formado por dos secuencias discontinuas que contiene antirrepeticiones en su extremo 3' (Faure y col., 2019b). Los productos ribonucleicos del locus se ensamblan entre sí para luego unirse a Cas12b creando una estructura tetrahelical donde el crARN se localiza en el canal central de C2c1, mientras que el tracrARN reside en la superficie del complejo (Liu y col., 2017).

Con respecto a Cas12b, esta es una proteína de naturaleza monomérica y la arquitectura bilobulada típica de las proteínas clase 2, comparable a la tenaza de un cangrejo (Yang y col., 2016). Al igual que otras proteínas efectoras Cas12b, está constituida por el lóbulo de reconocimiento o REC y el lóbulo efector o NUC (Teng y col., 2018). Por un lado, el lóbulo REC está constituido por el dominio Rec1 o helical I, el cual consiste en 11-14 α -hélices dispuestas en forma de mancuerna, donde cada extremo abultado o "bundle" α -helical contiene 5 α -hélices, vinculándose entre sí gracias a una α -hélice larga próxima al dominio PI, la cual discurre entre la parte proximal del dominio hasta la distal (Yang y col., 2016). El dominio Rec2 (helical II), situado en el mismo lóbulo, está conformado por 6 α -hélices e interactúa con regiones distales de PI. El motivo BH, está localizado entre la hélice α 1 y hélice α 2 del dominio helical II, lo cual establece una diferencia estructural con respecto a la

disposición de dicha secuencia en Cpf1. En contraste, el dominio OBD (*Origin Binding Domain*) compuesto por 9 β -láminas y 2 α -hélices es similar a su contraparte en Cas12a (Yang y col., 2016).

El lóbulo NUC de la proteína se ubica en el extremo C-terminal y contiene dos regiones Nuc separadas por el motivo RuvC III, la región Nuc1 posee una configuración similar a un barril formado por 5 β -láminas y rodeado por 3 α -hélices (Yan y col., 2019). Por su parte, la región Nuc2 contiene 3 β -láminas y un 6 α -hélices. El dominio efector Ruv-c-like posee 8 β -láminas, entre las cuales β -7 y β -8 conforman un β -*hairpin* similar a la estructura presente en Cpf1, así como 6 α -hélices (Wu y col., 2017).

Sistema CRISPR-Cas tipo VI

Los sistemas CRISPR-Cas tipo VI se distinguen por ser el único tipo cuya función está destinada específicamente al reconocimiento y escisión de ARN (Jing y col., 2018). Al igual que otros sistemas clase II, CRISPR VI es un complejo binario conformado por un crARN guía y una proteína efectora distintiva denominada Cas13 (Lin y col., 2020). Adicionalmente, el complejo se caracteriza por la presencia de proteínas accesorias las cuales no pueden ser clasificadas como proteínas Cas y cuyas funciones moduladoras tienen la facultad de potenciar o inhibir la fase de interferencia (Smargon y col., 2017).

La molécula guía del sistema está constituida por una repetición directa (DR) e invariable, presente en todos los sistemas tipo VI, así como una región guía variable o sgARN flanqueada bilateralmente por repeticiones cortas que contiene la secuencia del protoespaciador en cuestión (Wessels y col., 2020). Es notable en estos

sistemas la ausencia general del módulo de adaptación conformado por Cas1 y Cas2; sin embargo, ciertos estudios han comprobado la presencia de dichos módulos en diferentes subtipos, en consecuencia, se presume que estos sistemas obtienen sus protoespaciadores a partir de otros locus CRISPR situados en el mismo genoma o bien que los mismos han perdido la capacidad de adaptación y por lo tanto no pueden adquirir nuevos protoespaciadores (O'Connell, 2019).

Por otra parte, la proteína efectora Cas13 se caracteriza por tener dimensiones notablemente menores en comparación a sus contrapartes en sistemas CRISPR-Cas tipo II o tipo V, no obstante, su arquitectura general coincide con el resto de las proteínas efectoras al tener una configuración bilobulada, formada por los lóbulos REC y NUC (O'Connell, 2019). De esta forma, el lóbulo de reconocimiento contiene el dominio N-Terminal (NTD), el dominio Helical I y un fragmento del dominio HEPN1, mientras que el lóbulo NUC está conformado por el fragmento restante de HEPN1, el dominio Helical II y el segundo dominio efector HEPN2 (Koner mann y col., 2018). En relación a la acción ribonucleolítica de Cas13 los dominios HEPN (HEPN *domain, higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domain*) son especialmente relevantes ya que éstos se encargan de las actividad ARNsa del complejo (East-Seletsky y col., 2017). Por un lado, uno de los centros activos lleva a cabo el procesamiento del pre-crARN, lo cual explica la ausencia de tracrARN en estos sistemas, y por otro, el centro activo restante realiza la escisión del material genético (Toro y col., 2019). Curiosamente, Cas13 ejecuta estas escisiones de manera específica (cis)

al eliminar el fragmento de ARN blanco, pero también escinde el material genético adyacente a estas secuencias (trans), induciendo de esta forma la activación de vías apoptóticas o promotores del fenotipo senescente como medio de defensa contra la acción de bacteriófagos (Meeske y col., 2020).

Según las características filogenéticas del complejo, la estructura de Cas13 y la presencia de ciertas proteínas asociadas los sistemas tipo VI pueden dividirse en 4 subtipos: VI-A, VI-B, VI-C y VI-D (Lin y col., 2020). De los cuales, VI-A, VI-B y VI-D poseen una caracterización estructural y funcional más amplia (Yin y col., 2020). El subtipo VI-A, identificado inicialmente en *Leptotrichia shahii* posee las características convencionales del sistema VI, tales como la escisión cis/trans del ARN blanco, el par de dominios catalíticos HEPN y ausencia de tracrARN (Watanabe y col., 2019).

Adicionalmente el componente ribonucleico de este subtipo contiene 41-51 nucleótidos aproximadamente, de los cuales, 28 forman parte del extremo 5' de la molécula, adoptando forma de pseudonudo o *hairpin*, estructura descrita por otros autores como un tallo de 5-6 nucleótidos de longitud interrumpido por un bulbo invariante de dos nucleótidos con la secuencia AC o AA, que podría adoptar una configuración de hebra en algunas especies, asimismo algunos homólogos de VI-A presentan un lazo de 7-9 nucleótidos de longitud (Meeske y col., 2020; O'Connell, 2019).

Cas13a corresponde a la estructura general planteada para la proteína Cas13, ya que posee la típica arquitectura bilobular que deriva de la presencia de los lóbulos NUC y REC, los cuales se localizan en los

extremos C-terminal y N-terminal de la molécula, respectivamente (Aman y col., 2018). Mediante técnicas como SAD (*Single Anomalous Dispersion*) y Cryo-EM (*Cryogenic electron microscopy*) se ha determinado la naturaleza predominantemente α -helical de la molécula, visualizándose 6 dominios, de los cuales el dominio NTD, helical I y la porción N-terminal de HEPN1 forman el lóbulo REC, mientras que los dominios helical II, helical III, el fragmento C-terminal de HEPN1 y HEPN2 conforman el lóbulo NUC (Liu y col., 2017). Ambos lóbulos, así como los dominios que contienen se disponen alrededor del crARN, alojando la molécula en el interior de un canal central, positivamente cargado, dentro del cual el extremo 5' del crARN se une a los dominios NTD y helical I, a su vez el extremo 3' reside en el interior del lóbulo NUC, proporcionándole a la proteína una configuración general en forma de U donde los dominios catalíticos HEPN se ubican en la superficie del complejo (Knott y col., 2017).

Por su lado, el subtipo VI-B presenta un crARN cuya longitud de 41 nucleótidos es similar a aquella presentada por VI-A, sin embargo, los DR de estas moléculas suelen ser más largos, abarcando alrededor de 36 nucleótidos y dando lugar a una región guía corta de unos 5 nucleótidos aproximadamente (O'Connell, 2019). Los detalles estructurales de esta molécula no se conocen, no obstante, análisis de predicción indican que las regiones DR extensas con secuencias complementarias 5'-GUUG y CAAC-3' podrían estar acompañadas por secuencias irregulares sin emparejar, formaciones abultadas y zonas en forma de nudo o lazo en forma de U en el extremo 3' (Smargon y col., 2017).

En relación a Cas13b, esta variante parece ser más robusta en comparación a otros subtipos, su constitución general se caracteriza por la presencia de los lóbulos NUC y REC, así como 5' dominios contenidos en dichos lóbulos (Cui y col., 2020). Similar a Cas13a este subtipo posee dos dominios HEPN (HEPN1 y HEPN2), dos dominios helicales (helical I y helical II) y finalmente un dominio de interacción con la proteína lamina (LID, *Lamin Interaction Domain*), adyacente al extremo 3' del crARN (Slaymaker y col., 2019). Los dominios HEPN son principalmente α -helicales, ya que HEPN1 está formado por 12 α -hélices conectadas entre sí mediante lazos flexibles y vinculado a Helical-I mediante un motivo altamente conservado denominado IDL (enlace entre dominios), HEPN2 está compuesto por 9 α -hélices, múltiples β -láminas, así como un β -*hairpin* con residuos cargados orientados en dirección al sitio activo de la proteína. Estos dominios se superponen, HEPN2 sobre HEPN1, de tal forma que los residuos activos R0168, N1069, H1073, R156, N157 y H161 se ensamblan en los sitios catalíticos de los dominios efectores (Slaymaker y col., 2019).

Asimismo, el dominio helical-II está formado por 11 α -hélices y se conecta a los dominios LID mediante el β -*hairpin* y HEPN (Wang y col., 2020). El dominio LID posee una estructura tanto helical como β , obtiene un nombre a partir de la estructura ubicada en el extremo 3' y formada por 2 β -*hairpins* que contactan con el lazo de ARN y helical-I, formando una especie de tapa para el extremo 3' del crARN y un canal lateral entre el lazo del extremo 3' y los dos HEPN (Bandaru y col., 2020).

Adicionalmente, los sistemas VI-B se caracterizan por la presencia de proteínas

asociadas que dividen este subtipo en dos variantes: VI-B1 y VI-B2 principalmente. La variante VI-B1 se asocia Csx27, una proteína transmembrana presente en la mayoría de estos complejos y cuya función se cree que consiste en la represión de las actividades efectoras durante la fase de interferencia a través de la degradación de transcritos de ARN foráneo (Makarova y col., 2019). En contraste, Csx28 es un componente anciliar proteico, perteneciente a la misma familia de proteínas transmembrana, este se encuentra presente en las variantes VI-B2 y posee facultades que potencian las acciones nucleolíticas durante la fase de interferencia (Smargon, 2018).

Por último, el sistema VI-D localizado principalmente en especies bacterianas como *Eubacterium* y *Ruminococcus* sp. es el subtipo más pequeño con una estructura proteica conformada por unos 190-300 aminoácidos aproximadamente, lo cual represente dimensiones entre un 20-30% menores a otros subtipos, en adición a esto dichos sistemas no poseen estrecha homología con otros subtipos (Zhang y col., 2018). El componente guía de VI-D tiene un longitud que varía entre los 30-52 nucleótidos, de los cuales 8-10 nt pertenecen al tallo de la molécula ubicado en el extremo 3' conformado por DRs e interrumpido por una formación abultada (2 nt) seguida por un lazo (4-6 nt) y una región guía variable de 5-10 nt en el extremo 5' (O'Connell, 2019).

En referencia a la proteína efectora Cas13d, ésta posee una arquitectura bilobular gracias a la presencia de los lóbulos NUC y REC, así como 5 dominios que se disponen alrededor del crARN: NTD, HEPN1, HEPN2, RHH, HTH y helical-II (Yan y col., 2018). La mayoría de los dominios son de naturaleza α -helical a excepción de NTD

y la estructura general se asemeja a una pinza semi-abierta que aloja el crARN en su centro (Zhang y col., 2018). Al igual que VI-B este subtipo exhibe una proteína accesoria, este componente proteico, denominado WYL (designado así debido a la presencia de una secuencia conservada Trp-Tyr-Leu), se ha relacionado a sistemas defensores en organismos procariontes y para algunos es considerado un dominio putativo de Cas13d más que un componente aislado de la proteína y cuya finalidad es la regulación de la actividad efectora, mediante la potenciación de Cas13d de manera dosis dependiente (Zhang y col., 2019).

Consideraciones finales

Como se comentó previamente, el sistema CRISPR-Cas constituye un sistema de defensa de arqueas y bacterias. Este sistema permite cortar secuencias conocidas de ADN y ARN que provienen de virus y plásmidos y así evitar la infección. Esta capacidad para cortar ADN y ARN es lo que ha permitido ampliar el arsenal de herramientas disponibles para el diagnóstico de enfermedades en seres humanos y animales, pero su principal y más emocionante aplicación es la edición génica (Reyes Mata y col., 2023).

De las proteínas Cas que se han adaptado a aplicaciones en la ciencia, la Cas9 es la más utilizada para edición genética. CRISPR-Cas9 es una herramienta más versátil que TALEN y ZNF, ya que permite modificar de forma eficiente y económica líneas celulares animales, plantas y parásitos. Esta versatilidad ha permitido la creación de modelos animales *knock out* (animales a los cuales se les bloquea la función específica de un gen modificando la secuencia de ADN de dicho gen) y plantas

genéticamente modificadas, y en el área médica ha revolucionado el tratamiento de enfermedades hematológicas y cáncer (Gupta y col., 2019).

La edición génica con CRISPR-Cas9 ha tenido un rápido avance en aplicaciones médicas y actualmente se ha empleado *ex vivo*, es decir, fuera del cuerpo del paciente, para tratar enfermedades. En septiembre de 2023, en la base de datos *Clinical Trials* se tienen registrados 51 ensayos clínicos en diversas fases (I a III) utilizando esta tecnología para tratar diversas enfermedades, como infección por VIH, mieloma múltiple, betatalasemia, carcinoma renal, enfermedad de células falciformes, tumores sólidos de comportamiento carcinoma, COVID-19 y leucemias. Estas aplicaciones abarcan desde la corrección génica en precursores hematopoyéticos en betatalasemia, la terapia celular Car-t, y las células pancreáticas autólogas, hasta variantes de terapia génica que emplean vectores adenovirales o microesferas, para el transporte de la tecnología CRISPR/Cas (NIH - ClinicalTrials.gov, 2023). La primera enfermedad en ser tratada con la tecnología CRISPR-Cas9 fue la anemia de células falciformes. La anemia de células falciformes es una enfermedad monogénica que causa anemia, dolor y daño orgánico debido a cambios en un nucleótido en el gen de la β -globina. La técnica implica la edición genética de precursores hematopoyéticos del paciente, donde se transfiere el gen sano mediante CRISPR-Cas9 y se verifica la correcta inserción y viabilidad de las células editadas antes de ser trasplantadas nuevamente al paciente. Este enfoque autólogo fue aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) desde 2021 como tratamiento curativo para la anemia de células falciformes, ofreciendo una alternativa a los trasplantes de donantes

relacionados, que son limitados a un 15 % de pacientes debido a la baja compatibilidad (Frangoul y col., 2021; Ma y col., 2023; Park y Bao, 2021). La aproximación del tratamiento de células *ex vivo* está siendo estudiada en otras enfermedades hematológicas monogénicas, como la β -talasemia (Mohammadian Gol y col., 2023), así como para el trasplante de células β de páncreas diferenciadas *in vitro* a partir de células precursoras aisladas de islote pancreático en pacientes con diabetes mellitus (Maxwell y Millman, 2021) y en lesiones corneales por herpes virus (Li y col., 2022).

La terapia inmunológica del cáncer también se ha visto revolucionada por CRISPR-Cas9. La terapia Car-t (por sus siglas en inglés, *Chimeric Antigen Receptor - T-cell therapy*). La terapia Car-t consiste en adquirir linfocitos T del propio paciente, modificar *ex vivo* su receptor antigénico y posteriormente infundirlos en la circulación del paciente, o bien, obtener donantes compatibles con el paciente para la obtención de los linfocitos T (Khan y Sarkar, 2022). Una aplicación muy interesante ha sido en el tratamiento contra el cáncer, sin embargo, tiene muchos efectos adversos a lo largo de los linfocitos T para favorecer la expresión de citocinas que ayuden a reducir o eliminar el tumor. Para la cuarta generación de linfocitos Car-t se ha usado ingeniería genética para su modificación. A partir de 2017, se ha utilizado CRISPR-Cas9 para modificar el receptor de células T, bloquear señales supresoras y favorecer la expresión de interleucinas (IL) 12, 18 y 15 que favorecen la actividad antitumoral (Khan y Sarkar, 2022).

Hasta ahora no existen tratamientos aprobados con aplicación *in vivo*, es decir, directamente en el paciente. Si bien se

ha propuesto transpolar algunas técnicas usadas en terapia génica, como los vectores adenovirales o liposomas, actualmente el uso clínico del sistema CRISPR-Cas9 está limitado a la optimización de la terapia celular (Zhang y col., 2021). Sin embargo, ya hay estudios en fase clínica de enfermedades oculares para la aplicación directamente de CRISPR-Cas.

La edición genética con fines médicos está en constante crecimiento y sus aplicaciones se están diversificando. Su potencial para mejorar la calidad de vida y la salud de las personas es innegable. Sin embargo, hay que tener muy claros los límites éticos de su uso y las limitaciones de esta tecnología (Reyes Mata y col., 2023).

Conclusiones

En las últimas décadas las tecnologías de edición génica se han convertido en una alternativa viable para el tratamiento de múltiples patologías y particularmente los sistemas CRISPR-Cas han revolucionado el campo de la genética gracias no sólo a su especificidad y eficacia en comparación a tecnologías anteriores sino también su relativa simplicidad, haciéndola una opción terapéutica más accesible, rápida y eficaz para la población general. No obstante, el conocimiento actual sobre estos sistemas aún es incipiente, la vasta cantidad de variaciones tanto funcionales como estructurales del locus CRISPR y sus proteínas asociadas ha generado constante descubrimientos en los últimos tiempos y dichos avances están lejos de terminar. Por el contrario, es necesario continuar en la búsqueda de nuevos elementos que permitan la comprensión de estos sistemas en su totalidad, así

como esclarecer la información sobre los componentes existentes y sus mecanismos de acción para lograr avances significativos que permitan hacer de CRISPR-Cas una herramienta terapéutica estándar en numerosas enfermedades crónicas de origen genético.

Lista de Abreviaturas

- CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
- HIV: Human Immunodeficiency Virus
- TALEN: Transcription Activator-Like Effector Nuclease
- ZFN: Zinc Finger Nucleases
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- SRSR: Repeticiones Cortas Espaciadas Regularmente
- ARN: ácido ribonucleico
- crARN: CRISPR ARN
- NUC Lobe: Nuclease Lobe
- REC: Recognition Lobe
- RNP: Ribonucleoprotein Particle
- tracrARN: Trans-Activating crARN
- CTD: C-terminal Domain
- PAM: Protospacer Adjacent *Motif*
- RRM: ARN Recognition *Motif*
- RAMP: *Repair-Associated Mysterious Protein*
- mARN: ARN mensajero
- PAPS: 3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate

- PI Domain: PAM *Interacting Domain* Adli M. 2018. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature Communications* 9(1): 1911.
- BH: Bridge Helix Aman R, Ali Z, Butt H, Mahas A, Aljedaani F, Khan MZ, Ding S, Mahfouz M. 2018. ARN virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. *Genome Biology* 19(1):1.
- dsDNA: Double Strand DNA
- HEPN Domain: Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-Binding Domain Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M. 2014. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature* 513(7519): 569–573.
- NTD: N-Terminal Domain Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, Corn JE, Daley GQ, Doudna JA, Fenner M, Greely HT, Jinek M, Martin GS, Penhoet E, Puck J, Sternberg SH, Weissman JS, Yamamoto KR. 2015. *Biotechnology*. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science (New York, N.Y.)* 348(6230):36–38.
- RHH: Ribbon-Helix-Helix
- HTH: Helix-Turn-Helix Domain
- MGE: Mobile Genome Express Bandar S, Tsuji MH, Shimizu Y, Usami K, Lee S, Takei NK, Yoshitome K, Nishimura Y, Otsuki T, Ito T. 2020. Structure-based design of gARN for Cas13. *Scientific Reports* 10(1):11610.
- ssDNA: Single-Stranded DNA
- IHF: Integration-Host Factor Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)* 315(5819):1709-1712.
- ATP: Adenosine Triphosphate Bayat H, Modarressi MH, Rahimpour A. 2018. The Conspicuity of CRISPR-Cpf1 System as a Significant Breakthrough in Genome Editing. *Current Microbiology* 75(1):107–115.
- ABE: Adenine Base Editors Behler J, Sharma K, Reimann V, Wilde A, Urlaub H, Hess WR. 2018. The host-encoded RNase E endonuclease as the crARN maturation enzyme in a CRISPR-Cas subtype III-Bv system. *Nature Microbiology* 3(3): 367-377.
- CBE: Cytidine Base Editors Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151(Pt 8): 2551-2561.
- pegARN: Prime Editing Guide ARN Briner AE, Barrangou R. 2016. Guide ARNs: A Glimpse at the Sequences that Drive CRISPR-Cas Systems. *Cold Spring Harbor Protocols* 2016(7).
- CRISPRi: CRISPR Interference Brokowski C. 2018. Do CRISPR Germline Ethics Statements Cut It? *The CRISPR JouARNI* 1: 115–125.
- CRISPRa: CRISPR Activation Brokowski C, Adli M. 2020. Ethical Considerations in Therapeutic Clinical Trials Involving Novel Human Germline-Editing Technology. *The CRISPR J* 3(1): 18-26.
- DNMT3A: DNA Methyltransferase 3 Alpha Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJH, Snijders APL, Dickman MJ,
- TET: Ten-Eleven Translocation
- ChyMeRa: Cas Hybrid for Multiplexed Editing and Screening Application

Referencias Bibliográficas

2016 Canada Gairdner Award winners. 2016. Gairdner Foundation. CRISPR-CAS and HIV/AIDS Researchers Recognized. <https://gairdner.org/2016-canada-gairdner-award-winners/?lang=fr>

- Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J. 2008. Small CRISPR ARNs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science* 321(5891):960-964.
- Cameron P, Coons MM, Klompe SE, Lied AM, Smith SC, Vidal B, Donohoue PD, Rotstein T, Kohrs BW, Nyer DB, Kennedy R, Banh LM, Williams C, Toh MS, Irby MJ, Edwards LS, Lin C-H, Owen ALG, Künne T, van der Oost J, Brouns SJJ, Slorach EM, Fuller CK, Gradia S, Kanner SB, May AP, Sternberg SH. 2019. Harnessing type I CRISPR-Cas systems for genome engineering in human cells. *Nature Biotechnology* 37(12):1471-1477.
- Cannone G, Webber-Birungi M, Spagnolo L. 2013. Electron microscopy studies of Type III CRISPR machines in *Sulfolobus solfataricus*. *Biochemical Society Transactions* 41(6):1427-1430.
- Check E. 2002. It was a tragic setback. *Nature* 420(6912): 116-118.
- Chen H, Choi J, Bailey S. 2014. Cut site selection by the two nuclease domains of the Cas9 ARN-guided endonuclease. *J Biol Chem* 289(19):13284-13294.
- Chen K, Wang Y, Zhang R, Zhang H, Gao C. 2019. CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. *Annual Review of Plant Biology* 70:667-697.
- Chen Y, Liu J, Zhi, Zheng, Q, Ma W, Huang J, Liu Y, Liu D, Liang P, Songyang Z. 2020. Repurposing type I-F CRISPR-Cas system as a transcriptional activation tool in human cells. *Nature Communications* 11(1):3136.
- Chylinski K, Makarova KS, Charpentier E, Koonin EV. 2014. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research* 42(10): 6091-6105.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. 2013. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science (New York, N.Y.)* 339(6121): 819-823.
- Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. 2015. Therapeutic Genome Editing: Prospects and Challenges. *Nature Medicine* 21(2): 121-131.
- Crowley VM, Catching A, Taylor HN, Borges AL, Metcalf J, Bondy-Denomy J, Jackson RN. 2019. A Type IV-A CRISPR-Cas System in *Pseudomonas aeruginosa* Mediates ARN-Guided Plasmid Interference *in vivo*. *The CRISPRJ* 2(6): 434-440.
- Cui J, Techakriengkrai N, Nedumpun T, Suradhat S. 2020. Abrogation of PRRSV infectivity by CRISPR-Cas13b-mediated viral ARN cleavage in mammalian cells. *Scientific Reports* 10(1): 9617.
- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. 2011. CRISPR ARN maturation by trans-encoded small ARN and host factor RNase III. *Nature* 471(7340): 602-607.
- Dong L, Guan X, Li N, Zhang F, Zhu Y, Ren K, Yu L, Zhou F, Han Z, Gao N, Huang Z. 2019. An anti-CRISPR protein disables type V Cas12a by acetylation. *Nature Structural & Molecular Biology* 26(4):308-314.
- East-Seletsky A, O'Connell MR, Burstein D, Knott G., Doudna JA. 2017. ARN Targeting by Functionally Orthogonal Type VI-A CRISPR-Cas Enzymes. *Molecular Cell* 66(3):373-383.e3.
- Elmore JR, Sheppard NF, Ramia N, Deighan T, Li H, Terns RM, Terns MP. 2016. Bipartite recognition of target ARNs activates DNA cleavage by the Type III-B CRISPR-Cas system. *Genes & Development* 30(4):447-459.
- Estrella MA, Kuo F-T, Bailey S. 2016. ARN-activated DNA cleavage by the Type III-B CRISPR-Cas effector complex. *Genes & Development* 30(4), 460-470.
- Faure G, Makarova KS, Koonin EV. 2019a. CRISPR-Cas: Complex Functional Networks and Multiple Roles beyond Adaptive Immunity. *J Molecular Biology* 431(1):3-20.
- Faure G, Shmakov SA, Makarova KS, Wolf YI, Crawley AB, Barrangou R, Koonin EV. 2019b. Comparative genomics and evolution of trans-activating ARNs in Class 2 CRISPR-Cas systems. *ARN Biology* 16(4):435-448.
- Fellmann C, Gowen BG, Lin P-C, Doudna JA, Corn JE. 2017. Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy. *Nature Reviews. Drug Discovery* 16(2):89-100.
- Ferdosi SR, Ewaisha R, Moghadam F, Krishna S, Park JG, Ebrahimkhani MR, Kiani S, Anderson KS. 2019. Multifunctional CRISPR-Cas9 with engineered immunosilenced human T cell epitopes. *Nature Communications* 10(1):1842.
- Fonfara I, Le Rhun A, Chylinski K, Makarova KS, Lécivain A-L, Bzdrenga J, Koonin EV, Charpentier E. 2014. Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-ARN and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research* 42(4):2577-2590.
- Fonfara I, Richter H, Bratovič M, Le Rhun A, Charpentier E. 2016. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR ARN. *Nature* 532(7600):517-521.
- Foster AJ, Martin-Urdiroz M, Yan X, Wright HS, Soanes DM, Talbot NJ. 2018. CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein-mediated co-editing and

- counterselection in the rice blast fungus—*Scientific Reports* 8(1):14355.
- Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen Y-S, Domm J, Eustace BK, Foell J, de la Fuente J, Grupp S, Handgretinger R, Ho TW, Kattamis A, Kernytsky A, Lekstrom-Himes J, Li AM, Locatelli F, Mapara MY, de Montalembert M, Rondelli D, Sharma A, Sujit Sheth, Soni S, Steinberg MH, Wall D, Yen A, Corbacioglu S. 2021. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *The New England Journal of Medicine* 384(3):252-260.
- Garneau JE, Dupuis M-È, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 468(7320):67-71.
- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. 2012. Cas9-crARN ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(39):E2579-2586.
- Gong S, Yu HH, Johnson KA, Taylor DW. 2018. DNA Unwinding Is the Primary Determinant of CRISPR-Cas9 Activity. *Cell Reports* 22(2):359-371.
- Guo M, Ren K, Zhu Y, Tang Z, Wang Y, Zhang B, Huang Z. 2019. Structural insights into a high-fidelity variant of SpCas9. *Cell Research* 29(3):183-192.
- Gupta D, Bhattacharjee O, Mandal D, Sen MK, Dey D, Dasgupta A, Kazi TA, Gupta R, Sinharoy S, Acharya K, Chattopadhyay D, Ravichandiran V, Roy S, Ghosh D. 2019. CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life Sciences* 232:116636.
- Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. 2005. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol* 1(6):e60.
- Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L, Terns RM, Terns MP. 2009. ARN-Guided ARN Cleavage by a CRISPR ARN-Cas Protein Complex. *Cell* 139(5):945-956.
- Hale CR, Cocozaki A, Li H, Terns RM, Terns MP. 2014. Target ARN capture and cleavage by the Cmr type III-B CRISPR-Cas effector complex. *Genes & Development* 28(21):2432-2443.
- Hatoum-Aslan A, Maniv I, Samai P, Marraffini LA. 2014. Genetic characterization of antiplasmid immunity through a type III-A CRISPR-Cas system. *J Bacteriology* 196(2):310-317.
- Haurwitz RE, Jinek M, Wiedenheft B, Zhou K, Doudna JA. 2010. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science* 329: 1355-1358.
- Hrle A, Su AA, Ebert J, Benda C, Randau L, Conti E. 2013. Structure and ARN-binding properties of the Type III-A CRISPR-associated protein Csm3. *ARN Biology* 10(11):1670-1678.
- Huang C-H, Lee K-C, Doudna JA. 2018. Applications of CRISPR-Cas Enzymes in Cancer Therapeutics and Detection. *Trends in Cancer* 4(7):499-512.
- Institut de Recherches InteARNtionales Servier. 2021. Long-term Follow-up Study of Patients Who Have Previously Been Exposed to UCART19 (Allogeneic Engineered T-cells Expressing a Lentiviral-based Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor) (Clinical trial registration NCT02735083). [clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02735083](https://clinicaltrials.gov/show/NCT02735083)
- Ipoutcha T, Tsarmpopoulos I, Talenton V, Gaspin C, Moisan A, Walker CA, Brownlie J, Blanchard A, Thebault P, Sirand-Pugnet P. 2019. Multiple Origins and Specific Evolution of CRISPR/Cas9 Systems in Minimal Bacteria (Mollicutes). *Frontiers in Microbiology* 10:2701.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriology* 169(12):5429-5433.
- Jansen R, Embden JDA van, Gaastra W, Schouls LM. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* 43(6):1565-1575.
- Jiang F, Doudna JA. 2015. The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Structural Biology* 30:100-111.
- Jiang F, Doudna JA. 2017. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics* 46:505-529.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual-ARN-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337(6096):816-821.
- Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, Anders C, Hauer M, Zhou K, Lin S, Kaplan M, Iavaronen AT, Charpentier E, Nogales E, Doudna JA. 2014. Structures of Cas9 endonucleases reveal ARN-mediated conformational activation. *Science* 343(6176):1247997.
- Jing X, Xie B, Chen L, Zhang N, Jiang Y, Qin H, Wang H, Hao P, Yang S, Li X. 2018. Implementation of the CRISPR-Cas13a system in fission yeast and

- its repurposing for precise ARN editing. *Nucleic Acids Research* 46(15):e90.
- Ka D, Jang DM, Han BW, Bae E. 2018. Molecular organization of the type II-A CRISPR adaptation module and its interaction with Cas9 via Csn2. *Nucleic Acids Research* 46(18):9805-9815.
- Kazlauskienė M, Tamulaitis G, Kostiuk G, Venclovas Č, Siksnys V. 2016. Spatiotemporal Control of Type III-A CRISPR-Cas Immunity: Coupling DNA Degradation with the Target ARN Recognition. *Molecular Cell* 62(2):295-306.
- Kennedy EM, Cullen BR. 2017. Gene Editing: A New Tool for Viral Disease. *Annual Review of Medicine* 68:401-411.
- Khan A, Sarkar E. 2022. CRISPR/Cas9 encouraged CAR-T cell immunotherapy, reporting efficient and safe clinical results towards cancer. *Cancer Treatment and Research Communications* 33:100641.
- Kim JG, Garrett S, Wei Y, Graveley BR, Terns MP. 2019. CRISPR DNA elements controlling site-specific spacer integration and proper repeat length by a Type II CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Research* 47(16):8632-8648.
- Kim YS, Kim GR, Park M, Yang SC, Park SH, Won JE, Lee JH, Shin HE, Song H, Kim HR. 2020. Electroporation of AsCpf1/RNP at the Zygote Stage is an Efficient Genome Editing Method to Generate Knock-Out Mice Deficient in Leukemia Inhibitory Factor. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 17(1):45-53.
- Knott GJ, East-Seletsky A, Cofsky JC, Holton JM, Charles E, O'Connell MR, Doudna JA. 2017. Guide-bound structures of an ARN-targeting A-cleaving CRISPR-Cas13a enzyme. *Nature Structural & Molecular Biology* 24(10):825-833.
- Konermann S, Lotfy P, Brideau NJ, Oki J, Shokhirev MN, Hsu PD. 2018. Transcriptome Engineering with ARN-Targeting Type VI-D CRISPR Effectors. *Cell* 173(3):665-676.e14.
- Koonin EV, Makarova KS. 2013. CRISPR-Cas: Evolution of an ARN-based adaptive immunity system in prokaryotes. *ARN Biology* 10(5):679-686.
- Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. 2017. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol* 37:67-78.
- Lander ES. 2016. The Heroes of CRISPR. *Cell* 164(1-2):18-28.
- Lee SH, Bae S. 2016. Structural and dynamic views of the CRISPR-Cas system at the single-molecule level. *BMB Reports* 49(4):201-207.
- Lewis KM, Ke A. 2017. Building the Class 2 CRISPR-Cas Arsenal. *Molecular Cell* 65(3): 377-379.
- Li Y, Pan S, Zhang Y, Ren M, Feng M, Peng N, Chen L, Liang YX, She Q. 2016. Harnessing Type I and Type III CRISPR-Cas systems for genome editing. *Nucleic Acids Research* 44(4):e34.
- Li B, Zhao W, Luo X, Zhang X, Li C, Zeng C, Dong Y. 2017. Engineering CRISPR-Cpf1 crARNs and mARNs to maximize genome editing efficiency. *Nature Biomedical Engineering* 1(5):0066.
- Li W, Chan C, Zeng C, Turk R, Behlke MA, Cheng X, Dong Y. 2020. Rational Design of Small Molecules to Enhance Genome Editing Efficiency by Selectively Targeting Distinct Functional States of CRISPR-Cas12a. *Bioconjugate Chemistry* 31(3):542-546.
- Li H, Cui X, Sun L, Deng X, Liu S, Zou X, Li B, Wang C, Wang Y, Liu Y, Lu B, Cao B. 2021. High concentration of Cas12a effector tolerates more mismatches on ssDNA. *FASEB J* 35(1):e21153.
- Li Y, Wei Y, Li G, Huang S, Xu J, Ding Q, Hong J. 2022. Targeting nectin-1 Based on CRISPR/Cas9 System Attenuated the Herpes Simplex Virus Infection in Human Corneal Epithelial Cells *In vitro*. *Translational Vision Science & Technology* 11(2):8.
- Liao C, Ttofali F, Slotkowski RA, Denny SR, Cecil TD, Leenay RT, Keung AJ, Beisel CL. 2019. Modular one-pot assembly of CRISPR arrays enables library generation and reveals factors influencing crARN biogenesis. *Nature Communications* 10(1):2948.
- Lin P, Qin S, Pu Q, Wang Z, Wu Q, Gao P, Schettler J, Guo K, Li R, Li G, Huang C, Wei Y, Gao GF, Jiang J, Wu M. 2020. CRISPR-Cas13 Inhibitors Block ARN Editing in Bacteria and Mammalian Cells. *Molecular Cell* 78(5):850-861.e5.
- Liu L, Chen P, Wang M, Li X, Wang J, Yin M, Wang Y. 2017. C2c1-sgARN Complex Structure Reveals ARN-Guided DNA Cleavage Mechanism. *Molecular Cell* 65(2):310-322.
- Liu L, Li X, Ma J, Li Z, You L, Wang J, Wang M, Zhang X, Wang Y. 2017. The Molecular Architecture for ARN-Guided ARN Cleavage by Cas13a. *Cell* 170(4): 714-726.e10.
- Liu Z, Dong H, Cui Y, Cong L, Zhang D. 2020. Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. *Microbial Cell Factories* 19:172.
- Ma L, Yang S, Peng Q, Zhang J, Zhang J. 2023. CRISPR/Cas9-based gene-editing technology for sickle cell disease. *Gene* 874:147480.
- Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, Koonin EV. 2011. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-

- Cas systems. *Biology Direct* 6(1):38.
- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Wolf YI, Yakunin A, van der Oost J, Koonin EV. 2011. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews. Microbiology* 9(6):467-477.
- Makarova KS, Koonin EV. 2015. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods in Molecular Biology* 1311: 47-75.
- Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost J, Backofen R, Koonin EV. 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews. Microbiology* 13(11):722-736.
- Makarova KS, Zhang F, Koonin EV. 2017. SnapShot: Class 1 CRISPR-Cas Systems. *Cell* 168(5):946-946.e1.
- Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. 2018. Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here? *The CRISPR J* 1(5):325-336.
- Makarova KS, Gao L, Zhang F, Koonin EV. 2019. Unexpected connections between type VI-B CRISPR-Cas systems, bacterial natural competence, ubiquitin signaling network and DNA modification through a distinct family of membrane proteins. *FEMS Microbiology Letters* 366(8):fnz088.
- Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, Charpentier E, Cheng D, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM., Scott D, Shah SA, Siksnys V, Terns MP, Venclovas Č, White MF, Yakunin AF, Yan W, Zhang F, Garrett RA, Backofen R, van der Oost J, Barrangou R, Koonin EV. 2020. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: A burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews. Microbiology* 18(2): 67-83.
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. 2013. ARN-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339(6121):823-826.
- Marraffini LA, Sontheimer EJ. 2008. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science (New York, N.Y.)* 322(5909):1843-1845.
- Matthews KRW, Iltis AS. 2019. Are we ready to genetically modify a human embryo? Or is it too late to ask? *Accountability in Research* 26(4):265-270.
- Maxwell KG, Millman JR. 2021. Applications of iPSC-derived beta cells from patients with diabetes. *Cell Reports Medicine* 2(4):100238.
- McGinn J, Marraffini LA. 2019. Molecular mechanisms of CRISPR-Cas spacer acquisition. *Nature Reviews Microbiology* 17(1):artículo 1.
- Meeske AJ, Jia N, Cassel AK, Kozlova A, Liao J, Wiedmann M, Patel DJ, Marraffini LA. 2020. A phage-encoded anti-CRISPR enables complete evasion of type VI-A CRISPR-Cas immunity. *Science* 369(6499):54-59.
- Meijers AS, Troost R, Ummels R, Maaskant J, Speer A, Nejentsev S, Bitter W, Kuijl CP. 2020. Efficient genome editing in pathogenic mycobacteria using *Streptococcus thermophilus* CRISPR1-Cas9. *Tuberculosis* 124:101983.
- Meshalkina DA, Glushchenko AS, Kysil EV, Mizgirev IV, Frolov A. 2020. SpCas9- and LbCas12a-Mediated DNA Editing Produce Different Gene Knockout Outcomes in Zebrafish Embryos. *Genes* 11(7):740.
- Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar E. 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology* 29(2):143-148.
- Miller J, McLachlan AD, Klug, A. 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *The EMBO J* 4(6):1609-1614.
- Mir A, Edraki A, Lee J, Sontheimer EJ. 2018. Type II-C CRISPR-Cas9 Biology, Mechanism and Application. *ACS Chemical Biology* 13(2):357-365.
- Mohammadian Gol T, Urena-Bailen G, Hou Y, Sinn R, Antony JS, Handgretinger R, Mezger M. 2023. CRISPR medicine for blood disorders: Progress and challenges in delivery. *Frontiers in Genome Editing* 4:1037290.
- Mojica FJM, Juez G, Rodríguez-Valera F. 1993. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular Microbiology* 9(3):613-621.
- Mojica FJ, Ferrer C, Juez G, Rodríguez-Valera F. 1995. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the *Archaea Haloferax Mediterranean* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol Microbiol* 17(1):85-93.

- Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez, G. 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology* 36(1):244-246.
- Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Molecular Evolution* 60(2):174-182.
- Moon SB, Kim DY, Ko J-H, Kim Y-S. 2019. Recent advances in the CRISPR genome editing tool set. *Experimental & Molecular Medicine* 51(11):1-11.
- Mulepati S, Héroux A, Bailey S. 2014. Structural biology. Crystal structure of a CRISPR ARN-guided surveillance complex bound to a ssDNA target. *Science* 345(6203):1479-1484.
- Murugan K, Seetharam AS, Severin AJ, Sashital DG. 2020. CRISPR-Cas12a has widespread off-target and dsDNA-nicking effects. *J Biol Chem* 295(17):5538-5553.
- Nakata A, Amemura M, Makino K. 1989. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J Bacteriology* 171(6):3553-3556.
- Newire E, Aydin A, Juma S, Enne VI, Roberts AP. 2020. Identification of a Type IV-A CRISPR-Cas System Located Exclusively on IncHI1B/IncFIB Plasmids in Enterobacteriaceae. *Frontiers in Microbiology* 11:1937.
- Nicholson TJ, Jackson SA, Croft BI, Staals RHJ, Fineran PC, Brown CM. 2018. Bioinformatic evidence of widespread priming in type I and II CRISPR-Cas systems. *ARN Biology* 16(4):566-576.
- Nickel L, Weidenbach K, Jäger D, Backofen R, Lange SJ, Heidrich N, Schmitz RA. 2013. Two CRISPR-Cas systems in *Methanosarcina mazei* strain Gö1 display common processing features despite belonging to different types I and III. *ARN Biology* 10(5):779-791.
- Niewoehner O, Garcia-Doval C, Rostøl JT, Berk C, Schwede F, Bigler L, Hall J, Marraffini LA, Jinek M. 2017. Type III CRISPR-Cas systems produce cyclic oligoadenylate second messengers. *Nature* 548(7669):543-548.
- NIH-ClinicalTrials.gov. 2023. CRISPR-Cas9. Julio. <https://clinicaltrials.gov/search?term=crispr-Cas9>
- Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide ARN and target DNA. *Cell* 156(5):935-949.
- Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, Gao L, Hirano S, Okazaki S, Noda T, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Mori H, Oura S, Holmes B, Tanaka M, Seki M, Hirano H, Aburatani H, Ishitani R, Ikawa M, Yachie N, Zhang F, Nureki O. 2018. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science (New York, N.Y.)* 361(6408):1259-1262.
- Numata T, Inanaga H, Sato C, Osawa T. 2015. Crystal structure of the Csm3-Csm4 subcomplex in the type III-A CRISPR-Cas interference complex. *J Molecular Biology* 427(2):259-273.
- O'Connell MR. 2019. Molecular Mechanisms of RNA Targeting by Cas13-containing Type VI CRISPR-Cas Systems. *J Molecular Biology* 431(1):66-87.
- Olson S. 2016. Committee on Science, Technology, and Law; Policy and Global Affairs; National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. International Summit on Human Gene Editing: A Global Discussion. Olson S, editor. Washington (DC): National Academies Press (US).
- Özcan A, Pausch P, Linden A, Wulf A, Schühle K, Heider J, Urlaub H, Heimerl T, Bange G, Randau L. 2019. Type IV CRISPR ARN processing and effector complex formation in *Aromatoleum aromaticum*. *Nature Microbiology* 4(1): 89-96.
- Papasavva P, Kleanthous M, Lederer CW. 2019. Rare Opportunities: CRISPR/Cas-Based Therapy Development for Rare Genetic Diseases. *Molecular Diagnosis & Therapy* 23(2):201-222.
- Park SH, Bao G. 2021. CRISPR/Cas9 gene editing for curing sickle cell disease. *Transfusion and Apheresis Science: Official Journal of the World Apheresis Association: Official Journal of the European Society for Haemapheresis* 60(1).
- Paul B, Montoya G. 2020. CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications. *Biomedical J* 43: 8-17.
- Perez-Pinera P, Jones MF, Lal A, Lu TK. 2015. Putting Non-coding ARN on Display with CRISPR. *Molecular Cell* 59(2):146-148.
- Phan PT, Schelling M, Xue C, Sashital DG. 2019. Fluorescence-based methods for measuring target interference by CRISPR-Cas systems. *Methods in Enzymology* 616:61-85.
- Pinilla-Redondo R, Mayo-Muñoz D, Russel J, Garrett RA, Randau L, Sørensen SJ, Shah SA. 2020. Type IV CRISPR-Cas systems are highly diverse and involved in competition between plasmids. *Nucleic Acids Research* 48(4):2000-2012.
- Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. 2005. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology (Reading, England)* 151(Pt

- 3): 653-663.
- Raitskin O, Patron NJ. 2016. Multi-gene engineering in plants with ARN-guided Cas9 nuclease. *Current Opinion in Biotechnology* 37:69-75.
- Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS, Koonin E, Sharp PA, Zhang F, Yan W X, Scott DA. 2015. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* 520;7546: 186-91.
- Reyes Mata MP, Salazar Camarena DC, Martínez López E, Menchaca Tapia VM. 2023. CRISPR-Cas: de la investigación básica a la aplicación para la atención primaria en salud. Universidad de Guadalajara Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Retos e innovación desde las ciencias básicas para la atención primaria en la salud Cap10: 210-236.
- Safari F, Zare K, Negahdaripour M, Barekati-Mowahed M, Ghasemi Y. 2019. CRISPR Cpf1 proteins: Structure, function, and implications for genome editing. *Cell & Bioscience* 9(1):36.
- Samai P, Pyenson N, Jiang W, Goldberg GW, Hatoum-Aslan A, Marraffini LA. 2015. Co-transcriptional DNA and ARN Cleavage during Type III CRISPR-Cas Immunity. *Cell* 161(5):1164-1174.
- Sangamo Therapeutics. 2021. Long-Term Follow-up of HIV-Infected Subjects Treated with Autologous T-Cells Genetically Modified at the CCR5 Gene by Zinc Finger Nucleases (SB-728-T or SB-728mR-T) (Clinical trial registration NCT04201782). [clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04201782](https://clinicaltrials.gov/show/NCT04201782)
- Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. 2011. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 39(21):9275-9282.
- Scott T, Urak R, Soemardy C, Morris KV. 2019. Improved Cas9 activity by specific modifications of the tracrARN. *Scientific Reports* 9(1):16104.
- Shao Y, Coczaki AI, Ramia NF, Terns RM, Terns MP, Li H. 2013. Structure of the Cmr2-Cmr3 Subcomplex of the Cmr ARN Silencing Complex. *Structure* (London, England: 1993) 21(3):376-384.
- Shimori M, Garrett SC, Graveley BR, Terns MP. 2018. Cas4 Nucleases Define the PAM, Length, and Orientation of DNA Fragments Integrated at CRISPR Loci. *Molecular Cell* 70(5):814-824.e6.
- Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, Minakhin L, Joung J, Konermann S, Severinov K, Zhang F, Koonin EV. 2015. Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Mol Cell* 60(3):385-97.
- Sieber RN, Overballe-Petersen S, Kaya H, Larsen AR, Petersen A. 2020. Complete Genome Sequences of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains 110900 and 128254, Two Representatives of the CRISPR-Cas-Carrying Sequence Type 630/spa Type t4549 Lineage. *Microbiology Resource Announcements* 9(41):e00891-20.
- Skeens E, East KW, Lisi GP. 2021. 1H, 13C, 15 N backbone resonance assignment of the recognition lobe subdomain 3 (Rec3) from *Streptococcus pyogenes* CRISPR-Cas9. *Biomolecular NMR Assignments* 15(1):25-28.
- Slymaker IM, Mesa P, Kellner MJ, Kannan S, Brignole E, Koob J, Feliciano PR, Stella S, Abudayyeh O, Gootenberg J, Strecker J, Montoya G, Zhang F. 2019. High-resolution structure of Cas13b and biochemical characterization of ARN targeting and cleavage. *Cell report* 26(13):3741-3751.e5.
- Smargon AA, Cox DBT, Pyzocha NK, Zheng K, Slymaker IM, Gootenberg JS, Abudayyeh OA, Essletzbichler P, Shmakov S, Makarova KS, Koonin EV, Zhang F. 2017. Cas13b Is a Type VI-B CRISPR-Associated ARN-Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28. *Molecular Cell* 65(4):618-630. e7.
- Smargon AA. 2018. Discovery and characterization of Cas13b, a differentially regulated ARN-targeting CRISPR system [Thesis, Massachusetts Institute of Technology]. <https://dspace.mit.edu/handle/1721.1/115637>
- Staals RHJ, Zhu Y, Taylor DW, Kornfeld JE, Sharma K, Barendregt A, Koehorst JJ, Vlot M, Neupane N, Varossieau K, Sakamoto K, Suzuki T, Dohmae N, Yokoyama S, Schaap PJ, Urlaub H, Heck AJR, Nogales E, Doudna JA, van der Oost J. 2014. ARN targeting by the type III-A CRISPR-Cas Csm complex of *Thermus thermophilus*. *Molecular Cell* 56(4):518-530.
- Stella S, Alcón P, Montoya G. 2017. Class 2 CRISPR-Cas ARN-guided endonucleases: Swiss Army knives of genome editing. *Nature Structural & Molecular Biology* 24(11):882-892.
- Stella S, Mesa P, Thomsen J, Paul B, Alcón P, Jensen SB, Saligram B, Moses ME, Hatzakis NS, Montoya G. 2018. Conformational Activation Promotes CRISPR-Cas12a Catalysis and Resetting of the Endonuclease Activity. *Cell* 175(7):1856-1871. e21.
- Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. 2014. DNA interrogation by the

- CRISPR ARN-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507(7490): 62–67.
- Sternberg SH, Richter H, Charpentier E, Qimron U. 2016. Adaptation in CRISPR-Cas Systems. *Molecular Cell Review* 61: 797-808.
- Tamulaitis G, Kazlauskienė M, Manakova E, Venclovas Č, Nwokeoji AO, Dickman MJ, Horvath P, Siksnys V. 2014. Programmable ARN shredding by the type III-A CRISPR-Cas system of *Streptococcus thermophilus*. *Mol Cell* 56(4):506-17.
- Tang Y, Fu Y. 2018. Class 2 CRISPR/Cas: An expanding biotechnology toolbox for and beyond genome editing. *Cell & Bioscience* 8(1):59.
- Tang L. 2019. Exploring class 1 CRISPR systems. *Nature Methods* 16(11):1079.
- Taylor HN, Warner EE., Armbrust MJ, Crowley VM, Olsen KJ, Jackson RN. 2019. Structural basis of Type IV CRISPR ARN biogenesis by a Cas6 endoribonuclease. *ARN Biology* 16(10):1438-1447.
- Teng F, Cui T, Feng G, Guo L, Xu K, Gao Q, Li T, Li J, Zhou Q, Li W. 2018. Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering. *Cell Discovery* 4(1):1-15.
- The Nobel Prize in Chemistry 2020. NobelPrize.Org. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/>
- Travis J. And Science's 2015 Breakthrough of the Year is... CRISPR genome-editing technology shows its power. *Science* 350(6267):1456-1457.
- Toro N, Mestre MR, Martínez-Abarca F, González-Delgado A. 2019. Recruitment of Reverse Transcriptase-Cas1 Fusion Proteins by Type VI-A CRISPR-Cas Systems. *Frontiers in Microbiology* 10:2160.
- van Aelst K, Martínez-Santiago CJ, Cross SJ, Szczelkun MD. 2019. The Effect of DNA Topology on Observed Rates of R-Loop Formation and DNA Strand Cleavage by CRISPR Cas12a. *Genes* 10(2):E169.
- van Beljouw SPB, Sanders J, Rodriguez-Molina A, Brouns SJJ. 2023. RNA-targeting CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews. Microbiology* 21(1):21-34.
- van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B. 2014. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews. Microbiology* 12(7):479-492.
- Van Orden MJ, Newsom S, Rajan R. 2020. CRISPR type II-A subgroups exhibit phylogenetically distinct mechanisms for prespacer insertion. *J Biological Chemistry* 295(32):10956-10968.
- Vertex Pharmaceuticals Incorporated. 2021. A Long-term Follow-up Study of Subjects With β -thalassemia or Sickle Cell Disease Treated With Autologous CRISPR-Cas9 Modified Hematopoietic Stem Cells (CTX001) (Clinical trial registration NCT04208529). [clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04208529](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04208529)
- Vlot M, Houkes J, Lochs SJA, Swarts DC, Zheng P, Kunne T, Mohanraju P, Anders C, Jinek M, van der Oost J, Dickman MJ, Brouns SJJ. 2018. Bacteriophage DNA glucosylation impairs target DNA binding by type I and II but not by type V CRISPR-Cas effector complexes. *Nucleic Acids Research* 46(2):873-885.
- Voloshin ON, Vanevski F, Khil PP, Camerini-Otero, RD. 2003. Characterization of the DNA damage-inducible helicase DinG from *Escherichia coli*. *J Biological Chemistry* 278(30):28284-28293.
- Voloshin ON, Camerini-Otero RD. 2007. The DinG protein from *Escherichia coli* is a structure-specific helicase. *J Biological Chemistry* 282(25):18437–18447.
- Vora S, Tuttle M, Cheng J, Church G. 2016. Next step for the CRISPR revolution: ARN-guided epigenetic regulators. *The FEBS J* 283(17):3181–3193.
- Wang, J, Zhang C, Feng B. 2020. The rapidly advancing Class 2 CRISPR-Cas technologies: A customizable toolbox for molecular manipulations. *JouARNI of Cellular and Molecular Medicine* 24(6):3256-3270.
- Watanabe S, Cui B, Kiga K, Aiba Y, Tan X-E, Sato'o Y, Kawauchi M, Boonsiri T, Thitiananpakorn K, Taki Y, Li F-Y, Azam AH, Nakada Y, Sasahara T, Cui L. 2019. Composition and Diversity of CRISPR-Cas13a Systems in the Genus *Leptotrichia*. *Frontiers in Microbiology* 10:2838.
- Wessels H-H, Méndez-Mancilla A, Guo X, Legut M, Daniloski Z, Sanjana NE. 2020. Massively parallel Cas13 screens reveal principles for guide ARN design. *Nature Biotechnology* 38(6):722-727.
- Whitaker RJ, Vanderpool CK. 2016. CRISPR-Cas Gatekeeper: Slow on the Uptake but Gets the Job Done. *Cell Host Microbe* 19(2):135-7.
- Wilkinson M, Drabavicius G, Silanskas A, Gasiunas G, Siksnys V, Wigley DB. 2019. Structure of the DNA-Bound Spacer Capture Complex of a Type II CRISPR-Cas System. *Molecular Cell* 75(1):90-101.e5.
- Wu D, Guan X, Zhu Y, Ren K, Huang Z. 2017. Structural basis of stringent PAM recognition by CRISPR-C2c1 in complex with sgARN. *Cell Research* 27(5):705-708.
- Xie N, Zhou Y, Sun Q, Tang B. 2018. Novel Epigenetic Techniques Provided by the CRISPR/Cas9 System.

- Stem Cells IntenARntional 2018:7834175.
- Xing H-L, Dong L, Wang Z-P, Zhang H-Y, Han C-Y, Liu B, Wang X-C, Chen Q-J. 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology* 14:327.
- Xiong X, Chen M, Lim WA, Zhao D, Qi L. S. 2016. CRISPR/Cas9 for Human Genome Engineering and Disease Research. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 17:131-154.
- Yan F, Wang W, Zhang J. 2019. CRISPR-Cas12 and Cas13: The lesser-known siblings of CRISPR-Cas9. *Cell Biology and Toxicology* 35(6):489-492.
- Yan WX, Chong S, Zhang H, Makarova KS, Koonin EV, Chen DR, Scott DA. 2018. Cas13d is a Compact ARN-Targeting Type VI CRISPR Effector Positively Modulated by a WYL-Domain-Containing Accessory Protein. *Molecular Cell* 70(2):327-339.e5.
- Yan WX, Hunnewell P, Alfonse LE, Carte JM, Keston-Smith E, Sothiselvam S, Garrity AJ, Chong S, Makarova KS, Koonin EV, Cheng DR, Scott DA. 2019. Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems. *Science* 363(6422):88-91.
- Yang H, Gao P, Rajashankar KR, Patel DJ. 2016. PAM-Dependent Target DNA Recognition and Cleavage by C2c1 CRISPR-Cas Endonuclease. *Cell* 167(7):1814-1828.e12.
- Yin L, Zhao F, Sun H, Wang Z, Huang Y, Zhu W, Xu F, Mei S, Liu X, Zhang D, Wei L, Cen S, Hu S, Liang C, Guo F. 2020. CRISPR-Cas13a Inhibits HIV-1 Infection. *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 21:147-155.
- You L, Ma J, Wang J, Artamonova D, Wang M, Liu L, Xiang H, Severinov K, Zhang X, Wang Y. 2019. Structure Studies of the CRISPR-Csm Complex Reveal Mechanism of Co-transcriptional Interference. *Cell* 176(1-2):239-253.e16.
- Yu L, Marchisio MA. 2020. Types I and V Anti-CRISPR Proteins: From Phage Defense to Eukaryotic Synthetic Gene Circuits. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8:575393.
- Zhang J, White MF. 2015. Expression and Purification of the CMR (Type III-B) Complex in *Sulfolobus solfataricus*. *Methods in Molecular Biology* 1311:185-194.
- Zhang J, Graham S, Tello A, Liu H, White MF. 2016. Multiple nucleic acid cleavage modes in divergent type III CRISPR systems. *Nucleic Acids Research* 44(4):1789-1799.
- Zhang C, Konermann S, Brideau NJ, Lotfy P, Wu X, Novick SJ, Strutzenberg T, Griffin PR, Hsu PD, Lyumkis D. 2018. Structural Basis for the ARN-Guided Ribonuclease Activity of CRISPR-Cas13d. *Cell* 175(1):212-223.e17.
- Zhang H, Dong C, Li L, Wasney GA, Min J. 2019. Structural insights into the modulatory role of the accessory protein WYL1 in the Type VI-D CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res* 47(10):5420-5428
- Zhang H, Li Z, Daczkowski CM, Gabel C, Mesecar AD, Chang L. 2019. Structural Basis for the Inhibition of CRISPR-Cas12a by Anti-CRISPR Proteins. *Cell Host & Microbe* 25(6):815-826.e4.
- Zhang Y, Zhang Y, Qi Y. 2019. Plant Gene Knockout and Knockdown by CRISPR-Cpf1 (Cas12a) Systems. *Methods in Molecular Biology* 1917:245-256.
- Zhang S, Shen J, Li D, Cheng Y. 2021. Strategies in the delivery of Cas9 ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing. *Theranostics* 11(2): 614-648.
- Zheng Y, Li J, Wang B, Han J, Hao Y, Wang S, Ma X, Yang S, Ma L, Yi L, Peng W. 2020. Endogenous Type I CRISPR-Cas: From Foreign DNA Defense to Prokaryotic Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8:62.
- Zhou Y, Zhu S, Cai C, Yuan P, Li C, Huang Y, Wei W. 2014. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature* 509(7501):487-491.



Síntesis y evaluación preliminar como tripanocida y leishmanicida de una serie de análogos del ácido-2-fenil-benzotiazol-6-carboxílico

Synthesis and preliminary evaluation as trypanosomicidal and leishmanicidal of a series of analogs of acid-2-phenyl-benzothiazole-6-carboxylic acid

ALI MUJOBA^{1*,**}, ZULEYMA BLANCO^{2*}, NEREIDA PARRA^{3**}, FRANCIS GÓMEZ^{4***}, ESTEBAN FERNANDEZ-MOREIRA^{5****},
HEGIRA RAMÍREZ^{6*****}, XENÓN SERRANO^{7*****}, JAIME CHARRIS^{8*}

Resumen

La síntesis y comportamiento tripanocida y leishmanicida de una serie de 2-fenilbenzotiazoles es reportada. Fue necesario optimizar el rendimiento del intermediario clave **3**, para lo cual se modularon algunas variables como: tiempo de reacción, temperatura de la reacción y la base utilizada, el mejor resultado se alcanzó cuando fue usada solución hidroalcohólica de KOH al 35%. La actividad *in vitro* contra epimastigotes de *T. cruzi*, un parásito responsable de la enfermedad de Chagas y promastigotes de *L. braziliensis*, parásito responsable de la leishmaniasis cutánea ha sido prometedora, especialmente los resultados anti-*T. cruzi* encontrados para los compuestos **6** y **11**, con valores de inhibición de la proliferación de $52,76 \pm 2,28$ y $51,80 \pm 3,11\%$, respectivamente, y como leishmanicida los compuestos **5** y **6** resultaron con valores de $48,94 \pm 0,15$ y $45,56 \pm 2,12\%$, respectivamente, comparado con las drogas de uso clínico benznidazol y miltefosina $52,88 \pm 1,77$ y $48,12 \pm 1,15\%$, respectivamente. Estudios adicionales están aún en proceso, necesarios para determinar su comportamiento *in vivo* y el mecanismo de acción.

Palabras clave: Benzotiazol, *T. cruzi*, mal de Chagas, *L. braziliensis*, leishmaniasis

Abstract

The synthesis and trypanocidal and leishmanicidal behavior of a series of 2-phenylbenzothiazoles is reported. It was necessary to optimize the yield of the key intermediate **3**, for which some variables were modulated, such as reaction time, reaction temperature, and the base used; the best result was achieved when 35% KOH hydroalcoholic solution was used. *In vitro* activity against epimastigotes of *T. cruzi*, a parasite responsible for Chagas disease, and promastigotes of *L. braziliensis*, a parasite responsible for cutaneous leishmaniasis, has been promising, especially the results as anti-*T. cruzi* was found for compounds **6** and **11**, with proliferation inhibition values of 52.76 ± 2.28 and $51.80 \pm 3.11\%$, respectively, and as leishmanicidal compounds **5** and **6** were found with values of 48.94 ± 0.15 and $45.56 \pm 2.12\%$, respectively, compared to the clinically used drugs benznidazole and miltefosine 52.88 ± 1.77 and $48.12 \pm 1.15\%$, respectively. Additional studies are still ongoing to determine its *in vivo* behavior and mechanism of action.

Keywords: Benzothiazole, *T. cruzi*, Chagas disease, *L. braziliensis*, leishmaniasis

*Laboratorio de Síntesis Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Apartado 47206, Los Chaguaramos, 1041-A Caracas, Venezuela. **Laboratorio de Fisiología de Parásitos. Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Altos de Pipe, Caracas, Venezuela. ***Dirección de Energía y Ambiente, Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Sartenejas, Caracas, Venezuela ****Escuela de Medicina, Universidad Espíritu Santo, Samborondón 092301, Ecuador. *****Universidad ECOTEC, Km. 13.5 Vía Samborondón, Samborondón, Guayas, Guayaquil 092302, Ecuador. *****Centro de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela. Correspondencia: jaime.charris@ucv.ve

Orcid: ¹[0000-0002-8061-9625](https://orcid.org/0000-0002-8061-9625) ⁵[0000-0003-1892-5370](https://orcid.org/0000-0003-1892-5370)
²[0000-0003-4009-9730](https://orcid.org/0000-0003-4009-9730) ⁶[0000-0003-1916-6118](https://orcid.org/0000-0003-1916-6118)
³[0000-0001-9445-7682](https://orcid.org/0000-0001-9445-7682) ⁷[0000-0002-4895-3201](https://orcid.org/0000-0002-4895-3201)
⁴[0000-0003-3598-6677](https://orcid.org/0000-0003-3598-6677) ⁸[0000-0003-4404-2619](https://orcid.org/0000-0003-4404-2619)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.1-2.3](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.1-2.3)
Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff
Recepción: 06/06/2024
Aprobación: 16/06/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(1y2): 39-47. 2024

Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha enumerado 20 enfermedades tropicales desatendidas (ETDs), incluidas las infecciones causadas por virus, bacterias, hongos y protozoos. En conjunto, estas enfermedades ponen en riesgo a más de 1.400 millones de personas que viven en condiciones de absoluta pobreza, principalmente en los países en desarrollo. Dos de las ETDs más relevantes son la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas. La leishmaniasis es endémica en aproximadamente 98 países, especialmente en los ubicados en América Latina, África oriental y el sudeste asiático, con 14 millones de personas directamente afectadas por la enfermedad. La leishmaniasis visceral, o kala-azar, es causada por varias subespecies incluidas en la familia de la *L. donovani*, es la forma más importante porque causa la enfermedad más grave, con 200-400 mil casos por año y una mortalidad estimada en 10-20%. La leishmaniasis cutánea y mucocutánea están más extendida, y son prevalentes en América Latina, donde son causadas principalmente por la *L. mexicana*, *L. braziliensis*, y especies de *L. panamensis*.

La enfermedad de Chagas (EC), o tripanosomiasis americana, es endémica en los países de América Latina, afecta crónicamente a aproximadamente 6-7 millones de personas y causa 14 mil muertes anuales. El *Trypanosoma cruzi* es el parásito responsable para la EC, que consta de dos fases clínicas: aguda y crónica. En su fase crónica es responsable de problemas cardíacos graves y lesiones gastrointestinales (WHO 2023).

Debido a la gran cantidad de personas afectadas por estas infecciones tropicales

cada año, se han realizado grandes esfuerzos para encontrar y diseñar agentes terapéuticos con propiedades leishmanicidas y/o antichagásicas. Históricamente, dos compuestos heterocíclicos benzimidazol (BNZ) y nifurtimox (NFX) se han utilizados contra la EC (Figura 1), ambos son útiles en el tratamiento de la fase aguda, pero no así cuando la enfermedad llega a la etapa crónica, debido a su baja efectividad y efectos secundarios indeseables Viotti y col., 2009; Forsyth y col., 2016; Olivera y col., 2017). El fexinidazol (FX), un 5-nitroimidazol, originalmente se diseñó para ser empleado para el tratamiento de la EC, sin embargo, su uso se suspendió en la década de los 80s debido a que presentó citotoxicidad y mutagenicidad en los ensayos iniciales. En octubre de 2017, se inició con el FX un nuevo estudio de fase II utilizando regímenes de tratamiento más cortos y de dosis más bajas. El estudio se completó en 2019 y los resultados estuvieron disponibles en el año 2022. El estudio demostró que el FX erradicó con éxito la parasitemia en todos los pacientes; sin embargo, se suspendió debido a problemas de seguridad relacionadas con eventos adversos (Torricco y col., 2023). Muchas otras drogas han sido evaluadas en los últimos tiempos con una amplia variedad de resultados, ninguno de ellos está tan extendidos en la práctica clínica como los compuestos antes mencionados (De Rycker y col., 2016).

Se presenta un cuadro similar cuando se considera el tratamientos anti-Leishmania. Los antimoniales pentavalentes, por ejemplo, el stibogluconato, han sido las moléculas de elección durante muchos años, pero la resistencia de los parásitos contra esos medicamentos está ahora extendida en muchos países principalmente en el subcontinente indio. Más recientemente,

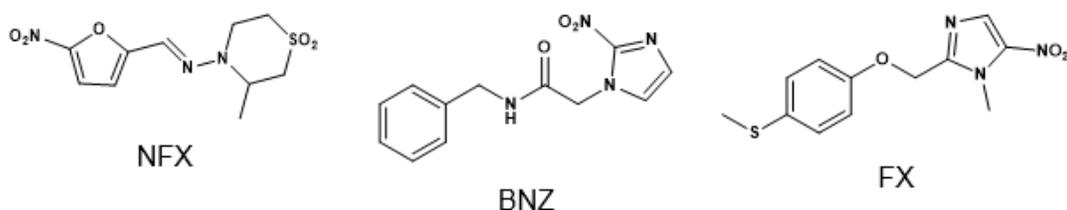


Figura 1. Estructuras para nifurtimox (NFX), benznidazol (BNZ) y fexinidazol (FX)

moléculas como la anfotericina B o la miltefosina han demostrado su eficacia contra la leishmaniasis (Figura 2), pero sus procesos de obtención son costosos y su uso no está exento de complicaciones terapéuticas (Menezes y col., 2015; Savoia, 2015). Como consecuencia, el diseño de nuevas moléculas efectivas, fáciles de sintetizar y sin efectos secundarios, sigue siendo un objetivo a lograr para muchos de los grupos de investigación que trabajan en el desarrollo de moléculas contra estas enfermedades parasitarias.

En relación con este tópico, nuestro grupo de investigación ha estado trabajando en los últimos años en la síntesis y propiedades antiparasitarias de diferentes series de derivados de benzotiazol y 5-nitroimidazol (Charris y col., 2006; Nuñez y col., 2012; Rodríguez y col., 2020; Blanco y col., 2021). De acuerdo con la actividad antiparasitaria reportada previamente, algunas de estas series que contienen la fracción de benzotiazol acompañada de grupos carboxilos (COOH) y trifluorometil (CF₃) proporcionan una acción sinérgica que podría ser la responsable de la buena actividad tripanocida y/o

leishmanicida mostrada *in vitro* por esta clase de compuestos. Sin embargo, cuando los compuestos fueron evaluados *in vivo* no se encontró efecto antiparasitario importante (Cuevas-Hernández y col., 2016; Patrick y col., 2017; Lasing y col., 2020; Martínez-Cerón y col., 2021; Yadav y col., 2023). En este trabajo estamos reportando una serie de doce benzotiazoles 5-16, en donde se puede observar el efecto de las modificaciones en la posición del grupo carboxilo, presente ahora en el anillo benzotiazol y el tipo de sustituyentes sobre el anillo fenilo en la posición dos del benzotiazol, sobre la actividad leishmanicida y tripanocida. Los compuestos se evaluaron *in vitro* contra promastigotes de *L. braziliensis* un parásito representante entre los causantes de la leishmaniasis mucocutánea y epimastigotes de *T. cruzi* como representante de la EC.

Materiales y Métodos

SECCIÓN QUÍMICA

Los puntos de fusión se determinaron en un fusiómetro Fisher-Johns^{MR} y no están

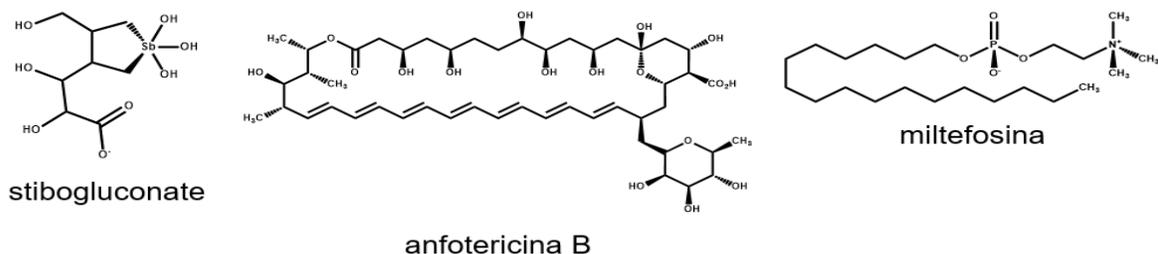


Figura 2. Estructuras para stibogluconato, anfotericina B y miltefosina

corregidos. La cromatografía en capa fina (CCF) se llevó a cabo en placas Merck^{MR} sílica F²⁵⁴ de 0,255 mm y las manchas se visualizaron mediante fluorescencia UV a 254 nm. Los espectros IR se determinaron mediante un espectrofotómetro Perkin-Elmer^{MR} Spectrum two ATR y se expresan en cm⁻¹. Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se realizaron usando espectrómetros Nanalysis^{MR} 100 MHz PRO Benchtop y un JEOL^{MR} Eclipse 270 (a 100 y 270 MHz para ¹H y 26,3 y 67,9 MHz para ¹³C, respectivamente) usando dimetilsulfóxido (DMSO) d₆ como solvente. Los desplazamientos se reportan en ppm empleando como referencia el DMSO residual (δ 2,54 ppm para RMN ¹H y 44,5 ppm para RMN ¹³C, respectivamente). Los reactivos químicos se obtuvieron de Aldrich Chemical Co^{MR}, EE.UU. de Norte América. Todos los disolventes se destilaron y secaron de la manera habitual. El compuesto 2-amino-1,3-benzotiazol-6-carbonitrilo **2** fue reportado previamente (Charris y col., 2006).

SÍNTESIS DE ÁCIDO 4-AMINO-3-MERCAPTOBENZÓICO **3**

Una mezcla constituida por 2-amino-1,3-benzotiazol-6-carbonitrilo **2** (15 mmol) en 30 mL de una mezcla hidroalcohólica de hidróxido de potasio al 35%, se reflujo durante 48 h. Finalizada la reacción, la mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió ácido clorhídrico concentrado hasta la aparición de un precipitado. Se filtró, se secó al vacío por 24h y recristalizó en etanol, para obtener un sólido amarillo con rendimiento del 87 %; p.f. 290 °C (290 °C, Charris y col., 2006); IR cm⁻¹: 3504, 3408, 2640, 1676, 1606; RMN ¹H, DMSO_{d6}, δ ppm: 6,72 (d, 1H, H5, $J = 8,4$ Hz), 7,56 (d, 1H, H2, $J = 1,9$ Hz), 7,62 (dd, 1H, H6, $J_1 = 1,9$

Hz, $J_2 = 8,4$ Hz), 11,90 (sa, 1H, OH); RMN ¹³C, DMSO_{d6}, δ ppm: 114,4; 115,4; 118,0; 133,3; 138,6; 154,1; 167,1; FM. C₇H₇NO₂S, PM. 169,02

PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS 2-ARIL-BENZOTIAZOL-6-CARBOXÍLICOS **5-16**

Una mezcla del ácido 4-amino-3-mercaptobenzoico **3** (0,6 mmol), el aldehído correspondiente **4a-1**, en nitrobenzono 20 mL se sometió a reflujo por 6h. Finalizada la reacción se adicionó n-heptano y el precipitado resultante se filtró, se lavó con éter dietílico, se secó al vacío y se recristalizó en etanol para obtener los productos finales. Los compuestos **2, 3, 5-7, 12-16** han sido reportados previamente por nuestro grupo, sus características fisicoquímicas son igual a las reportadas (Charris y col., 2006).

Ácido-2-(2-metoxifenil)-benzotiazol-6-carboxílico **5**

Ácido-2-(3-metoxifenil)-benzotiazol-6-carboxílico **6**

Ácido-2-(4-metoxifenil)-benzotiazol-6-carboxílico **7**

Ácido-2-(3,4-dimetoxifenil)-benzotiazol-6-carboxílico **8**

Sólido marrón. Rendimiento: 40 %; p.f. > 300 °C; IR cm⁻¹: 3317-2314, 1680, 1590, 1476, 1259, 1123, 1021; RMN ¹H, DMSO_{d6}, δ ppm: 3,89 (s, 3H, OCH₃), 3,92 (s, 3H, OCH₃), 7,20-7,44 (m, 2H, Ar), 7,71-8,09 (m, 3H, Ar), 8,75 (s, 1H, H7), 12,39 (sa, 1H, OH); RMN ¹³C, DMSO_{d6}, δ ppm: 56,1; 57,0; 112,3; 112,7; 120,4; 121,6; 123,9; 126,3; 127,9; 135,3; 149,1; 159,1; 160,1; 167,1; 170,9; C₁₆H₁₅NO₄S, PM. 315,06.

Ácido-2-(3,5-dimetoxifenil)-benzotiazol-6-carboxílico 9

Sólido gris. Rendimiento: 42 %; p.f. > 300 °C; IR cm^{-1} : 3327-2341, 1688, 1604, 1456, 1327, 1261, 1135, 1025; RMN ^1H , DMSO_{d6} , δ ppm: 3,96 (s, 6H, 2OCH_3), 6,76-6,91 (s, 2H, $\text{H}_{2,6}$), 7,24 (s, 1H, H_4), 7,83-8,13 (m, 1H, H_5), 8,18 (d, 1H, H_4 , $J = 7,2$ Hz), 8,78 (s, 1H, H_7); 12,45 (sa, 1H, OH); RMN ^{13}C , DMSO_{d6} , δ ppm: 56,1; 57,0; 112,3; 112,7; 120,4; 121,6; 123,9; 126,3; 127,9; 135,3; 149,1; 159,1; 160,1; 167,1; 170,9; FM: $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$, PM. 315,06.

Ácido-2-(3,4,5-trimetoxifenil)-benzotiazol-6-carboxílico 10

Sólido marrón. Rendimiento: 36 %; p.f. > 300 °C; IR cm^{-1} : 3300-2310, 1682, 1596, 1479, 1330, 1263, 1121, 1035; RMN ^1H , DMSO_{d6} , δ ppm: 3,83 (s, 3H, OCH_3), 3,99 (s, 6H, 2OCH_3), 7,44 (s, 2H, $\text{H}_{2,6}$), 7,45-8,34 (m, 2H, Ar), 8,85 (s, 1H, H_7), 12,87 (sa, 1H, OH); RMN ^{13}C , DMSO_{d6} , δ ppm: 55,9; 59,4; 105,1; 122,1; 123,4; 125,9; 126,3; 128,4; 135,0; 140,3; 155,7; 159,8; 166,9; 169,8; FM: $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_5\text{S}$, PM. 345,07.

Ácido-2-(2,3,4-trimetoxifenil)-benzotiazol-6-carboxílico 11

Sólido marrón. Rendimiento: 42 %; p.f. > 300 °C; IR cm^{-1} : 3300-2330, 1693, 1606, 1482, 1341, 1261, 1120, 1043; RMN ^1H , DMSO_{d6} , δ ppm: 3,73 (s, 3H, OCH_3), 3,80 (s, 3H, OCH_3), 3,83 (s, 3H, OCH_3), 6,65 (d, 1H, H_5 , $J = 8,7$ Hz), 7,41 (d, 1H, H_6 , $J = 8,7$ Hz), 7,69 (d, 1H, H_4 , $J = 8,1$ Hz), 8,11 (dd, 1H, H_5 , $J_1 = 1,5$ Hz, $J_2 = 8,1$ Hz), 8,87 (d, 1H, H_7 , $J = 1,5$ Hz), 12,85 (sa, 1H, OH); RMN ^{13}C , DMSO_{d6} , δ ppm: 56,3; 58,1; 60,6; 104,0; 116,2; 121,8; 122,1; 123,9; 125,7; 126,1; 135,2; 143,9; 149,2; 154,1; 159,1; 166,7; 169,4; FM: $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_5\text{S}$, PM. 345,07.

Ácido-2-(2,4,6-trimetoxifenil)-benzotiazol-6-carboxílico 12

Sólido naranja. Rendimiento: 32 %; p.f. > 300 °C; IR cm^{-1} : 3300-2343, 1702, 1601, 1462, 1378, 1270, 1134, 1027; RMN ^1H , DMSO_{d6} , δ ppm: 3,69 (s, 3H, OCH_3), 3,81 (s, 6H, 2OCH_3), 6,32 (s, 2H, $\text{H}_{3,5}$), 7,63-8,19 (m, 2H, Ar), 8,62 (s, 1H, H_7), 12,34 (sa, 1H, OH); RMN ^{13}C , DMSO_{d6} , δ ppm: 54,8; 57,2; 91,7; 101,3; 121,7; 123,2; 126,1; 126,9; 128,4; 135,9; 159,3; 160,1; 161,4; 166,2; 170,6; FM: $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_5\text{S}$, PM. 345,07.

Ácido-2-(2-nitrofenil)-benzotiazol-6-carboxílico 13**Ácido-2-(3-nitrofenil)-benzotiazol-6-carboxílico 14****Ácido-2-(4-nitrofenil)-benzotiazol-6-carboxílico 15****Ácido-2-(2,4-dinitrofenil)-benzotiazol-6-carboxílico 16****SECCIÓN BIOLÓGICA**

Se evaluó la actividad tripanocida de los compuestos 5-16 sobre la viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa venezolana aislada (MHOM/VE/92/YBM) (Guevara y col., 2005) y sobre promastigotes de *Leishmania (V.) braziliensis* cepa MHOM/CO/87/UA301 (proporcionado por el Dr. Carlos Muskus. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET, Universidad de Antioquia, Colombia), que fueron aislados de lesiones generadas en ratones BALB/C previamente infectados (Nuñez y col., 2012). Los parásitos fueron mantenidos *in vitro* por repiques semanales bajo agitación fuerte a 28°C, en medio de cultivo de Infusión de Hígado Triptosa (*Liver Infusion Tryptose*, LIT) modificado,

suplementado al 10% con suero fetal bovino inactivado.

Se utilizó el método MTT con pequeñas modificaciones (Leañez y col., 2019). A continuación, 5×10^5 parásitos/mL se sembraron en una placa de 96 pozos, adicionando $50 \mu\text{M}$ de cada derivado disuelto en DMSO (la concentración final del DMSO se mantuvo por debajo del 1%). La placa se incubó durante 96 h a 29°C . Se adicionó 3 mg/mL de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) y se incubó en la oscuridad durante 4 h. Después de este tiempo, se procedió a lisar las células con isopropanol ácido (4N) y la placa se leyó a 540 nm en un espectrofotómetro Synergy HT (Biotek). Se utilizaron benznidazol y miltefosina ($50 \mu\text{M}$) como fármacos de referencia.

Resultados y Discusión

Fundamentados en nuestras observaciones previas sobre la capacidad de este tipo de derivados como potenciales agentes antimaláricos (Charris y col., 2006; Nuñez y col., 2012; Rodríguez y col., 2020; Blanco y col., 2021), nos propusimos completar la serie de compuestos incorporando sustituyentes metoxilados haciendo uso de diferentes aldehídos polimetoxilados disponibles comercialmente. Para la generación del intermediario **3** (esquema 1), no disponible comercialmente, clave para la obtención de los productos finales **5-16**, se usó el 4-aminobenzonitrilo **1** que, al ser tratado con tiocianato de amonio en presencia de bromo, generó el correspondiente 2-aminobenzotiazol-6-carbonitrilo **2**.

Fue necesario optimizar el rendimiento del intermediario clave **3**, para lo cual se modularon algunas variables como: tiempo de reacción, temperatura de la reacción y la base utilizada. Cuando en la hidrólisis alcalina se empleó LiOH, en solución hidroalcohólica 1:1 al 35%, el rendimiento estuvo en el orden 62%, cuando la base fue sustituida por KOH al 35% el rendimiento estuvo en el orden del 87%. Previo fue necesario trabajar con otras concentraciones y tiempos de reacción (Tabla I) para alcanzar un rendimiento optimizado con respecto al reportado previamente (Charris y col., 2006).

Caracterizado el intermediario **3**, éste fue sometido al acoplamiento con los aldehídos respectivos empleando como agente oxidante nitrobenzeno, a diferencia del procedimiento reportado, la reacción se detuvo añadiendo n-heptano. Cinco de los nuevos benzotiazoles **8-12**, de los 12 compuestos reportados en este trabajo, fueron caracterizados a través de las técnicas de infrarrojo y resonancia magnética nuclear uni- y bidimensional, los datos se encuentran descritos en la parte experimental.

La actividad biológica de los compuestos **5-16** se determinó midiendo la capacidad inhibitoria de la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. braziliensis in vitro* empleando la técnica del MTT, los resultados se reportan en la Tabla II, de donde se puede deducir que los compuestos mono metoxilados orto y meta sustituidos presentaron la mejor actividad inhibitoria tanto en epimastigotes de *T. cruzi* como en promastigotes de *L. braziliensis* comparados con las drogas de referencias BNZ y miltefosina,

Esquema 1: Síntesis de los compuestos benzotiazol 5-16



i: NH_4SCN , Br_2 , ác. acético, ta. ii: KOH , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, calor, HCl . iii: RCHO , nitrobenzeno, calor

| | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|--------------|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|
| R | 2'-OMe | 3'-OMe | 4'-OMe | 3',4'-OMe | 3',5'-OMe | 3',4',5'-OMe |
| | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| R | 2',3',4'-OMe | 2',4',6'-OMe | 2'-NO ₂ | 3'-NO ₂ | 4'-NO ₂ | 2',4'-NO ₂ |

Tabla I.

Condiciones empleadas para optimizar rendimiento del intermediario 3

| Base | Concen. % | Tiemp. h | Rend. % |
|------|-----------|----------|---------|
| NaOH | 30 | 72 | 76 |
| LiOH | 30 | 72 | 53 |
| LiOH | 35 | 72 | 62 |
| LiOH | 35 | 48 | 57 |
| KOH | 30 | 72 | 71 |
| KOH | 35 | 72 | 64 |
| KOH | 35 | 48 | 87 |

respectivamente. En lo que respecta a las moléculas trisustituidas la mejor actividad la presentaron los compuestos 2,3,4 y 3,4,5-trimetoxi sustituidos siendo más efectivos sobre los epimastigotes de *T. cruzi* 44,9% y 51,8%, que sobre promastigotes de *L. braziliensis* con valores en el orden de 37,6% y 25,2%, respectivamente.

En lo que respecta a los compuestos nitro-sustituidos, solamente se puede considerar con potencial actividad tripanocida al compuesto mono meta sustituido con un valor en orden de 47,8

Tabla II.

Resultados de la actividad inhibitoria sobre epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. braziliensis* a la concentración única de 50 μM

| No | % Inhibición <i>T. cruzi</i> | % Inhibición <i>L. braziliensis</i> |
|--------|------------------------------|-------------------------------------|
| 5 | 48,76 \pm 1,09 | 48,94 \pm 0,15 |
| 6 | 52,76 \pm 2,28 | 45,56 \pm 2,12 |
| 7 | 27,23 \pm 2,82 | 33,15 \pm 1,60 |
| 8 | 26,34 \pm 8,12 | 19,95 \pm 6,36 |
| 9 | 23,80 \pm 1,65 | 10,68 \pm 1,13 |
| 10 | 44,95 \pm 1,71 | 37,63 \pm 1,09 |
| 11 | 51,80 \pm 3,11 | 25,29 \pm 3,22 |
| 12 | 14,66 \pm 3,80 | 21,84 \pm 3,69 |
| 13 | 35,11 \pm 4,19 | 11,86 \pm 1,72 |
| 14 | 47,80 \pm 0,63 | 37,00 \pm 1,25 |
| 15 | 28,64 \pm 0,38 | 14,30 \pm 2,27 |
| 16 | 32,57 \pm 4,36 | 21,60 \pm 7,22 |
| BNZ | 52,88 \pm 1,77 | - |
| Milte. | - | 48,12 \pm 1,15 |

%. Se puede inferir que un efecto dador de electrones de los grupos metoxilos sobre el anillo aromático está jugando un papel crucial en la actividad biológica que el que ejercen los sustituyentes atractores de electrones como el grupo NO₂ empleado en esta oportunidad, además, se suma la posición que ocupe el referido sustituyente sobre el anillo aromático, donde se puede observar que las posiciones del sustituyente dador de electrones en orto y meta están más favorecidas.

Conclusiones

La síntesis y evaluación biológica como anti-*T. cruzi* y leishmanicida de varios derivados de 2-arilbenzotiazol **5-16** se logró a partir de **1**. Las modificaciones de **R** a través de la incorporación de grupos dadores y atractores electrones como el metoxilo o nitro, respectivamente, y la ocupación con un grupo carboxilo sobre la posición **5** del núcleo del benzotiazol produjeron un efecto significativo sobre la actividad antiparasitaria de estos derivados. Como resultado de esta optimización, se identificaron dos nuevos compuestos **6** y **11** con potencial actividad anti-*T. cruzi* *in vitro*, mientras que en la evaluación como leishmanicida los compuestos **5** y **6** resultaron con actividad similar a la droga clínicamente usada como la miltefosina. Los resultados obtenidos en este estudio son muy prometedores, por lo que, se están realizando los estudios adicionales necesario para determinar el comportamiento *in vivo* y el mecanismo implicado en el patrón de actividad observado para los compuestos considerados como líderes.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas (IIF), al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH) y al Ministerio del Poder Popular para Ciencias y Tecnología (MINCYT) proyectos Nos. 20220PGP65 y 222-2024, por el apoyo brindado para la realización de esta investigación. Además, se agradece al Dr. Carlos Muskus. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET, Universidad de Antioquia, Colombia, por aportarnos la cepa de *L. braziliensis* con la que se realizó parte de este trabajo.

Conflicto de interés: Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de interés financiero o con personas que pudieran haber influido en el trabajo reportado.

Referencias Bibliográficas

- Blanco Z, Mijares MR, Ramírez H, Fernández Moreira E, Oviedo HJ, Rodríguez NM, Charris JE. 2021. *In vitro* evaluation and *in vivo* efficacy of nitroimidazole sulfanyl ethyl derivatives against *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) Mexicana*. Parasitolo Res 120(9): 3307-3317.
- Charris J, Camacho J, Ferrer R, Lobo G, Barazarte A, Gamboa N, Rodrigues J, López S. 2006. A convenient route to 2-substituted benzothiazole-6-carboxylic acids using nitrobenzene as oxidant. J Chem Res 12: 769-770.
- Cuevas-Hernández RI, Correa-Basurto J, Flores-Sandoval CA, Padilla-Martínez II, Nogueada-Torres B, Villa-Tanaca M, Tamay-Cach F, Nolasco-Fidencio JJ, Trujillo-Ferrara JG. 2016. Fluorine-containing benzothiazole as a novel trypanocidal agent: design, in silico study, synthesis and activity evaluation. Med Chem Res 25(2): 211-224.
- De Rycker M, Thomas J, Riley J, Brough SJ, Miles TJ, Gray DW. 2016. Identification of trypanocidal activity for known clinical compounds using a

- new *Trypanosoma cruzi* hit-discovery screening cascade. PLoS Negl Trop Dis 10(4): e0004584.
- Forsyth CJ, Hernandez S, Olmedo W, Abuhamidah A, Traina MI, Sanchez DR, Soverow Meymandi JSK. 2016. Safety profile of nifurtimox for treatment of Chagas Disease in the United States. Clin Infect Dis 63(8): 1056-1062.
- Guevara P, Dias M, Rojas A, Crisantes G, Abreu-Balco M, Umezawa E, Vazques M, Levin M, Añez N, Ramírez JL. 2005. Expression of Fluorescent Genes in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): Its Application to Parasite-Vector Biology. J Med Entomo. 42(1): 48-56.
- Lasing T, Phumee A, Siriyasatien P, Chitchak K, Vanalabhpattana P, Mak K-K, Ng CH, Vilaivan T, Khotavivattan T. 2020. Synthesis and antileishmanial activity of fluorinated rhodacyanine analogues: The 'fluorine-walk' analysis. Bioorg Med Chem 28(1):115187.
- Leañez J, Nuñez J, García-Marchan Y, Sojo F, Arvelo F, Rodríguez D, Buscema I, Alvarez-Aular A, Bello J, Kouznetsov V, Serrano-Martín X. 2019. Anti-leishmanial effect of spiro dihydroquinoline-oxindoles on volume regulation decrease and sterol biosynthesis of *Leishmania braziliensis*. Exp Parasitol 198: 31-38.
- Martínez-Cerón S, Gutiérrez-Nágera NA, Mirzaeicheshmeh E, Cuevas-Hernández RI, Trujillo-Ferrara JG. 2021. Phenylbenzothiazole derivatives: effects against a *Trypanosoma cruzi* infection and toxicological profiles. Parasitol Res 120(8): 2905-2918.
- Menezes JPB, Guedes CES, Petersen ALD, Fraga DBM, Veras PST. 2015. Advances in development of new treatment for Leishmaniasis. Biomed Res Int 2015: 815023.
- Nuñez J, Bompard D, Charris J, Camacho J, Rodríguez D, Rodríguez T, Visbal G, Álvarez A, García Y, Serrano X. 2012. Efectos deletorios del jc25 sobre la bioenergética celular y la biosíntesis de esteroides de *Leishmania braziliensis*. Rev Fac Far-UCV. 75(2): 50-58.
- Olivera MJ, Cucunubá ZM, Valencia-Hernández CA, Herazo R, Agreda-Rudenko D, Flórez C, Duque S, Nicholls RS. 2017. Risk factors for treatment interruption and severe adverse effects to benznidazole in adult patients with Chagas disease. PLoS One 12(9): e0185033.
- Patrick DA, Gillespie JR, McQueen J, Hulverson MA, Ranade RM, Creason SA, Herbst ZM, Gelb MH, Buckner FS, Tidwell RR. 2017. Urea Derivatives of 2-aryl-benzothiazol-5-amines: A new class of potential drugs for human African Trypanosomiasis. J Med Chem 60(3): 957-971.
- Rodríguez M, Gutiérrez J, Domínguez J, Peixoto PA, Fernández A, Rodríguez N, Deffieux D, Rojas L, Quideau S, Pouységu L, Charris J. 2020. Synthesis and leishmanicidal evaluation of sulfanyl and sulfonyl-tethered functionalized benzoate derivatives featuring a nitroimidazole moiety. Arch Pharm 353(5): e2000002.
- Savoia D. 2015. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. J Infect Dev Ctries 9(6): 588-596.
- Torrice F, Gascón J, Ortiz L, Pinto J, Rojas G, Palacios A, Barreira F, Blum B, Schijman AG, Vaillant M, Strub-Wourgaft N, Pinazo MJ, Bilbe G, Ribeiro I. 2023. A phase 2, randomized, multicenter, placebo-controlled, proof-of-concept trial of oral fexinidazole in adults with chronic indeterminate Chagas disease. Clin Infect Dis 76(3): e1186-e119.
- Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Álvarez MG, Petti M, Bertocchi G, Armenti A. 2009. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. Expert Rev Anti-Infect Ther 7(2): 157-163.
- World Health Organization. 2023. Chagas Disease (American trypanosomiasis) Fact sheet, Geneva, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-American>. (Accesado 18 Abril 2023).
- World Health Organization (2023) Leishmaniasis. Fact sheet, Geneva <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/leishmaniasis> (Accesado 18 Abril 2024).
- Yadav KP, Rahman MdA, Nishad S, Maurya SK, Anas M, Mujahid M. 2023. Synthesis and biological activities of benzothiazole derivatives: A review. Intelligent Pharmacy 1(3): 122-132.



La dimetilarginina asimétrica y el óxido nítrico en la Aterosclerosis. Su papel como marcador sérico de la aterosclerosis

Asymmetric dimethylarginine and nitric oxide in atherosclerosis.

Role as a serum marker of atherosclerosis

LETICIA FIGUEIRA^{1*,**}, JULIO CÉSAR GONZÁLEZ^{2*,***}

Resumen

La dimetilarginina asimétrica (ADMA) es un inhibidor competitivo de la sintasa de óxido nítrico (NOS); por lo que inhibe la formación de óxido nítrico (NO). Esta molécula se le ha implicado como un factor de riesgo para la disfunción endotelial, la cual es relevante en la fisiopatología de la aterosclerosis. En el presente estudio se evaluó los niveles séricos de ADMA, NO y los productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) y su evolución en el tiempo en conejos alimentados con dieta enriquecida con colesterol. Para ello, 42 conejos machos Nueva Zelanda fueron divididos en dos grupos durante 12 semanas: Grupo 1 (control): Conejarina. Grupo 2: Conejarina suplementada con 0,5% p/p de colesterol. Se realizaron determinaciones séricas de colesterol y sus fracciones, ADMA, NO y TBARS al inicio, 4ta, 8va y 12ma semana de experimentación. 7 conejos de cada grupo fueron sacrificados a la 4ta, 8va y 12ma semana y se realizó estudio histológico de su aorta. Se encontró un aumento en los niveles séricos de ADMA y TBARS, y disminución del NO en el grupo 2 desde la 4ta semana de experimentación con respecto al control (Grupo 1) ($p < 0,005$); lo cual se vio acompañado de ateromas. En conclusión, la ADMA, NO y TBARS son marcadores séricos no invasivos de aterosclerosis; sugiriendo el papel del estrés oxidativo en la fisiopatología de esta enfermedad.

Palabras clave: Dimetilarginina asimétrica, óxido nítrico, sintasa de óxido nítrico, estrés oxidativo, aterosclerosis

Abstract

Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is a competitive inhibitor of nitric oxide synthase (NOS); therefore, it inhibits the formation of nitric oxide (NO). This molecule has been implicated as a risk factor for endothelial dysfunction and is involved in atherosclerosis. We evaluated the serum levels of ADMA, NO, and thiobarbituric acid-reactive lipid peroxidation products (TBARS) during the progression and evolution of atherosclerosis and its evolution over time in rabbits fed with a cholesterol diet. 42 New Zealand white male rabbits were randomly divided into two groups that received for 12 weeks: Group 1 (control): Standard diet (commercial rabbit food). Group 2: Cholesterol diet (0.5% cholesterol). Blood samples of overnight-fasted rabbits were collected in the basal, fourth, eighth, and twelfth weeks, and the concentration of lipid profile, ADMA, NO, and TBARS were determined. Seven of the animals from each group were sacrificed on the fourth, eighth, and twelfth week, and the aorta was dissected for histological studies. Our findings demonstrated that the ADMA and TBARS levels were significantly higher, and NO levels were lower in Group 2 than in Group 1 since the 4th week ($p < 0.005$), which was accompanied by atherosclerotic lesions. These results support that serum ADMA, NO and TBARS levels are markers noninvasive of atherosclerosis. Likewise, oxidative stress is important for atherosclerosis.

Keywords: Asymmetric dimethylarginine, nitric oxide, nitric oxide synthase, oxidative stress, atherosclerosis

*Laboratorio de Investigación y Postgrado de la Escuela de Bioanálisis (LIPEB), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Carabobo – Venezuela. **Laboratorio Clínico Dra. Leticia Figueira. Carabobo – Venezuela, ***Laboratorio Clínico Julio César González. Carabobo – Venezuela. Correspondencia: figueiraleticia@gmail.com

Orcid: ¹[0000-0003-3865-5355](https://orcid.org/0000-0003-3865-5355)
²[0000-0003-1980-5848](https://orcid.org/0000-0003-1980-5848)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.1-2.4](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.1-2.4)
Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 13/06/2024

Aprobación: 18/06/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(1y2): 48-61. 2024

Introducción

La aterosclerosis es una enfermedad inmunoinflamatoria crónica caracterizada por un engrosamiento secuencial y focal de la íntima arterial, que afecta principalmente a arterias de mediano y gran calibre, y en la que están implicados varios tipos de células y lípidos (Kong y col., 2022). Este proceso se caracteriza por una interacción dinámica entre células inflamatorias, citocinas y quimioquinas en la pared arterial. La característica más resaltante de esta enfermedad es el engrosamiento de la pared arterial debido a la acumulación de lípidos y tejido conectivo en proporción variable y la concomitante reducción en el diámetro del lumen vascular (Jebari-Benslaiman y col., 2022); por lo tanto, la aterosclerosis es una enfermedad progresiva que se caracteriza por la presencia de placas fibroadiposas en la íntima arterial que puede llegar a obstruir el lumen de las arterias comprometiendo la funcionalidad circulatoria (Gusev y col., 2023).

La integridad de la barrera endotelial juega un papel importante en el mantenimiento del equilibrio entre la circulación y los tejidos; y en la homeostasis vascular. Algunos estudios han demostrado asociación entre la disfunción endotelial y la subsecuente elevación de factores endoteliales y el desarrollo e intensificación de la enfermedad de las arterias coronarias y aterosclerosis (Shao y col., 2020).

La disfunción endotelial puede definirse como un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que predispone a la inflamación, la vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad vascular, y que puede facilitar la aterogénesis, agregación plaquetaria y trombosis. En

las últimas décadas se ha demostrado que factores de riesgo coronario bien conocidos como el colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL), el tabaquismo, la diabetes, la hipertensión, y otros factores como el estrés oxidativo producen disfunción endotelial (Gimbrone y col., 2016); siendo ésta el paso inicial en la patogénesis de la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares (CDV). De hecho la falla en la vasodilatación dependiente del endotelio es una característica común encontrada en la vasculatura de pacientes con enfermedades CDV, y la mejoría de la función endotelial podría prevenir el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis, lo cual resulta en una disminución de los eventos cardíacos (Higashi y col., 2009; Batty y col., 2022).

Diversos investigadores han reportado los posibles mecanismos que intervienen en la disfunción endotelial, entre los que se incluye el incremento en agentes vasoconstrictores como la angiotensina II (Ang II), endotelina-1 y norepinefrina; inactivación del óxido nítrico (NO) por especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otros; por lo que la evidencia sugiere la existencia de una interacción entre el estrés oxidativo y la función endotelial; ya que el incremento en la producción de ROS y la atenuación de los sistemas de defensa antioxidante podrían contribuir al daño endotelial en las enfermedades CDV (Cai y col., 2000). Por otra parte, los sistemas de defensa antioxidante tales como, la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa, degradan las ROS en la vasculatura, lo cual resulta en una inhibición en la degradación del NO (Higashi y col., 2009; Dri y col., 2023).

El NO es un poderoso vasodilatador producido por el endotelio que juega un

papel muy importante en la regulación del tono vascular, en la supresión de la proliferación de las células de músculo liso vascular, en la inhibición de la agregación plaquetaria y adhesión de los leucocitos al endotelio (Lüscher, 1990). El NO se genera en las células a través de la oxidación del aminoácido L-arginina (L-Arg) con oxígeno molecular, siendo el coproducto de esta reacción biológica la L-citrulina. Esta reacción está catalizada por un grupo de enzimas, la sintasa de NO (NOS), que requiere para su actividad múltiples cofactores, entre los que se incluyen la tetrahidrobiopterina (BH4) (Taddei y col., 2003).

Diversa evidencia ha señalado que el NO es una molécula endógena antiaterogénica, pues es capaz de inhibir la adhesividad y agregación plaquetaria, la adherencia y quimiotaxis de los monocitos y la proliferación de las células musculares lisas del vaso; procesos celulares que están intrínsecamente relacionados con el desarrollo de la aterogénesis (Creager y col., 1992, Nappi y col., 2022).

Por su parte, la dimetilarginina asimétrica (ADMA) es un análogo de la L-Arg que inhibe la síntesis del NO debido a que compite con este aminoácido por el sitio activo de la NOS. Además de inhibir la formación de NO, la ADMA puede desacoplar a la NOS lo cual lleva a la generación de superóxido. Se ha sugerido que la ADMA puede contribuir al estrés oxidativo al desacoplar la NOS endotelial (eNOS) a través del agotamiento de la BH4, lo cual resulta en un cambio en la producción de NO a anión superóxido (Antoniades y col., 2009; Franceschelli y col., 2013); por lo que se ha descrito una fuerte asociación entre el estrés oxidativo, el incremento de la ADMA endotelial y la producción de superóxido

mediada por la NOS. Sin embargo, no está claro si la incrementada producción de ROS es responsable de los niveles elevados de ADMA o si la incrementada producción de ADMA contribuye al estrés oxidativo (Ghebremariam y col., 2013).

La ADMA se le ha implicado como un factor de riesgo para la disfunción endotelial y la enfermedad coronaria pues se ha encontrado niveles elevados de ADMA en condiciones caracterizadas por disfunción endotelial como la hipertensión, hipercolesterolemia, hiperglicemia e insuficiencia renal (Franceschelli y col., 2013). Asimismo, se ha descrito que la ADMA puede inducir inflamación vascular induciendo el desarrollo de enfermedades CDV mediante la activación de la adhesión de leucocitos y la producción de citocinas (Zuccalá y col., 2005); por lo que la ADMA no es únicamente un factor de riesgo para la disfunción endotelial, sino que se comporta como un mediador proinflamatorio y oxidativo (Franceschelli y col., 2013). Sin embargo, a pesar de que está bien documentado que el NO y ADMA participa en la fisiopatología de la aterosclerosis, no está clara su evolución a lo largo del proceso aterogénico; es por ello que en el presente estudio se evaluó los niveles séricos de NO y ADMA como marcador de aterosclerosis y su evolución en el tiempo en conejos alimentados con dieta enriquecida con colesterol.

Materiales y Métodos

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se emplearon 42 conejos machos de la raza Nueva Zelanda de 12 semanas de edad con un peso entre 1.200 a 1.300 gramos,

provenientes del Bioterio del Instituto de Higiene "Rafael Rangel" (Caracas, Venezuela). Los animales fueron mantenidos en jaulas a temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) con ciclos de 12 horas luz/oscuridad. Después de una semana de ambientación en el Bioterio Experimental de la Universidad de Carabobo (Valencia, Venezuela), los conejos fueron divididos aleatoriamente en dos grupos de 21 conejos cada uno, organizados de la siguiente manera: Grupo 1 (Control): Los cuales fueron alimentados diariamente con conejarina comercial (Protinal, Venezuela); Grupo 2 (Colesterol): Alimentados diariamente con conejarina comercial suplementada con 0,5% p/p de colesterol.

Todos los conejos consumieron agua a libre demanda. El periodo experimental tuvo una duración de doce semanas. Los conejos fueron pesados antes, durante y después de la experimentación. Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Bioética, y siguieron las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio del National Institute of Health (NIH Publications No. 8023,1978).

ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS ALIMENTOS

Conejarina comercial (Protinal, Venezuela): Maíz, sorgo, afrechillo de trigo, harinas de maíz, ajonjolí, algodón, girasol y soya, concha de arroz, bagacillo de caña, pasto deshidratado, melaza, grasa estabilizada, carbonato y fosfato de calcio, sal, minerales "trazas" (cobalto, cobre, hierro, manganeso, yodo y zinc) suplementos de las vitaminas A, B2, B12, C, D3, E, ácido pantoténico y niacina, antioxidante, suplemento antibiótico y anticoccidial. Proteína cruda 12%, grasa

cruda 1%, fibra cruda 20%, extracto libre de nitrógeno 42%.

Dieta hipercolesterolémica: La administración de colesterol mediante el enriquecimiento de una dieta estándar se realizó de acuerdo con el método descrito en los modelos animales de aterosclerosis inducida por la dieta (Rasmussen y col., 2007); la cual se preparó disolviendo el colesterol en etil-éter y etanol absoluto, y cubriendo con esta mezcla los granos de la conejarina en una relación de 0,5 g de colesterol por cada 100 g de alimento y se dejó secar hasta la evaporación completa de los solventes por 24 horas.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Determinaciones bioquímicas. Las muestras de sangre fueron extraídas por punción intracardiaca a todos los conejos previo ayuno de 14 horas en las semanas 0, 4^{ta}, 8^{va} y 12^{ma}, utilizando tubos sin anticoagulante. Posteriormente, las muestras previamente mantenidas en frío, se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 minutos y el suero obtenido fue conservado en congelación a -70°C hasta el momento del procesamiento. Se realizaron determinaciones séricas de colesterol total (CT) por método enzimáticos (Wiener Lab, Argentina). La determinación del colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) y asociado a las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) se realizaron por precipitación y posterior determinación enzimática (Wiener Lab, Argentina). Las concentraciones séricas de ADMA fueron determinadas por ensayo inmunoenzimático (NeoBiolab, Cambridge, Massachusetts, USA). El NO sérico fue determinado indirectamente mediante la

determinación de los niveles de nitritos/nitratos usando la reacción de Griess (Green y col., 1982). Para ello, 50 μL de reactivo de Griess fueron añadidos a 50 μL de suero, incubado por 10 minutos a temperatura ambiente y la absorbancia fue medida a 570 nm. Los resultados obtenidos fueron referidos a un patrón de nitrito de sodio y expresado en μM . Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) fueron evaluadas por un método colorimétrico, el cual consistió en evaluar el efecto de las ROS sobre los lípidos, que resulta en la producción de varias sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico y que pueden ser medidas por espectrofotometría (Ohkawa y col., 1979).

SACRIFICIO DE LOS ANIMALES. PREPARACIÓN DE TEJIDOS Y TIPIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LAS LESIONES ATROSCLERÓTICAS

Se sacrificaron por dislocación cervical 7 conejos de cada grupo a la 0, 4^{ta}, 8^{va} semana y al final del estudio. Se procedió a realizar la autopsia de dichos animales, extrayendo la arteria aorta para ser examinada. Las muestras de tejido extraídas fueron fijadas en formaldehído al 10 % en PBS durante 24 horas y procesadas según la técnica de rutina y posteriormente teñidas con hematoxilina – eosina, para luego ser observados por microscopía de luz. Las lesiones fueron tipificadas de acuerdo con la clasificación de la *American Heart Association*, la cual considera como lesiones tipo I, aquellas iniciales constituidas por células espumosas sub-endoteliales aisladas; las lesiones tipo II constituidas principalmente por un cúmulo de lípidos intracelulares; las lesiones tipo III son intermedias o pre-ateromas, caracterizadas por cúmulos de lípidos intracelulares y dispersos

lípidos extracelulares; las lesiones tipo IV son los ateromas, representan lesiones avanzadas, y están constituidas por lípidos intracelulares y por una gran cantidad de lípidos extracelulares; las lesiones tipo V contienen tejido conectivo fibroso y en ocasiones se encuentran calcificaciones y las lesiones tipo VI son las placas complicadas (fisura, trombos, hematomas) (Stary y col., 1995).

Análisis estadístico de los datos

Se calculó el promedio y la desviación estándar para las variables estudiadas. Se realizó las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Jarque-Bera. Se empleó el análisis de Kruskal-Wallis con análisis *post hoc* mediante la prueba de U- de Mann-Whitney sobre cada par de grupos. Se empleó la correlación de Spearman para relacionar el NO y ADMA con las variables del estudio. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.

Resultados

PERFIL LIPÍDICO DE LOS CONEJOS

Como se puede apreciar en la Tabla I, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas basales de los lípidos séricos entre los grupos de conejos sujetos a estudio. El CT y sus fracciones en el grupo 1 permanecieron sin cambios significativos a lo largo del estudio. Sin embargo, en la 4^{ta}, 8^{va} y 12^{ma} semana de experimentación se observó un aumento significativo en la concentración de CT, c-HDL y c-LDL en el grupo 2 con respecto al grupo 1 ($p < 0,0001$). Para el

Tabla I.
Lípidos séricos de los conejos
sujetos a estudio

| | CT (mg/dL) | c-LDL (mg/dL) | c-HDL (mg/dL) |
|-------------------------------|---------------|------------------|------------------|
| Basal | | | |
| Grupo 1 | 68 ± 17 | 35 ± 11 | 30 ± 9 |
| Grupo 2 | 65 ± 19 | 40 ± 10 | 36 ± 11 |
| 4^{ta} semana | | | |
| Grupo 1 | 70 ± 16 | 37 ± 13 | 35 ± 12 |
| Grupo 2 | 295 ± 79* | 240 ± 51* | 59 ± 17* |
| 8^{va} semana | | | |
| Grupo 1 | 75 ± 16 | 44 ± 10 | 36 ± 13 |
| Grupo 2 | 801 ± 168* | 681 ± 93* | 76 ± 32* |
| 12^{ma} semana | | | |
| Grupo 1 | 82 ± 19 | 47 ± 12 | 36 ± 11 |
| Grupo 2 | 1119 ± 253* | 899 ± 127* | 79 ± 38* |
| Valores p | | | |
| Grupo 1 | 0,9258 | 0,9575 | 0,9725 |
| Grupo 2 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0001 |

Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar de la media. Significativo $p < 0,05$

*= Comparación con respecto al grupo 1.

ρ= Comparación con respecto a su basal.

grupo 2 las concentraciones de los lípidos variaron desde el inicio hasta el final del experimento ($p < 0,0001$).

CONCENTRACIONES SÉRICAS DE ADMA, NO Y TBARS

Como se puede apreciar en las Figuras 1-3, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles séricos basales de ADMA, NO y TBARS entre los grupos de conejos sujetos a estudio. De igual manera, dichas variables en el grupo 1 permanecieron sin cambios a lo largo del experimento; por su parte, en el grupo 2 variaron a lo largo del estudio ($p < 0,0001$). En la 4^{ta}, 8^{va} y al final del

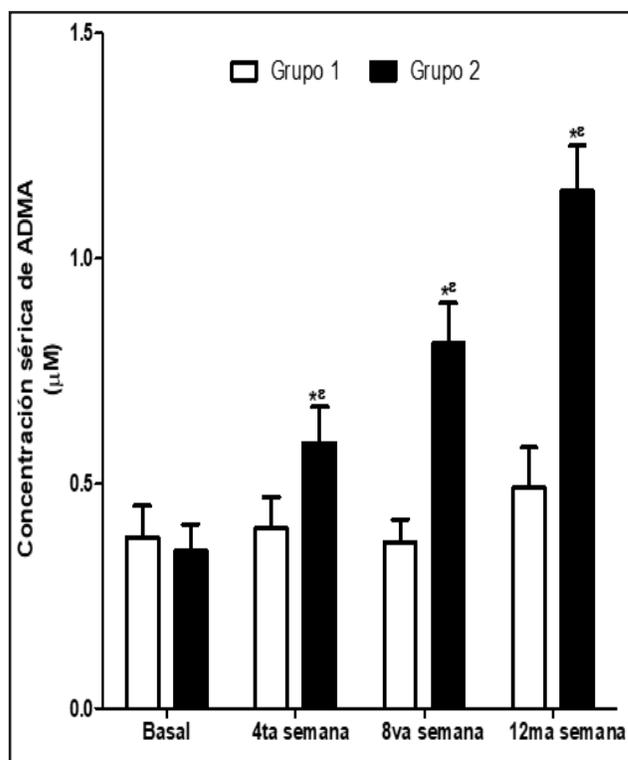


Figura 1. Concentraciones séricas de ADMA en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 4^{ta}, 8^{va} y 12^{ma}. Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar de la media ($n=42$ basal y 4^{ta} semana; $n=28$ en la 8^{va} semana; $n=14$ en la 12^{ma} semana). * $p < 0,005$ vs. grupo control (Grupo 1). ρ $p < 0,0001$ vs. su respectivo valor basal.

experimento las concentraciones séricas de NO disminuyeron, y las de ADMA y TBARS aumentaron en el grupo 2 con respecto al grupo 1 y con respecto a sus valores basales ($p < 0,005$).

En la Tabla II se muestra el análisis de Spearman de las correlaciones entre la concentración de ADMA, NO, TBARS y los lípidos séricos, evidenciando correlación positiva significativa entre la ADMA con TBARS y con el perfil lipídico, e inversa con el NO; y del NO con TBARS ($p < 0,0001$).

ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA AORTA

En la Tabla III se presenta la distribución de los conejos según el máximo grado de aterosclerosis encontrado en los cortes de aorta,

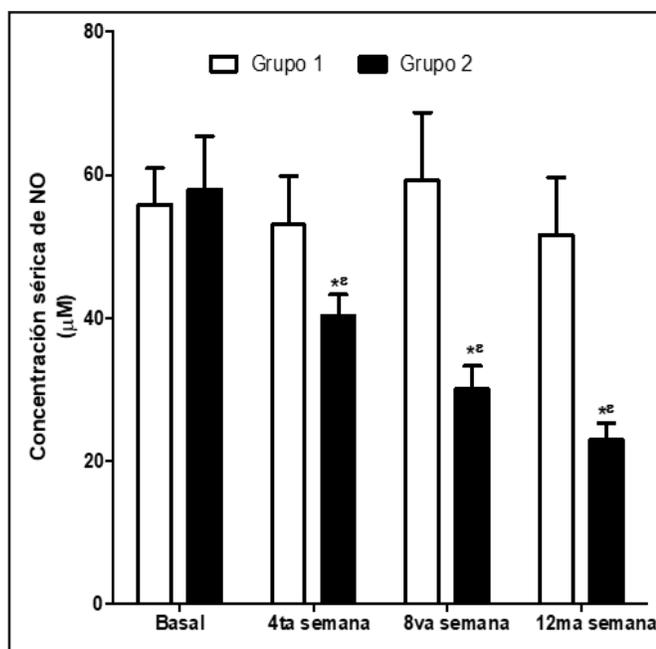


Figura 2. Concentraciones séricas de NO en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 4^{ta}, 8^{va} y 12^{ma}. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de la media (n=42 basal y 4^{ta} semana; n=28 en la 8^{va} semana; n=14 en la 12^{ma} semana). *p<0,005 vs. grupo control (Grupo 1). **p<0,0001 vs. su respectivo valor basal.

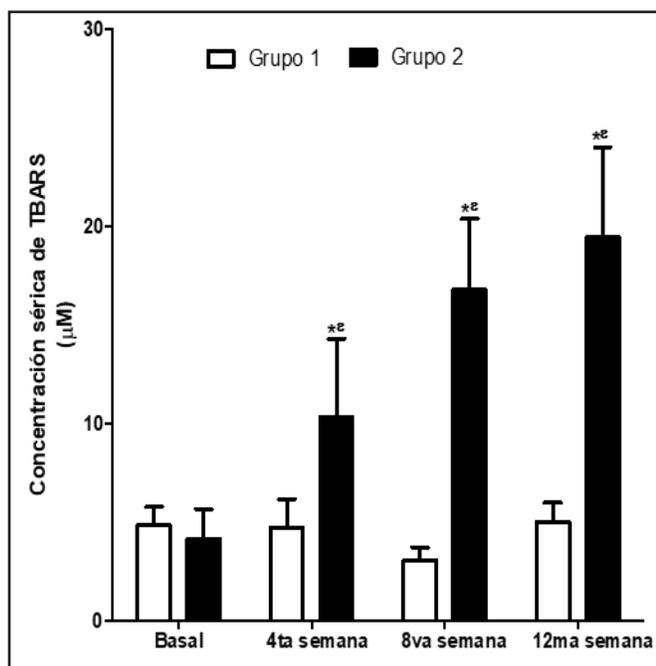


Figura 3. Concentraciones séricas de TBARS en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 4^{ta}, 8^{va} y 12^{ma}. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de la media (n=42 basal y 4^{ta} semana; n=28 en la 8^{va} semana; n=14 en la 12^{ma} semana). *p<0,005 vs. grupo control (Grupo 1). **p<0,0001 vs. su respectivo valor basal.

evidenciando que ningún conejo del grupo 1 presentó lesiones ateroscleróticas a lo largo del estudio. Por su parte, los conejos del grupo 2 presentaron lesiones de grado intermedio y avanzado al finalizar el estudio (Figura 4).

Discusión

Durante las últimas décadas diversos estudios han examinado el papel del estrés oxidativo sobre la aterogénesis (Madamanchi y col., 2005). De acuerdo, a la teoría del estrés oxidativo, la aterosclerosis es el resultado de las modificaciones oxidativas de las LDL en la pared arterial por las ROS. La evidencia sugiere que factores de riesgo para la aterosclerosis como la hipercolesterolemia, diabetes mellitus, hipertensión arterial, tabaquismo y edad, incrementan la producción de ROS (Vogiatzi y col., 2009). Asimismo, diversos procesos son disparados por estos factores de riesgo, como la expresión de moléculas de adhesión celular, la proliferación y migración de células de músculo liso, apoptosis de las células endoteliales, oxidación de lípidos, activación de metaloproteinasas de matriz extracelular y la alteración de la actividad vasomotora (Vogiatzi y col., 2009).

Se ha demostrado ampliamente que la función endotelial se encuentra alterada desde los estadios más tempranos de la aterosclerosis; de hecho, se cree que la producción de ROS induce la disfunción endotelial, paso inicial de la aterogénesis; puesto que el estrés oxidativo conlleva la oxidación de las LDL y la expresión de genes inflamatorios redox sensibles.

Tabla II.

Análisis de la correlación de Spearman entre las concentraciones de ADMA, NO, TBARS y los lípidos séricos

| | r | p |
|--------------|----------|----------|
| ADMA & CT | 0,3726 | 0,0001 |
| ADMA & c-LDL | 0,3026 | 0,0001 |
| ADMA & c-HDL | 0,1597 | 0,0001 |
| ADMA & NO | -0,6188 | 0,0001 |
| ADMA & TBARS | 0,5752 | 0,0001 |
| NO & TBARS | -0,4265 | 0,0001 |

ADMA: Dimetilarginina asimétrica, c-HDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad, c-LDL: Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad, CT: Colesterol total, NO: Óxido nítrico, TBARS: Productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico.

Todos estos cambios inducen la alteración en la estructura y función de las células endoteliales y contribuyen a la iniciación de la aterosclerosis (Vogiatzi col., 2009).

Las ROS median muchos efectos en la pared de los vasos sanguíneos, entre los que se incluyen la disfunción endotelial así como la migración, crecimiento y apoptosis de las células de músculo liso. Se ha observado que la producción de anión superóxido y otras ROS están incrementados en arterias en varias condiciones CDV, lo cual sugiere que el estrés oxidativo juega un papel muy importante en la fisiopatología de la aterosclerosis, hipertensión y otras enfermedades CDV (Griendling y col., 2000).

El NO es un potente vasodilatador que tiene una importante acción en el mantenimiento de la homeostasis vascular, mediante sus efectos antiaterogénicos y anti proliferativos sobre la pared vascular (Franceschelli y col., 2013). Esta molécula vasoprotectora ha sido implicada en la

Tabla III.

Distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta. Datos presentados como n (%)

| Grupo | Sin ateroma | Tipo I | Tipo II | Tipo III | Tipo IV | Tipo V |
|-------------------------------|--------------------|---------------|----------------|-----------------|----------------|---------------|
| 4^{ta} semana | | | | | | |
| 1 | 7 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| 2 | 1 (14%) | 3 (43%) | 3 (43%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| 8^{va} semana | | | | | | |
| 1 | 7 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| 2 | 0 (0%) | 0 (0%) | 2 (29%) | 3 (42%) | 2 (29%) | 0 (0%) |
| 12^{ma} semana | | | | | | |
| 1 | 7 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| 2 | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 3 (43%) | 4 (57%) | 0 (0%) |

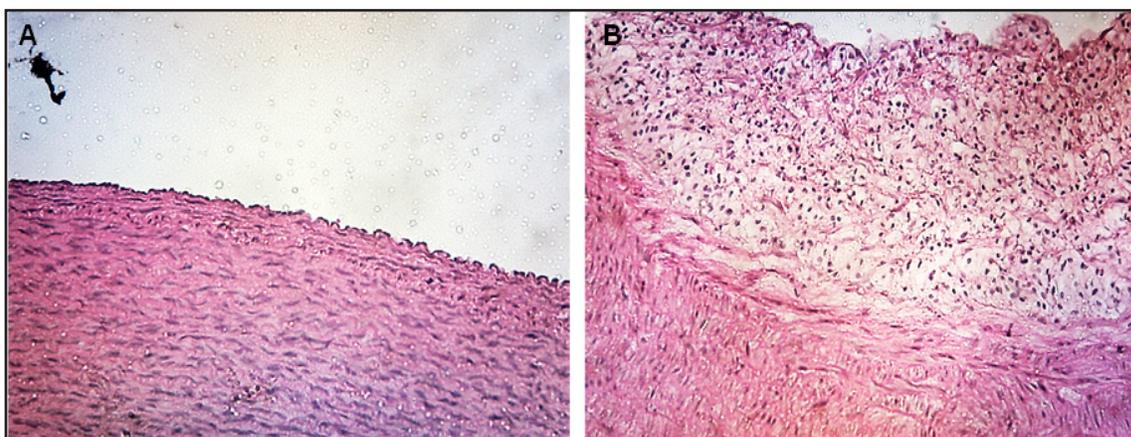


Figura 4. Cortes histológicos de las aortas de los conejos a lo largo del estudio. Sin lesiones (Panel A) de un conejo perteneciente al grupo 1 al final del estudio. Lesión tipo IV (Panel B) de un conejo perteneciente al grupo 2 al final del estudio. Se observa en la íntima arterial lípidos intracelulares y extracelulares en mayor extensión. Tinción hematoxilina – eosina. 50X

inhibición del estrés oxidativo, inflamación, proliferación y agregación plaquetaria; de hecho, el deterioro de la vasoactividad mediada por NO es un evento temprano en la aterosclerosis, pues contribuye al vasoespasmo, formación de trombos intravasculares, isquemia cardiaca, conllevando síntomas clínicos tales como angina e infarto al miocardio (Kauser y col., 2000).

Por su parte, la ADMA es un análogo endógeno de la L-Arg, sustituido con guanidina, que inhibe la síntesis *in vivo* del NO ya que es un inhibidor endógeno competitivo de las tres isoformas de la NOS, la neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) y la inducible (iNOS). La ADMA es sintetizada mediante proteólisis de la Arg metilada post-traduccionalmente en proteínas (Fickling y col., 1993). Esta modificación postraducciona es llevada a cabo por enzimas denominadas metiltransferasas de proteína – arginina (PRMTs) (Bedford y col., 2009). En los mamíferos estas enzimas han sido clasificadas como tipo I (PRMT a, 3, 4, 6 y 8), y tipo II (PRMT 5, 7 y FBXO11). En la primera reacción,

ambas enzimas catalizan la formación de monometilarginina (NMMA) a partir de L-Arg, pero en la segunda reacción las PRMTs tipo I producen ADMA, mientras que las PRMTs tipo II producen dimetilarginina simétrica (SDMA). Durante el recambio proteico, las metilargininas son liberadas en el citoplasma. La SDMA es eliminada principalmente mediante excreción renal; por su parte la ADMA es extensamente metabolizada intracelularmente mediante la acción de enzimas denominadas dimetilarginina dimetilaminohidrolasas (DDAH) produciendo citrulina y dimetilamina (DMA) (Franceschelli y col., 2013).

Se ha sugerido que la ADMA participa en la patogenia de las enfermedades CDV y sus complicaciones; pues se ha descrito que las concentraciones plasmáticas de ADMA predicen eventos CDV y la mortalidad en poblaciones con riesgo alto, intermedio y bajo (Böger y col., 2009); pues es capaz de inhibir la NOS y al transportador de aminoácido catiónicos, participando en la disfunción endotelial y en la generación de estrés oxidativo microvascular, los cuales son importantes mediadores de

las enfermedades CDV y aterosclerosis (Teerlink y col., 2009).

En el presente estudio y bajo nuestras condiciones experimentales, pudimos apreciar que la administración de una dieta enriquecida con colesterol ocasionó un incremento en las concentraciones séricas de ADMA y TBARS y disminución del NO, efectos que se acompañaron con la formación de lesiones ateroscleróticas; evidenciando además asociación positiva entre la ADMA con TBARS, y una relación inversa entre el NO con ADMA y TBARS. En este sentido, se ha descrito que el estrés oxidativo y la disfunción endotelial juegan un papel importante en la aterosclerosis; de hecho la ADMA ha sido reconocida como un marcador de disfunción endotelial, por lo que se le ha relacionado con varios factores de riesgo cardiovascular, como hipertensión, obesidad, hipertrigliceridemia y diabetes (Dowsett y col., 2020). Estudios longitudinales revelan que la ADMA predice la morbimortalidad en pacientes con infarto al miocardio y accidente cerebro vascular (Yoo y col., 2001; Leong y col., 2008). En efecto, diversos estudios han encontrado una fuerte relación entre el espesor de la íntima media con la ADMA (Miyazaki y col., 2003; Furuki y col., 2007; Furuki y col., 2008), comportándose como un predictor independiente de mortalidad en pacientes con infarto al miocardio (Zeller y col., 2008), y como valor pronóstico para predecir futuros eventos CDV, más allá de los factores de riesgo tradicionales (Schnabel y col., 2005). Además, la evidencia indica que las concentraciones elevadas de ADMA se correlacionan con la presencia de placas ateromatosas, particularmente en la arteria carótida, y son predictores del riesgo de desarrollo de futuras lesiones, de infarto al miocardio y accidente cerebro vascular (Dowsett y col., 2020).

Se ha descrito la participación del NO y ADMA en la aterosclerosis y en la disfunción endotelial pues la ADMA tiene efectos sobre la función endotelial, reduciendo la integridad de la barrera endotelial, incrementando la producción de ROS y de marcadores proinflamatorios; siendo muchas de estas acciones mediadas por la inhibición de la producción de NO (Dowsett y col., 2020). En este sentido, en condiciones fisiológicas, se ha destacado que el flujo laminar protege al endotelio mediante la supresión de factores proinflamatorios e incrementando la liberación de mediadores vasoactivos tales como el NO, el cual además de regular el tono vascular, tiene efectos anti-proliferativos y anti-trombóticos. Las lesiones ateroscleróticas, en contraste, tienden a encontrarse en áreas de baja tensión de corte y flujo no laminar perturbado, tales como en las bifurcaciones arteriales y áreas de alta curvatura, donde exhibe alta permeabilidad, permitiendo que macromoléculas como las LDL oxidadas (LDLox) migren al espacio subendotelial, induciendo un ambiente inflamatorio, iniciando el proceso aterosclerótico (Dowsett y col., 2020). En modelos experimentales de aterosclerosis se ha encontrado niveles elevados de ADMA plasmático y disfunción endotelial (Böger y col., 2000; Jacobi y col., 2010). Por su parte, la administración exógena de ADMA en ratones C57BL/6J desencadena el desarrollo de lesiones ateroscleróticas (Xiao y col., 2007) e induce fibrosis perivascular y engrosamiento de la íntima arterial en la microvasculatura coronaria (Suda y col., 2004). Asimismo, el tratamiento con ADMA en ratones deficientes con apolipoproteína E, exacerba las lesiones ateroscleróticas (Xiao y col., 2007). Todo ello sugiere que los niveles elevados de ADMA podrían afectar la aterogénesis al inhibir los

procesos de reparación vascular, lo cual refuerza la hipótesis de que la ADMA es una molécula implicada en el desarrollo de la aterosclerosis. Por lo tanto, el aumento de las concentraciones de ADMA inducida por la dieta enriquecida con colesterol observado en la presente investigación, sugiere que es parcialmente responsable del aumento de ROS (TBARS) y de la disminución de NO, posiblemente al desacoplar e inhibir a la NOS, respectivamente. Adicionalmente, el incremento del ADMA pudo contribuir al desarrollo y progresión de la aterosclerosis, posiblemente induciendo inflamación vascular y un ambiente oxidativo.

Es relevante señalar que la elevación de las concentraciones séricas de TBARS y ADMA, y la disminución de NO encontrado en el presente estudio se evidenció desde la cuarta semana de experimentación, lo cual sugiere que los mismos son marcadores tempranos, no invasivos de aterosclerosis; pues intervienen en el inicio y progresión de esta enfermedad. De hecho, la ADMA puede inducir la formación de células espumosas, las lesiones incipientes de la aterosclerosis. En este sentido, se ha demostrado que el tratamiento con ADMA en macrófagos es capaz de incrementar la expresión del receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidado tipo lectina-1 (LOX-1), el cual media la captación de LDLox, paso clave en la aterosclerosis; y además incrementa la expresión de la acetil coenzima A colesterol acetil transferasa 1 (ACAT-1), la cual esterifica el colesterol; por lo que la ADMA incrementa el almacenamiento de colesterol, acontecimientos importantes en la aterosclerosis. Además, la ADMA disminuye la expresión del transportador de cassette de unión a ATP, ABCA1 y ABCG1, reduciendo el eflujo del colesterol desde el macrófago, contribuyendo con la formación

de las células espumosas (Dowsett y col., 2020). De igual manera, la evidencia indica que el tratamiento con ADMA produce la reorganización de actina y la dispersión de las uniones adherentes, que fue revertido tanto por la apocinina, un inhibidor de la NADPH oxidasa, y el SB203580, un inhibidor de la proteína quinasa activada por mitógenos p38. Esto indica que la ADMA puede influir en la permeabilidad de las células endoteliales mediante la organización del citoesqueleto de actina, a través de la señalización de las ROS y MAPK p38, y sugiere que la ADMA puede mediar la reducción de la integridad de la barrera endotelial contribuyendo a la acumulación de LDLox en la aterosclerosis.

Por otra parte, la ADMA es capaz de inducir la activación de las células endoteliales, y en consecuencia mediar las acciones inflamatorias en el endotelio; pues estudios *in vitro* han descrito que el tratamiento con ADMA indujo la expresión de citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión vascular como la molécula de adhesión intercelular tipo 1 (ICAM-1), molécula de adhesión vascular tipo 1 (VCAM-1), proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 (MCP-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Böger y col., 2000; Guo y col., 2011 y 2013), además la ADMA incrementó la translocación nuclear del factor nuclear kappa B (NF-KB), lo cual coincidió con la incrementada expresión de ICAM-1 en células endoteliales de las venas de cordón umbilical humana HUVEC (Guo y col., 2011), indicando que la ADMA induce disfunción endotelial y propicia un ambiente proinflamatorio y oxidativo, propio de la aterosclerosis.

Por lo tanto, el aumento de las concentraciones séricas de ADMA y TBARS, y disminución de NO observados en el presente estudio sugieren que pudieron ser

debidos al proceso inmunoinflamatorio y oxidativo de la aterosclerosis inducido por la dieta enriquecida con colesterol; pues se ha descrito asociación positiva entre las concentraciones plasmáticas de ADMA con la producción de superóxido en pacientes con enfermedad arterial coronaria (Antoniades y col., 2009). De hecho, se ha postulado que la ADMA puede promover el desbalance de ROS vascular contribuyendo a la disfunción endotelial, mediante la reducción de la biodisponibilidad del NO, además la ADMA puede incrementar la producción de superóxido mediante el desacople de la eNOS (Antoniades y col., 2009). En este sentido, Borger y col., (2000) encontraron que la producción de superóxido inducida por ADMA fue acompañada de la activación de NF-KB, la secreción de MCP-1 y la formación de lesiones (Suda y col., 2004). Por otra parte, la evidencia sugiere que la ADMA puede modular la carga oxidativa a través de mecanismos independientes del NO, pues la ADMA puede inhibir los sistemas de defensa antioxidante. En este sentido, se ha demostrado que la administración crónica de ADMA en ratas redujo la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa, SOD y GPx, lo cual se acompañó de un aumento en los niveles circulantes de malondialdehído (Alacam y col., 2013), sugiriendo que la ADMA puede además reducir la eliminación de las ROS, contribuyendo a la carga oxidativa; y ratifica el papel de la oxidación e inflamación en esta patología. En apoyo a este concepto, en estudios previos demostramos que la administración de una dieta enriquecida con colesterol incrementó los niveles séricos de marcadores de oxidación como LOX-1, LDLox y TBARS y de inflamación desde las primeras fases de la aterosclerosis, siendo esto revertido con la administración oral de antioxidantes, lo cual se vio acompañado de

una reducción en la formación y severidad de lesiones ateroscleróticas (González y col., 2008; Figueira y González, 2008; 2018; 2020; 2022, 2023).

En conclusión, bajo nuestras condiciones experimentales y de acuerdo con los resultados obtenidos, la ADMA, el NO y TBARS constituyen marcadores tempranos no invasivos de oxidación y aterosclerosis; pues los mismos se modificaron desde la 4ta semana de estudio. Esto sugiere que la oxidación y la disfunción arterial juegan un papel relevante en la fisiopatología de esta enfermedad.

Referencias Bibliográficas

- Alacam H, Avci B, Sali O, Dilek A, Kozan A, Mertoglu C, Sahin M, Okuyucu A. 2013. Does ADMA affect the oxidant/antioxidant balance in rats? *Turk J Med Sci* 43: 405-10.
- Antoniades C, Shirodaria C, Leeson P, Antonopoulos A, Warrick N, Van-Assche T, Cunningham C, Tousoulis D, Pillai R, Ratnatunga C. 2009. Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: Implications for endothelial function in human atherosclerosis. *Eur Heart J* 30: 1142-50.
- Batty M, Bennett MR, Yu E. 2022. The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Cells* 11(23):3843.
- Bedford M, Clarke S. 2009. Protein arginine methylation in mammals: Who, what, and why. *Mol Cell* 33: 1-13.
- Böger R, Bode-Böger S, Sydow K, Heistad D, Lentz S. 2000. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1557-64.
- Böger R, Bode-Böger S, Tsao P, Lin P, Chan J, Cooke J. 2000. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J Am Coll Cardiol* 36: 2287-95.
- Böger RH, Maas R, Schulze F, Schwedhelm E. 2009. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a prospective marker of cardiovascular disease and

- mortality--an update on patient populations with a wide range of cardiovascular risk. *Pharmacol Res* 60(6):481-7.
- Cai H, Harrison DG. 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. *Circ Res* 87: 840-844.
- Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP. 1992. L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 90: 1248-1253.
- Dowsett L, Higgins E, Alanazi S, Alshuwayer NA, Leiper FC, Leiper J. 2020. ADMA: A Key Player in the Relationship between Vascular Dysfunction and Inflammation in Atherosclerosis. *J Clin Med* 20(9):3026.
- Dri E, Lampas E, Lazaros G, Lazarou E, Theofilis P, Tsioufis C, Tousoulis D. 2023. Inflammatory Mediators of Endothelial Dysfunction. *Life (Basel)* 13(6):1420.
- Fickling S, Leone A, Nussey S, Vallance P, Whitley G. 1993. Synthesis of NG, NG dimethylarginine by human endothelial cells. *Endothelium* 1: 137-40.
- Figueira L, González J. 2008. Efecto del extracto de *Pinus maritime*, Vitamina C y E, sobre la concentración sérica de LDLox, PCR, Selectina-E, IL-6 y formación de ateromas en conejos con dieta hiperlipidémica. *Informe Médico* 10 (10): 593-607.
- Figueira L, González J. 2018. Efecto del resveratrol sobre las concentraciones séricas del factor de crecimiento endotelial vascular durante la aterosclerosis. *Clin Investig Arterioscler* 30(5):209-216.
- Figueira L, González J. 2020. Efecto del resveratrol sobre quimioquinas séricas en la aterosclerosis. *Rev Fac Farma UCV* 83 (1 y 2): 7-23.
- Figueira L, González J. 2022. Efecto antiinflamatorio y antioxidante del resveratrol en la aterosclerosis. Papel de la molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria 1. *Rev Fac Farma UCV* 85(1 y 2): 51-66.
- Figueira L, González J. 2023. Papel del receptor de lipoproteína de baja densidad oxidado tipo lectina-1 como marcador sérico de aterosclerosis. *Rev Fac Farma* 86(1 y 2):93-105.
- Franceschelli S, Ferrone A, Pesce M, Riccioni G, Speranza L. 2013. Biological functional relevance of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in cardiovascular disease. *Int J Mol Sci* 2013. 14(12):24412-21.
- Furuki K, Adachi H, Enomoto M, Otsuka M, Fukami A, Kumagai S, Matsuoka H, Nanjo Y, Kakuma T, Imaizumi T. 2008. Plasma level of asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a predictor of carotid intima-media thickness progression: Six-Year prospective study using carotid ultrasonography. *Hypertens Res* 31: 1185-9.
- Furuki K, Adachi H, Matsuoka H, Enomoto M, Satoh A, Hino A, Hirai Y, Imaizumi T. 2007. Plasma levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) are related to intima-media thickness of the carotid artery: An epidemiological study. *Atherosclerosis*.191: 206-10.
- Ghebremariam Y, Erlanson D, Cooke J. 2014. A novel and potent inhibitor of dimethylarginine dimethylaminohydrolase: A modulator of cardiovascular nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 348(1): 69-76.
- Gimbrone MA Jr, García-Cardena G. 2016. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* 118(4):620-36.
- González J, Figueira L, Reigosa A. 2008. Selectina-E, VCAM-1, FNT- α , IL-6, PCR y Fibrinógeno plasmático como marcadores de inflamación en la aterosclerosis, en conejos machos Nueva Zelanda, expuestos a una dieta hiperlipidémica. *Salus* 12 (2): 50-57.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1982. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138.
- Griendling K, Sorescu D, Ushio-Fukai M. 2000. NAD(P) H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494-501.
- Guo W, Zhang D, Wang L, Zhang Y, Liu W. 2013. Disruption of asymmetric dimethylarginine-induced RelA/P65 association with actin in endothelial cells. *Acta Biochim Biophys Sin* 45: 229-35.
- Guo W, Zhang D, Wang X, Kong W, Zhang Y, Zhang Q, Liu W. 2011. Actin cytoskeleton modulates ADMA-induced NF-kappaB nuclear translocation and ICAM-1 expression in endothelial cells. *Med Sci Monit* 17: BR242-7.
- Gusev E, Sarapultsev A. 2023. Atherosclerosis and Inflammation: Insights from the Theory of General Pathological Processes. *Int J Mol Sci* 24(9):7910.
- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. 2009. Endothelial Function and Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Circ J* 73: 411-418.
- Jacobi J, Maas R, Cardounel A, Arend M, Pope A, Cordasic N, Heusinger-Ribeiro J, Atzler D, Strobel J, Schwedhelm E. 2010. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpression ameliorates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by lowering asymmetric dimethylarginine. *Am J Pathol* 176: 2559-70.

- Jebari-Benslaiman S, Galicia-García U, Larrea-Sebal A, Olaetxea JR, Alloza I, Vandenbroeck K, Benito-Vicente A, Martín C. 2022. Pathophysiology of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* 23(6):3346.
- Kauser K, da Cunha V, Fitch R, Mallari C, Rubanyi GM. 2000. Role of endogenous nitric oxide in progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(5):H1679-85.
- Kong P, Cui ZY, Huang XF, Zhang DD, Guo RJ, Han M. 2022. Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention. *Signal Transduct Target Ther* 7(1):131.
- Leong T, Zylberstein D, Graham I, Lissner L, Ward D, Fogart J, Bengtsson C, Björkelund C, Thelle D, Collaboration S.-I.-N. 2008. Asymmetric dimethylarginine independently predicts fatal and nonfatal myocardial infarction and stroke in women: 24-year follow-up of the population study of women in Gothenburg. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 961-7.
- Lüscher TF. 1990. Imbalance of endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Am J Hypertens* 3: 317-330.
- Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. 2005. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 29-38.
- Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke J, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. 1999. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: A novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 99: 1141-6.
- Nappi F, Fiore A, Masigliat J, Cavuoti T, Romandini M, Nappi P, Avtaar Singh SS, Couetil JP. 2022. Endothelium-Derived Relaxing Factors and Endothelial Function: A Systematic Review. *Biomedicines* 10(11):2884.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Rev Anal Biochem* 95(2):351-8.
- Rasmussen C, Moinard C, Martin C, Tricottet V, Cynober L, Couderc R. 2007. L-arginine plus atorvastatin for prevention of atheroma formation in genetically hypercholesterolaemic rabbits. *Br J Nutr* 97: 1083-9.
- Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner K, Rupprecht H, Espinola-Klein C, Jachmann N, Post F, Peetz D, Bickel C. 2005. Asymmetric Dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease. *Circ Res* 97: e53-9.
- Shao C, Wang J, Tian J, Tang YD. 2020. Coronary artery disease: from mechanism to clinical practice. *Adv Exp Med Biol* 2020;1177:1-36.
- Stary H, Chandler A, Dinsmore R, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfield M, Schwartz C, Wagner W, Wesler R. 1995. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis. *Am Heart Asso Circulation* 15:1512-31.
- Suda O, Tsutsui M, Morishita T, Tasaki H, Ueno S, Nakata S, Tsujimoto T, Toyohira Y, Hayashida Y, Sasaguri Y. 2004. Asymmetric dimethylarginine produces vascular lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice: Involvement of renin-angiotensin system and oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1682-8.
- Taddei S, Ghiadoni L, Virdis A, Versari D, Salvetti A. 2003. Mechanisms of Endothelial Dysfunction: Clinical Significance and Preventive Non-Pharmacological Therapeutic Strategies. *Curr Pharmaceut Des* 9: 2385-2402.
- Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS. 2009. Cellular ADMA: regulation and action. *Pharmacol Res* 60(6):448-60.
- Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C. 2009. The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol* 50: 402-409.
- Xiao H, Yang Z, Jia S, Li N, Jiang D, Zhang X, Guo R, Zhou Z, Deng H, Li Y. 2007. Effect of asymmetric dimethylarginine on atherogenesis and erythrocyte deformability in apolipoprotein E deficient mice. *Life Sci* 81: 1-7.
- Xuan C, Tian Q, Li H, Bei-Bei Z, He G, Lun L. 2015. Levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, and risk of coronary artery disease: A meta-analysis based on 4713 participants. *Eur J Prev Cardiol* 23: 502-10.
- Yoo J, Lee S. 2001. Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis* 158: 425-30.
- Zeller M, Korandji C, Guillard J, Sicard P, Vergely C, Lorgis L, Beer J, Duvillard L, Lagrost A, Moreau D. 2008. Impact of asymmetric dimethylarginine on mortality after acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 954-60.
- Zuccalá A, Fiorenza S, Rapaná R, Santoro A. 2005. Hypertension, atherosclerosis and kidney. *G Ital Nefrol* 22(Suppl 31):S9-14.



On the path to a diabetes cure: a critical appraisal of developments in pancreatic beta cell encapsulation and implantation

En el camino hacia una cura de la diabetes: una evaluación crítica de los desarrollos en la encapsulación e implantación de células beta pancreáticas

MARÍA DÍAZ^{*1}, OMAR A. ROSS^{*2}, HELIANA PARRA^{*3}, CARLA NAVARRO^{*4}, WHEELER TORRES^{*5}, RUBÉN CARRASQUERO^{*6}, ANA-KARINA CARBONELL-ZABALETA^{**7}, VALMORE BERMÚDEZ^{**,**8}

Abstract

Microencapsulation of β -cells is a rapidly growing field that offers broad potential for the therapy and possible cure of diabetes, especially type 1 diabetes, thanks to the immunization of the engrafted tissue that increases its long-term efficacy and decreases the risk of immunogenicity. Despite the promising results obtained in human and animal studies, important challenges need to be addressed. The structure and composition of the microspheres and the site where they are implanted can affect the effectiveness of the treatment, and associated immunogenicity problems have been reported. To improve the safety of the encapsulated islet graft system, new efforts are being made in the bioengineering of the capsules and the production of insulin-producing cells within the capsular membranes. These critical advances in cell encapsulation technology are expected to enable broader and more effective human application of this system. In this review, the great potential of encapsulated pancreatic islet transplantation to provide a cure for type 1 diabetes is highlighted. The advantages and disadvantages of this therapeutic strategy are also outlined, as well as key advances made in cellular microencapsulation research for treating diabetes.

Keywords: Type 1 Diabetes, Microencapsulation, Insulin

Resumen

La microencapsulación de células β es un campo en rápido crecimiento que ofrece un amplio potencial para la terapia y posible cura de la diabetes, especialmente la diabetes tipo 1, gracias a la inmunización del tejido injertado que aumenta su eficacia a largo plazo y disminuye el riesgo de inmunogenicidad. A pesar de los resultados prometedores obtenidos en estudios en humanos y animales, es necesario abordar importantes desafíos. La estructura y composición de las microesferas y el sitio donde se implantan pueden afectar la eficacia del tratamiento y se han reportado problemas de inmunogenicidad asociados. Para mejorar la seguridad del sistema de injerto de islotes encapsulados, se están realizando nuevos esfuerzos en la bioingeniería de las cápsulas y la producción de células productoras de insulina dentro de las membranas capsulares. Se espera que estos avances críticos en la tecnología de encapsulación celular permitan una aplicación humana más amplia y efectiva de este sistema. En esta revisión, se destaca el gran potencial del trasplante de islotes pancreáticos encapsulados para proporcionar una cura para la diabetes tipo 1. También se describen las ventajas y desventajas de esta estrategia terapéutica, así como los avances clave realizados en la investigación de microencapsulación celular para el tratamiento de la diabetes.

Palabras clave: Diabetes tipo 1, Microencapsulación, Insulina

*Universidad del Zulia. Escuela de Medicina. Centro de Investigación de Enfermedades Endocrinas y Metabólicas. Maracaibo, Venezuela.**Universidad Simón Bolívar, Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Medicina, Barranquilla, Colombia.***Universidad Simón Bolívar, Facultad de Ciencias de la Salud. Centro de Investigaciones en Ciencias de la Vida. Barranquilla, Colombia. Correspondencia: rubendavidxd@gmail.com

Orcid: [10000-0001-6295-0229](https://orcid.org/0000-0001-6295-0229)

[60000-0002-3401-2267](https://orcid.org/0000-0002-3401-2267)

[20009-0004-3852-9716](https://orcid.org/0009-0004-3852-9716)

[70009-0001-3690-9721](https://orcid.org/0009-0001-3690-9721)

[30000-0002-6604-4212](https://orcid.org/0000-0002-6604-4212)

[80000-0003-1880-8887](https://orcid.org/0000-0003-1880-8887)

[40000-0002-1321-9568](https://orcid.org/0000-0002-1321-9568)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.1-2.5](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.1-2.5)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 10/05/2024

Aprobación: 01/06/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(1y2): 62-81. 2024

Introducción

Diabetes mellitus (DM) is a growing cause of global morbidity and mortality. More than half a billion people are living with diabetes worldwide, affecting men, women, and children of all ages in every country. That number is projected to more than double to 1.3 billion people in the next 30 years, with every country seeing an increase (GBD 2021 Diabetes Collaborators, 2023). In 2014, its prevalence was around 442 million people (Lovic et al., 2020), increasing to over 536.6 million in 2021, with estimates exceeding 783.2 million individuals expected to suffer from this disease by 2045 (Sun et al., 2022; Paneni et al., 2013). DM is strongly associated with comorbidities such as obesity, hypertension, and dyslipidemia. Furthermore, this disease is associated with a high number of macrovascular and microvascular complications, such as ischemic heart disease affecting 10% of diabetic individuals, diabetic nephropathy with a prevalence of up to 35%, and diabetic retinopathy, which is the leading cause of blindness in diabetic patients affecting between 12% and 18% of them (Aikaeli et al., 2022). Consequently, there is a constant demand for the development of therapies that prevent and effectively control these disorders and save lives (Armengol et al., 2021).

The continuous loss of pancreatic β -cells with the subsequent deficiency in insulin production is the hallmark of type 1 diabetes (T1D) and late-stage type 2 diabetes (T2D) (Alejandro et al., 2015; Atkinson et al., 2014). The current standard treatment for this subgroup of patients is the administration of human recombinant insulin and insulin analogs through the classic subcutaneous and intravenous routes, the recently developed inhaled

route, and the routes currently under development that will be available in the near future, such as the transdermal route and oral insulin.

These therapies include different types of insulin, such as long-acting insulin, which provides the basal insulin component normally combined with rapid—or ultra-rapid-acting insulin administered before meals. In this way, it is sought to mimic pancreatic physiological function and thus achieve better results (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2022).

However, despite being the “gold standard” in the treatment of T1D and T2D with advanced beta secretory failure, exogenous insulin therapy has been associated with adverse effects such as weight gain, lipoatrophy, hyperlipotrophy, skin infections, hypoglycemia (Demir et al., 2022; Guarneri and Hoffman, 2022; Amiel, 2021), and even therapeutic failure in a considerable percentage of patients (Al-Qerem et al., 2022; Sherwood et al., 2020; Shetty and Ramachandrapa, 2019; Alzaheb and Altemani, 2018). As a result, efficient therapeutic strategies have been developed in recent decades to effectively control these disorders and restore endogenous insulin production (Posselt et al., 2010).

An existing approach, different from conventional diabetes treatments, is the transplantation of human cadaveric islets to replace the patient’s destroyed β -cells. This procedure generally results in improved glycemic control, rendering patients insulin-independent for extended periods and improving overall quality of life (White et al., 2009). While a promising approach, this therapy presents certain limitations, such as a shortage of cadaveric donors

compared to the large number of diabetic patients requiring the intervention, the need for chronic immunosuppression to prevent graft rejection, and complications related to the immunological component of DM (Shapiro, 2000 and 2011).

As a result of these limitations, new immune-invasive alternatives have emerged, such as the microencapsulation of pancreatic islets. This technique represents a promising approach to ensuring the viability and function of transplanted cells (Pereira et al., 2020). Encapsulating these cells in a biocompatible material reduces the probability of immune rejection reactions while extending their half-life without affecting their endocrine function. This opens up new possibilities for xenotransplantation, the transplantation of non-human cells of animal origin, such as porcine cells, increasing the availability and reducing the cost of these cells (Safley et al., 2018; Shimoda and Matsumoto, 2017).

CELLULAR MICROENCAPSULATION TECHNIQUES

Cell encapsulation is a technology mainly implemented in cell therapies and tissue bioengineering (Pereira et al., 2020). This is because it allows for the rapid and efficient reproduction of the natural microenvironment and enables the proper organization of immobilized cells (Bidoret et al., 2017). This technology is based on the immune isolation of cells or cell clusters suspended in a biocompatible substance. These cells are protected by an outer protective layer that maintains their structural integrity and allows optimal nutrient exchange for survival and proliferation (Calafiore et al., 2017).

Encapsulation strategies have traditionally been categorized into two groups based on the length scale of the encapsulation structure: microencapsulation and macroencapsulation. While cell attachment is generally required for the survival of encapsulated cells, in some microencapsulation applications, such as those aimed at tissue repair or regeneration, biodegradability of the protective layer may be desirable. When this layer degrades, the trapped cells can proliferate and create their own extracellular matrix instead of the artificial one used to entrap them (Opara, 2017a,b).

Microencapsulation consists of three main stages. First, the cells are mixed with the substance that will be the main component of the capsule, where they will be suspended (usually a liquid). Second, they are dispersed into droplets. Finally, they are converted into microspheres (Bidoret et al., 2017). There are different methods for manufacturing microcapsules, such as emulsification, dispersion, and solvent evaporation. However, most of these methods use organic solvents and high vortex speeds, which have high cytotoxicity and make it impossible to create microcapsules (Imaninezhad et al., 2019). One of the most common and safe methods is using coaxial air jets (Walker et al., 2015; Hsu and Fu, 2017).

Another widely used method is fluid extrusion, in which a solution of cells suspended in a liquid is taken up in glass syringes and pumped into microchannels using syringe pumps to generate droplets. Depending on the number of flow capillaries, droplets can be generated in three regimes: squeezing, dripping, and jetting, using a flow-focusing junction (Jayaprakash and Sen, 2019).

Recent studies have shown increasing interest in developing and implementing new techniques for creating microcapsules capable of containing live cells. One of the most promising techniques is electrohydrodynamic spraying (EHDS) (Gansau et al., 2018). EHDS has an excellent ability to fabricate microspheres with a wide range of sizes between 70-700 μm (Imaninezhad et al., 2019).

EHDS creates microspheres by pumping a liquid through a fine metal capillary and applying a high electrical voltage between the capillary and a ground collector. The driven liquid overcomes surface tension forces by accumulating opposite charges on its surface, which occurs if a critical applied voltage (V_{cr}) is exceeded. Further increase in the applied voltage leads to a conical liquid meniscus at the needle tip called the Taylor cone, which causes a continuous jet that breaks up into fine droplets on the surface of a collector. To achieve cell encapsulation with this technique, a suspension of live cells is pre-mixed with the precursor liquid and sprayed by applying a high voltage as described above. The microdroplets are then collected in a collector medium that induces their transition to a gel, allowing cell encapsulation within (Qayyum et al., 2017).

STRUCTURE

The main determinant factor in the success of cell-based therapies lies in the composition of the device in which they are encapsulated. This device must be a biocompatible polymer envelope with the properties of a semipermeable barrier. It must not trigger autoimmune responses that endanger the recipient's integrity or the cells inside the device (Bose et al., 2020).

Despite the wide availability of polymers used in different areas of bioengineering, very few meet the necessary properties of biocompatibility and efficiency in microencapsulation processes for cell therapies (Calafiore, 2018). In this context, two substances have become relevant and are the most used in this field: alginate and polyethylene glycol (PEG) (Aijaz et al., 2017) (Table I).

Alginate is a unique and versatile polysaccharide derived from a species known as brown algae. It comprises linear copolymers of two acidic units, β -D-mannuronic (M) and α -L-guluronic (G), repeated throughout the molecule as dimeric units GG, MM or MG. Alginate can form hydrogels in divalent cationic aqueous solutions (Ca^{2+} , Ba^{2+}) (Calafiore et al., 2017). The main drawback of alginate is its lack of selective permeability, which is crucial for adequately isolating its contents. For this reason, it is often combined with a layer of amino acid polymers, mainly poly-L-lysine (PLL) and poly-L-ornithine (PLO) (Kendall Jr and Opara, 2017) (Figure 1).

On the other hand, PEG encapsulation is an alternative to alginate. Its use lies in modifying the cell surface by conjugating PEG, a process known as PEGylation. This procedure is carried out using heterofunctional PEG: NHSPEG-CH₃ (NHS-mPEG). The N-hydroxysuccinimide (NHS) group allows spontaneous reactivity with free amines, while the methyl (CH₃-) group leaves an inert terminal end (Giraldo et al., 2017). Compared to alginate, PEGylation improves cell viability by reducing the diffusion barrier and enabling transplantation via the portal vein (Park et al., 2018). However, PEGylation does not entirely prevent the rejection of allogeneic and xenogeneic grafts, likely due to the limited capacity of individual PEG

Table I.
A list of capsules reported in the literature for islet encapsulation and transplantation

| Type | Materials | Encapsulation method | Design advantage |
|---|---|--|---|
| Photo-crosslinked | <ul style="list-style-type: none"> • 4-armed PEG cystine • Laminin and laminin peptides | <ul style="list-style-type: none"> • Islet suspension in hydrogel solution and photopolymerization | <ul style="list-style-type: none"> • Increased insulin production • Prevention of fibroblast attachment |
| Ultra-thin layers | <ul style="list-style-type: none"> • PEG | <ul style="list-style-type: none"> • Layer-by-layer PEG application | <ul style="list-style-type: none"> • Thin membrane increased small molecule diffusion |
| Thin layers | <ul style="list-style-type: none"> • PVPON and TA | <ul style="list-style-type: none"> • PVPON adsorption to islet surface followed by TA absorption | <ul style="list-style-type: none"> • Created thin layers using PVPON • Used TA to reduce the ROS |
| Cell-based capsule | <ul style="list-style-type: none"> • PEG-lipid-biotin layer • HEK293 cells | <ul style="list-style-type: none"> • Islets coated with PEG-lipid-biotin layer • Coated islets were cultured with streptavidin-immobilized HEK293 cells, and a biotin streptavidin reaction resulted in HEK293 cells covering the surface, forming a capsule | <ul style="list-style-type: none"> • Potential to improve immunoisolation due to capsule made of cells |
| ECM-based microcapsule | <ul style="list-style-type: none"> • Fibronectin • Gelatin | <ul style="list-style-type: none"> • Layer-by-layer coating | <ul style="list-style-type: none"> • ECM-mimicking capsule materials created a more realistic microenvironment • Greater islet insulin secretion |
| Ion-crosslinked microcapsule | <ul style="list-style-type: none"> • High-mannuronic acid alginate | <ul style="list-style-type: none"> • Air droplet generation crosslinked with BaCl₂ | <ul style="list-style-type: none"> • Increased control over droplet size |
| Ion-crosslinked microcapsule | <ul style="list-style-type: none"> • Alginate | <ul style="list-style-type: none"> • Electrostatic droplet generation crosslinked with BaCl₂ | <ul style="list-style-type: none"> • Smaller microcapsules compared with air-based droplet generation |
| Core-shell microcapsule | <ul style="list-style-type: none"> • Alginate • Matrigel | <ul style="list-style-type: none"> • Co-axial electrostatic droplet generation gelled using BaCl₂ | <ul style="list-style-type: none"> • Islets were contained in the center of the capsule, reducing fouling • Core material can be modified to improve islet survival |
| Conformal coating | <ul style="list-style-type: none"> • PEG • Alginate coating | <ul style="list-style-type: none"> • Droplet generation using small needle • Capsules crosslinked using DTT | <ul style="list-style-type: none"> • Thin membrane around capsule using droplet-based generation |
| Crosslinked on-chip capsule | <ul style="list-style-type: none"> • PEG | <ul style="list-style-type: none"> • On-chip flow focusing microcapsule creation, crosslinked with DTT | <ul style="list-style-type: none"> • Smaller capsule diameter size |
| High-throughput ion-cross-linked micro-capsules | <ul style="list-style-type: none"> • Alginate | <ul style="list-style-type: none"> • On-chip nozzle capsule formation, crosslinked in CaCl₂ gelling bath | <ul style="list-style-type: none"> • High throughput design with eight channels for faster capsule generation |

Source: White et al., 2020

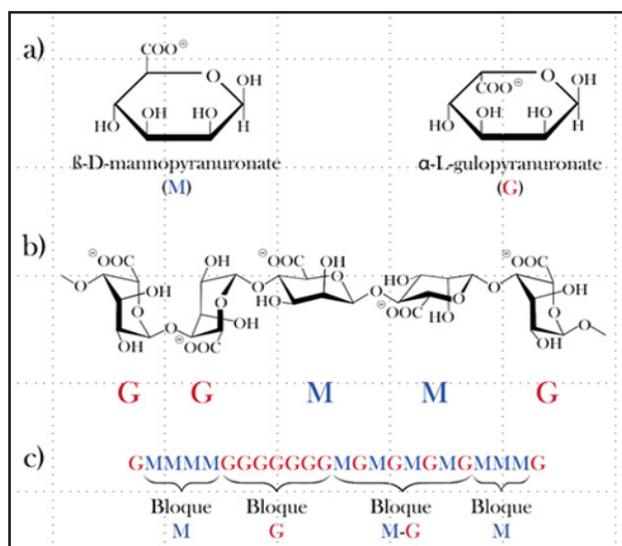


Figure 1. Alginate Structure. Alginic acid is a polysaccharide composed of two types of uronic acid: Mannuronic acid unit (M) and Guluronic acid unit (G), which form three kinds of polymer segments of blocks. (a) Alginic Monomers (M and G), (b) Macromolecular, (c) Block Sequence of M, G, and M-G Units

chains to provide durable protection against aggressive immune responses. Therefore, PEG-based cell therapies are often combined with local immunosuppression to ensure greater benefits (Stabler et al., 2020) (Figure 2).

THERAPEUTIC LIMITATIONS

Nanoencapsulation is a developing technology with great potential, although it has certain limitations that depend on the structure and composition of the microspheres and the site of implantation. These limitations must be overcome to ensure the reliability and safety of microencapsulated pancreatic beta-cell transplantation (Opara, 2017 a,b).

STRUCTURAL INSTABILITY

Membrane stability is a major challenge in microencapsulation that limits its clinical application due to the cracking of the polymeric membrane of the materials used

to create microspheres (Toda et al., 2019). On the one hand, alginate is susceptible to swelling and subsequent rupture after transplantation due to osmotic stress, which leads to loss of immunoisolation and graft rejection. Furthermore, the membrane stability of PEG-based microcapsules is lower than that of hydrogel-based capsules because their uniformity is still poor, which causes them to break. However, recent studies have shown a significant improvement in PEG capsules, which are more resistant to osmotic stress than alginate (Park et al., 2018).

A promising option is using hybrid alginate-PEG microspheres, which are less prone to osmotic swelling and provide greater stability after exposure to chelating agents than alginate or PEG spheres alone (Köllmer et al., 2016).

IMMUNE RESPONSE

Despite the great potential of microencapsulated cell-based therapy, there are still multiple reasons why no clinically licensed therapeutic product based on this technology has yet reached the market. The main reason is the challenge of counteracting the host immune response caused by both the implanted capsule and the encapsulated cells (Ashimova et al., 2019). Therefore, it is necessary to use the most purified polymers possible since, for example, commercially available crude alginates contain pro-inflammatory pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), such as flagellin, lipopolysaccharide, peptidoglycan, lipoteichoic acid, and polyphenols, which induce inflammatory responses in receptors either by diffusion out of the capsules or by being present in the capsule. Likewise, the presence of PAMPs has been evidenced in

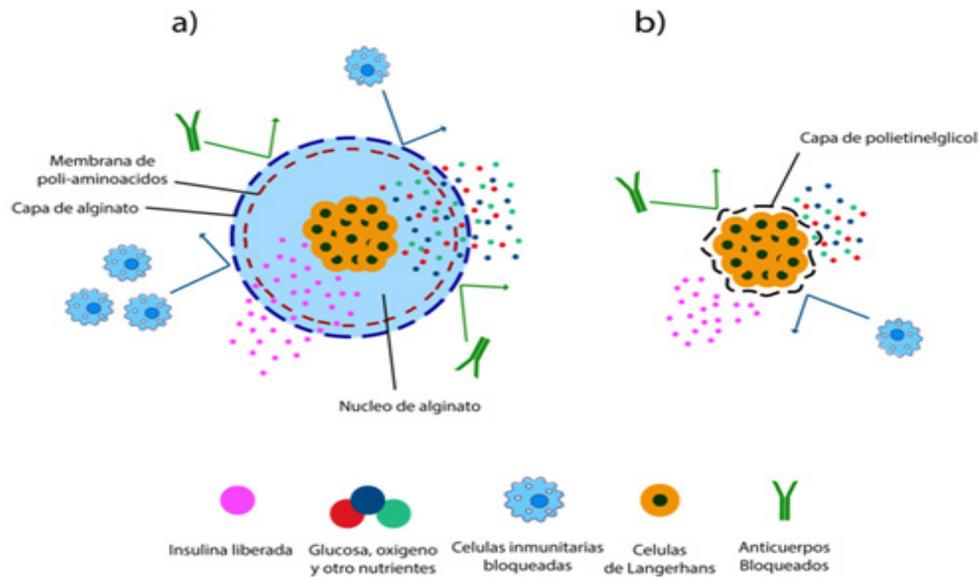


Figure 2. Microcapsule Structure. Schematic illustration of the structure of microcapsules. a) Alginate-based microcapsules with a longer diffusion distance. These are composed of linear copolymers of two acid units, β -D-mannuronic (M) and α -L-guluronic (G), repeated throughout the molecule as dimeric units. b) A Polyethylene glycol (PEG)-based microcapsule with a shorter diffusion distance. This involves modifying the cell surface by conjugating PEG with it, a process known as PEGylation. Both microcapsules block the entry of immune cells and antibodies while allowing the entry of glucose, oxygen, and other nutrients and the exit of insulin released by the Langerhans β cells.

other sources, such as synthetic molecules, i.e., PEG (Hu and de Vos, 2019).

These PAMPs stimulate a cascade of signal transduction pathways, starting with Toll-like receptors (TLRs) and pattern recognition receptors (PRRs). After the activation of PRRs in immune cells, a cascade of intracellular signaling pathways is activated, leading to the translocation of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) that induces the secretion of inflammatory cytokines, which ultimately results in overgrowth of the capsules by immune cells and fibroblasts (Fang et al., 2017), destroying the transplanted cells and decreasing the transport of oxygen and nutrients through the membrane, this is called foreign body response (FBR) (Korsgren, 2017).

IMPLANTATION SITE OF MICROENCAPSULATED PANCREATIC BETA-CELL TRANSPLANTATION

The implant site exerts an important influence on the engraftment, stability, and biocompatibility of implanted microencapsulated pancreatic beta-cells. Currently, an optimal site for encapsulated islet transplantation may include sufficient capacity to host large graft volumes, portal drainage, ease of access using a safe and reproducible procedure, adequate blood/oxygen supply, minimal immune/inflammatory reaction, pliable for noninvasive imaging and biopsy, and potential of local microenvironment manipulation or bioengineering. Varying degrees of success have been confirmed with the utilization of liver or extrahepatic sites in an experimental or preclinical

setting. However, the ideal implant site remains to be further engineered or selected for the widespread application of encapsulated islet transplantation.

The infusion of islets into the vascular system is technically straightforward, as percutaneous access to nearly any large vessel is possible with fluoroscopic guidance. Refinements have included the selection of arterial or venous locations that confer better oxygen tension and those at relatively low risk of embolic disease. The bloodstream, the uncertain distribution of the transplanted microspheres, and the stacking of capsules in the pelvic cavity of bipeds result in aggregation and difficulty in retrieval (Papas et al., 2019). On the other hand, the renal subcapsule is another option. Unfortunately, the kidney capsule has a relatively poor blood supply and does not provide an oxygen-rich microenvironment for the islets. The kidney cortex has approximately half the blood flow of the kidney parenchyma, and its oxygen tension is only 15 mmHg. In addition, the high requirement of capsules in the transplant promotes the aggregation of encapsulated islets (Shimoda and Matsumoto, 2017) (Table II).

The subcutaneous space, despite its limited access to blood, can also be used to deposit a large number of encapsulated islets; however, it requires two surgical procedures, one dedicated to vascularization and then the actual transplantation (Pepper et al., 2015; Farina et al., 2017). Unlike the subcutaneous space, the omental space could be an ideal site for implanting encapsulated islets since it does not require two operations. Omental pouch sites are attractive as they allow a large implantation volume and the concurrent use of transplant devices or capsules. Furthermore, the activated omentum has an increased number of blood vessels and blood content, as well as growth and progenitor factors such as vascular endothelial growth factor, stromal cell-derived factor 1 α , the chemokine receptor CXCR4 and Wilms' tumor suppressor gene. For islet transplantation, the omentum may not only provide these benefits but also offer some immune privilege. Still, the large number of islets required in these sites and limited data on long-term survival make omental pouch approaches less attractive than others (Merani et al., 2008). The long-term function of encapsulated islets in the omental bursa was demonstrated using

Table II. Capsule Types and Materials

| | Prevention of Aggregation | Close Access to Blood | Ease of Retrieval | Stable distribution |
|---|----------------------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Renal subcapsule | NO | YES | NO | YES |
| Omental bursa | YES | YES | YES | YES |
| Intraperitoneal cavity | NO | NO | NO | NO |
| Subcutaneous Space | YES | NO | YES | YES |
| Prevascularized subcutaneous space | YES | YES | YES | YES |

an immunocompetent diabetic rat model (Pareta et al., 2014) (Table II).

RECENT ADVANCES

There has been growing interest in cell encapsulation technologies and therapies in recent years to overcome the current therapeutic limitations that hinder and slow their development. Limitations such as the immune rejection response to the capsule components and structural weakness could lead to rupture and release of their cellular content, leading to adverse immune reactions that can endanger the recipient's life (Toda et al., 2019). These advances focus mainly on alternative measures to ensure greater efficacy and safety in their implementation, ranging from a rethinking of the microcapsule structure by modifying the number of layers (Syed et al., 2018; Bhujbal et al., 2014), its conformation and surface (Alagpulinsa et al., 2019 a,b), to the combination of macro and microcapsules (Saenz del Burgo et al., 2018), among others.

BIOCOMPATIBLE POLYMERS

Foreign Body Reaction (FBR) is a complex biological response to implanted biomaterials that involves inflammatory events and wound-healing processes leading to fibrosis (Klopfleisch and Jung, 2017). There has been a growing interest in developing anti-inflammatory and anti-fibrotic biopolymers to mitigate this response in recent years. Alginate, the most widely used material for microcapsule creation, has been covalently modified with different chemical groups to achieve this goal. In an extensive study by Vegas et

al. (2016a,b), 774 alginate recombinants were analyzed and subjected to various rigorous tests. Three alginate recombinants had promising properties: Z2-Y12, Z1-Y15, and Z1-Y19. All three modifications were triazole derivatives, suggesting that this class of molecules can modulate immune cell populations, specifically macrophages, on the surface of these materials in a way that inhibits their activation and disrupts fibrotic processes.

Microcapsules made with triazole-derived modified alginate, such as triazole-thiomorpholine dioxide (TMTD) alginate, have been shown to provide long-term glycemic correction and glucose responsiveness without immunosuppressive therapy for up to 174 days, demonstrating low susceptibility to FBR (Vegas et al., 2016 a,b).

There has also been research on the combination of different polymers (Correia et al., 2019), specifically alginate-PEG (Villa et al., 2017) and alginate-chitosan (Yang et al., 2016), to create bilayer capsules that provide effective immunization. This idea was later improved with the implementation of methoxy polyethylene glycol-succinimidyl valerate (mPEG-SVA), previously used in conjunction with immunoprotectors (Hashemi et al., 2017), now in combination with alginate and chitosan for the creation of an alginate-chitosan-mPEG-SVA multipolymer microcapsule. This approach showed a decrease of approximately 38% in IL-2 production by lymphocytes compared to unencapsulated pancreatic cell islets. It showed no difference in insulin secretion compared to unencapsulated cells, demonstrating no adverse effects on the isolated cells (Najafikhah et al., 2018). However, efforts have been made to find alternatives to alginate, among which

PEOT/PBT300 stands out recently. Sthijns et al. (2021), indicated that PEOT/PBT300 showed the best results compared to other biomaterials, considering its properties of elasticity and resistance to breakage, unaffected gene expression related to angiogenesis, low levels of oxidative stress, expression of endogenous antioxidants, and viability and functionality of pancreatic beta and alpha cells. Thus, PEOT/PBT300 was demonstrated to be a promising polymer for cell encapsulation.

TOROIDAL MICROCAPSULES

Pancreatic cell encapsulation and transplantation technologies and therapies offer an innovative perspective in current diabetes treatments, although several limitations persist. Microencapsulation devices have been designed for *in vivo* transplantation and retrieval. However, their large geometrical scale hinders adequate mass transfer of nutrients and insulin into and out of the encapsulated device. Microencapsulation technologies have improved their mass transfer properties. However, their complete retrieval remains challenging if the graft becomes a life-threatening problem for the recipient (Ernst et al., 2019).

Several studies have proposed a novel, non-traditional design of cell microcapsules with a toroidal structure (Zhang et al., 2018). A torus is a geometric shape similar to a donut or a ring (Gardner, 1975). These donut-shaped capsules have a large surface area, higher than traditional spherical capsules of the same volume, which improves mass transfer.

In a study conducted by Chen et al. (2019), capsules of different geometries

were fabricated, including toroidal, rod, and spheroid shapes, with a similar number of cells per microcapsule using initial cell seeding densities of 3.5, 5.8, and 9.3 million cells/mL, respectively. Results demonstrated that the average number of cells per microcapsule for toroidal, spheroid, and rod-shaped capsules was approximately 12,000. The mean percentage of dead cells was lowest (11%) for toroidal capsules and highest (25%) for spheroids.

Toroidal microcapsules also possess the ability to be interconnected into chains, which theoretically allows for their retrieval after implantation. Additionally, multi-compartmental toroidal capsules have also been developed, which could enable the co-encapsulation of other components (Ernst et al., 2019).

These unusual capsules are formed through vortex rings generated by dropping a droplet into a miscible liquid. Upon impacting the surface of a miscible liquid at a sufficient impact velocity, the droplet begins to deform to dissipate energy by curling backward. As the rim continues to curl, the center of the droplet becomes thinner and thinner. Eventually, when the center is too thin to sustain surface tension, it breaks up, forming a toroidal ring (Agbaglah et al., 2015).

An et al. (2016) presented an efficient method for mass-producing chitosan and alginate toroidal microcapsules using an industrially scalable electrospaying technique (Figures 3 and 4).

IMMUNOMODULATORS

It is well known that one of the most prominent obstacles to performing

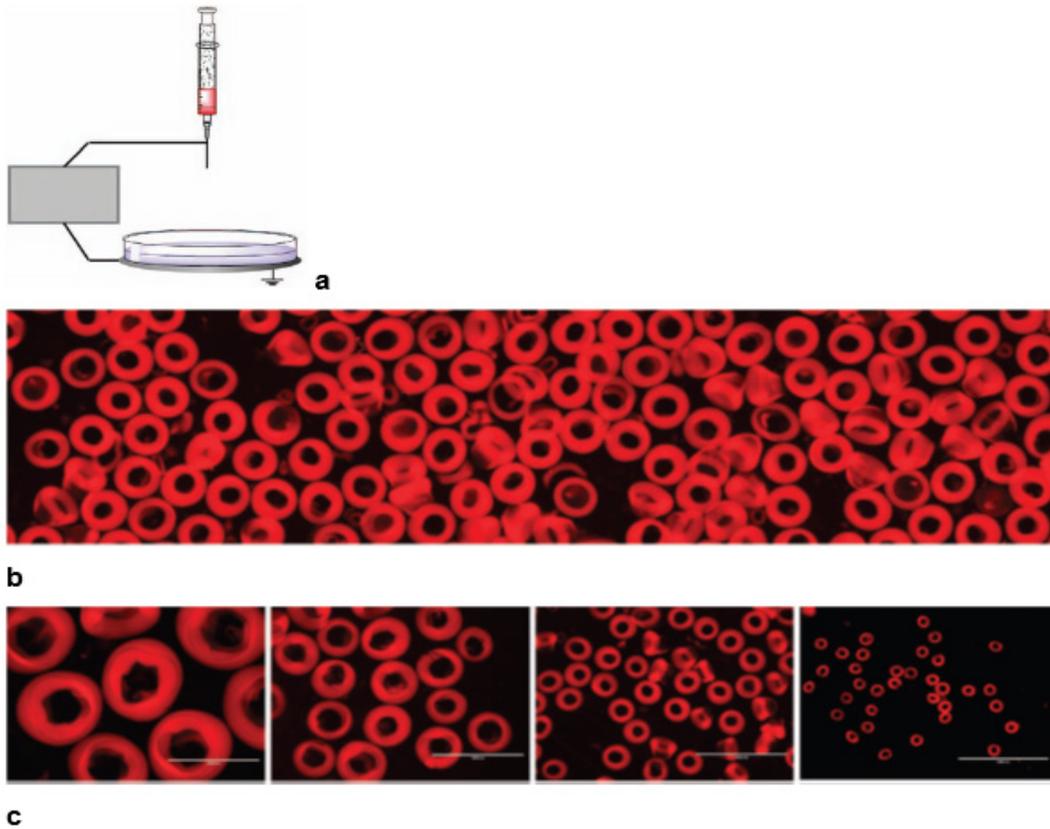


Figure 3. Mass production and size/shape control. (a) Schematic illustration of the electro spray setup. (b) Microscopic fluorescent images of the nanoclay hydrogel donut-microVRP fabricated by electro spraying. For better visualization, a fluorescent dye Rhodamine B was mixed in the nanoclay solution. (c) Size control of the nanoclay hydrogel donut-microVRP. Taken from An et al., 2016

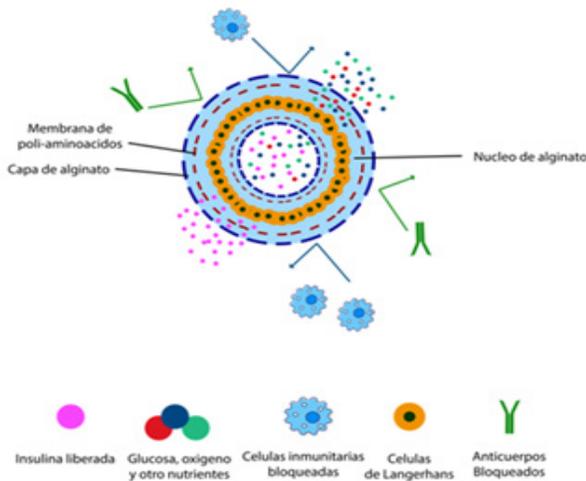


Figure 4. Structure of Toroidal Microcapsules. This is a schematic illustration of the structure of toroidal microcapsules. They possess a donut shape, a larger diffusion surface area, and a shorter diffusion distance, thus allowing for greater viability. They block the entry of immune system cells and antibodies while allowing the entry of glucose, oxygen, and other nutrients and the exit of insulin being released by Langerhans beta cells.

any transplant is the immune reaction to the implanted grafts. Although microencapsulation is a technique that inherently seeks to create a state of immunoisolation, scientific evidence suggests the use of additional techniques to attenuate the Foreign Body Reaction (FBR) and thereby ensure the long-term functionality and viability of the transplanted islets (Mellor and Munn, 2008; Gibly et al., 2017; Calafiore, 2018; Tomei, 2018; Kogawa et al., 2020). Consequently, immunosuppression emerged as an initial alternative to prevent graft rejection; however, given the multiple adverse effects that this measure entails, new strategies focused on modulating the immune system without the need for harmful immunosuppressive agents are currently

under development (Opara, 2017 a,b; Omami et al., 2017).

Among the most relevant techniques for improving islet transplantation outcomes are incorporating immunomodulatory molecules and biomaterials into microcapsules, cell co-transplantation, and antigen-specific immunomodulation (Desai and Shea, 2017; Basta et al., 2021). Experimental studies have incorporated various immunomodulatory molecules into the capsules to stimulate the recruitment of immune suppressor cells or polarize them toward an anti-inflammatory phenotype (Dimitrioglou et al., 2019). Among these are TGF- β 1, CXCL12, CCL22, UDCA, HMGB1, MCP1, IL-10, IL-4, IDO1, LTB4, IL-33, and PGE2 (Luo et al., 2008; Mooranian et al., 2017; Alagpulinsa et al., 2019 a,b; Elnashar et al., 2020; Safley et al., 2020). Overall, the results of these studies have been favorable, demonstrating improvements in local inflammatory status and, consequently, in the graft's viability, functionality, and survival (Agesjö et al., 2015; Liu et al., 2016;).

In addition, modulation of specific antigens has been proposed as a potential replacement for conventional systemic immunosuppressive therapies. This strategy consists of decreasing FBR through the induction of T cell anergy, which is another mechanism of lymphocyte tolerance, in which the lymphocyte is functionally unresponsive after antigen encounter but remains alive for extended periods in a hyporesponsive state; expansion of Regulatory T cells (Tregs), which are a specialized subpopulation of T cells that act to suppress immune response, thereby maintaining homeostasis and self-tolerance; or deletion of reactive T lymphocytes in regions surrounding the

transplant exclusively (Pearson et al., 2017; Serra and Santamaria, 2019; Clough et al., 2020; Basta et al., 2021). Finally, while this section focuses on immunomodulators, other elements capable of decreasing the severity of FBR without interfering with immunomodulation are worth mentioning. These include conformal coatings, multilamellar capsules, anti-biofouling molecules, and polymer brushes, as well as the proper selection of polymers for microcapsule manufacturing and their purification level (Hwang et al., 2017; Bochenek et al., 2018; Ramezanzadeh Andevvari et al., 2018; Calafiore, 2018; Toda et al., 2019; Hu and de Vos 2019; Watanabe et al., 2020; Gattás-Asfura et al., 2020).

Additionally, cell co-encapsulation technologies have recently been implemented, where pancreatic β -cells are encapsulated together with mesenchymal cells (MSCs) (White et al., 2009; Ben Nasr et al., 2015). This approach takes full advantage of the microencapsulation's immunoisolating properties, protecting both pancreatic and MSCs from the host's immune system. This increases their half-life without affecting their secretory function of insulin, cytokines, and angiogenic (SCF, TPO, CXCL12) and immunomodulatory proteins attributed to these cells (Laporte et al., 2019; Kim et al., 2019; Laporte et al., 2020). Indeed, several studies have demonstrated the positive influence of MSCs on cell survival and local inflammatory state reduction, presumably through increased expression of immunomodulatory genes related to IL-6, IL-10, CCL2, CCL5, TGF- β , NOS-2, TSG-6, mPGES-2, and COX-2 (Mao et al., 2019).

OXYGEN ENHANCERS

Another major obstacle to overcome in microencapsulated beta cell transplantation

is the hypoxic conditions to which the graft is subjected after implantation. Disruption of oxygen and nutrient supply is a common phenomenon, especially during the first week after transplantation, due to factors such as abrupt rupture of adjacent capillaries during inoculation and defects in blood flow distribution that particularly affect the central cells of the encapsulated islets (White et al., 2020).

Since hypoxic conditions can themselves determine the success or rejection of the procedure, different strategies have been developed around the local revascularization of the graft, as well as the direct supply of oxygen to the interior of the microcapsules (Groot Nibbelink et al., 2018). One of the most popular strategies in this field is the use of revascularization-promoting biomaterials or pre-vascularized devices. An example of this is the experimental study by Weaver et al. (2018), where a specialized device with a hydrogel center linked to a polyethylene dithiol (PEG dithiol) and an external vasculogenic layer with proteolytic peptides was used as a transport medium for encapsulated islets. This study demonstrated increases in local vascularization and cell viability after implantation. Similarly, other pre-vascularized devices synthesized with biopolymers such as alginate, collagen type I (COL1) or polycaprolactone have incorporated additional techniques such as the addition of gels enriched with growth factors, surface patterns to increase the adhesion of potentially angiogenic cells, porous membranes to facilitate nutrient exchange or the stimulation of fibrinogen, thus generating increases in the survival, functionality and viability of the graft by mitigating local hypoxia (Marchioli et al., 2015; Zbinden et al., 2021; Mridha et al., 2022).

Likewise, techniques such as co-encapsulating pancreatic islets have recently gained relevance. In this context, pancreatic beta cells are microencapsulated together with potentially angiogenic cells that facilitate revascularization, such as endothelial cells, fibroblasts, and particularly pluripotent mesenchymal cells, through the stimulation of factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF), kinase insert domain receptor (KDR) or hepatocyte growth factor (HGF) (Cavallari et al., 2012; Zhang et al., 2013; He, 2017; Groot Nibbelink et al., 2018; Kogawa et al., 2020; Nilsson et al., 2020). Other compounds, such as bilirubin, have exhibited beneficial antioxidant effects for the survival of pancreatic β -cells under hypoxic conditions. This molecule has been shown to interfere with hypoxia-inducing apoptotic pathways through the downregulation of TNF- α and the upregulation of anti-apoptotic genes such as haeme oxygenase (HO-1) and anti-apoptotic B-cell lymphoma-2 (BCL-2) (White et al., 2020). These findings were demonstrated in the study where nanoencapsulation of bilirubin in chitosan-127-pluronic particles led to increases in cell viability, as well as reductions in hypoxia and apoptosis levels (Fullagar et al., 2017). Finally, specialized devices have been designed to meet the oxygen demands of transplanted cells. In this regard, the bioartificial device called β -Air consists of pancreatic islets suspended in an alginate hydrogel and a gas chamber that houses oxygen, both covered by an internal membrane permeable to gaseous substances, as well as an external membrane and a mechanical support mechanism (Barkai et al., 2013). In addition, encapsulation of pancreatic islets using the TheraCyte™ device has been shown to protect against allograft

rejection in nonimmunized recipients. The TheraCyte™ system for encapsulating and transplanting cells is a thin membrane-based polymeric chamber. It is fabricated from biocompatible membranes that protect allogeneic cells from rejection by the recipient and, when implanted subcutaneously, induce the development of blood capillaries close to the membranes. This device also has a series of membranes that aim to achieve immuno-isolation of the graft and simultaneously promote local vascularization thanks to an angiogenic outer layer (Kumagai-Braesch et al., 2013).

Conclusions

Pancreatic islet transplantation has emerged as a solution to the limitations of conventional procedures. It significantly improves the quality of life for patients by freeing them from lifelong dependence on exogenous insulin administration and reducing the associated adverse effects. Despite the challenges inherent in transplantation, such as autoimmune reactions, islet microencapsulation is a promising technique to ensure transplanted cells' viability and successful function.

While persistent hurdles exist regarding graft compatibility, nutrient diffusion, and local immunomodulation, pancreatic islet transplantation using cellular microencapsulation techniques has shown successful outcomes. Nevertheless, further long-term clinical research is required to offer accurate and representative assessments of this procedure's efficacy. Additionally, it is essential to continue implementing novel strategies to optimize microencapsulation devices and overcome the existing challenges.

The unexplored combined use of some of the most innovative strategies, technologies, and techniques could potentially solve the current problems that prevent the commercialization and global use of β -cell microencapsulation.

Firstly, achieving effective immunoisolation using biopolymer capsules would open the possibility of using cells of non-human origin. This strategy would address the challenge of biocompatibility by isolating insulin-producing cells from the patient's immune system, thus preventing rejection. In addition, by complementing this technique with the co-encapsulation of MSCs, which possess immunomodulatory properties, not only would the lifespan of the encapsulated cells be extended, but local angiogenesis at the implantation site would also be stimulated.

Furthermore, the use of toroidal capsules, which, due to their geometrical properties, increase the surface area for contact, facilitating oxygen transport to most of the cellular content, and which are manufactured with hybrid biopolymers or with PEOT PBT300, would ensure proper immunoisolation, generating minimal or no inflammatory response, while also preserving essential structural characteristics such as elasticity and resistance to breakage. Thus, by combining these advances, it could be possible to reach the ideal formula to overcome most of the current limitations of cell encapsulation and treat or even cure DM in the future.

References

- Agbaglah G, Thoraval M-J, Thoroddsen ST, Zhang LV, Fezzaa K, Deegan RD. 2015. Drop Impact into a Deep Pool: Vortex Shedding and Jet Formation.

- J Fluid Mechanics 764: R1.
- Agesjö E, Christoffersson G, Waldén TB, Carlsson PO, Essand M, Korsgren O, Phillipson M. 2015. Immunological shielding by induced recruitment of regulatory T-lymphocytes delays the rejection of islets transplanted in muscle. *Cell Transplant* 24(2):263-76.
- Aijaz A, Perera D, Olabisi RM. 2017. Polymeric Materials for Cell Microencapsulation. *Methods Mol Biol* 1479:79-93.
- Aikaeli F, Njim T, Gissing S, Moyo F, Alam U, Mfinanga SG, Okebe J, Ramaiya K, Webb EL, Jaffar S, Garrib A. 2022. Prevalence of microvascular and macrovascular complications of diabetes in newly diagnosed type 2 diabetes in low-and-middle-income countries: A systematic review and meta-analysis. *PLOS Glob Public Health* 2(6):e0000599.
- Alagpulinsa DA, Cao JJJ, Driscoll RK, Sîrbulescu RF, Penson MFE, Sremac M, Engquist EN, Brauns TA, Markmann JF, Melton DA, Poznansky MC. 2019a. Alginate-microencapsulation of human stem cell-derived β cells with CXCL12 prolongs their survival and function in immunocompetent mice without systemic immunosuppression. *Am J Transplant* 19(7):1930-1940.
- Alagpulinsa DA, Cao JJJ, Sobell D, Poznansky MC. 2019b. Harnessing CXCL12 signaling to protect and preserve functional β -cell mass and for cell replacement in type 1 diabetes. *Pharmacol Ther* 193:63-74.
- Alejandro EU, Gregg B, Blandino-Rosano M, Cras-Méneur C, Bernal-Mizrachi E. 2015. Natural history of β -cell adaptation and failure in type 2 diabetes. *Mol Aspects Med* 42:19-41.
- Al-Qerem W, Jarab AS, Badinjki M, Hammad A, Ling J, Alasmari F. 2022. Factors associated with glycemic control among patients with type 2 diabetes: a cross-sectional study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 26(7):2415-2421
- Alzaheb RA, Altemani AH. 2018. The prevalence and determinants of poor glycemic control among adults with type 2 diabetes mellitus in Saudi Arabia. *Diabetes Metab Syndr Obes* 11:15-21.
- American Diabetes Association Professional Practice Committee. 9. 2022. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care* 1;45(Suppl 1):S125-S143.
- Amiel SA. 2021. The consequences of hypoglycaemia. *Diabetologia* 64(5):963-970.
- An D, Warning A, Yancey KG, Chang CT, Kern VR, Datta AK, Steen PH, Luo D, Ma M. 2016. Mass production of shaped particles through vortex ring freezing. *Nat Commun* 7:12401.
- Armengol GD, Hayfron-Benjamin CF, van den Born BH, Galenkamp H, Agyemang C. 2021. Microvascular and macrovascular complications in type 2 diabetes in a multi-ethnic population based in Amsterdam. The HELIUS study. *Prim Care Diabetes* 15(3):528-534.
- Ashimova A, Yegorov S, Negmetzhanov B, Hortelano G. 2019. Cell Encapsulation Within Alginate Microcapsules: Immunological Challenges and Outlook. *Front Bioeng Biotechnol* 7:380.
- Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. 2014. Type 1 diabetes. *Lancet* 383(9911):69-82.
- Barkai U, Weir GC, Colton CK, Ludwig B, Bornstein SR, Brendel MD, Neufeld T, Bremer C, Leon A, Evron Y, Yavriyants K, Azarov D, Zimmermann B, Maimon S, Shabtay N, Balyura M, Rozenshtein T, Vardi P, Bloch K, de Vos P, Rotem A. 2013. Enhanced oxygen supply improves islet viability in a new bioartificial pancreas. *Cell Transplant* 22(8):1463-76.
- Basta G, Montanucci P, Calafiore R. 2021. Microencapsulation of cells and molecular therapy of type 1 diabetes mellitus: The actual state and future perspectives between promise and progress. *J Diabetes Investig* 12(3):301-309.
- Ben Nasr M, Vergani A, Avruch J, Liu L, Kefaloyianni E, D'Addio F, Tezza S, Corradi D, Bassi R, Valderrama-Vasquez A, Usuelli V, Kim J, Azzi J, El Essawy B, Markmann J, Abdi R, Fiorina P. 2015. Co-transplantation of autologous MSCs delays islet allograft rejection and generates a local immunoprivileged site. *Acta Diabetol* 52(5):917-27.
- Bhujbal SV, de Haan B, Niclou SP, de Vos P. 2014. A novel multilayer immunoisolating encapsulation system overcoming protrusion of cells. *Sci Rep* 4:6856.
- Bidoret A, Martins E, De Smet BP, Poncelet D. 2017. Cell Microencapsulation: Dripping Methods. *Methods Mol Biol* 1479:43-55.
- Bochenek MA, Veiseh O, Vegas AJ, McGarrigle JJ, Qi M, Marchese E, Omami M, Doloff JC, Mendoza-Elias J, Nourmohammadzadeh M, Khan A, Yeh CC, Xing Y, Isa D, Ghani S, Li J, Landry C, Bader AR, Olejnik K, Chen M, Hollister-Lock J, Wang Y, Greiner DL, Weir GC, Strand BL, Rokstad AMA, Lacik I, Langer R, Anderson DG, Oberholzer J. 2018. Alginate encapsulation as long-term immune protection of allogeneic pancreatic islet cells transplanted into the omental bursa of macaques. *Nat Biomed Eng* 2(11):810-821.

- Bose S, Volpatti LR, Thiono D, Yesilyurt V, McGladrigan C, Tang Y, Facklam A, Wang A, Jhunjhunwala S, Veiseh O, Hollister-Lock J, Bhattacharya C, Weir GC, Greiner DL, Langer R, Anderson DG. 2020. A retrievable implant for the long-term encapsulation and survival of therapeutic xenogeneic cells. *Nat Biomed Eng* 4(8):814–826.
- Calafiore R, Basta G, Montanucci P. 2017. Microencapsulation of Islets for the Treatment of Type 1 Diabetes Mellitus (T1D). *Methods Mol Biol* 1479:283-304.
- Calafiore R. 2018. Microencapsulation for cell therapy of type 1 diabetes mellitus: The interplay between common beliefs, prejudices and real progress. *J Diabetes Investig* 9(2):231-233.
- Cavallari G, Olivi E, Bianchi F, Neri F, Foroni L, Valente S, La Manna G, Nardo B, Stefoni S, Ventura C. 2012. Mesenchymal stem cells and islet cotransplantation in diabetic rats: improved islet graft revascularization and function by human adipose tissue-derived stem cells preconditioned with natural molecules. *Cell Transplant* 21(12):2771-81.
- Chen Y, Nguyen DT, Kokil GR, Wong YX, Dang TT. 2019. Microencapsulated islet-like microtissues with toroid geometry for enhanced cellular viability. *Acta Biomater* 97:260-271.
- Clough DW, King JL, Li F, Shea LD. 2020. Integration of Islet/Beta-Cell Transplants with Host Tissue Using Biomaterial Platforms. *Endocrinology* 161(11):bqaa156.
- Correia CR, Ghasemzadeh-Hasankolaei M, Mano JF. 2019. Cell encapsulation in liquified compartments: Protocol optimization and challenges. *PLoS One* 14(6):e0218045.
- Demir G, Er E, Atik Altınok Y, Özen S, Darcan Ş, Gökşen D. 2022. Local complications of insulin administration sites and effect on diabetes management. *J Clin Nurs* 31(17-18):2530-2538.
- Desai T, Shea LD. 2017. Advances in islet encapsulation technologies. *Nat Rev Drug Discov* 16(5):338–350.
- Dimitrioglou N, Kanelli M, Papageorgiou E, Karatzas T, Hatzivramidis D. 2019. Paving the way for successful islet encapsulation. *Drug Discov Today* 24(3):737-748.
- Elnashar M, Vaccarezza M, Al-Salami H. 2020. Cutting-edge biotechnological advancement in islet delivery using pancreatic and cellular approaches. *Future Sci OA* 7(3):FSO660.
- Ernst AU, Wang LH, Ma M. 2019. Interconnected Toroidal Hydrogels for Islet Encapsulation. *Adv Healthc Mater* 8(12):e1900423.
- Fang W, Bi D, Zheng R, Cai N, Xu H, Zhou R, Lu J, Wan M, Xu X. 2017. Identification and activation of TLR4-mediated signalling pathways by alginate-derived guluronate oligosaccharide in RAW264.7 macrophages. *Sci Rep* 7:1663.
- Farina M, Ballerini A, Fraga DW, Nicolov E, Hogan M, Demarchi D, Scaglione F, Sabek OM, Horner P, Thekkedath U, Gaber OA, Grattoni A. 2017. 3D Printed Vascularized Device for Subcutaneous Transplantation of Human Islets. *Biotechnol J* 12(9).
- Fullagar B, Rao W, Gilor C, Xu F, He X, Adin CA. 2017. Nano-Encapsulation of Bilirubin in Pluronic F127-Chitosan Improves Uptake in β Cells and Increases Islet Viability and Function after Hypoxic Stress. *Cell Transplant* 26(10):1703-1715.
- Gansau J, Kelly L, Buckley CT. 2018. Influence of key processing parameters and seeding density effects of microencapsulated chondrocytes fabricated using electrohydrodynamic spraying. *Biofabrication* 10(3):035011.
- Gardner M. 1975. Mathematical Games. *Scientific American* 233(1):112-19.
- Gattás-Asfura KM, Abuid NJ, Labrada I, Stabler CL. 2020. Promoting Dendrimer Self-Assembly Enhances Covalent Layer-by-Layer Encapsulation of Pancreatic Islets. *ACS Biomater Sci Eng* 6(5):2641-2651.
- GBD 2021 Diabetes Collaborators. 2023. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet* 2023; 402: 203–234.
- Gibly RF, Graham JG, Luo X, Lowe WL, Hering BJ, Shea LD. 2011. Advancing islet transplantation: From engraftment to the immune response. *Diabetología* 54(10):2494-2505.
- Giraldo JA, Molano RD, Rengifo HR, Fotino C, Gattás-Asfura KM, Pileggi A, Stabler CL. 2017. The impact of cell surface PEGylation and short-course immunotherapy on islet graft survival in an allogeneic murine model. *Acta Biomater* 49:272-283.
- Groot Nibbelink M, Skrzypek K, Karbaat L, Both S, Plass J, Klomphaar B, van Lente J, Henke S, Karperien M, Stamatialis D, van Apeldoorn A. 2018. An important step towards a prevascularized islet microencapsulation device: *in vivo* prevascularization by combination of mesenchymal stem cells on micropatterned membranes. *J Mater Sci Mater Med* 29(11):174.

- Guarneri AM, Hoffman RP. 2022. Non-glycemic Adverse Effects of Insulin. *Curr Diabetes Rev* 18(2):e012821190877
- Hashemi J, Hashemi-Najafabadi S, Vasheghani-Farahani E. 2017. Synergistic effect of PEGylation and pentoxifylline addition on immunoprotection of pancreatic islets. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 28(1):33–49.
- He X. 2017. Microscale Biomaterials with Bioinspired Complexity of Early Embryo Development and in the Ovary for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *ACS Biomater Sci Eng* 3(11):2692-2701.
- Hsu BR, Fu SH. 2017. Field Effect Microparticle Generation for Cell Microencapsulation. *Methods Mol Biol* 1479:57-70.
- Hu S, de Vos P. 2019. Polymeric Approaches to Reduce Tissue Responses Against Devices Applied for Islet-Cell Encapsulation. *Front Bioeng Biotechnol* 7:134.
- Hwang PTJ, Shah DK, Garcia JA, Alexander GC, Lim DJ, Cui W, Cooper DK, Shalev A, Kin T, Kim JA, Jun HW. 2017. Encapsulation of Human Islets Using a Biomimetic Self-Assembled Nanomatrix Gel for Protection against Cellular Inflammatory Responses. *ACS Biomater Sci Eng* 3(9):2110-2119.
- Imaninezhad M, Jain E, Zustiak SP. 2019. Cell Microencapsulation in Polyethylene Glycol Hydrogel Microspheres Using Electrohydrodynamic Spraying. *Methods Mol Biol* 1576:313-325.
- Jayaprakash KS, Sen AK. 2019. Droplet encapsulation of particles in different regimes and sorting of particle-encapsulating-droplets from empty droplets. *Biomicrofluidics* 13(3):034108.
- Kendall WF Jr, Opara EC. 2017. Polymeric Materials for Perm-Selective Coating of Alginate Microbeads. In: Opara, E. (eds) *Cell Microencapsulation. Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, NY 1479:95-109.
- Kim JS, Jung Y, Kim SH, Shin JS, Kim SH, Park CG. 2019. Vascularization of PLGA-based bio-artificial beds by hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells for subcutaneous xenogeneic islet transplantation. *Xenotransplantation* 26(1):e12441.
- Klopfleisch R, Jung F. 2017. The pathology of the foreign body reaction against biomaterials. *J Biomed Mater Res A* 105(3):927-940.
- Kogawa R, Nakamura K, Mochizuki Y. 2020. A New Islet Transplantation Method Combining Mesenchymal Stem Cells with Recombinant Peptide Pieces, Microencapsulated Islets, and Mesh Bags. *Biomedicines* 8(9):299.
- Köllmer M, Appel AA, Somo SI, Brey EM. 2016. Long-Term Function of Alginate-Encapsulated Islets. *Tissue Eng Part B Rev* 22(1):34-46.
- Korsgren O. 2017. Islet Encapsulation: Physiological Possibilities and Limitations. *Diabetes* 66(7):1748-1754.
- Kumagai-Braesch M, Jacobson S, Mori H, Jia X, Takahashi T, Wernerson A, Flodström-Tullberg M, Tibell A. 2013. The TheraCyte™ device protects against islet allograft rejection in immunized hosts. *Cell Transplant* 22(7):1137-46.
- Laporte C, Tubbs E, Cristante J, Gauchez AS, Pesenti S, Lamarche F, Cottet-Rousselle C, Garrel C, Moisan A, Moulis JM, Fontaine E, Benhamou PY, Lablanche S. 2019. Human mesenchymal stem cells improve rat islet functionality under cytokine stress with combined upregulation of heme oxygenase-1 and ferritin. *Stem Cell Res Ther* 10(1):85.
- Laporte C, Tubbs E, Pierron M, Gallego A, Moisan A, Lamarche F, Lozano T, Hernandez A, Cottet-Rousselle C, Gauchez AS, Persoons V, Bottausci F, Fontelaye C, Boizot F, Lablanche S, Rivera F. 2020. Improved human islets' viability and functionality with mesenchymal stem cells and arg-gly-asp tripeptides supplementation of alginate micro-encapsulated islets *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 528(4):650-657.
- Liu JMH, Zhang J, Zhang X, Hlavaty KA, Ricci CF, Leonard JN, Shea LD, Gower RM. 2016. Transforming growth factor-beta 1 delivery from microporous scaffolds decreases inflammation post-implant and enhances function of transplanted islets. *Biomaterials* 80:11-19.
- Lovic D, Piperidou A, Zografou I, Grassos H, Pittaras A, Manolis A. 2020. The Growing Epidemic of Diabetes Mellitus. *Curr Vasc Pharmacol* 18(2):104-109.
- Luo X, Pothoven KL, McCarthy D, DeGutes M, Martin A, Getts DR, Xia G, He J, Zhang X, Kaufman DB, Miller SD. 2008. ECDI-fixed allogeneic splenocytes induce donor-specific tolerance for long-term survival of islet transplants via two distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(38):14527-14532.
- Mao AS, Özkale B, Shah NJ, Vining KH, Descombes T, Zhang L, Tringides CM, Wong SW, Shin JW, Scadden DT, Weitz DA, Mooney DJ. 2019. Programmable microencapsulation for enhanced mesenchymal stem cell persistence and immunomodulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(31):15392–15397.

- Marchioli G, van Gurp L, van Krieken PP, Stamatialis D, Engelse M, van Blitterswijk CA, Karperien MB, de Koning E, Alblas J, Moroni L, van Apeldoorn AA. 2015. Fabrication of three-dimensional bioprinted hydrogel scaffolds for islets of Langerhans transplantation. *Biofabrication* 7(2):025009.
- Mellor AL, Munn DH. 2008. Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends but protects foes. *Nat Rev Immunol* 8(1):74-80.
- Merani S, Toso C, Emamaullee J, Shapiro AMJ. 2008. Optimal implantation site for pancreatic islet transplantation. *British J Surgery* 95: 1449-1461.
- Mooranian A, Tackechi R, Jamieson E, Morahan G, Al-Salami H. 2017. Innovative Microcapsules for Pancreatic β -Cells Harvested from Mature Double-Transgenic Mice: Cell Imaging, Viability, Induced Glucose-Stimulated Insulin Measurements and Proinflammatory Cytokines Analysis. *Pharm Res* 34(6):1217-1223.
- Mridha AR, Dargaville TR, Dalton PD, Carroll L, Morris MB, Vaithilingam V, Tuch BE. 2022. Prevascularized Retrievable Hybrid Implant to Enhance Function of Subcutaneous Encapsulated Islets. *Tissue Eng Part A* 28(5-6):212-224.
- Najafikhah N, Hashemi-Najafabadi S, Zahediasl S, Nabavimanesh MM, Farrokhsfall K. 2018. Normal Insulin Secretion from Immune-Protected Islets of Langerhans by PEGylation and Encapsulation in the Alginate-Chitosan-PEG. *Iranian Journal of Biotechnology* 16(4); e1669.
- Nilsson J, Fardoos R, Hansen L, Lökvist H, Pietras K, Holmberg D, Schmidt-Christensen A. 2020. Recruited fibroblasts reconstitute the peri-islet membrane: a longitudinal imaging study of human islet grafting and revascularisation. *Diabetologia* 63(1):137-148.
- Omami M, McGarrigle JJ, Reedy M, Isa D, Ghani S, Marchese E, Bochenek MA, Longi M, Xing Y, Joshi I, Wang Y, Oberholzer J. 2017. Islet Microencapsulation: Strategies and Clinical Status in Diabetes. *Current Diabetes Reports* 17(7):47.
- Opara EC. 2017a. Applications of Cell Microencapsulation. *Methods Mol Biol* 1479:23-39.
- Opara EC. 2017b. Applications of Cell Microencapsulation. In: Opara E (eds) *Cell Microencapsulation*. *Methods in Molecular Biology*, 1479. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6364-5_2.
- Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. 2013. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J* 34:2436-2443.
- Papas KK, De Leon H, Suszynski TM, Johnson RC. 2019. Oxygenation strategies for encapsulated islet and beta cell transplants. *Adv Drug Deliv Rev* 139:139-156.
- Pareta R, McQuilling JP, Sittadjody S, Jenkins R, Bowden S, Orlando G, Farney AC, Brey EM, Opara EC. 2014. Long-term function of islets encapsulated in a redesigned alginate microcapsule construct in omentum pouches of immune-competent diabetic rats. *Pancreas* 43(4):605-13.
- Park H, Haque MR, Park JB, Lee KW, Lee S, Kwon Y, Lee HS, Kim GS, Shin DY, Jin SM, Kim JH, Kang HJ, Byun Y, Kim SJ. 2018. Polymeric nano-shielded islets with heparin-polyethylene glycol in a non-human primate model. *Biomaterials* 171:164-177.
- Pearson RM, Casey LM, Hughes KR, Miller SD, Shea LD. 2017. *In vivo* reprogramming of immune cells: Technologies for induction of antigen-specific tolerance. *Adv Drug Deliv Rev* 114:240-255.
- Pepper AR, Gala-Lopez B, Pawlick R, Merani S, Kin T, Shapiro AM. 2015. A prevascularized subcutaneous device-less site for islet and cellular transplantation. *Nat Biotechnol* 33(5):518-23.
- Pereira MS, Cardoso LMDF, da Silva TB, Teixeira AJ, Mizrahi SE, Ferreira GSM, Dantas FML, Cottade-Almeida V, Alves LA. 2020. A Low-Cost Open Source Device for Cell Microencapsulation. *Materials (Basel)* 13(22):5090.
- Posselt AM, Szot GL, Frassetto LA, Masharani U, Tavakol M, Amin R, McElroy J, Ramos MD, Kerlan RK, Fong L, Vincenti F, Bluestone JA, Stock PG. 2010. Islet transplantation in type 1 diabetic patients using calcineurin inhibitor-free immunosuppressive protocols based on T-cell adhesion or costimulation blockade. *Transplantation* 90(12):1595-1601.
- Qayyum AS, Jain E, Kolar G, Kim Y, Sell SA, Zustiak SP. 2017. Design of electrohydrodynamic sprayed polyethylene glycol hydrogel microspheres for cell encapsulation. *Biofabrication* 9(2):025019.
- Ramezanzadeh Andevvari R, Hashemi-Najafabadi S, Bagheri F. 2018. Immunoisolation of stem cells by simultaneous encapsulation and PEGylation. *Prog Biomater* 7(1):55-60.

- Saenz del Burgo L, Ciriza J, Espona-Noguera A, Illa X, Cabruja E, Orive G, Hernández RM, Villa R, Pedraz JL, Álvarez M. 2018. 3D Printed porous polyamide macrocapsule combined with alginate microcapsules for safer cell-based therapies. *Sci Rep* 8:8512.
- Safley SA, Kenyon NS, Berman DM, Barber GF, Willman M, Duncanson S, Iwakoshi N, Holdcraft R, Gazda L, Thompson P, Badell IR, Sambanis A, Ricordi C, Weber CJ. 2018. Microencapsulated Adult Porcine Islets Transplanted Intraperitoneally in Streptozotocin-diabetic Non-human Primates. *Xenotransplantation* 25(6):e12450.
- Safley SA, Barber GF, Holdcraft RW, Gazda LS, Duncanson S, Poznansky MC, Sambanis A, Weber CJ. 2020. Multiple clinically relevant immunotherapies prolong the function of microencapsulated porcine islet xenografts in diabetic NOD mice without the use of anti-CD154 mAb. *Xenotransplantation* 27(4):e12577.
- Serra P, Santamaria P. 2019. Antigen-specific therapeutic approaches for autoimmunity. *Nat Biotechnol* 37(3):238-251.
- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. 2000. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343(4):230-238.
- Shapiro AM. 2011. State of the art of clinical islet transplantation and novel protocols of immunosuppression. *Curr Diab Rep* 11:345-354.
- Sherwood JS, Russell SJ, Putman MS. 2020. New and Emerging Technologies in Type 1 Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 49(4):667-678.
- Shetty SB, Ramachandrapa L. 2019. Glycemic control amongst diabetic subjects on insulin therapy: Still off target! *International Journal of Medical Research and Review* 7(4):280-286.
- Shimoda M, Matsumoto S. 2017. Microencapsulation in Clinical Islet Xenotransplantation. *Methods Mol Biol* 1479:335-345.
- Stabler CL, Giraldo JA, Berman DM, Gattás-Asfura KM, Willman MA, Rabassa A, Geary J, Diaz W, Kenyon NM, Kenyon NS. 2020. Transplantation of PEGylated islets enhances therapeutic efficacy in a diabetic nonhuman primate model. *Am J Transplant* 20(3):689-700.
- Sthijns MMJPE, Jetten MJ, Mohammed SG, Claessen SMH, de Vries RHW, Stell A, de Bont DFA, Engelse MA, Mumcuoglu D, van Blitterswijk CA, Dankers PYW, de Koning EJP, van Apeldoorn AA, LaPointe VLS. 2021. Oxidative stress in pancreatic alpha and beta cells as a selection criterion for biocompatible biomaterials. *Biomaterials* 267:120449.
- Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, Stein C, Basit A, Chan JCN, Mbanya JC, Pavkov ME, Ramachandaran A, Wild SH, James S, Herman WH, Zhang P, Bommer C, Kuo S, Boyko EJ, Magliano DJ. 2022. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* 183:109119.
- Syed F, Bugliani M, Novelli M, Olimpico F, Suleiman M, Marselli L, Boggi U, Filipponi F, Raffa V, Krol S, Campani D, Masiello P, De Tata V, Marchetti P. 2018. Conformal coating by multilayer nano-encapsulation for the protection of human pancreatic islets: *In-vitro* and *in-vivo* studies. *Nanomedicine* 14(7):2191-2203.
- Toda S, Fattah A, Asawa K, Nakamura N, N Ekdahl K, Nilsson B, Teramura Y. 2019. Optimization of Islet Microencapsulation with Thin Polymer Membranes for Long-Term Stability. *Micromachines (Basel)*. 10(11):755.
- Tomei AA. 2018. Engineering Confined and Prevascularized Sites for Islet Transplantation. *Transplantation* 102(11):1793-1794.
- Vegas AJ, Veiseh O, Doloff JC, Ma M, Tam HH, Bratlie K, Li J, Bader AR, Langan E, Olejnik K, Fenton P, Kang JW, Hollister-Locke J, Bochenek MA, Chiu A, Siebert S, Tang K, Jhunjunwala S, Aresta-Dasilva S, Dholakia N, Thakrar R, Vietti T, Chen M, Cohen J, Siniakowicz K, Qi M, McGarrigle J, Graham AC, Lyle S, Harlan DM, Greiner DL, Oberholzer J, Weir GC, Langer R, Anderson DG. 2016a. Combinatorial hydrogel library enables identification of materials that mitigate the foreign body response in primates. *Nat Biotechnol* 34(3):345-52.
- Vegas AJ, Veiseh O, Gürtler M, Millman JR, Pagliuca FW, Bader AR, Doloff JC, Li J, Chen M, Olejnik K, Tam HH, Jhunjunwala S, Langan E, Aresta-Dasilva S, Gandham S, McGarrigle JJ, Bochenek MA, Hollister-Locke J, Oberholzer J, Greiner DL, Weir GC, Melton DA, Langer R, Anderson DG. 2016b. Long-term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell-derived beta cells in immune-competent mice. *Nat Med* 22(3):306-11.
- Villa C, Manzoli V, Abreu MM, Verheyen CA, Seskin M, Najjar M, Molano RD, Torrente Y, Ricordi C, Tomei AA. 2017. Effects of Composition of Alginate-Polyethylene Glycol Microcapsules and Transplant

- Site on Encapsulated Islet Graft Outcomes in Mice. *Transplantation* 101(5):1025-1035.
- Walker TW, Loggia AN, Fuller GG. 2015. Multiphase Flow of Miscible Liquids: Jets and Drops. *Experiments in Fluids* 56(5):106.
- Watanabe T, Okitsu T, Ozawa F, Nagata S, Matsunari H, Nagashima H, Nagaya M, Teramae H, Takeuchi S. 2020. Millimeter-Thick Xenoislet-Laden Fibers as Retrievable Transplants Mitigate Foreign Body Reactions for Long-Term Glycemic Control in Diabetic Mice. *Biomaterials* 255:120162.
- Weaver JD, Headen DM, Hunckler MD, Coronel MM, Stabler CL, García AJ. 2018. Design of a vascularized synthetic poly (ethylene glycol) macroencapsulation device for islet transplantation. *Biomaterials* 172:54-65.
- White AM, Shamul JG, Xu J, Stewart S, Bromberg JS, He X. 2020. Engineering Strategies to Improve Islet Transplantation for Type 1 Diabetes Therapy. *ACS Biomater Sci Eng* 6(5):2543-2562.
- White SA, Shaw JA, Sutherland DE. 2009. Pancreas transplantation. *Lancet* 373:1808-1817.
- Yang HK, Ham DS, Park HS, Rhee M, You YH, Kim MJ, Shin J, Kim OY, Khang G, Hong TH, Kim JW, Lee SH, Cho JH, Yoon KH. 2016. Long-term Efficacy and Biocompatibility of Encapsulated Islet Transplantation with Chitosan-Coated Alginate Capsules in Mice and Canine Models of Diabetes. *Transplantation* 100(2):334-43.
- Zbinden A, Urbanczyk M, Layland SL, Becker L, Marzi J, Bosch M, Loskill P, Duffy GP, Schenke-Layland K. 2021. Collagen and Endothelial Cell Coculture Improves β -Cell Functionality and Rescues Pancreatic Extracellular Matrix. *Tissue Eng Part A* 27(13-14):977-991.
- Zhang W, Zhao S, Rao W, Snyder J, Choi JK, Wang J, Khan IA, Saleh NB, Mohler PJ, Yu J, Hund TJ, Tang C, He X. 2013. A Novel Core-Shell Microcapsule for Encapsulation and 3D Culture of Embryonic Stem Cells. *J Mater Chem B* 2013(7):1002-1009.
- Zhang Y, Yong Y, An D, Song W, Liu Q, Wang L, Pardo Y, Kern VR, Steen PH, Hong W, Liu Z, Ma M. 2018. A Drip-Crosslinked Tough Hydrogel. *Polymer* 135: 327-330.



La Unión Europea y los Fondos Europeos

The European Union and European Funds

MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO*¹, GINÉS TOCÓN PASTOR**

Resumen

La Unión Europea (UE) es una asociación económica y política formada por 27 países de Europa (Bélgica, Bulgaria, Chequia, Dinamarca, Alemania, Estonia, Irlanda, Grecia, España, Francia, Croacia, Italia, Chipre, Letonia, Lituania, Luxemburgo, Hungría, Malta, Países Bajos, Austria, Polonia, Portugal, Rumanía, Eslovenia, Eslovaquia, Finlandia y Suecia) que han delegado parte de su soberanía en instituciones comunes para tomar democráticamente decisiones sobre asuntos de interés común. La UE es una potencia mundial que garantiza acuerdos comerciales, apoya la economía, promueve los valores de la UE, protege sus derechos y el medio ambiente. Los Fondos Europeos son instrumentos financieros del presupuesto de la Unión Europea. Estos recursos son los Fondos Estructurales y de Inversión Europeos (Fondos EIE) y el Fondo de Cohesión gestionados conjuntamente por la Comisión Europea y los países de la UE. Tanto los Fondos EIE como el Fondo de Cohesión son utilizados para llevar a cabo la política de cohesión de la Unión Europea, que beneficia a todas las regiones y ciudades de la Unión y favorece el crecimiento económico, la creación de empleo, la competitividad empresarial, el desarrollo sostenible y la protección del medio ambiente. La relación entre la Unión Europea y Venezuela se enmarca en la Nueva Agenda para las Relaciones entre la UE y América Latina y el Caribe, resaltada en las conclusiones de la Cumbre UE-CELAC celebrada en julio de 2023 en Bruselas. Esta propone una asociación estratégica más moderna y sólida, a través de un diálogo político fortalecido, estimulando el comercio e inversión, y fomentando sociedades más sostenibles, justas e interconectadas.

Palabras clave: Unión Europea, Fondos, Agenda 2030 Europa, Desarrollo Sostenible

Abstract

The European Union (EU) is an economic and political association made up of 27 European countries (Belgium, Bulgaria, Czechia, Denmark, Germany, Estonia, Ireland, Greece, Spain, France, Croatia, Italy, Cyprus, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Hungary, Malta, the Netherlands, Austria, Poland, Portugal, Romania, Slovenia, Slovakia, Finland and Sweden) that have delegated part of their sovereignty to common institutions to make decisions democratically, on matters of common interest. The EU is a world power that guarantees trade agreements, supports the economy, promotes EU values, and protects its rights and the environment. The European Funds are financial instruments of the budget of the European Union. These resources are the European Structural and Investment Funds (ESIF) and the Cohesion Fund, managed jointly by the European Commission and EU countries. Both the ESI Funds and the Cohesion Fund are used to carry out the cohesion policy of the European Union, which benefits all regions and cities of the Union and promotes economic growth, job creation, business competitiveness, sustainable development and environmental protection. The European Union and Venezuela relationship is framed in the New Agenda for Relations between the EU and Latin America and the Caribbean, highlighted in the conclusions of the EU-CELAC Summit held in July 2023 in Brussels. This proposes a more modern and solid strategic partnership through a strengthened political dialogue, stimulating trade and investment, and promoting more sustainable, fair, and interconnected societies.

Keywords: European Union, Funds, Agenda 2030 Europe, Sustainable Development

*Prof. Jubilado, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Farmacia, Cátedra de Biología. **Enfermero Perfusionista. Cirugía Cardíaca. Hospital Virgen del Rocío. Sevilla, España. Correspondencia: mrgarrido11@hotmail.com

Orcid: [0000-0001-9662-4405](https://orcid.org/0000-0001-9662-4405)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.1-2.6](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.1-2.6)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 12/06/2024

Aprobación: 19/06/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(1y2): 82-104. 2024

Introducción

Tras la segunda Guerra Mundial y viendo el resultado negativo del impacto de la misma, no sólo en el país perdedor, Alemania, sino en la economía de los países que participaron en la contienda, se formó en 1949 y a instancias de la propia Alemania, Países Bajos, Francia e Italia, el llamado Consejo de Europa (https://es.wikipedia.org/wiki/Uni%C3%B3n_Europea; https://european-union.europa.eu/index_es).

Las industrias del acero y del carbón de Alemania del Oeste, Francia, Bélgica, Luxemburgo y los Países Bajos se unieron y crearon un mercado común de bienes para tratar de estabilizar la economía e imposibilitar que un solo país acaparara el mercado de materiales empleados para hacer la guerra.

Para la reconstrucción y desarrollo de estos países, fue imprescindible el tener en cuenta estos materiales. Además, interesaba controlar e investigar la energía nuclear para el futuro, a fin de obtener beneficios de ella, prever sus posibles efectos negativos y aprovechar los positivos, y sobre la que se tenía bastante que investigar por el respeto que causaba tras la utilización de la bomba atómica en la 2ª Guerra Mundial. Sin embargo, con la creación de centrales nucleares se aprovechaba esta energía y se creaba electricidad (https://es.wikipedia.org/wiki/Uni%C3%B3n_Europea; https://european-union.europa.eu/index_es).

En 1957 se firma el Tratado Constitutivo de la Comunidad Europea (CEE), en el que intervinieron Francia, Alemania, Bélgica e Italia. En 1973, se anexionaron el Reino Unido e Irlanda, y en 1986, se le adhirieron

Portugal y España, ésta última lo hizo una vez modificada su Constitución en 1978.

Tras estas anexiones y transcurridos bastantes años, se les dio paso en 1994 -una vez que ya hubo caído el Muro de Berlín en 1989 y se iniciara una política de democratización y apertura de los países situados tras el Telón de Acero- a algunas de las antiguas Repúblicas Socialistas Soviéticas como Polonia y Eslovenia. Después se incorporaron Rumanía y Bulgaria, y ya en 1995, Austria y Suecia. En 2003 se integra, tras la guerra que dividió la antigua Yugoslavia, Croacia, quedando fuera Noruega y Suiza.

La Unión Europea (UE) la forman actualmente 27 países y a esta fecha son candidatos: Macedonia, Islandia, Montenegro, Serbia y Turquía y recientemente, Ucrania (https://es.wikipedia.org/wiki/Uni%C3%B3n_Europea; https://european-union.europa.eu/index_es).

CARACTERÍSTICAS Y OBJETIVOS DEL TRATADO DE CONSTITUCIÓN DE LA CEE

El Tratado de Constitución de la CEE consta de 6 Títulos, y la principal característica de la UE con respecto a otras potencias es la Defensa de los Derechos Humanos, y su regla fundamental, el conseguir el equilibrio constitucional entre sus países.

Actualmente, la Presidencia de la Comunidad la ostenta la alemana Úrsula von der Leyen, política y médica, perteneciente al Grupo del Partido Popular Europeo (https://es.wikipedia.org/wiki/Uni%C3%B3n_Europea; https://european-union.europa.eu/index_es).

DENOMINACIÓN DE LA UNIÓN COMO COMUNIDAD ECONÓMICA EUROPEA

Se acordó la denominación de la Unión como Comunidad Económica Europea en el Tratado de Maastricht en 1992, y en el mismo se decidió que el poder legislativo lo ostentase el Parlamento, y que el poder político lo llevase a cabo el Consejo Europeo, máximo organismo de la Comunidad. Después, y una vez desarrollado todo el proceso de formación y del comienzo de la actividad de dichos organismos, se firmaron: en 1997, el Tratado de Ámsterdam; en 2000 el de Niza; y en 2007 el de Lisboa, en el que se unificó y promulgó lo que hoy llamamos Legislación Europea.

La principal finalidad de la UE consiste en contribuir a la paz, seguridad y desarrollo sostenible del planeta, contribuir a la solidaridad y respeto mutuo entre los pueblos, conseguir un comercio libre y justo, erradicar la pobreza y proteger los derechos humanos y observar un estricto respeto al Derecho Internacional (https://es.wikipedia.org/wiki/Uni%C3%B3n_Europea; https://european-union.europa.eu/index_es).

DATOS DE LA UE

Población, Superficie y otros datos

Con una superficie de la CEE de unos 4.272 Km², la población actual de la UE es de 447,7 millones de personas. En 2020, Alemania lideraba el ranking de los países más poblados de la UE con más de 83 millones de habitantes; seguido de Francia con una población de 67,8 millones de habitantes. Les sigue Italia con 58 millones y España con 47,5 aproximadamente. Detrás de éstos Polonia, Rumanía, Países Bajos,

Bélgica, Grecia, Chequia, Suecia, Portugal y Hungría (Figuras 1 y 2). (https://es.wikipedia.org/wiki/Uni%C3%B3n_Europea; https://europeanunion.europa.eu/index_es).

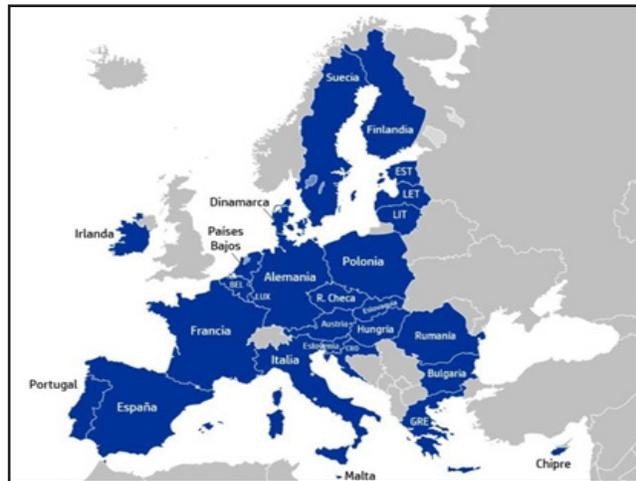


Figura 1. Mapa de la Unión Europea

| | |
|---------------------------|---|
| <u>Capital</u> | Bruselas (de <u>facto</u>) ^a |
| <u>Ciudad más poblada</u> | <u>Berlín</u> |
| <u>Idiomas oficiales</u> | <u>24</u> |
| Tipo | Unión supranacional |
| Presidentes: | |
| • <u>Consejo Europeo</u> | <u>Charles Michel</u> |
| • <u>Comisión</u> | <u>Ursula von der Leyen</u> |
| • <u>Parlamento</u> | <u>Roberta Metsola</u> |
| • <u>Consejo de la UE</u> | Presidencia Checa, próxima presidencia española |
| Fundación | |
| <u>Tratados:</u> | |
| • <u>París</u> | 18 de abril de 1951 |
| • <u>Roma</u> | 25 de marzo de 1957 |
| • <u>Bruselas</u> | 1 de julio de 1967 |
| • <u>Acta Única</u> | 1 de julio de 1987 |
| • <u>Maastricht</u> | 1 de noviembre de 1993 |
| • <u>Ámsterdam</u> | 1 de mayo de 1999 |
| • <u>Niza</u> | 1 de febrero de 2003 |
| • <u>Lisboa</u> | 1 de diciembre de 2009 |
| <u>Estados miembros</u> | <u>27</u> |

| | |
|-------------------------------|--|
| Candidatos oficiales | 8:00 |
| Candidatos potenciales | 2:00 |
| Superficie | |
| - Total | 4 237 473 km ² |
| Población | Puesto 3.º |
| - Total | 446 824 564 hab. (2019) |
| - Densidad | n/d |
| PIB (nominal) | Puesto 3.º |
| - Total (2022) | US\$16,813 billones ³ |
| - Per cápita | US\$37,180 |
| PIB (PPA) | Puesto 3.º |
| - Total (2022) | US\$24,049 billones ³ |
| - Per cápita | US\$53,960 |
| IDH (2020) | 0,896 ⁴ (27.º) – Muy alto |
| Moneda | Euro (€, EUR) ⁵ |
| Gentilicio | Europeo, -a |
| Huso horario | UTC-4:00 a UTC+4:00 (Europa continental: UTC-1:00 a UTC+3:00) |
| Dominio Internet | .eu |
| Sitio web | europea.eu |
| Miembro de: | OMC, G-7, G-20, OCDE, BERD |

Figura 2. Datos de la Unión Europea

↑ Otras instituciones europeas tienen su sede en Estrasburgo, Fráncfort del Meno y Luxemburgo (https://european-union.europa.eu/index_es)

↑ El euro es la moneda de las instituciones de la Unión, aunque algunos de los Estados conservan su moneda nacional

Símbolos de la Unión Europea

- El Himno Europeo. Es la Oda a la Alegría, basada en la 9ª Sinfonía de Beethoven, compuesta en 1823, que pasó a ser himno oficial en 1985.
- La bandera, que simboliza tanto a la Unión Europea, como a la identidad y a la unidad de la misma.
- El Día de Europa, en el que cada 9 de mayo se celebra la paz y la unidad de Europa.

El lema de la UE

Unidad en la diversidad (en latín, *In varietate concordia*), que se utilizó por

vez primera en 2020 y se refiere a la forma en la que los europeos se han unido para trabajar por la paz y la prosperidad, beneficiándose de la gran diversidad de culturas, tradiciones y lenguas del continente y todo ello respetando la idiosincrasia de cada país incorporado, y atendiendo a formar una legislatura que amparase los respectivos derechos y deberes de los países miembros. (https://es.wikipedia.org/wiki/Unión_Europea; https://european-union.europa.eu/index_es).

Instituciones de la UE (https://european-union.europa.eu/institutions-law-budget/budget/revenue_es) (Figura 3)

- Parlamento europeo.
- Consejo europeo.
- Consejo de la UE.
- Comisión Europea.
- Tribunal de Justicia de la UE (TJUE).
- Banco Central Europeo (BCE).
- Tribunal de Cuentas.
- Servicio Europeo de Acción Exterior.
- Comité Económico y Social.
- Comité Europeo de las Regiones.
- Banco Europeo de Inversiones.
- Defensor del Pueblo Europeo.
- Supervisor Europeo de Protección de Datos.
- Oficina Europea de Selección de Personal.
- Oficina de Publicaciones de la UE.
- Agencias varias.

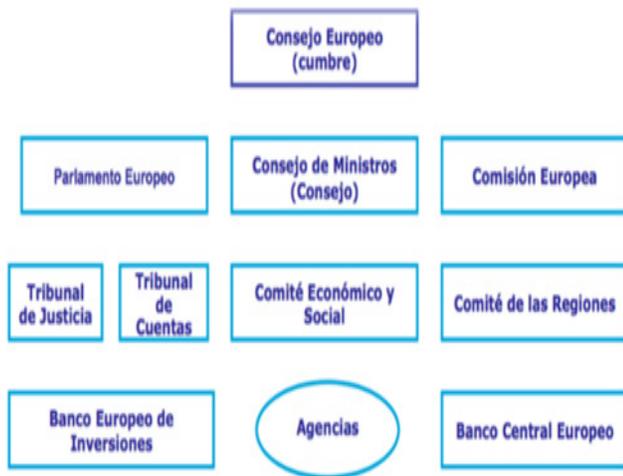


Figura 3. Instituciones de la Unión Europea

EL BREXIT

La palabra deriva de BRITAIN (Gran Bretaña), más EXIT o salida. Tras las elecciones de Diciembre de 2019, el Parlamento Británico ratificó el Acuerdo de Retirada en 2020. El Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte dejó de ser Estado miembro de la UE y de la Comunidad Europea de la Energía Atómica y pasó a tener la consideración de tercer estado el 31 de enero de 2020, abandonándose la CEE el 31 de Enero del mismo año y haciéndose efectivo al día siguiente. Este suceso ha influido en toda la economía europea, sobre todo en la británica. Las consecuencias de ello han alterado profundamente la economía inglesa (https://es.wikipedia.org/wiki/Unión_Europea; <https://www.exteriores.gob.es/es/PoliticaExterior/Paginas/Brexit>).

Así, en principio el país ha de sortear la burocracia existente para la promoción y expansión de su industria, se han de resolver determinados problemas en el ámbito educativo con respecto al Programa Erasmus y atender al cambio para el uso de datos móviles fuera de sus límites nacionales.

Las posibles ventajas: la posibilidad de mantener aún buena relación comercial con Europa, promoviendo el comercio nacional, la actividad y crecimiento económico, con unos lazos fuertes basados en la posibilidad de Acuerdos.

REFUNDACIÓN DE LA UNIÓN: PANDEMIA E INVASIÓN RUSA DE UCRAINA

Recientemente, la UE busca la reforma institucional y la readaptación de sus políticas. Iniciado en 2017 e impulsado principalmente por la Comisión Europea (CE) y el denominado eje franco-alemán, refleja la voluntad de aumentar la capacidad geopolítica, la autonomía estratégica y la soberanía de la Unión. El presidente Macron utilizó las palabras «relanzamiento, pertenencia» para definir los ejes de trabajo durante la «presidencia francesa del Consejo de la UE en 2022, un momento clave en el desarrollo del proyecto. La UE inicia su 'refundación' de la mano de los ciudadanos: "Este es nuestro tiempo, es el momento de dar respuestas" (<https://www.europaciudadana.org/300-intelectuales-piden-la-refundacion-de-la-union-europea/>).

La tensión diplomática entre Rusia y la UE y la intensificación de la rivalidad entre China y Estados Unidos, propició que la UE debatiera la noción de *autonomía estratégica*, a fin de defender su soberanía y promover sus intereses de manera independiente, no solo vinculada a la defensa sino considerando que a nivel internacional las capacidades económicas y tecnológicas han ganado relevancia. La «pérdida de confianza» en la relación bilateral estadounidense y la UE y las nuevas relaciones euro británicas, tras el

referéndum y posterior salida del Reino Unido de la UE en 2020, han chocado con algunos intereses de la UE.

Sin embargo, han sido dos los principales catalizadores que desde 2020 impulsan una serie de cambios de considerable magnitud en el bloque comunitario: la crisis de la pandemia de la COVID-19 y la situación de la Unión tras la invasión rusa de Ucrania. Ambas crisis pusieron en evidencia la dependencia exterior de la Unión para abastecerse de productos y materias primas de carácter estratégico. Ello, unido al creciente proteccionismo de competidores clave como China y Estados Unidos, potenció la adopción de medidas comunitarias que buscan la reindustrialización al interior de la UE.

El 9 de mayo de 2022, Día de Europa, los líderes de las instituciones europeas recibieron las conclusiones de la Conferencia sobre el Futuro de Europa (CoFoE), en las que los ciudadanos pedían más Europa para encarar el porvenir. El 27 de mayo de 2020 Úrsula von der Leyen presentó el programa *Next Generation EU*.

¿CÓMO SE FINANCIA LA UE?

Su financiación se lleva a cabo mediante:

- Recursos propios (derechos aduaneros por importaciones).
- Otros recursos propios, como el IVA o Impuesto sobre el Valor Añadido. A cada miembro le corresponde un 0,3% de su base de IVA.
- Y otros basados en la RNB (Renta Nacional Bruta), de la que cada estado transfiere un porcentaje de la misma a la UE.

Actualmente hay países, a los que se les ha proporcionado más dinero que el que han devuelto, contrayendo así una deuda importante que, sin duda, afectará a sus próximos presupuestos si en un futuro no la redujeran, o difícilmente la anularan (https://european-union.europa.eu/institutions-law-budget/budget/revenue_es).

Para financiar *Next Generation EU*, la Comisión Europea, en nombre de la Unión Europea, obtiene préstamos en los mercados a costes más favorables que la mayoría de los estados miembros y redistribuye los importes (<https://www.fondoseuropeos.hacienda.gob.es/sitios/dgpmrr/es-es/Paginas/Inicio.aspx>; European regional policy 2014.svg - Wikipedia, la enciclopedia libre, <https://www.consilium.europa.eu/es/infographics/20201006-recovery-resilience-rrf/>; commission.europa.eu/strategy-and-policy/recovery-plan-europe.es; <https://www.bing.com/search?q=que+son+las+AGENDA+S+de+la+UE>).

Antes de *Next Generation EU*, la Comisión Europea ya emitía bonos, por ejemplo, para financiar préstamos a los Estados miembros de la UE y a terceros países, entre ellos hasta 100 000 millones de euros para el programa SURE destinados a apoyar el empleo y mantener a los trabajadores en sus puestos de trabajo durante la pandemia de la COVID-19. La Unión Europea recaudará hasta unos 800 000 millones de euros a precios corrientes de aquí a 2026 para *Next Generation EU* a través de una estrategia de financiación diversificada ([librehttps://www.consilium.europa.eu/es/infographics/20201006-recovery-resilience-rrf/](https://www.consilium.europa.eu/es/infographics/20201006-recovery-resilience-rrf/); commission.europa.eu/strategy-and-policy/recovery-plan-europe.es; <https://www.bing.com/search?q=que+son+las+AGENDAS+de+la+UE>).

AGENDAS DE LA UNIÓN EUROPEA: Cómo Financia la UE a sus estados miembros

Origen

Las Agendas de la Unión Europea (UE) tienen su origen en un proceso histórico que se remonta a los pioneros visionarios, abogados, parlamentarios y sociedad civil, que compartían ideales de una Europa pacífica, unida y próspera. Estos pioneros, sentaron las bases para la creación de la UE tal como la conocemos hoy.

Para comprender mejor este proceso, echemos un vistazo a la cronología de la evolución de la UE a lo largo de las décadas (https://european-union.europa.eu/principles-countries-history/history-eu_es; <https://ec.europa.eu/social/main.jsp?catId=1606&langId=es>).

1. 1945-59: Paz en Europa y comienzos de la cooperación

La cooperación en Europa después de la Segunda Guerra Mundial condujo a la creación de la Comunidad Europea del Carbón y del Acero y la firma de los Tratados de Roma, que establecieron las bases para la integración europea y dieron origen al Parlamento Europeo.

2. 1960-69: Los “vibrantes 60”

Etapa de crecimiento económico e inicios de la cooperación internacional.

3. 1970-79: Una Comunidad en crecimiento

Adhesión de los primeros nuevos miembros: Dinamarca, Irlanda y el Reino Unido. Se llevaron a cabo las primeras elecciones europeas. Se implementó una política regional para impulsar las zonas más pobres.

4. 1980-89: El rostro cambiante de Europa

Caída del comunismo, expansión de la UE, introducción del programa Erasmus e inicio del mercado único.

5. 1990-99: Una Europa sin fronteras

Mayor expansión de la UE, implementación del mercado único, la circulación sin fronteras y la introducción del euro.

6. 2000-09: Expansión

Admisión de 12 nuevos países, el euro se convirtió en moneda de curso legal y se firmó el Tratado de Lisboa.

7. 2010-19: Una década delicada

Respuesta a la crisis financiera del 2008, la adhesión de Croacia a la UE y el voto del Reino Unido para abandonar la UE marcaron esta década.

8. 2020 - hoy: Una UE unida y resiliente

La UE ha enfrentado retos sin precedentes, como la pandemia de la COVID-19, la guerra de agresión de Rusia contra Ucrania y la lucha contra el cambio climático. La Unión Europea quiere hacer de Europa un lugar más justo, inclusivo y lleno de oportunidades para todos.

En resumen, las Agendas de la UE se han desarrollado a lo largo de décadas de cooperación, expansión y adaptación a los desafíos cambiantes del mundo. Las Agendas Europeas se basan en los 20 principios del Pilar Europeo de Derechos Sociales. Estas partes han sido acordadas por los 27 países de la Unión Europea (<https://www.mdsocialesa2030.gob.es/derechos->

sociales/inclusion/marco-ue.htm; https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/recovery-plan-europe_en).

Principios del Pilar Europeo de Derechos Sociales

1. Educación, formación y aprendizaje permanente

Toda persona tiene derecho a una educación, una formación y un aprendizaje permanente inclusivos y de calidad que les permitan participar plenamente en la sociedad y gestionar con éxito las transiciones en el mercado laboral.

2. Igualdad de trato entre mujeres y hombres

Debe garantizarse y fomentarse la igualdad de trato y de oportunidades entre mujeres y hombres en todos los ámbitos, incluida la participación en el mercado laboral, los términos y condiciones de empleo y la progresión profesional.

3. Igualdad de oportunidades

Independientemente de su género, origen racial o étnico, religión o creencias, discapacidad, edad u orientación sexual, toda persona tiene derecho a la igualdad de trato y de oportunidades en materia de empleo, protección social, educación y acceso a bienes y servicios disponibles para el público. Se fomentará la igualdad de oportunidades de los grupos infrarrepresentados.

4. Apoyo activo para el empleo

Toda persona tiene derecho a recibir asistencia personalizada y oportuna a fin de mejorar sus perspectivas de empleo o de trabajar por cuenta propia. Esto incluye recibir ayuda para la búsqueda de empleo, la

formación y el reciclaje. Toda persona tiene derecho a la transferencia de la protección social y el derecho a la formación durante las transiciones profesionales.

Los jóvenes tienen derecho a educación continua, una formación como aprendices, un período de prácticas o una oferta de empleo de buena calidad en los cuatro meses siguientes a quedar desempleados o finalizar los estudios. Las personas desempleadas tienen derecho a recibir una ayuda personalizada, continuada y adecuada. Los desempleados de larga duración tienen derecho a una evaluación individual detallada a más tardar a los dieciocho meses de desempleo.

5. Empleo seguro y adaptable

Los trabajadores tienen derecho a un trato justo e igualitario en cuanto a las condiciones de trabajo, el acceso a la protección social y la formación. Se fomentará la transición hacia formas de empleo indefinidas. Se garantizará la flexibilidad necesaria para que los empresarios se adapten rápidamente a los cambios del contexto económico.

Se fomentarán formas de trabajo innovadoras que garanticen unas condiciones laborales de calidad. Se fomentará el espíritu empresarial y el trabajo por cuenta propia. Se facilitará la movilidad profesional. Se prohibirá el abuso de contratos atípicos. Cualquier período de prueba debe tener una duración razonable.

6. Salarios

Los trabajadores tienen derecho a salarios justos que les proporcionen un nivel de vida digno, con salarios mínimos adecuados, que prevea las necesidades del trabajador y de su familia a la luz de las condiciones económicas y sociales

nacionales, salvaguardando al mismo tiempo el acceso al empleo y los incentivos para buscar trabajo. Todos los salarios se fijarán de forma transparente y predecible según las prácticas nacionales y respetando la autonomía de los interlocutores sociales.

7. Información sobre las condiciones de trabajo y la protección en caso de despido

Los trabajadores tienen derecho a ser informados sobre sus derechos y obligaciones derivados de la relación laboral, incluso en período de prueba. Antes de proceder a un despido, los trabajadores deberán ser informados de los motivos de éste y a que se les conceda un plazo razonable de preaviso. Tienen derecho a acceder a una resolución de litigios efectiva e imparcial y, en caso de despido injustificado, tienen derecho a reparación, incluida una indemnización adecuada.

8. Diálogo social y participación de los trabajadores

Se consultará a los interlocutores sociales sobre el diseño y la aplicación de políticas sociales, económicas y de empleo, de acuerdo con las prácticas nacionales. Deberán negociar convenios colectivos en asuntos de su incumbencia, respetando su autonomía y su derecho a la acción colectiva.

Los trabajadores o sus representantes tienen derecho a ser informados y consultados oportunamente sobre asuntos de interés para ellos, en particular sobre la transferencia, reestructuración y fusión de empresas y sobre despidos colectivos.

9. Equilibrio entre vida profesional y vida privada

Los padres y las personas con responsabilidades asistenciales tienen

derecho a los permisos adecuados, a unas condiciones de trabajo flexibles y a servicios de asistencia. Las mujeres y los hombres deberán tener igualdad de acceso a permisos especiales para cumplir con sus responsabilidades asistenciales y deberá animárseles a utilizarlos de forma equilibrada.

10. Entorno de trabajo saludable, seguro y adaptado y protección de datos

Los trabajadores tienen derecho a un elevado nivel de protección de la salud y la seguridad en el trabajo, con un entorno de trabajo adaptado a sus necesidades profesionales y que les permita prolongar su participación en el mercado laboral. Los trabajadores tienen derecho a la protección de sus datos personales en el contexto del empleo.

11. Cuidado infantil y apoyo a los niños

Los niños tienen derecho a una educación infantil asequible, a cuidados de buena calidad, y derecho a protección contra la pobreza. Los niños de entornos desfavorecidos tienen derecho a medidas específicas para mejorar la igualdad de oportunidades.

12. Protección social

Independientemente del tipo y duración de su relación laboral, los trabajadores y, en condiciones comparables, los trabajadores por cuenta propia tienen derecho a una protección social adecuada.

13. Prestaciones de desempleo

Los desempleados tienen derecho a un apoyo de los servicios públicos de empleo para (re)integrarse en el mercado laboral y a prestaciones de desempleo adecuadas y de duración razonable, de conformidad con

sus cotizaciones y las normas nacionales de elegibilidad. Dichos beneficios no constituirán un desincentivo para un rápido retorno al empleo.

14. Ingreso mínimo

Toda persona que carezca de recursos suficientes tiene derecho a prestaciones de ingresos mínimos adecuados que garanticen una vida digna en todas las etapas de la vida y un acceso efectivo a bienes y servicios propicios. Para quienes pueden trabajar, los beneficios de ingresos mínimos deberían combinarse con incentivos para (re)integrarse al mercado laboral.

15. Ingresos y pensiones de vejez

Los trabajadores y autónomos jubilados tienen derecho a una pensión proporcional a sus aportaciones y que les asegure unos ingresos adecuados, con igualdad de derechos entre mujeres y hombres.

16. Atención médica

Toda persona tiene derecho a un acceso oportuno a una atención sanitaria asequible, preventiva y curativa de buena calidad.

17. Inclusión de personas con discapacidad

Las personas con discapacidad tienen derecho a un apoyo a los ingresos que les garantice una vida digna, servicios que les permitan participar en el mercado laboral y en la sociedad, y un entorno de trabajo adaptado a sus necesidades.

18. Cuidados a largo plazo

Toda persona tiene derecho a servicios de atención a largo plazo asequibles y de buena calidad, en particular atención domiciliaria y servicios comunitarios.

19. Vivienda y asistencia a las personas sin hogar

Se facilitará a quienes lo necesiten acceso a viviendas sociales o a ayudas de vivienda de buena calidad. Las personas vulnerables tienen derecho a asistencia y protección adecuadas contra los desalojos forzosos. Se proporcionará alojamiento y servicios adecuados a las personas sin hogar para promover su inclusión social.

20. Acceso a servicios esenciales

Toda persona tiene derecho a acceder a servicios esenciales de buena calidad, incluidos el agua, el saneamiento, la energía, el transporte, los servicios financieros y las comunicaciones digitales. El apoyo para el acceso a dichos servicios estará disponible para quienes lo necesiten.

AGENDA 2030 EUROPA Y LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE

En los últimos años se ha construido un importante consenso a nivel internacional sobre cómo reducir la pobreza en el mundo, basado en la Declaración del Milenio, fruto de la Cumbre del Milenio celebrada en el 2000, en la que los dirigentes mundiales se comprometieron a unir sus fuerzas para lograr que para el 2015 o antes se cumplieren 8 objetivos y 18 metas para avanzar en la reducción de la pobreza en el mundo (https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/recovery-plan-europe_en; <https://www.bing.com/search?q=La+Agenda+2030+de+los+Objetivos+de+Desarrollo+Sostenible+>).

Posteriormente, el 11 de septiembre de 2012, la Asamblea General de Naciones Unidas dio carta oficial a la necesidad

de definir una Agenda Internacional de Desarrollo y unos Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) (<https://www.bing.com/search?q=La+Agenda+2030+de+los+Objetivos+de+Desarrollo+Sostenible+>).

El 25 de septiembre de 2015, los 193 Estados que conforman la ONU aprobaron formalmente en la Asamblea General de Naciones Unidas en Nueva York, La Agenda 2030 de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) también conocida como Agenda, es el marco político internacional que los Estados miembros de Naciones Unidas han asumido como hoja de ruta para la sostenibilidad de la vida de las personas y tiene como objetivo abordar los desafíos globales que enfrentamos día a día. Incluye 17 objetivos, desagregados en 169 metas, entre cuyos fines está acabar con la pobreza, garantizar la educación, proteger el medio ambiente, combatir el cambio climático y lograr la equidad de género y el empoderamiento de las mujeres (<https://www.bing.com/search?q=La+Agenda+2030+de+los+Objetivos+de+Desarrollo+Sostenible+>).

La Agenda 2030 es un plan de acción a favor de las personas, el planeta y la prosperidad, que también tiene la intención de fortalecer la paz universal y el acceso a la justicia, tiene como objetivos erradicar la pobreza extrema y el hambre, combatir la desigualdad y el cambio climático, asegurar la igualdad de género y los derechos humanos de las mujeres y garantizar el acceso universal a servicios de salud y educación de calidad, entre otros. Estos objetivos se interrelacionan entre sí y abarcan áreas como la pobreza, la desigualdad, el cambio climático, la prosperidad, la paz y la justicia (Figura 4) (<https://www.bing.com/search?q=La+Agenda+2030+de+los+>



Figura 4. Objetivos de Desarrollo Sostenible

[Objetivos+de+Desarrollo+Sostenible+](https://www.bing.com/search?q=Objetivos+de+Desarrollo+Sostenible+)).

Se presentan los 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) que guían esta hoja de ruta hacia un mundo más sostenible (<https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/sustainable-development-goals/>):

1. **Fin de la pobreza:** promover la igualdad, fomentar un crecimiento económico inclusivo con empleos sostenibles.
2. **Hambre cero:** El sector alimentario y agrícola son vitales para eliminar el hambre y la pobreza.
3. **Salud y bienestar:** Garantizar una vida saludable y promover el bienestar universal.
4. **Educación de calidad:** fundamental para mejorar nuestras vidas y lograr el desarrollo sostenible.
5. **Igualdad de género:** esencial para un mundo pacífico, próspero y sostenible.
6. **Agua limpia y saneamiento:** Acceso al agua sin impurezas para todos.

- 7. Energía asequible y no contaminante:** necesaria para enfrentar los desafíos actuales. La biodiversidad y los ecosistemas terrestres, un uso sostenible de la tierra y los recursos naturales.
- 8. Trabajo decente y crecimiento económico:** Evitar el progreso lento y desigual y revisar políticas económicas y sociales para erradicar la pobreza.
- 9. Industria, innovación e infraestructuras:** Las inversiones en infraestructura son fundamentales para el desarrollo sostenible.
- 10. Reducción de las desigualdades:** Reducir la desigualdad dentro y entre los países.
- 11. Ciudades y comunidades sostenibles:** Las inversiones en infraestructura son cruciales para lograr el desarrollo sostenible.
- 12. Producción y consumo responsables:** Promoción de prácticas sostenibles en la producción y el consumo de bienes y servicios. Busca reducir el desperdicio, fomentar la eficiencia en el uso de recursos y garantizar que nuestras acciones no agoten los recursos naturales.
- 13. Acción por el clima:** El cambio climático es uno de los mayores desafíos que enfrentamos. Este objetivo busca reducir las emisiones de gases de efecto invernadero y fortalecer la resiliencia climática.
- 14. Vida submarina:** Se enfoca en conservar océanos y ecosistemas marinos y utilizar de manera sostenible los recursos marinos y costeros.
- 15. Vida de ecosistemas terrestres:** Busca proteger, restaurar y promover
- 16. Paz, justicia e instituciones sólidas:** La paz, la justicia y las instituciones efectivas son pilares para el desarrollo sostenible. Se centra en promover sociedades pacíficas, inclusivas y justas, y en fortalecer el acceso a la justicia y la rendición de cuentas.
- 17. Alianzas para lograr los objetivos:** Este objetivo busca fortalecer las alianzas entre gobiernos, sociedad civil, sector privado y otros actores para abordar los desafíos globales y lograr un mundo más sostenible y equitativo.

POLÍTICA DE COHESIÓN, EL MARCO FINANCIERO PLURIANUAL 2021-2027 Y FONDOS EUROPEOS

La Política de Cohesión de la Unión Europea es la principal política de inversión de la Unión Europea. Su objetivo es corregir los desequilibrios entre los diferentes países y regiones, contribuir a reforzar la cohesión económica, social y territorial de la Unión Europea y cumplir las prioridades políticas de la Unión, especialmente la transición ecológica y digital.

La política de cohesión se dirige a todas las regiones y ciudades de la Unión Europea con el fin de apoyar la creación de empleo, la competitividad de las empresas, el crecimiento económico, el desarrollo sostenible y la mejora de la calidad de vida de los ciudadanos para lo cual se han reservado 392 000 millones de EUR, casi un tercio del presupuesto total de la UE

para la política de cohesión para el período 2021-2027.

El marco de la política de cohesión se establece para un periodo de 7 años y se ejecuta, principalmente, a través de FONDOS (<https://www.consilium.europa.eu/es/policies/the-eu-budget/long-term-eu-budget-2021-2027/>; <https://femp-fondos-europa.es/fondos-europeos-2021-2027/el-marco-financiero-plurianual-2021-2027-y-la-politica-de-cohesion/>; <https://es.fi-group.com/novedades-europeas-diciembre/>; <https://es.fi-group.com/recurso/marco-financiero-plurianual-2021-2027-y-next-generation/>).

Para la programación 2021-2027, la estrategia y los recursos de la Política de Cohesión se organizan alrededor de cinco objetivos prioritarios, a saber:

- Una Europa más competitiva e inteligente, promoviendo una transformación económica innovadora y una conectividad regional a las tecnologías de la información y de las comunicaciones.
 - Una Europa más verde, baja en carbono, en transición hacia una economía climáticamente neutra y resiliente, promoviendo una transición energética limpia y justa, la inversión verde y azul, la economía circular, la mitigación y adaptación al cambio climático, la prevención y gestión de riesgos y la movilidad urbana sostenible.
 - Una Europa más conectada, mejorando la movilidad.
 - Una Europa más social e intuitiva, por medio de la aplicación del Pilar Europeo de Derechos Sociales.
- Una Europa más cercana a los ciudadanos, fomentando el desarrollo integrado y sostenible de todo tipo de territorios e iniciativas sociales.

Tras la aprobación del Parlamento Europeo, el 17 de diciembre de 2020 el Consejo de la UE adoptó el Reglamento por el que se establece el Marco Financiero Plurianual (MFP) de la UE para el periodo 2021-2027. El Reglamento prevé un presupuesto de la UE a largo plazo de 1,0743 billones de euros para la EU-27 a precios de 2018, en el que se ha integrado el Fondo Europeo de Desarrollo (<https://es.fi-group.com/recurso/marco-financiero-plurianual-2021-2027-y-next-generation/>; <https://procesa.es/fondos-estructurales-de-la-union-europea/>; <https://commission.europa.eu/funding-tenders/find-funding/funding-management-mode/2014-2020-european-structural-and-investment-funds.es>).

El Marco Financiero Plurianual tiene entre sus principales programas:

- La Política de Cohesión
- La Política Agrícola PAC y
- Las Prioridades Nuevas y Reforzadas (incluyen Fondo Horizonte Europa, Instrumento de Vecindad, Desarrollo y Cooperación Internacional y el «Mecanismo Conectar Europa», entre otras (<https://commission.europa.eu/funding-tenders/find-funding/funding-management-mode/2014-2020-european-structural-and-investment-funds.es>; <https://femp-fondos-europa.es/fondos-europeos-ng-eu/fondos-next-generation-eu-ng-eu/>; <https://www.fondoseuropeos.hacienda.gob.es/sitios/dgfc/esES/paginas/femp.aspx>).

La política de cohesión se lleva a cabo a través de fondos específicos

Existen muchas modalidades de Fondos. En primer lugar, el país que quiere conseguir las subvenciones hace una propuesta incorporando los proyectos que quiere llevar a cabo, y esta documentación se eleva al Parlamento. Luego Bruselas acuerda las cantidades a entregar para su desarrollo, que habrán de ser justificadas debidamente por sus destinatarios mediante certificaciones de gasto, teniendo en cuenta que, si el proyecto subvencionado no se lleva a cabo, habrá de devolverse su importe al organismo del que procedieran dichos fondos (https://es.wikipedia.org/wiki/Uni%C3%B3n_Europea; <https://procesa.es/fondos-estructurales-de-la-union-europea/>; <https://commission.europa.eu/funding-tenders/find-funding/funding-management-mode/2014-2020-european-structural-and-investment-funds.es>; <https://femp-fondos-europa.es/fondos-europeos-ng-eu/> [fondos-next-generation-eu-ng-eu/](https://www.fondoseuropeos.hacienda.gob.es/sitios/dgfc/esES/paginas/femp.aspx); <https://www.fondoseuropeos.hacienda.gob.es/sitios/dgfc/esES/paginas/femp.aspx>).

Más de la mitad de los fondos de la UE se canalizan a través de los Fondos Estructurales y están gestionados conjuntamente por la Comisión Europea y por los distintos países de la UE. Se destinan a invertir en la creación de empleo y en una economía y medio ambiente sostenibles y sanos (<https://procesa.es/fondos-estructurales-de-la-union-europea/>; <https://commission.europa.eu/funding-tenders/find-funding/funding-management-mode/2014-2020-european-structural-and-investment-funds.es>; <https://femp-fondos-europa.es/fondos-europeos-ng-eu/> [fondos-next-generation-eu-ng-eu/](https://www.fondoseuropeos.hacienda.gob.es/sitios/dgfc/esES/paginas/femp.aspx); <https://www.fondoseuropeos.hacienda.gob.es/sitios/dgfc/esES/paginas/femp.aspx>).

Los Fondos atienden a 5 sectores con preferencia:

- Investigación e Innovación.
- Tecnologías Digitales.
- Economía hipo carbónica.
- Gestión sostenible de recursos naturales.
- Creación y gestión de PYMES.

Y financian proyectos de transporte y medio ambiente en países cuya renta nacional bruta (RNB) per cápita sea menor que el 90% de la media de la UE.

Los países financiados por el Fondo de Cohesión en 2020 eran Bulgaria, Chequia, Chipre, Croacia, Eslovenia, Estonia, Grecia, Hungría, Letonia, Lituania, Malta, Polonia, Portugal y Rumanía (<https://commission.europa.eu/funding-tenders/find-funding/funding-management-mode/2014-2020-european-structural-and-investment-funds.es>),

Los fondos del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)

El Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) es uno de los principales instrumentos financieros de la política de cohesión europea. Su objetivo es contribuir a reducir las diferencias entre los niveles de desarrollo de las regiones europeas y mejorar el nivel de vida en las regiones menos favorecidas. Se presta especial atención a las regiones que sufren desventajas naturales o demográficas graves y permanentes, como las regiones más septentrionales, que tienen una escasa densidad de población, y las regiones insulares, transfronterizas y montañosas, fomentan el desarrollo equilibrado de las

distintas regiones de la UE (ayudas para construcción de infraestructuras, carreteras, etc., y otros) (<https://procesa.es/fondos-estructurales-de-la-union-europea/>; <https://commission.europa.eu/funding-tenders/find-funding/funding-management-mode/2014-2020-european-structural-and-investment-funds.es>; <https://femp-fondos-europa.es/fondos-europeos-ng-eu/fondos-next-generation-eu-ng-eu/>; <https://www.fondoseuropeos.hacienda.gob.es/sitios/dgfc/esES/paginas/femp.aspx>; <https://www.europarl.europa.eu/factsheets/es/sheet/95/el-fondo-europeo-de-desarrollo-regional-feder>; <https://www.redpoliticaside.es/es/ambitos/fondo-europeo-de-desarrollo-regional-feder>).

Fondo Social Europeo (FSE), ahora FSE+

La educación es la principal vía para un mejor acceso al mercado de trabajo y el empleo es el principal vector de integración social y de mejora de calidad de vida. Por ello, el Fondo Social Europeo (2014-2020) facilitó el acceso a los estudios, e invirtió en el desarrollo del potencial humano para luchar contra el abandono escolar incentivando a las empresas para proporcionar empleo estable y de calidad para toda la ciudadanía en igualdad de oportunidades y condiciones (<https://commission.europa.eu/funding-tenders/find-funding/funding-management-mode/2014-2020-european-structural-and-investment-funds.es>; <https://www.fondos-europeos.hacienda.gob.es/sitios/dgfc/esES/paginas/femp.aspx>; <https://www.europarl.europa.eu/factsheets/es/sheet/95/el-fondo-europeo-de-desarrollo-regional-feder>; <https://www.redpoliticaside.es/es/ambitos/fondo-europeo-de-desarrollo-regional-feder>; <https://www.europarl.europa.eu/factsheets/es/sheet/53/el-fondo-social-europeo-plus>).

[el-fondo-social-europeo-plus](https://www.europarl.europa.eu/factsheets/es/sheet/53/el-fondo-social-europeo-plus)).

El Fondo Social Europeo Plus (FSE+) (2021-2027), cuenta con un presupuesto total de casi 99 300 millones de euros para este período. El FSE+ seguirá aportando una importante contribución a la política laboral, social, educativa y de formación de la UE, incluidas las reformas estructurales en estos ámbitos y también será una de las piedras angulares de la recuperación socioeconómica de la UE tras la pandemia de coronavirus. La pandemia ha invertido los aumentos en la participación en el mercado laboral, ha puesto en tela de juicio los sistemas educativos y sanitarios y ha aumentado las desigualdades. El FSE+ será uno de los instrumentos clave de la UE que ofrecerá apoyo a los Estados miembros para hacer frente a estos retos. Como parte de la política de cohesión, el FSE+ también continuará con su misión de respaldar la cohesión económica, territorial y social en la UE, reduciendo las disparidades entre los Estados miembros y las regiones (<https://commission.europa.eu/funding-tenders/find-funding/funding-management-mode/2014-2020-european-structural-and-investment-funds.es>; <https://www.fondoseuropeos.hacienda.gob.es/sitios/dgfc/esES/paginas/femp.aspx>; <https://www.europarl.europa.eu/factsheets/es/sheet/95/el-fondo-europeo-de-desarrollo-regional-feder>; <https://www.redpoliticaside.es/es/ambitos/fondo-europeo-de-desarrollo-regional-feder>; <https://www.europarl.europa.eu/factsheets/es/sheet/53/el-fondo-social-europeo-plus>).

Fondo Europeo Marítimo, de Pesca y de Acuicultura (FEMPA) (2021-2027)

El FEMPA, antes FEMP, persigue ayudar a los pescadores en la transición a la pesca sostenible, ayudar a las comunidades costeras

a diversificar sus economías, financiar proyectos para crear empleo, mejorar la calidad de vida en las costas europeas y facilitar el acceso a la financiación. Gestiona la pesca y la acuicultura, así como asesoramiento científico, controles y comprobaciones, inteligencia de mercado, vigilancia marítima y seguridad (<https://commission.europa.eu/funding-tenders/find-funding/funding-management-mode/2014-2020-european-structural-and-investment-funds.es>; <https://femp-fondos-europa.es/fondos-europeos-ng-eu/fondos-next-generation-eu-ng-eu/>; <https://www.fondoseuropeos.hacienda.gob.es/sitios/dgfc/esES/paginas/femp.aspx>; <https://www.mapa.gob.es/es/pesca/temas/fondos-europeos/fempa/>).

El FEMPA está en línea con la Política Pesquera Común, para gestionar las flotas europeas y conservar las poblaciones de peces, que incluye instalación obligatoria de cámaras de videovigilancia en buques grandes, medidas para disminuir los desechos marinos y una mejor trazabilidad de las capturas a lo largo de toda la cadena, incluidos productos procesados e importaciones (<https://www.mapa.gob.es/es/pesca/temas/fondos-europeos/fempa/>).

• **Apoyo a las comunidades costeras**

El objetivo del nuevo fondo es ayudar a los pescadores cuyas actividades cesaron de forma temporal o permanente debido a la crisis de la COVID-19. Una de las medidas para este fin es apoyar la primera adquisición de buques por parte de jóvenes pescadores menores de 40 años.

• **Mares y océanos sostenibles**

Incluido en el marco del Pacto Verde Europeo. Contempla los compromisos internacionales de la UE para contar con océanos seguros, limpios y gestionados de

forma sostenible. El FEMPA contribuirá a la recolecta de equipos de pesca abandonados y de basura marina para limpiar los mares y océanos. La estrategia europea para los plásticos es una de las siete áreas fundamentales de la Comisión Europea para alcanzar la economía circular en la UE para 2050. Su objetivo es eliminar el uso de microplásticos.

Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural (FEADER)

El Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural (FEADER), segundo pilar de la Política Agraria Común (PAC), financia la contribución de la PAC a los objetivos de desarrollo rural de la Unión Europea:

- a. Mejorar la competitividad de la agricultura
- b. Fomentar la gestión sostenible de los recursos naturales y la acción por el clima
- c. Lograr un desarrollo territorial equilibrado de las economías y comunidades rurales.

Estos objetivos se alcanzan a través de los programas nacionales y regionales de desarrollo rural (PDR), cofinanciados por el FEADER y los presupuestos nacionales de los países de la Unión Europea. El FEADER también proporciona apoyo a la inversión para empresas y proyectos rurales a través de instrumentos financieros, como préstamos, garantías o capital (<https://commission.europa.eu/funding-tenders/find-funding/funding-management-mode/2014-2020-european-structural-and-investment-funds.es>; <https://femp-fondos-europa.es/fondos-europeos-ng-eu/fondos-next-generation-eu-ng-eu/>; <https://www.fondoseuropeos.hacienda.gob.es/sitios/dgfc/esES/>

paginas/femp.aspx; https://agriculture.ec.europa.eu/common-agricultural-policy/rural-development_es).

Fondo Europeo de Transición Justa (FETJ)

El Fondo de Transición Justa es un instrumento financiero en el ámbito de la política de cohesión cuyo objetivo es prestar apoyo a los territorios que se enfrentan a retos socioeconómicos graves derivados del proceso de transición a la neutralidad climática. El conjunto de estos fondos constituye los Fondos Estructurales y de Inversión Europeos (Fondos EIE). Además, cabe mencionar otros fondos como son el Fondo de Asilo, Migración e Integración (FAMI); el Fondo de Seguridad Interior (FSI) y el Instrumento de Apoyo Financiero a la Gestión de Fronteras y la Política de Visados (IGFV) (<https://www.europarl.europa.eu/factsheets/es/sheet/214/fondo-de-transicion-justa>).

La política de cohesión beneficia a todas las regiones de la Unión Europea y el nivel de inversión refleja las necesidades de desarrollo de los Estados miembros. Las regiones se clasifican según su Producto Interior Bruto (PIB) como más desarrolladas, en transición o menos desarrolladas. En función de esta clasificación, los Fondos pueden proporcionar entre un 50% y un 85% de la financiación total de un proyecto. La financiación restante puede proceder de fuentes públicas (nacionales o regionales) o privadas (<https://www.redpoliticaside.es/es/politicas/politicas-europeas/politica-cohesion>).

La Política de Cohesión va evolucionando, por lo tanto, modificándose, principalmente en línea con cada período de programación. Recientemente y tras la pandemia del

COVID-19, se establecen:

Los fondos *Next Generation EU*

El 21 de julio de 2020, los Jefes de Estado y de Gobierno de la Unión Europea acordaron un paquete de ayuda financiera para paliar la grave crisis económica y social ocasionada por la pandemia del COVID-19 y transformar las economías europeas haciéndolas más verdes, digitales y resilientes. Con este objetivo, se diseñó el programa de recuperación de carácter temporal *Next Generation EU* (Figura 5) (https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/recovery-plan-europe_es; https://next-generation-eu.europa.eu/index_es; <https://femp-fondos-europa.es/fondos-europeos-ng-eu/fondos-next-generation-eu-ng-eu/>; <https://nexteugeneration.com/info-next-generation-eu/>; <https://www.hacienda.gob.es/es-ES/CDI/Paginas/FondosEuropeos/Fondos-relacionados-COVID/Next-Generation.aspx>).

El mayor paquete de estímulo jamás financiado: El presupuesto a largo plazo de la UE y *Next Generation EU*, el instrumento temporal concebido para impulsar la recuperación, constituyen el mayor paquete de estímulo jamás financiado en Europa. Un total de 2,018 billones de euros a precios corrientes (1.8 billones de euros a precios de 2018), están ayudando a reconstruir la Europa posterior a la COVID-19. Los fondos se utilizan para hacer frente a los retos más importantes a los que se afronta Europa y apoyar a las personas que lo necesiten. Tras la agresión de Rusia contra Ucrania, se movilizó el presupuesto de la UE para proporcionar ayuda de emergencia y apoyo tanto en Ucrania como en los países de la UE, así como para aliviar las consecuencias humanitarias de la guerra (<https://www.consilium.europa.eu/es/policies/the-eu->

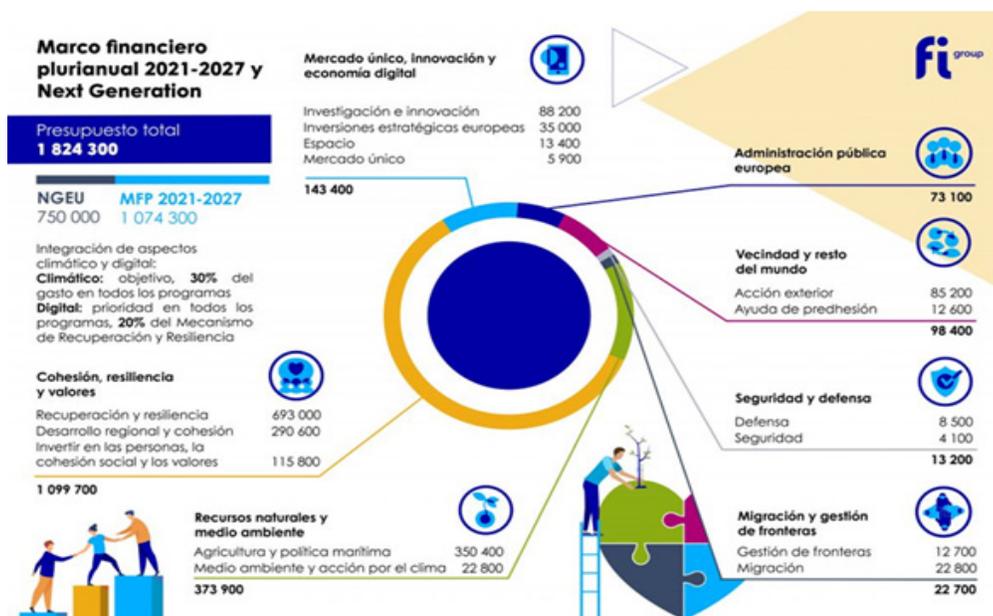


Figura 5. Financiamento MFP+NG.

Tomado de <https://es.fi-group.com/recurso/marco-financiero-plurianual-2021-2027-y-next-generation>

budget/long-term-eu-budget-2021-2027/; <https://femp-fondos-europa.es/fondos-europeos-2021-2027/el-marco-financiero-plurianual-2021-2027-y-la-politica-de-cohesion/>; <https://es.fi-group.com/novedades-europeas-diciembre/>; <https://es.fi-group.com/recurso/marco-financiero-plurianual-2021-2027-y-next-generation/>; <https://procesa.es/fondos-estructurales-de-la-union-europea/>; <https://commission.europa.eu/funding-tenders/find-funding/funding-management-mode/2014-2020-european-structural-and-investment-funds.es>; <https://femp-fondos-europa.es/fondos-europeos-ng-eu/fondos-next-generation-eu-ng-eu/>; https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/recovery-plan-europe_es; https://next-generation-eu.europa.eu/index_es; <https://femp-fondos-europa.es/fondos-europeos-ng-eu/fondos-next-generation-eu-ng-eu/>; <https://nexteugeneration.com/info-next-generation-eu/>; <https://www.hacienda.gob.es/es-ES/CDI/Paginas/FondosEuropeos/Fondos-relacionados-COVID/Next-Generation.aspx>.

MECANISMO DE RECUPERACIÓN Y RESILIENCIA

Next Generation EU contribuirá a reparar los daños económicos y sociales inmediatos causados por la pandemia de coronavirus para tener una Europa mejor adaptada a los retos actuales y futuros. Su principal componente es el Mecanismo de Recuperación y Resiliencia (MRR), un instrumento destinado a conceder subvenciones y préstamos para apoyar reformas e inversiones en los Estados miembros de la UE con una duración de seis años, de 2021 a 2026, y con un importe total que asciende a 672.500 millones de euros* (312.500 en transferencias y 360.000 millones en préstamos a bajo interés) (*Valor actual 723.800 MM de euros) (Tabla I) (<https://www.hacienda.gob.es/es-ES/CDI/Paginas/FondosEuropeos/Fondos-relacionados-COVID/Next-Generation.aspx>; <https://www.consilium.europa.eu/es/infographics/20201006-recovery-resilience-rrf/>; [Revista de la Facultad de Farmacia - Vol. 87 - Nºs 1 y 2 - 2024](https://commission.europa.eu/business-economy-euro/economic-</p>
</div>
<div data-bbox=)

Tabla I.

Asignaciones totales por rúbrica del marco financiero plurianual 2021-2027 y *Next Generation EU*

| Rúbrica | MFP | NextGenerationEU |
|---|------------------------------|----------------------------|
| 1. Mercado único, innovación y economía digital | 149 500 MM de euros | 11 500 MM de euros |
| 2. Cohesión, resiliencia y valores | 426 700 MM de euros | 500 MM de euros |
| 3. Recursos naturales y medio ambiente | 401 000 MM de euros | 18 900 MM de euros |
| 4. Migración y gestión de las fronteras | 25 700 millones de euros | - |
| 5. Seguridad y defensa | 14 900 millones de euros | - |
| 6. Vecindad y resto del mundo | 110 600 millones de euros | - |
| 7. Administración pública europea | 82 500 millones de euros | - |
| TOTAL MFP | 1 210 900 MM de euros | 806 900 MM de euros |

Todos los importes en euros son valores a precios corrientes. Fuente: Comisión Europea (<https://www.consilium.europa.eu/es/policies/the-eu-budget/long-term-eu-budget-2021-2027/>; <https://www.consilium.europa.eu/es/infographics/20201006-recovery-resilience-rrf/>)

[recovery/recovery-and-resilience-facility_es; https://es.fi-group.com/recurso/marco-financiero-plurianual-2021-2027-y-next-generation/](https://www.consilium.europa.eu/es/infographics/20201006-recovery-resilience-rrf/)).

El Reglamento establece que el Mecanismo de Recuperación y Resiliencia comunitario se apoya en seis pilares destinados a favorecer la recuperación económica, crear empleo y sentar las bases de una Unión Europea más fuerte y resistente:

Transición ecológica; Transformación digital; Crecimiento inteligente, sostenible e integrador; Cohesión social y territorial; Salud y resiliencia económica, social e institucional; y Políticas para la próxima generación, infancia y juventud.

Junto con el instrumento de recuperación *Next Generation EU*, de 750 000 millones de euros, el presupuesto permitirá a la UE aportar una financiación sin precedentes de 1,8 billones de euros en los próximos años para sustentar la recuperación de la pandemia de la COVID-19 y las prioridades a largo plazo de la UE en diferentes ámbitos de actuación (Tabla II) (<https://www.hacienda.gob.es/es-ES/CDI/Paginas/FondosEuropeos/Fondos-relacionados-COVID/Next-Generation.aspx>; <https://www.consilium.europa.eu/es/infographics/20201006-recovery-resilience-rrf/>; https://commission.europa.eu/business-economy-euro/economic-recovery/recovery-and-resilience-facility_es; <https://es.fi-group.com/recurso/marco-financiero-plurianual-2021-2027-y-next-generation/>).

En el marco de la iniciativa *Next Generation EU* se crean dos instrumentos financieros que son incorporados a los Programas Operativos de FEDER y FSE: 1. Mecanismo Europeo de Recuperación y Resiliencia (MRR) y 2. Ayuda a la Recuperación para la Cohesión y los Territorios de Europa (REACT-UE). (<https://planderecuperacion.gob.es/plan-de-recuperacion-para-europa>; <https://planderecuperacion.gob.es/preguntas/que-es-el-fondo-de-recuperacion-next-generationeu#:~:text=REACT%2DEU%3A%20Instrumento%20de%20ayuda,el%20inicio%20de%20la%20pandemia>).

REACT-EU (*Recovery Assistance for Cohesion and the Territories of Europe*), es uno de los nuevos programas bajo el instrumento *Next Generation EU*, con una suma de 50.600 millones de euros. Su finalidad es continuar y extender la respuesta y medidas a la crisis de la COVID-19 a través de la “*Coronavirus*

Tabla II.

Asignaciones totales por programa del marco financiero plurianual 2021-2027 y *Next Generation EU*

| Programa | MFF+NGEU | Incremento | Presupuesto final |
|--|----------|------------|-------------------|
| Horizonte Europa | 80.900 | +4.000 | 84.900 |
| InvestEU | 8.400 | +1.000 | 9.400 |
| Erasmus + | 21.200 | +2.200 | 23.400 |
| EU4Health | 1.700 | +3.400 | 5.100 |
| Fondo para la gestión integrada de las fronteras y la guardia fronteriza y costera | 5.500 | +1.500 | 7.000 |
| Creative Europe | 1.600 | + 600 | 2.200 |
| Programa de derechos y valores | 600 | +800 | 1.400 |
| El Instrumento de Vecindad, Desarrollo y Cooperación Internacional | 70.800 | +1.000 | 71.800 |
| Ayuda humanitaria | 9.800 | +500 | 10.300 |
| Flexibilidad extra | | +1.000 | |

Response Investment Initiative” y la “*Coronavirus Response Investment Initiative Plus*”, y constituye un puente para los planes de recuperación a más largo plazo (<https://planderecuperacion.gob.es/plan-de-recuperacion-para-europa>; <https://planderecuperacion.gob.es/preguntas-que-es-el-fondo-de-recuperacionnextgenerationeu#:~:text=REACT%20DEU%3A%20Instrumento%20de%20ayuda,eI%20inicio%20de%20la%20pandemia>; https://ec.europa.eu/regional_policy/funding/react-eu_en).

Programa RED.ES: Se trata de un servicio electrónico ofertado por la Tesorería General de la Seguridad Social (TGSS) hacia empresas y profesionales autónomos, el cual permite el contacto directo y el intercambio de información y documentos entre ambos a través de internet. Adjudica Fondos *Next Generation EU* a Ayuntamientos y Diputaciones para la creación de un sistema digital moderno en el sector audiovisual. Esto permite la eliminación de las gestiones administrativas por el procedimiento convencional en papel, con las consiguientes ventajas en comodidad, ahorro de tiempo y costos, al

poder realizarlas desde la propia empresa, además de la conexión directa para la realización de trámites con carácter telemático, tanto de afiliación como de cotización, incluido en la Agenda “España Digital 2026” del Plan de Recuperación (<https://es.fi-group.com/novedades-europeas-diciembre/>; <https://revista.seg-social.es/-/%C2%BFqu%C3%A9-es-y-para-qu%C3%A9-sirve-el-sistema-red->; https://ec.europa.eu/regional_policy/funding/react-eu_en).

La Unión Europea y el papel de los Fondos Europeos en la Industria Farmacéutica. Inversión en Latinoamérica y Venezuela

La industria farmacéutica es considerada como un sector clave para la reconstrucción sanitaria, económica y social de la Unión Europea, especialmente después de la crisis desencadenada por la pandemia de SARS-CoV-2. Se destaca su contribución a la reactivación del continente, garantizando crecimiento y competitividad para sentar las bases para el futuro de la economía europea. La industria farmacéutica europea

ha sido un actor clave durante la pandemia de la COVID-19, por su protagonismo en el desarrollo de vacunas y medicamentos, y se sitúa como uno de los sectores estratégicos para la recuperación económica y social de Europa. Según datos de la Comisión Europea, la industria farmacéutica es el sector de alta tecnología con el mayor valor agregado por persona empleada en Europa, y también es el sector líder en intensidad en Innovación y Desarrollo (I+D), es decir, inversión en función de las ventas netas.

La Unión Europea tiene un papel fundamental en la regulación y promoción de la industria farmacéutica, buscando garantizar su competitividad a nivel mundial y su contribución a la salud pública y la economía europea.

Los fondos europeos también desempeñan un papel crucial en el apoyo a la industria farmacéutica y otros sectores estratégicos para la UE. La influencia de la Unión Europea en la industria farmacéutica es significativa, ya que esta industria puede contribuir a la reconstrucción sanitaria, económica y social de la UE, especialmente tras la crisis desatada por el SARS-CoV-2. La UE busca un marco regulatorio estable, rápido, efectivo y competitivo a nivel mundial, así como una estrategia de propiedad industrial que proteja la inversión en investigación biomédica y garantice al menos la paridad con regiones competidoras como Estados Unidos y China. Esto es necesario para impulsar un sector estratégico para la salud y la economía europeas. La industria farmacéutica no solo transforma la vida de los pacientes, sino que también es un pilar de la economía europea, por lo que se busca facilitar su desarrollo. Además, las políticas dirigidas a potenciar la economía y la competitividad industrial europea

inciden en el futuro del sector farmacéutico. El desarrollo de políticas análogas en los ámbitos industrial y de salud pública pone de manifiesto el decisivo doble papel que desempeñan los medicamentos y la ineludible necesidad de una acción horizontal, así como de aplicaciones sectoriales para resolver sus necesidades específicas (Pagés, 2004).

Se ha intensificado el debate sobre fondos europeos conforme se acercan los plazos propuestos por la Comisión Europea. El sector primario, incluyendo la industria farmacéutica, constituye una de las puntas de lanza de la política europea. Se busca entender el sector agroalimentario desde el punto de vista de la soberanía productiva, es decir, la capacidad de la Unión Europea de producir con altos estándares de calidad y exigencia de sostenibilidad los alimentos que llegan a una población consumidora cada vez más numerosa. Esto incluye una capacidad de respuesta imprescindible ante las necesidades de la población.

La relación entre los fondos europeos de la Unión Europea y la industria farmacéutica en Latinoamérica, incluyendo Venezuela, puede estar influenciada por los programas de reconversión regional y el enfoque en la reconstrucción sanitaria y económica en la Unión Europea (www.europarl.europa.eu/factsheets/es).

Los fondos de la Unión Europea, como el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), tienen especial enfoque en la reconversión de regiones industriales en declive, lo que podría tener implicaciones para la industria farmacéutica en Latinoamérica, incluyendo Venezuela.

La relación entre la Unión Europea y Venezuela se enmarca en la Nueva

Agenda para las Relaciones entre la UE y América Latina y el Caribe, resaltada en las conclusiones de la Cumbre UE-CELAC celebrada en julio de 2023 en Bruselas. Esta propone una asociación estratégica más moderna y sólida, a través de un diálogo político fortalecido, estimulando el comercio e inversión, y fomentando sociedades más sostenibles, justas e interconectadas.

La UE es el principal donante mundial en materia de cooperación al desarrollo en el mundo. A través de su principal instrumento financiero para la acción exterior (2021-2027), el Instrumento de Vecindad, Cooperación al Desarrollo y Cooperación Internacional-Europa Global (NDICI-Europa Global), la Unión Europea va a:

- apoyar y fomentar el diálogo y la cooperación con terceros países en África subsahariana, Asia y el Pacífico, y en las Américas y el Caribe;
- promover la democracia, el estado de derecho y los derechos humanos apoyando una mayor estabilidad y paz;
- responder rápidamente a situaciones de crisis, inestabilidad y conflicto.

La Unión Europea periódicamente fija áreas temáticas prioritarias para su trabajo de cooperación con la Comunidad Internacional, Organizaciones de la Sociedad Civil (OSC) y Autoridades Locales (AL) que pueden recibir un financiamiento directo de la UE a través de convocatorias. Actualmente en Venezuela, la Unión Europea trabaja principalmente con Organizaciones de la Sociedad Civil (OSC) y agencias de las Naciones Unidas. A través de estos socios se trabaja para apoyar la promoción y protección de los derechos humanos,

la dignidad humana, la inclusión, la participación democrática y la resiliencia a nivel comunitario en el acceso a servicios básicos y la seguridad alimentaria. Los proyectos seleccionados dentro de estas convocatorias obtendrán un contrato de subvención entre la Unión Europea y el beneficiario, para el financiamiento e implementación de su proyecto.

Los programas de cooperación regional fortalecen las relaciones entre América Latina y la Unión Europea al intercambiar experiencias y crear redes, al mismo tiempo que crea vínculos entre los países dentro de la región. Estos programas abordan intervenciones en materia de seguridad, gobernanza y cohesión social, sostenibilidad medio ambiental y cambio climático. Adicionalmente, existen programas globales como Erasmus+ dirigidos al fomento de intercambios y cooperación entre universidades, profesores, institutos de investigación e investigadores europeos, venezolanos y de otras regiones, además de incluir becas y movilidad para estudiantes entre Europa y Venezuela (https://www.eeas.europa.eu/venezuela/union-europea-y-venezuela_es?s=195).

Referencias Bibliográficas

- https://es.wikipedia.org/wiki/Uni%C3%B3n_Europea
https://european-union.europa.eu/index_es
https://european-union.europa.eu/institutions-law-budget/budget/revenue_es
<https://www.exteriores.gob.es/es/PoliticaExterior/Paginas/Brexit>
<https://www.20minutos.es/noticia/4997001/0/claves-acto-dia-europa-entrega-conclusiones-cofoe-ue/> La UE inicia su 'refundación' de la mano de los ciudadanos: "Este es nuestro tiempo, es el momento de dar respuestas"
<https://www.europaciudadana.org/300-intelectuales-piden-la-refundacion-de-la-union-europea/>

- <https://www.fondoseuropeos.hacienda.gob.es/sitios/dgpmrr/es-es/Paginas/Inicio.aspx?Archivo:European regional policy 2014.svg>
- Wikipedia, la enciclopedia libre
- <https://www.consilium.europa.eu/es/infographics/20201006-recovery-resilience-rrf/commission.europa.eu/strategy-and-policy/recovery-plan-europe.es>
- <https://www.bing.com/search?q=que+son+las+AGENDAS+de+la+UE>
- https://european-union.europa.eu/principles-countries-history/history-eu_es
- <https://ec.europa.eu/social/main.jsp?catId=1606&langId=es>
- <https://www.mdsocialesa2030.gob.es/derechos-sociales/inclusion/marco-ue.htm>
- https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/recovery-plan-europe_en
- <https://www.bing.com/search?q=La+Agenda+2030+de+los+Objetivos+de+Desarrollo+Sostenible+>
- <https://www.consilium.europa.eu/es/policies/the-eu-budget/long-term-eu-budget-2021-2027/>
- <https://femp-fondos-europa.es/fondos-europeos-2021-2027/el-marco-financiero-plurianual-2021-2027-y-la-politica-de-cohesion/>
- <https://es.fi-group.com/novedades-europeas-diciembre/>
- <https://es.fi-group.com/recurso/marco-financiero-plurianual-2021-2027-y-next-generation/>
- <https://procesas.es/fondos-estructurales-de-la-union-europea/>
- <https://commission.europa.eu/funding-tenders/find-funding/funding-management-mode/2014-2020-european-structural-and-investment-funds.es>
- <https://femp-fondos-europa.es/fondos-europeos-ng-eu/fondos-next-generation-eu-ng-eu/>
- <https://www.fondoseuropeos.hacienda.gob.es/sitios/dgfc/esES/paginas/femp.aspx>
- <https://www.europarl.europa.eu/factsheets/es/sheet/95/el-fondo-europeo-de-desarrollo-regional-feder>
- <https://www.redpoliticasidi.es/es/ambitos/fondo-europeo-de-desarrollo-regional-feder>
- <https://www.europarl.europa.eu/factsheets/es/sheet/53/el-fondo-social-europeo-plus>
- <https://www.mapa.gob.es/es/pesca/temas/fondos-europeos/fempa/>
- https://agriculture.ec.europa.eu/common-agricultural-policy/rural-development_es
- <https://www.europarl.europa.eu/factsheets/es/sheet/214/fondo-de-transicion-justa>
- <https://www.redpoliticasidi.es/es/politicas/politicas-europeas/politica-cohesion>
- https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/recovery-plan-europe_es
- https://next-generation-eu.europa.eu/index_es
- <https://femp-fondos-europa.es/fondos-europeos-ng-eu/fondos-next-generation-eu-ng-eu/>
- <https://nexteugeneration.com/info-next-generation-eu/>
- <https://www.hacienda.gob.es/es-ES/CDI/Paginas/FondosEuropeos/Fondos-relacionados-COVID/Next-Generation.aspx>
- <https://www.consilium.europa.eu/es/infographics/20201006-recovery-resilience-rrf/>
- https://commission.europa.eu/business-economy-euro/economic-recovery/recovery-and-resilience-facility_es
- <https://es.fi-group.com/recurso/marco-financiero-plurianual-2021-2027-y-next-generation/>
- <https://planderecuperacion.gob.es/plan-de-recuperacion-para-europa>
- <https://planderecuperacion.gob.es/preguntas/que-es-el-fondo-de-recuperacion-xtgenerationeu#:~:text=REACT%2DEU%3A%20Instrumento%20de%20ayuda,el%20inicio%20de%20la%20pandemiahttps://revista.seq-social.es/-/%C2%BFqu%C3%A9-es-y-para-qu%C3%A9-sirve-el-sistema-red->
- https://ec.europa.eu/regional_policy/funding/react-eu_en
- <https://www.europarl.europa.eu/factsheets/es>
- https://www.eeas.europa.eu/venezuela/union-europea-y-venezuela_es?s=195

Pagés MT. Las políticas farmacéuticas en Europa. Rev Adm Sanit 2004;2(1):15-27.



Prevalencia de anemia, leucopenia y trombocitopenia en una población adulta en el servicio de hospitalización de una institución prestadora de servicios de salud de tercer nivel, Sincelejo-Sucre

Prevalence of anemia, leukopenia and thrombocytopenia in an adult population in the hospitalization service of a third-level institution providing health services, Sincelejo-Sucre

IRENE TOVÍO-MARTÍNEZ*, ALMA LUNA-MANJARREZ**1, NERLIS PÁJARO-CASTRO***2, EDGAR VERGARA-DAGOBETH****

Resumen

Introducción: La anemia es uno de los problemas de salud pública más graves a nivel mundial, con una prevalencia en la población general del 24,8%. La leucopenia constituye un 5% aproximadamente de las consultas en el servicio de hematología, puede presentarse como un proceso secundario a una patología y en menor grado a alteraciones propias del sistema hematológico. El 0,9% de los pacientes con una enfermedad aguda, y cerca del 25% al 46% de los pacientes en unidad de cuidados intensivos, presentan algún grado de trombocitopenia. Estas alteraciones hematológicas constituyen las principales causas de problemas de salud pública. **Objetivo:** Caracterizar la anemia, la trombocitopenia y la leucopenia en una población adulta del Servicio de Hospitalización de la Clínica las Peñitas, Sincelejo-Sucre, durante el periodo comprendido entre el 01 junio de 2017 al 01 mayo de 2018. **Metodología:** Este estudio es una investigación de tipo cuantitativo, observacional descriptivo, retrospectivo de tipo transversal, no experimental. Se revisaron 524 historias clínicas de las cuales 447 cumplían los criterios de inclusión. Para el análisis de las variables se tabularon los datos, se obtuvo la prevalencia mediante la fórmula para el cálculo de prevalencia de periodo. **Resultados:** Se identificó que el mayor porcentaje de pacientes fueron de sexo masculino, procedentes del municipio de Sincelejo, cuyo principal trastorno hematológico fue la anemia. **Conclusiones:** Se pudo identificar que el trastorno más frecuente es la anemia, la relación que existe entre su presentación a un mayor rango de edad de los pacientes nos alerta acerca de la importancia de realizar tamizajes y manejos profilácticos. Esto abre una ventana a un manejo más oportuno de los pacientes y un mejoramiento de su calidad de vida.

Palabras clave: Anemia, leucopenia, trombocitopenia, prevalencia, medicina interna

Abstract

Introduction: Anemia is one of the most severe public health problems worldwide, with a prevalence in the general population of 24.8%. Leukopenia constitutes approximately 5% of consultations to a hematology service, can be presented as a secondary process to pathology, and in fewer cases to alterations of the hematological system, 0.9% of patients with acute disease and about 25% to 46% of patients in intensive care unit have some degree of thrombocytopenia. These hematological alterations constitute the leading causes of public health problems. **Aim:** To characterize anemia, thrombocytopenia, and leukopenia in the adult population of the Hospitalization Service of Las Peñitas Clinic, Sincelejo-Sucre, from 01 June 2017 to 01 May 2018. **Methodology:** This study is a quantitative, descriptive observational, retrospective, cross-sectional, non-experimental type investigation. Five hundred twenty-four medical records were reviewed, of which 447 met the inclusion criteria. The data were tabulated to analyze the variables, and the prevalence was found using the formula for calculating period prevalence. **Results:** It was identified that the highest percentage of patients were male, from the municipality of Sincelejo, whose main hematological disorder was anemia. **Conclusions:** It was possible to determine that the most frequent disorder is anemia. The relationship between its presentation to a greater age range of patients alerts us about the importance of screening and prophylactic management; this opens a window to management that is more suitable to the patients and improves their quality of life.

Keywords: Anemia, leukopenia, thrombocytopenia, prevalence, internal medicine

* Médico. Grupo de Ciencias Médicas y Farmacéuticas. Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia. **Médico Internista. Clínica Las Peñitas. Facultad de Ciencias de la Salud, Grupo de Ciencias Médicas y Farmacéuticas. Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia. *** Docente. Facultad de Ciencias de la Salud, Grupo de Ciencias Médicas y Farmacéuticas. Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia. **** Docente. Facultad de Ciencias de la Salud, Grupo de Ciencias Médicas y Farmacéuticas, Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia. Correspondencia: nerlis.pajaro@unisuc.edu.co

Orcid: [0009-0006-9582-189X](https://orcid.org/0009-0006-9582-189X)
[0000-0002-9831-9665](https://orcid.org/0000-0002-9831-9665)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.1-2.7](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.1-2.7)
Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff
Recepción: 02/04/2024
Aprobación: 12/04/2024

Introducción

La sangre es un componente vital del organismo humano, compuesta por un líquido rico en proteínas llamado plasma, en el cual se encuentran suspendidos los elementos celulares como los leucocitos, eritrocitos y plaquetas (Barrett y col., 2016; Valdivieso Sánchez, 2023). Los trastornos que afectan a la sangre se conocen como trastornos sanguíneos o trastornos hematológicos. Estos trastornos pueden afectar tanto la cantidad como la funcionalidad de las células sanguíneas, las proteínas del sistema de coagulación de la sangre o el sistema inmunitario (Kuter, 2017). Existen diferentes tipos de alteraciones en la sangre, que pueden manifestarse en cambios en el tamaño, forma, coloración y cantidad de las células sanguíneas (Mantuano Delgado y col., 2023). Algunos trastornos sanguíneos pueden provocar una disminución en el número de células sanguíneas, como la anemia (disminución de glóbulos rojos), la leucopenia (disminución de glóbulos blancos) y la trombocitopenia (disminución de plaquetas) (Kuter, 2017). Es importante destacar que la trombocitopenia no es una enfermedad aislada, sino más bien un signo de una enfermedad subyacente de carácter sistémico (Muñoz Honiball, 2023).

Los trastornos sanguíneos pueden causar síntomas debido a la afectación de las funciones sanguíneas, y estos síntomas pueden manifestarse en cualquier tejido u órgano del cuerpo. Los médicos suelen investigar la presencia de trastornos sanguíneos a través de la realización de análisis de sangre, que permiten detectar alteraciones en los resultados de laboratorio (Kuter, 2017). Por lo general, los análisis de sangre son el punto de partida para detectar enfermedades sanguíneas, obteniendo la

muestra de sangre fácilmente mediante una aguja y una jeringa desde una vena, o en algunos casos, mediante un pinchazo en la punta de los dedos (*The Oncology Institute*, 2018). Sin embargo, en ocasiones puede ser necesario realizar una evaluación de la médula ósea, ya que es allí donde se producen las células sanguíneas.

La anemia es uno de los problemas de salud pública más graves a nivel mundial, con una alta prevalencia en la población general. Aproximadamente el 24,8% de la población mundial, es decir, alrededor de 1620 millones de personas, se ven afectadas por la anemia. Esta prevalencia varía según las regiones geográficas, siendo África y Asia Sudoriental las áreas con mayor prevalencia, mientras que las Américas, Europa y el Pacífico Occidental presentan una prevalencia del 20% (Organización Mundial de la Salud, 2017). En Latinoamérica, la prevalencia de la anemia alcanza el 58% (Abril y col., 2017; Hussain y col., 2019).

En Colombia, la anemia también es un problema de salud pública, especialmente en el grupo de mujeres en edad fértil, con una prevalencia que oscila entre el 20% y el 39% (Abril y col., 2017), en el año 2015 alcanzó un 32,8% (Ministerio de Salud y Protección Social, 2010). Según los datos de la Encuesta Nacional de Situación Nutricional (ENSIN 2015), aproximadamente una cuarta parte de los niños y niñas en Colombia presentaron esta condición, con una prevalencia nacional del 24,7%. Las regiones con mayor prevalencia fueron la Amazonia y la Orinoquia, con un 33,1%, mientras que la región central presentó la menor prevalencia, con un 18,6%. La región atlántica, a la cual pertenece el departamento de Sucre, tuvo una prevalencia del 25,7% (Ministerio de Salud y Protección Social, 2015).

La leucopenia, otra alteración hematológica, puede manifestarse de manera global o como la disminución de un solo tipo de células sanguíneas, siendo destacables la neutropenia y la linfopenia (Gigato, 2015). La leucopenia suele ser frecuente en la práctica clínica diaria, representando aproximadamente el 5% de las consultas en servicios de hematología (Grupo Científico DTM, 2018). En Venezuela, se ha observado una prevalencia de leucopenia del 2,48% en comunidades indígenas, asociada a su estilo de vida y a las condiciones socioeconómicas (Ministerio de Salud y Protección Social, 2015). La trombocitopenia, por su parte, se estima que afecta aproximadamente al 2,5% de la población mundial. Esta condición a menudo es asintomática y se descubre de manera incidental (Ministerio de Salud y Protección Social, 2015). Sin embargo, alrededor del 0,9% de los pacientes con enfermedades agudas y entre el 25% y el 46% de los pacientes en unidades de cuidados intensivos presentan algún grado de trombocitopenia (Cajo, 2017).

Las alteraciones hematológicas pueden presentarse de diversas formas y su comportamiento puede variar. Pueden ser la primera manifestación de una enfermedad o desarrollarse durante su evolución. Es fundamental diagnosticar y tratar adecuadamente estos trastornos hematológicos para minimizar sus secuelas. Dado que las anemias son bastante comunes en la población adulta, es esencial tener en cuenta la alta incidencia de estas enfermedades, especialmente en adultos (Mantuano Delgado y Valdiviezo Sornoza, 2023).

En resumen, tanto la anemia, la leucopenia, así como la trombocitopenia son trastornos hematológicos que afectan

la sangre y pueden ser indicadores de enfermedades subyacentes (Hannaoui y col., 2016). Estos trastornos pueden tener un impacto significativo en la salud pública, y su detección y tratamiento adecuados son fundamentales para prevenir complicaciones y mejorar la calidad de vida de los pacientes (Gigato, 2015). Es por ello por lo que el presente estudio tiene como objetivo caracterizar la presencia de anemia, leucopenia y trombocitopenia en la población adulta de una Institución Prestadora de Servicios de Salud (IPS) de nivel 3 en Sincelejo, Sucre, Colombia.

Metodología

Este estudio es una investigación de tipo cuantitativo, observacional descriptivo, retrospectivo de tipo transversal, no experimental. La población objeto de estudio se conformó por todos los pacientes hospitalizados por cualquier motivo de consulta en la Clínica Las Peñitas en el servicio de medicina interna durante el periodo del 01 de junio del 2017 al 01 de mayo del 2018. La muestra se conformó por todos los pacientes que presentaron disminución de las líneas celulares sanguíneas y cumplían con los criterios de inclusión. El tamaño de la muestra se calculó en el aplicativo EpiInfo versión 7.2.2.16, se utilizó el módulo *population survey* correspondiente a la sección Statcalc, con el cual se estimó el nivel de confiabilidad de la muestra en 97%, siendo 447 el tamaño de la muestra dado por el programa.

Por lo tanto, se seleccionaron de 524 pacientes que presentaron alguna disminución de las líneas celulares sanguíneas en base a los 8400 pacientes hospitalizados durante el periodo del 01 de

junio del 2017 al 01 de mayo del 2018 en la Clínica Las Peñitas, de estos pacientes solo 447 cumplieron los criterios de inclusión.

Los criterios de inclusión fueron pacientes mayores de 18 años, pacientes hospitalizados en el Servicio de Medicina Interna, pacientes con estudios de cuadro hemático realizado en la institución. Los criterios de exclusión fueron pacientes embarazadas, pacientes con diagnóstico de ingreso con enfermedad hematológica primaria o secundaria conocida o con hemorragia aguda.

La investigación se realizó en el Área de Hospitalización, del Servicio de Medicina Interna, de la Clínica Las Peñitas, cuya categorización es III nivel (alta complejidad). La clínica cuenta con los servicios de urgencias, hospitalización, cirugía, consulta externa y odontología en sus diferentes sedes, para todas las personas que procede de cualquier punto de la ciudad y municipios aledaños. Considerada como un centro de referencia local y con certificado de calidad otorgado por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas (ICONTEC) bajo la norma ISO 9001:2000, el cual ha sido renovado hasta la fecha para la atención del adulto, mujeres embarazadas y niños debido a la oferta de las diferentes especialidades médico-quirúrgica para el manejo de patologías de alta complejidad en estos grupos poblacionales (Las Peñitas S.A.S C, 2014).

Unidad de análisis. Se utilizaron valores de referencia (Tabla I) obtenidos de la literatura médica los cuales son avalados por las diferentes organizaciones médicas a nivel mundial (Robertson y col., 2017; Okam y col., 2017; Grupo Científico DTM, 2018; Bow y col., 2019) y se correlacionaron con los datos obtenidos.

Para la recolección de datos se utilizaron los siguientes instrumentos: El sistema informático de la Clínica WINSISMED, Historias clínicas, Resultado de laboratorios (cuadro hemático).

Procedimientos. Para la obtención de los datos se acudió a la IPS Clínica las Peñitas, se revisaron las historias clínicas de todos los pacientes atendidos en el área de hospitalización del Servicio de Medicina Interna en el periodo de año 01 de junio de 2017 al 01 de mayo de 2018 a través del sistema de datos de la institución WINSISMED. La información que se manejó en esta investigación fue: edad, sexo, ocupación, procedencia, motivo de consulta, consumo de medicamentos, resultados de hemogramas (nivel de hemoglobina, nivel de leucocitos, nivel de plaquetas), registrando todo esto en una hoja de Excel donde se sometieron a todo un proceso de estudio, para corroborar el cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión descritos anteriormente.

Análisis de datos. Se tabularon los datos en EXCEL OFICE 360, se determinaron las frecuencias y prevalencia de la anemia, leucopenia y trombocitopenia, Se utilizó la fórmula para el cálculo de prevalencia de periodo (Prevalencia de periodo PP (to, t) = C (to,t)/N) donde el significado de las variables de la anterior formula es C(to,t)= número de casos incidentes o prevalentes identificados durante el periodo to, t. N= es el tamaño de la población.

Aspectos éticos. La investigación se hizo teniendo en cuenta los parámetros éticos establecidos a nivel Nacional en la resolución N.º 008430 DE 1993 (4 de octubre del 1993), en donde se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en

Tabla I.

Valores de referencias de las líneas celulares para correlacionar con el trabajo

| Líneas celulares | Valores normales | Valores patológicos |
|------------------|---|------------------------------|
| Hemoglobina | 12- 16g/dL | < 9 g/dL (anemia moderada) |
| Leucocitos | 4,500 - 11,000 céls/mm ³ | < 3.500 céls/mm ³ |
| Trombocitos | 150.000/ mm ³ - 450.000/ mm ³ | < 150.000/mm ³ |

Variables y operacionalización

| Variable | Naturaleza | Definición | Nivel de Medición | Criterio de clasificación |
|--------------------|-------------------------------|--|-----------------------|--|
| GÉNERO | Cualitativa Dicotómica | Características biológicas o fisiológicas típicamente asociadas tanto con hembras o machos | Nominal dicotómica | Femenino Masculino |
| EDAD | Cuantitativa Independiente | Número de años cumplido por los pacientes | Continua (razón) | Número de años de acuerdo con la fecha de nacimiento |
| PROCEDENCIA | Cualitativa politómica | Lugar de residencia al momento de la consulta del paciente | Nominal politómica | Nombre del municipio de residencia |
| OCUPACIÓN | Cualitativa politómica | Actividad a la cual el paciente dedica la mayor cantidad de tiempo durante el día | Nominal politómica | Nombre de la labor que realiza |
| MOTIVO DE CONSULTA | Cualitativa politómica | Causa que impulso al paciente a asistir al servicio de urgencias | Nominal politómica | Síntomas y signos referentes a su patología |
| ANEMIA | Cuantitativa discreta | Reducción por debajo de los límites normales del volumen de hematíes concentrados, medidos por el hematocito o una reducción en la concentración de la hemoglobina en sangre | Intervalo | Leve:11-10 Moderada:10-9 Severa:< 8 |
| LEUCOPENIA | Cuantitativa discreta | Disminución de los valores normales de leucocitos | Razón | < 4000 |
| TROMBOCITOPENIA | Cuantitativa discreta | Disminución de los valores normales de trombocitos | Razón | < 150000 |

salud, el siguiente trabajo de investigación se cataloga como una investigación sin riesgo, en donde se le informan los fines académicos y no se va a revelar la confidencialidad de los datos, ni violar ningún derecho, permitiendo que sean incluidos en la investigación.

Resultados y Discusión

Durante el periodo de 11 meses (junio-mayo) entre 2017 – 2018 se registraron 8400 hospitalizaciones en el servicio de medicina interna de la Clínica Las Peñitas; del total de casos se registraron 524 pacientes a quienes se le hallaron algún tipo de disminución en las líneas celulares sanguíneas (anemia, leucopenia, trombocitopenia) pero de ellos solo el 85,3% (447 casos) cumplieron con los criterios de inclusión establecidos, lo que equivale al 5,3% de la población.

De un total de 447 pacientes el 54,1% fueron de sexo masculino y el 45,8% de sexo femenino. Estos hallazgos difieren del estudio realizado con 171 habitantes de Sarapamba Yutuloma, Tambo – Cañar, en el cual 66,1% eran mujeres y solo el 33,9% hombres (Trelles y Zúñiga, 2016), al igual que en los estudios realizados en Lima en el que predominaron las féminas de 60-69 años (25,5 %) (Álvarez y col., 2017).

El promedio de edad de los pacientes que se incluyeron en el estudio fue de $68,8 \pm 12$ años (rango de 23- 92 años), en donde 53,4% pertenece a la población de adulto mayor (edad > 60 años) (Martínez y col., 2018) (Figura 1). Estos resultados difieren de los de la población de Sarapamba Yutuloma, Tambo – Cañar, en donde el grupo etario predominante corresponde

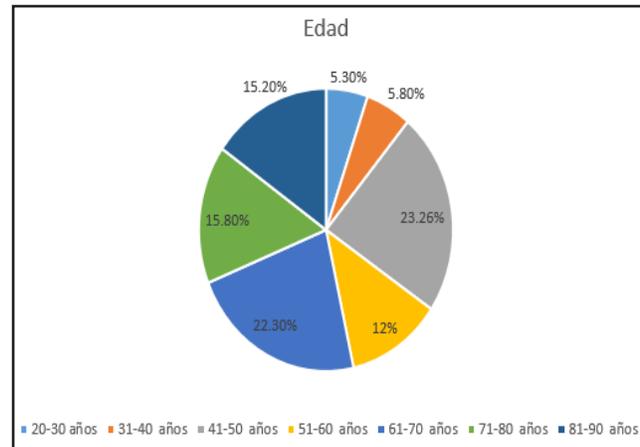


Figura 1. Porcentaje de rango de edades

de 15 a 65 años con el 47,9% y 19,3% corresponde a edades entre 6 – 45 años (Trelles y Zúñiga, 2016.). Por su parte, en un estudio realizado en San Martín de Lima con una población de 42 adultos mayores de ambos sexos se encontró 21,4% correspondían a personas de 70 a 79 años (Aguirre y Izaguirre, 2018), valores de edad que resultan un 15,8% mayores a los del presente estudio.

Nuestros resultados indican que el grupo etario de 65 años la anemia asciende en un 21,9%, mientras que los pacientes mayores solo presentan 5,8% de anemia. Estos datos no están en línea con los estudios de Tarqui y col. (2015), quienes demostraron que en los adultos con más de 65 años la anemia asciende a 10%-11%, mientras que en los mayores de 85 aumenta 26,1- 20,1% (Tarqui y col., 2015).

La Tabla II describe la ocupación de los pacientes, y se muestra que el 59,5% no se encontraba laborando y solo un 3,3% se encontraba cursando estudios universitarios. En cuanto a la procedencia se pudo establecer que el 75% de la población es de la ciudad de Sincelejo, similar a lo encontrado en un estudio con

Tabla II.
Porcentaje de ocupación de los pacientes

| Ocupación | Porcentaje de pacientes |
|------------|-------------------------|
| No laboran | 59,5% |
| Laborando | 32,2% |
| Estudios | 3,3% |
| Hogar | 4,9% |

87 ancianos en Ecuador, donde más del 50,0% vivían en zona urbana (Cañarte y col., 2018) (Figura 2).

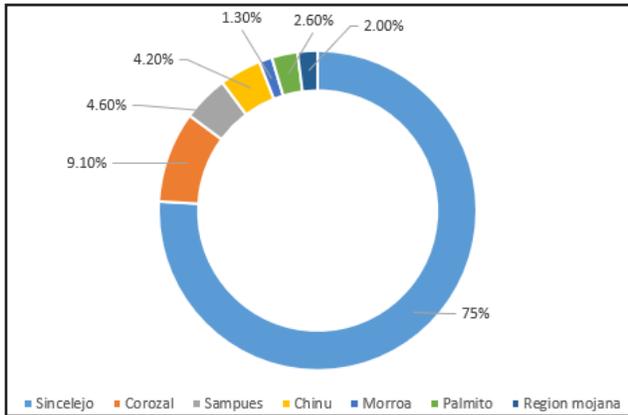


Figura 2. Porcentaje de sitio de procedencia de pacientes

Los datos del presente estudio demuestran que, de los 447 pacientes, el 48% presentó anemia. Estos resultados son similares a los reportados en el estudio realizado en Popayán en donde se incluyeron 373 pacientes, con una media de edad de 54 ± 19 y donde obtuvieron una prevalencia global de anemia al ingreso de 38,8% y al egreso 53,8%, mientras que el 29% de los pacientes presentó trombocitopenia; similar a los reportado en el estudio realizado en Santa Fe de Argentina (Vallejo y col., 2017), mientras que solo el 12,5% presentó leucopenia, valor superior al hallado en los habitantes de Sarapamba Yutuloma que presentaron 2,9% Leucopenia y el 4,1% Leucocitosis (Trelles y Zúñiga,

2016). Cabe resaltar que se identificaron pacientes con bicitopenias siendo la más frecuente anemia y trombocitopenia con un 0,09% de los pacientes mientras que las de tipo leucopenia con trombocitopenia y leucopenia con anemia se presentaron en un 1,7% en ambos casos. Con los anteriores datos se obtuvo que la prevalencia de los trastornos hematológicos es de un 5% (Figura 3). En un estudio realizado por Carbonel Castillo, 2021, en una población de 95 pacientes del Hospital Regional Lambayeque, Perú, se reportó que el 55,79% de la población observada presentó Leucemia mieloide aguda (LMA). Los resultados de laboratorio mostraron que existió mayor frecuencia de trombocitopenia, leucocitosis y anemia. En las LMA fue más frecuente la trombocitopenia y leucocitosis, siendo frecuente valores de hemoglobina baja (68,4%), linfocitosis (67,4%), plaquetopenia (63,2%).

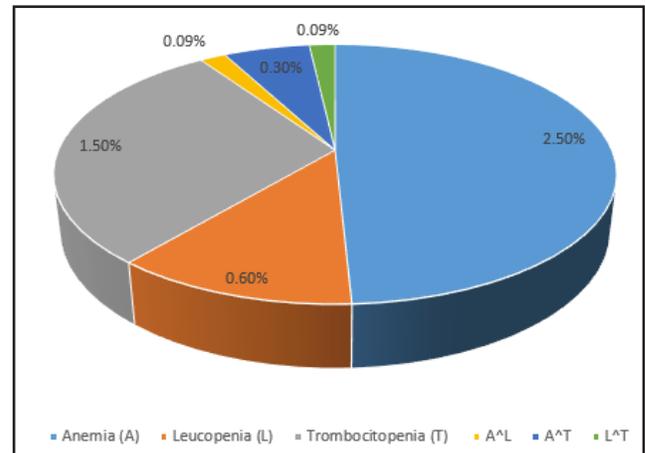


Figura 3. Prevalencia de los trastornos hematológicos

Al considerar los motivos de consulta de los pacientes, sin discriminar por el sexo, se encontró que los más frecuentes fueron la caída desde su propia altura (23%), traumatismos, cefalea y otras con un 45,8%, por tipo infecciosos la celulitis, diarrea y fiebre con un 22,5%, de tipo

respiratorio la hemoptisis y disnea con un 18,1%, de tipo cardiogénico como la crisis hipertensiva, síncope y dolor torácico con un 13,4% (Tabla III). En un estudio realizado en Santa Fe, Argentina con un total de 51 pacientes los motivos más frecuentes al ingreso fueron: dolor abdominal con el 23,5%, seguido de fiebre con el 17,6%, y sangrado con el 15,7% (Tamagnone, 2018).

Tabla III.
Porcentaje del motivo de consulta

| Motivo de consulta | Porcentaje de pacientes |
|--|-------------------------|
| Caída desde su propia altura | 23,0% |
| Varios (edema, somnolencia, dolor abdominal) | 18,3% |
| Cefalea | 13,4% |
| Diarrea | 9,1% |
| Disnea | 9,1% |
| Fiebre | 8,9% |
| Hemoptisis | 8,9% |
| Pérdida del estado de consciencia | 4,4% |
| Dolor torácico | 4,4% |
| Celulitis | 4,4% |
| Crisis hipertensiva | 4,4% |

Al organizar los pacientes por los diferentes grupos etarios con intervalos de edades de 10 años cada uno y correlacionarlos con los trastornos hematológicos se encontró que el rango de edad con mayor porcentaje de trastornos hematológicos es de 41 a 50 años con un 23,2%, mientras que el rango entre los 20 a 30 años presenta menor porcentaje de trastornos hematológicos con un 5,3% (Figura 4). En un estudio realizado con 2172 adultos mayores en la ciudad de Lima, se encontró que la edad de 70 a 79 años y >80

años se asociaron con la anemia (Cárdenas y Roldan, 2017).

En relación con los posibles medicamentos que recibían los pacientes, se encontró que del grupo pacientes estudiados, 244 no recibían medicamentos en casa mientras que 74 pacientes recibían algún medicamento antihipertensivo en combinación con otros medicamentos (Tabla IV). En un estudio realizado en Madrid con una población de 22.076, se determinó que 3 de cada 4 casos (73,9%) está tomando fármacos antihipertensivos, lo cual es superior a los valores encontrados en los pacientes del presente estudio (López, 2017).

Conclusiones

El trastorno más frecuente encontrado en la población de pacientes estudiada fue la anemia, siendo de mayor prevalencia en los pacientes de mayor edad y perteneciente al área urbana. Esto alerta acerca de la importancia de realizar tamizajes y manejos profilácticos en la comunidad descrita, lo que abre una ventana a un manejo más oportuno de los pacientes y un mejoramiento de su calidad de vida. Aunque la leucopenia y trombocitopenia se presentaron en menor proporción con relación a la anemia, es de gran importancia resaltar que su presentación en poblaciones jóvenes es significativa, lo que genera la necesidad de realizar campañas de promoción y prevención para difundir sus signos y síntomas.

Agradecimientos

A la Clínica Las Peñitas por permitir realizar la investigación y a la Universidad de Sucre por su ayuda en todo este proceso.

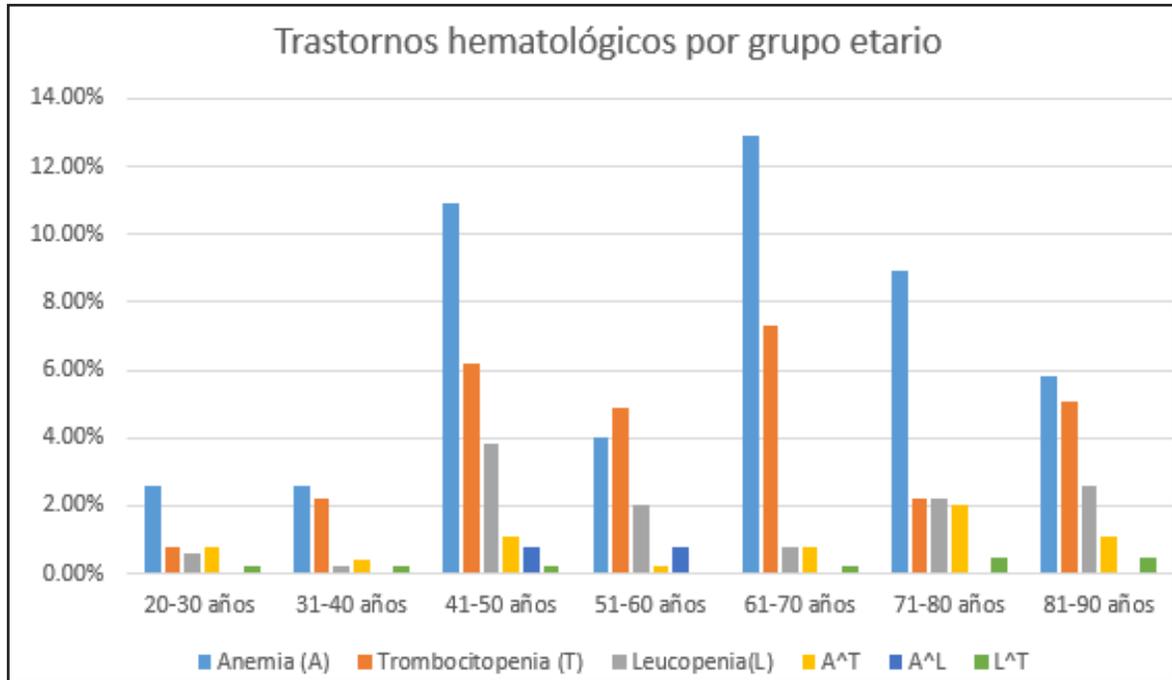


Figura 4. Porcentaje de los trastornos hematológicos por grupo etario

Tabla IV.
Porcentaje de pacientes a los que se les administraba algún medicamento

| Consumo de medicamentos | Porcentaje de pacientes |
|---|-------------------------|
| No consumen | 54,5% |
| Medicamentos Antihipertensivos | 12,3% |
| Medicamentos Antigluceante | 8,9% |
| Medicamentos Antihipertensivos en combinación con otros (antigluceantes o ansiolíticos o anticoagulantes) | 16,5% |
| Consumen otro tipo de medicamentos | 7,6% |

Los autores declaramos no tener conflictos de intereses.

Referencias Bibliográficas

Abril A, Álvarez S, Romero E, Romero A, Sabogal M, Serrano L. 2017. Anemia por deficiencia de hierro, una breve mirada. *Biociencias* 1(2):1-8.

Aguirre A, Izaguirre B. 2018. Niveles de hierro sérico y su relación con la hemoglobina y el hematocrito, en una población de adultos mayores de Lima. Año 2017 [Licenciatura]. Lima: Universidad Norbert Wiener.

Álvarez K, Madera Y, Díaz M, Naranjo J, Delgado A. 2017. Caracterización de adultos mayores con anemia. *MEDISAN* 21(11):3227-3234.

Barrett K, Barman S, Boitano S, Brooks H. 2016. *Ganong Fisiología Médica*. 25th ed. México: Mcgraw-Hill Interamericana Editores S.A. p. 556.

Bow E, Marr K, Thörner A. 2019. Overview of neutropenic fever syndromes. *Post TW*, editor. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate. Disponible en: www.uptodate.com.

- Cajo A. 2017. Evaluación de la concordancia de resultados de trombocitopenia mediante el principio de impedancia y el frotis en sangre periférica en el servicio de consulta externa de hematología del Hospital Carlos Andrade Marín-Quito, durante el periodo de septiembre - diciembre del 2016 [Licenciatura]. Quito: Universidad Central del Ecuador.
- Cañarte J, Lucas E, Guerrero M, Moreira R. 2018. Anemia en el adulto mayor. *Pol Con* 3(7):162-171.
- Carbonel Castillo MA. 2021. Características clínicas y sociodemográficas de los pacientes adultos diagnosticados con leucemia aguda en un hospital nivel III de Lambayeque - Perú durante los años 2013-2017. [Perú]: Universidad Señor de Sipán. Disponible en: <https://repositorio.uss.edu.pe/handle/20.500.12802/8231>.
- Cárdenas H, Roldan L. 2017. Prevalencia de anemia en adultos mayores no institucionalizados de Lima metropolitana, en relación al nivel socioeconómico. *Rev Chil Nutr* 44(2):131-136.
- Gigato E. 2015. La anemia ferropénica. Diagnóstico, tratamiento y prevención. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición* 5(2):371-389.
- Grupo Científico. 2018. Green Book- Diagnóstico y Tratamiento Médico. 7th Ed. España: Marbán Libros. p. 1652, 1923, 2031.
- Hannaoui E, Capua F, Rengel A, Cedeno F, Campos M. 2016. Prevalencia de anemia ferropénica y su asociación con parasitosis intestinal, en niños y adultos del Municipio Sucre, Estado Sucre, Venezuela. *Multiciencias* 16(2):211-2017. <https://doi.org/10.56048/MQR20225.6.3.2022.781-797>
- Hussain S, Habib A, Najmi A. 2019. Anemia prevalence and its impact on health-related quality of life in Indian diabetic kidney disease patients: Evidence from a cross-sectional study. *J Evid Based Med* 12(4):243-252.
- Kuter D. 2017. Introducción a los trastornos de la sangre. Manual MSD. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-co/hogar/trastornos-de-la-sangre/s%C3%ADntomas-y-diagn%C3%B3stico-de-los-trastornos-de-la-sangre/introducci%C3%B3n-a-los-trastornos-de-la-sangre#>
- Las Peñitas S.A.S C. 2014. Código de buen gobierno y ética Clínica Las Peñitas S.A.S. 6th ed. Sincelejo; Disponible en: <http://www.clipesindelejo.com/Clinica/dctos/SSSSMA012-6.pdf>.
- López Riquelme P. 2017. Características clínicas y manejo de los pacientes con anemia en el servicio de urgencias de un hospital general [Tesis doctoral]. Universidad Complutense de Madrid. Disponible: <https://hdl.handle.net/20.500.14352/22543>
- Mantuano Delgado AN, Valdiviezo Sornoza JJ, Reyes-Baqhe JM. 2022. Alteraciones hematológicas y su asociación a enfermedades crónicas no transmisibles en adultos. *MQRInvestigar* 6(3): 781-797.
- Martínez T, González C, Castellón G, González B. 2018. El envejecimiento, la vejez y la calidad de vida: ¿éxito o dificultad? *Revista Finlay* 8(1):59-65.
- Ministerio de Salud y Protección Social. 2010. Encuesta Nacional De La Situación Nutricional En Colombia 2010 [Internet]. Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/ED/GCFI/Base%20de%20datos%20ENSIN%20-%20Protocolo%20Ensin%202010.pdf>.
- Ministerio de Salud y Protección Social. 2015. Encuesta Nacional de la Situación Nutricional En Colombia. Bogotá: Ministerio de Salud y Protección Social. Disponible en: <http://www.ensin.gov.co/Documents/Resumen-ejecutivo-ENSIN-2015.pdf>.
- Muñoz Honiball PA. 2023. Revisión fisiopatológica y algoritmo diagnóstico para pacientes hospitalizados con hallazgo de trombocitopenia en los servicios de medicina y cirugía aplicable a los diferentes hospitales nacionales. San José: Universidad de Costa Rica. Disponible en: <https://www.kerwa.ucr.ac.cr/handle/10669/89266>.
- Okam M, Koch T, Tran M. 2017. Iron Supplementation, Response in Iron-Deficiency Anemia: Analysis of Five Trials. *Am J Med* 130(8): 991.e1-991.e8.
- Organización Mundial de la Salud. 2017. Concentraciones de hemoglobina para diagnosticar la anemia y evaluar su enfermedad Ginebra. Organización Mundial de la Salud. Disponible en: <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin/es/>.
- Robertson J, Brem E, Koyfman A. 2017. The Acute Hemolytic Anemias: The Importance of Emergency Diagnosis and Management. *J Emergency Medicine* 53(2):202-211.
- Tamagnone N. 2018. Trombocitopenia en pacientes internados en un hospital de tercer nivel [Licenciatura]. Rosario: Universidad Nacional de Rosario.
- Tarqui C, Sánchez J, Álvarez D, Espinoza P, Jordan LT. 2015. Prevalencia de anemia y factores asociados en adultos mayores peruanos. *Rev Peruana Med Exp Salud Pública* 32(4).

- The Oncology Institute. 2018. Trastornos hematológicos Que Tratamos. The Oncology Institute of Hope and Innovation; Disponible en: <https://theoncologyinstitute.com/es/trastornos-hematologicos/>.
- Trelles N, Zúñiga Y. 2016. Principales alteraciones en el hemograma de los habitantes de Sarapamba Yutuloma, Tambo – Cañar. Julio 2015 – enero 2016 [Licenciatura]. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Valdivieso Sánchez N. 2023 ¿Podemos Vivir Sin Plasma? Revisión Sistemática. Grado en Enfermería. Facultad de Enfermería. Universidad de Valladolid. Disponible en: <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/60034/TFG-H2820.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Vallejo C, Correa F, Solarte H, Solano AF, Paz P, Fajardo L, Martínez DB. 2017. Prevalencia de anemia en pacientes hospitalizados en el Hospital Universitario San José de Popayán. Revista Repertorio de Medicina Y Cirugía 26(1):17-21.



Caso clínico: Lepra Lepromatosa

Clinical case: Lepromatous Leprosy

VALMORE BERMÚDEZ^{1*,**}, MARÍA JOSÉ CALVO^{*}, NAILET ARRAIZ^{2*}, MARICARMEN CHACÍN^{3**}

Resumen

La Lepra es una enfermedad granulomatosa crónica, ocasionada por *Mycobacterium leprae*, caracterizada principalmente por la afectación de los nervios periféricos y la piel, con un largo periodo de incubación y mecanismo de transmisión desconocido. En este caso, nos referimos a un paciente masculino de 61 años de edad, carpintero, con antecedentes de psoriasis quien desde el año 2014 presenta sintomatología variada y acumulativa, lo que le obliga a consultar a varios centros asistenciales; tales síntomas se refieren al aumento de volumen en región facial de predominio frontal y auricular, acentuación de pliegues faciales, pérdida de las cejas, fascie leonina, engrosamiento cutáneo y coloración rosácea de piel con áreas descamativas asociadas a prurito, engrosamiento de nervios cubitales bilateral, edema de miembros superiores e inferiores e hipoestesia en lesiones, por lo que se realizó la baciloscopia la que resultó negativa. Por la alta sospecha clínica se procede a la realización de la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) resultando positivo para *Mycobacterium leprae*, lo que confirmó el diagnóstico de Lepra Lepromatosa dos años más tarde. De esta manera, surge la importancia de reforzar los conocimientos en el ámbito médico para poder ofrecer un diagnóstico temprano sobre una enfermedad poco prevalente.

Palabras clave: Enfermedad de Hansen, Lepra Lepromatosa, *Mycobacterium leprae*

Abstract

Leprosy is a chronic granulomatous disease caused by *Mycobacterium leprae*, primarily affecting peripheral nerves and skin, characterized by a long incubation period and an unknown transmission mechanism. This case involves a 61-year-old male carpenter with a history of psoriasis who has been experiencing a variety of cumulative symptoms since 2014. These symptoms led him to seek consultation from various healthcare facilities. The symptoms included swelling in the facial region, predominantly in the forehead and ears, deepening of facial folds, loss of eyebrows, leonine facies, skin thickening with rosy discoloration and associated scaly areas, bilateral thickening of ulnar nerves, edema in the upper and lower extremities, and hypoesthesia in lesions. Despite a negative bacilloscopy, a polymerase chain reaction (PCR) test was performed due to high clinical suspicion, which turned positive for *Mycobacterium leprae*, confirming the diagnosis of lepromatous leprosy two years later. This case underscores the importance of enhancing medical knowledge to facilitate early diagnosis of a rare disease.

Keywords: Hansen's Disease, Lepromatous Leprosy, *Mycobacterium leprae*

*Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez", Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo - Zulia, Venezuela.**Universidad Simón Bolívar. Facultad de Ciencias de la Salud. Barranquilla, Colombia. Centro de Investigaciones de Ciencias de la Vida (CICV). Correspondencia: maricarmen.chacing@unisimon.edu.co

Orcid: ¹[0000-0003-1880-8887](https://orcid.org/0000-0003-1880-8887)
²[0000-0002-9263-5665](https://orcid.org/0000-0002-9263-5665)
³[0000-0002-5208-9401](https://orcid.org/0000-0002-5208-9401)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.1-2.8](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.1-2.8)
Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff
Recepción: 11/06/2024
Aprobación: 17/06/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(1y2): 116-125. 2024

Introducción

La enfermedad de Hansen (EH), históricamente conocida como Lepra es una infección granulomatosa crónica causada por *Mycobacterium leprae*, que compromete primariamente la piel y los nervios periféricos. Aproximadamente en el año 600 AC se describieron los primeros casos en la India, sin embargo, la causa se conoce desde 1873, fecha en la que el noruego Gerhard Hansen identificó el bacilo como agente etiológico (Concha y col., 2008).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2021 la prevalencia mundial de la lepra era de 133,802 casos, y en 2022 se notificaron más de 200,000 casos nuevos (Organización Mundial de la Salud, 2016). De éstos, los países con mayor número de casos son Brasil, República Democrática del Congo, Sudan, Bangladesh, India, Indonesia, Myanmar, Nepal, Sri Lanka, China y Filipinas (World Health Organization, 2012). La prevalencia de la Enfermedad de Hansen en Venezuela ha mostrado variaciones a lo largo del tiempo. En 1997, Venezuela alcanzó el nivel de eliminación de la lepra como problema de salud, de acuerdo con el criterio de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que establece una tasa de prevalencia inferior a uno por 10.000 habitantes (Control de la lepra en Venezuela después de más de cinco décadas de desarrollo) (Convit y col., 1999). En el año 2012 fallecieron cinco personas con EH, uno de ellos con Lepra Lepromatosa (LL) (Ministerio del Poder Popular para la Salud, 2012), y durante el año 2011, asistieron a consulta 919 individuos con EH. Según los datos más recientes, en 2021 la prevalencia registrada fue de 705 casos, con 239 nuevos casos detectados ese año. Para el año 2022,

el número de casos de lepra reportados en Venezuela fue de 325, reflejando una tendencia decreciente a lo largo de los años recientes (Ministerio del Poder Popular para la Salud, 2011).

Esencialmente la lepra es una enfermedad de los nervios periféricos, pero también afecta otros órganos como piel, mucosas, ojos, testículos, tracto respiratorio alto, músculos y huesos. Su mecanismo de transmisión es desconocido, pero se cree que la diseminación ocurre por vía respiratoria. El desarrollo de la enfermedad depende de las características inmunológicas del huésped ya que se ha demostrado que solo un 3-5% de la población expuesta a *M. leprae* es susceptible a desarrollar la patología. La respuesta inmunitaria al *M. leprae* varía ampliamente; aquellos con una respuesta celular fuerte suelen desarrollar formas paucibacilares (PB), con pocas lesiones y menos bacilos, mientras que una respuesta humoral dominante, pero ineficaz, lleva a formas multibacilares (MB), caracterizadas por numerosas lesiones y alta carga bacilar (Ramaprasad y col., 1997).

Desde el año 1995 la OMS proporciona gratuitamente a todos los enfermos leproso del mundo el tratamiento multimedicamentoso, logrando que para en el año 2000 la lepra dejará de ser un problema de salud pública (Organización Mundial de la Salud, 2016). A pesar de la disponibilidad del tratamiento, esta enfermedad no ha podido ser erradicada probablemente por su largo periodo de incubación y su cronicidad (Ramaprasad y col., 1997).

Se presenta el caso de un paciente masculino con signos y síntomas cutáneos variados, así como sintomatología en el

área neurológica de evolución prolongada, el cual asistió a diversas consultas, donde su sintomatología fue considerada como patologías aisladas, sin llegar a un diagnóstico definitivo.

Presentación del Caso

Se trata de paciente masculino de 61 años de edad, procedente de la ciudad de Maracaibo, el cual acude al Hospital Coromoto en octubre del 2014 por presentar coloración rosácea de la piel, eritema y edema en región facial por lo cual le indican Prednisona 50 miligramos, por vía oral orden diaria, por 10 días y luego reducir la dosis a 25 miligramos diarios durante 10 días y hasta disminuir la dosis a 5 miligramos diarios por quince días. Se le realizó serología con resultados de complemento C3 236 mg/dL, C4 51 mg/dL, Anticuerpos Antinucleares (ANA); anticuerpos Anti-DNA y Antiestreptolisina negativos, Células Lupus Negativos en Hematología (Tabla I).

Tabla I.
Exámenes complementarios

| Examen | Resultado | Valores de referencia |
|--|-----------|-----------------------|
| Complemento C3 (mg/dL) | 236 | 90-170 |
| Complemento C4 (mg/dL) | 51 | 20-45 |
| ANA | Negativo | |
| Ac. Anti-DNA | Negativo | |
| Antiestreptolisina | Negativo | |
| Células Lupus | Negativo | |
| ANA= Anticuerpos anti-nucleares, Ac= Anticuerpos | | |

En febrero de 2015 regresa por no presentar mejoría del cuadro clínico, aunado a prurito y descamación generalizada de la piel, por lo que se indica una ampolla intramuscular de betametasona dipropionato + betametasona fosfato disódico (Betaduo[®], 2mL) dosis única, Levocetirizina (Glencet[®]) 5 miligramos por vía oral cada 12 horas por 20 días, y duchas con Jabón Bios[®] para piel seca durante dos meses.

En marzo del año 2015, asiste a otro centro asistencial con aumento de volumen en región facial, edema, leve aumento de volumen en pabellón auricular, descamación generalizada de piel, prurito, tos seca y edema generalizado grado II, por lo que se indica como tratamiento una ampolla intramuscular de Fosfato disódico de Betametasona y Acetato de Betametasona (Betagen[®]Solspen, 1mL) dosis única, Prednisona una tableta diaria de 50 miligramos vía oral por 15 días, Fexofenadina (Allegra[®]) una tableta de 120 miligramos cada 12 horas durante un mes, Propionato de Clobetasol al 0,05% (Dermovate[®]) en crema, aplicar todas las noches, y loción hidratante de nuez de macadamia (Cetaphil[®]) aplicar varias veces durante el día. Además, se realiza la toma de biopsia de región lumbosacra donde arrojo como diagnóstico anatomo-patológico: Hallazgos histopatológicos compatibles a psoriasis (Figura 1), por lo que fue tratado con Metotrexate 6 comprimidos de 2,5 miligramos vía oral, ciprofloxacina 500mg vía oral cada 12 horas por 10 días y Levocetirizina (Cenaret[®]) 5 mg vía oral en la noche durante un mes.

El 15 de marzo del año 2016 asiste al Hospital General del Sur Dr. Pedro Iturbe, por presentar un cuadro clínico de aproximadamente 2 años de evolución,



Figura 1. Resultados de biopsia de lesión en piel región lumbosacra

caracterizado por aumento de volumen en región facial de predominio frontal y auricular, acentuación de pliegues faciales, pérdida de las cejas, fascie leonina, engrosamiento cutáneo y coloración rosácea de piel con áreas descamativas asociadas a prurito. Asimismo, presenta engrosamiento de los nervios cubitales bilateral, edema de miembros superiores e inferiores e hipoestesia en lesiones (Figuras 2-4), con tratamiento previo con antialérgicos tipo fexofenadina y esteroides tipo prednisona y betametasona con alivio transitorio de los síntomas.

Con respecto a sus antecedentes, el paciente tiene diagnóstico de psoriasis desde hace aproximadamente un año, sin algún otro antecedente patológico de importancia; es carpintero desde los 14 años de edad, fumador desde los 20 años de edad (10 cigarrillos al día) y consumidor de alcohol. Su vivienda es de techo, paredes y pisos de cemento, 3 habitaciones para 10 personas, con todos los servicios básicos y dos perros de mascotas. Ninguno de sus familiares presenta una sintomatología similar. Refiere un vecino con Enfermedad de Hansen con el cual niega contacto.

Tomando en cuenta los signos y síntomas del paciente sugestivos de Lepra Lepromatosa, el paciente es evaluado en el Ambulatorio "Dr. Francisco Gómez Padrón" diez días previo a su ingreso al hospital, donde se le toman muestra de linfa de oídos, codos, miembros inferiores y moco nasal que arrojan resultado negativo para *Mycobacterium leprae*, por lo que posteriormente se realiza toma de tejido de áreas donde se observa mayor afectación: tejido lóbulo de la oreja izquierda, tejido de lesión de codo derecho e hisopado nasal, para estudio mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) donde arrojo una respuesta positiva para *Mycobacterium leprae*; lo que confirma el diagnóstico de Enfermedad de Hansen o Lepra Lepromatosa. Por lo que se indica el tratamiento con Dapsona + Clofazimina + Rifampicina, a los 10 días de iniciado el tratamiento, el paciente fallece de hemorragia digestiva superior en su hogar (Moschella, 2004).

ANÁLISIS DE ADN

Extracción de ADN

Se reciben tres muestras clínicas identificadas como 1: Tejido lóbulo de la oreja izquierda (LOI), 2: Tejido de lesión de codo derecho (LCD). 3: Hisopo nasal (HN), para investigación de micobacterias del Complejo No Tuberculosis y *Mycobacterium leprae*.

Se hizo extracción de ADN de cada una de las muestras de manera individual. El tejido se sometió a dos lavados con 100 μ l de buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1mM EDTA, pH 8). Después de descartar el sobrenadante se agregó 500 μ L de buffer de lisis (50 mM Tris-Hcl pH 7,5, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 150 μ g/mL de



Figura 2. Fascie leonina. Aumento de volumen facial y pabellón auricular



Figura 3. Onicolisis en miembros superiores e inferiores



Figura 4. Fascie: El antes y después de Lepra Lepromatosa

proteínasa K) y se incubó la muestra a 50°C por 24 horas. El ADN fue purificado mediante extracción con fenol cloroformo, seguido de precipitación con etanol 100%. El ADN se resuspendió en 80 µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1mM EDTA, pH 8). Se utilizó 10 µL de la muestra para ensayos de amplificación (250 ng de ADN total).

EVALUACIÓN POR PCR

Micobacterias del Complejo No *M. tuberculosis*

Se utilizaron ensayos de amplificación especie-específicos para investigar la presencia de secuencias de ADN de Micobacterias del *Complejo No M. tuberculosis*. Se incluyeron oligonucleótidos iniciadores dirigidos a secuencias intergénicas espaciadores transcritas 16S-23S ribosomal DNA (rDNA) específicas de *M. chelonae* (*Mche*), *M. fortuitum*, *M. gordonae* (*Mgor*), *M. scrofulaceum* (*Mscr*), *M. szulgai* (*Mszu*) y complejo *avium intracellulare* (*MAC*) (Park y col., 2000). Como control positivo se incluyó ADN genómico aislado de colonias de cada una de las micobacterias en estudio. Como control negativo se utilizó agua ultrapura estéril (Figura 5).

Mycobacterium leprae

La detección especie-específica de *Mycobacterium leprae* se llevó a cabo mediante reacciones de amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos iniciadores LP1 y LP2 dirigidos a los elementos RLEP descritos previamente (Donoghue y col., 2001), consistente en regiones de repeticiones dispersas (RLEP) de estructura variable distribuidas en el genoma de *M. leprae*.

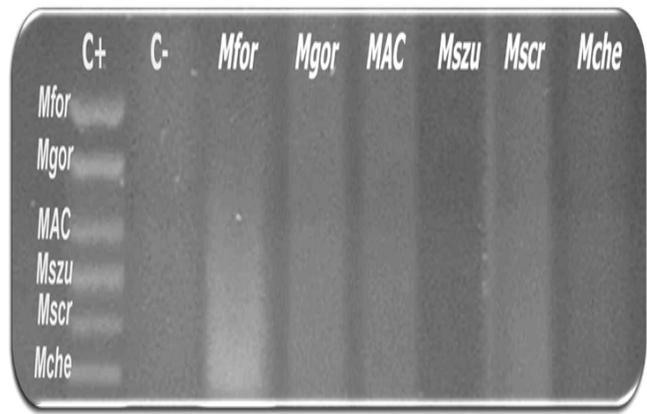


Figura 5. Amplificación de regiones intergénicas 16S-23S ribosomal DNA especie-específicos para detección de micobacterias del *complejo No M. tuberculosis*. Se investiga la presencia de secuencias de ADN de *M. chelonae* (*Mche*), *M. flavescens* (*Mfla*), *M. fortuitum*, *M. gordonae* (*Mgor*), *M. kansasii* (*Mkan*), *M. scrofulaceum* (*Mscr*), *M. szulgai* (*Mszu*) y complejo *avium intracellulare* (*MAC*). C+: control positivo de amplificación utilizando ADN genómico de los microorganismos investigados

Para las reacciones de amplificación se utilizó un volumen final de 50 µl, consistiendo en 5 µl de buffer Taq DNA polimerasa 5X (Promega), 1,5 µM de MgCl₂, 25 µM de cada oligonucleótido iniciador, 200µM cada desoxirribonucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y 1 unidad de Taq DNA polimerasa (Promega). Se utilizó una desnaturalización inicial a 95° por 10 min; seguido de 25 ciclos de 45 seg a 95°C; 45 seg a 58°C y 45 seg a 72°C. El producto amplificado (129 pb) se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % % teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz UV (Figura 6).

Discusión

La Lepra es una enfermedad crónica granulomatosa de baja prevalencia e incidencia a nivel mundial (Organización

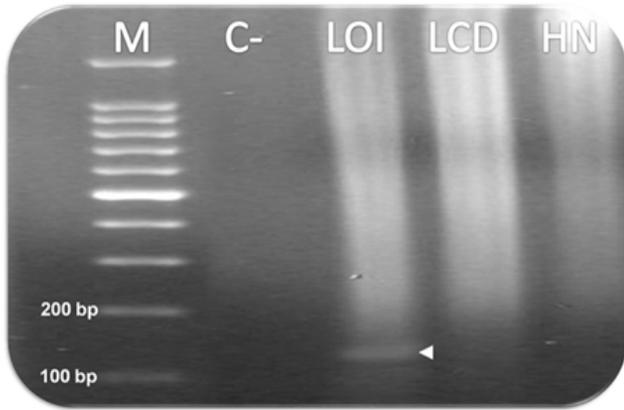


Figura 6. Amplificación especie-específica de regiones RLEP de *M. leprae*. Se muestra resultados de amplificación utilizando ADN aislado de tejidos de *lóbulo de la oreja izquierda (LOI)*, *lesión de codo derecho (LCD)* e *hisopo nasal (HN)*. Con flecha se indica producto obtenido a partir de LOI (129 pb)

Mundial de la Salud, 2016), con un largo periodo de incubación y clínica característica. Su agente etiológico es el *Mycobacterium leprae*, un bacilo ácido-alcohol resistente, intracelular obligado con un tiempo de replicación de 12,5 días en promedio, en correspondencia con su prolongado período de incubación de aproximadamente tres a cinco años (Yoder y col., 2001). Su mecanismo de transmisión es desconocido, se postula que pueda ser por vía aérea; del cual solo el 5% de la población expuesta a *M. leprae* será susceptible a desarrollar la enfermedad.

Dentro de los factores de riesgo se encuentran la presencia de un contacto cercano (domiciliario), el tipo de la lepra con el que se tenga contacto (siendo mayor el riesgo en la lepra multibacilar), el incremento de la edad, y condiciones como hacinamiento, bajo nivel educacional, entre otras (Bakker y col., 2006; Kerr-Pontes y col., 2006). La temperatura óptima para su reproducción está entre 27 y 33 °C, lo que explica su predilección por las áreas más frías del cuerpo como son la piel, los

nervios periféricos y la mucosa de la vía aérea superior (Campbell y col., 1987). Se ubica en los macrófagos de piel donde evita ser digerido para poder multiplicarse hasta que rompe la membrana celular, y en las células de Schwann donde puede permanecer por largo tiempo sin estimular una respuesta inmune (Yoder y col., 2001).

Por otro lado, presenta una disfunción inmunológica compleja y profunda, que facilita la propagación incontrolada del *Mycobacterium leprae* (ML) y provoca manifestaciones clínicas severas. En estos pacientes, se observa una disminución significativa de los linfocitos T cooperadores CD4+ (Th de "helper") tipo Th1, esenciales para combatir patógenos intracelulares como ML. Estas células normalmente producen interferón-gamma (IFN- γ), que activa los macrófagos para destruir las bacterias intracelulares. Sin embargo, en la LL, hay un aumento de las células T reguladoras (Tregs), las cuales son linfocitos T que regulan o suprimen a otras células del sistema inmunitario, suprimiendo esta respuesta, permitiendo que el bacilo prospere. Las células Treg suprimen la activación, proliferación y producción de citocinas por parte de las células T CD4+ y T CD8+ y puede que también a los linfocitos B y células dendríticas. Además, las células dendríticas en pacientes con LL presentan disfunciones que limitan su capacidad de presentar antígenos y activar una respuesta inmunitaria eficaz (Fischer, 2017).

Adicionalmente, la respuesta humoral en LL está alterada, con niveles elevados de anticuerpos IgA e IgE, que no son efectivos contra ML, mientras que los anticuerpos IgG e IgM, importantes para la opsonización y eliminación de bacterias, están disminuidos. Esta ineficacia permite la propagación del bacilo y contribuye al desarrollo de lesiones

cutáneas características, daño a los nervios periféricos y discapacidad asociada con la lepra. Estas disfunciones inmunitarias facilitan la supervivencia del patógeno y exacerbando la morbilidad del paciente, subrayando la necesidad de terapias que modulen el sistema inmunitario para mejorar los resultados clínicos y controlar mejor la enfermedad (Froes y col., 2022)

Existen dos clasificaciones para la lepra: 1) La clasificación de la OMS que divide a los pacientes en dos categorías, considerando el número de lesiones cutáneas: a. paucibacilar (PB) si posee de 1 a 5 lesiones cutáneas y b. multibacilar (MB) si posee más de 5 lesiones cutáneas y la clasificación más utilizada actualmente 2) La de Ridley-Jopling que se basa en el estado clínico, inmunológico e histopatológico del paciente, dividiéndola en 6 categorías: lepra indeterminada, que se considera un estado inicial de la enfermedad y la que con tratamiento puede ser curada fácilmente, dos polos: LL y lepra tuberculoide (LT), un estado intermedio denominado lepra dimorfa o borderline y los casos dimorfos mientras se acercan al polo tuberculoso o lepromatoso serán anteceditos por la palabra *borderline* (BT y BL) (Concha y col., 2008; Eichelmann y col., 2013).

El cuadro clínico de lepra se caracteriza principalmente por lesiones en piel y afectación nerviosa la cual incluye lesión de nervios periféricos como el nervio tibial posterior, cubital, mediano, radial, auricular mayor, facial y peroneo lateral (Concha y col., 2008); además de engrosamiento de los nervios por reacción osteofibrótica ocasionando dolor, pérdidas sensoriales y motoras, lo que puede llevar hipoanestesia, úlceras, deformidades y fracturas (Sehgal y col., 2007; Gargy col., 2010). La LL comienza como máculas simétricas ligeramente

eritematosas y mal definidas, también podemos encontrar lesiones tipo pápulas y nódulos que confluyen, originando una marcada infiltración difusa de la piel que da lugar a la denominada facies leonina y la madarosis, además de la presencia de lesiones simétricas y bilaterales que en etapas tempranas suelen tener apariencia infiltrada y cérea (Eichelmann y col., 2013). Se produce engrosamiento e ictiosis en piernas, y en ocasiones, la piel afectada puede ulcerarse, al no haber formación de granulomas, el compromiso neural es tardío pero generalizado, conservando la función motora (Donoghue y col., 2001; Sehgal y col., 2007). La sospecha diagnóstica de LL en este paciente se establece a través de los hallazgos clínicos y paraclínicos entre los que destaca el aumento de volumen en región facial y auricular, la presencia de pliegues cutáneos, fascie leonina, pérdida de cejas, madarosis e hipoanestesia en lesiones, aunado al tiempo de evolución de la enfermedad.

El diagnóstico de la Lepra es principalmente clínico y así lo demuestra la OMS basándose en tres signos cardinales: 1. Lesiones dermatológicas hipopigmentadas o eritematosas en piel con pérdida de sensibilidad, 2. Engrosamiento de los nervios periféricos, 3. Baciloscopia positiva o bacilos en biopsia; definiendo como Lepra cuando un individuo no ha completado un curso de tratamiento y tiene al menos uno de los signos mencionados previamente (Ramos-e-Silva y col., 2004; Britton y Lockwood, 2004). Asimismo, dentro de estudios complementarios tenemos biopsia de piel con diferentes resultados dentro del polo en que se encuentre la enfermedad, baciloscopia, la cual en este caso, no arrojó resultados concluyentes, por lo que se procedió a efectuar pruebas serológicas

específicamente a la realización de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual es altamente específica y sensible dando positiva para *M. leprae*; entre otras pruebas podemos mencionar los anticuerpos glucolipídico fenólico 1 (PGL-1) (Hatta y col., 1995; Silva y col., 2007).

Recientemente, el tratamiento de la lepra ha experimentado importantes actualizaciones enfocadas en mejorar la efectividad terapéutica y reducir la transmisión. La OMS y el Global Partnership for Zero Leprosy (GPZL) han desarrollado nuevas estrategias para 2024-2026, centradas en interrumpir la transmisión y en un enfoque centrado en los derechos de los pacientes. La terapia multidroga (TMD) sigue siendo fundamental, incluyendo rifampicina, clofazimina y dapsona para la lepra multibacilar, y rifampicina y dapsona para la paucibacilar. Innovaciones como la profilaxis con una dosis única de rifampicina (SDR-PEP) para contactos cercanos han mostrado eficacia en reducir nuevos casos. Además, la OMS está facilitando la implementación de nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas, colaborando con gobiernos y socios internacionales para escalarlas a nivel nacional. Los esfuerzos de investigación priorizan el desarrollo de nuevas terapias y métodos de prevención, alineados con la hoja de ruta de enfermedades tropicales desatendidas (NTD) de la OMS, y se enfocan en comprender mejor la respuesta inmunitaria y su modulación para reducir recaídas. Estas iniciativas integrales buscan no solo tratar la lepra, sino también eliminarla como problema de salud pública, garantizando una atención integral y combatiendo la estigmatización (Kar y Gupta, 2015).

Debido a su baja incidencia y a no ser considerado un problema de salud pública, la LL, una de las formas menos comunes de la lepra, suele ser mal comprendida. Esta falta de conocimiento, junto con la creencia errónea de que la lepra es una enfermedad rara relegada a los libros de historia, y su naturaleza crónica, puede llevar a diagnósticos erróneos. En el caso presentado, hubo un uso excesivo de esteroides y el diagnóstico de LL solo se hizo evidente en etapas avanzadas. Es crucial resaltar que, aunque de baja prevalencia, la lepra sigue presente en nuestro país y en muchos otros. Conocer los factores epidemiológicos asociados y realizar un diagnóstico temprano es fundamental para evitar tratamientos innecesarios que solo incrementan la ansiedad y la desesperanza en los pacientes y sus familiares.

Conflicto de intereses

Los autores no declaran ningún conflicto de interés.

Referencias Bibliográficas

- Bakker MI, Hatta M, Kwenang A, Van Mosseveld P, Faber WR, Klatser PR, Oskam L. 2006. Risk factors for developing leprosy: a population-based cohort study in Indonesia. *Lepr Rev* 77(2): 48-61.
- Britton WJ, Lockwood DN. 2004. Leprosy. *The Lancet* 363:1209-1219.
- Campbell PB, Tolson TA, Yoder L, Loesch J, Krahenbuhl JL. 1987. Lesional modulation of peripheral monocyte leucotactic responsiveness in leprosy. *Clin Exp Immunol* 70(2): 289-297.
- Concha M, Cossio ML, Salazar I, Fich F, Pérez C, González S. 2008. Enfermedad de Hansen: Revisión a propósito de un caso. *Rev Chil Infect* 25 (1): 64-69.
- Convit J, Avilán R, Díaz D, Ulrich M, Quiroga R, Arázazu N, Borges R, Pinardi ME. 1999. Control de la Lepra en Venezuela después de más de cinco décadas de desarrollo. *Revista de Leprología – Fontilles* 22(2): 145-162.

- Donoghue HDJ, Halto M. 2001. Spigelman. PCR primer that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. *J Med Microbiol* 50:177-18.
- Eichelmann K, González González SE, Salas-Alanis JC, Ocampo-Candiani J. 2013. Lepra: puesta al día. Definición, patogénesis, clasificación, diagnóstico y tratamiento *Actas Dermosifiliogr* 104(7):554-563.
- Fischer M. 2017. Leprosy - an overview of clinical features, diagnosis, and treatment. *J Dtsch Dermatol Ges* 15(8):801-827.
- Froes LAR Jr, Trindade MAB, Sotto MN. 2022. Immunology of leprosy. *Int Rev Immunol* 41(2):72-83.
- Garg R, Dehran M. 2010. Leprosy: a precipitating factor for complex regional pain syndrome. *Minerva Anestesiol* 76:758-760.
- Hatta M, van Beers S, Madjid B, Djumadi A, de Wit M, Klatser P. 1995. Distribution and persistence of *Mycobacterium leprae* nasal carriage among a population in which leprosy is endemic in Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89:381-385.
- Kar HK, Gupta R. 2015. Treatment of leprosy. *Clin Dermatol* 33(1):55-65.
- Kerr-Pontes LR, Barreto ML, Evangelista CM, Rodrigues LC, Heukelbach J, Feldmeier H. 2006. Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in North-east Brazil: results of a case-control study. *Int J Epidemiol* 35:994-1000.
- Ministerio del Poder Popular para la Salud. Anuario de Morbilidad 2011, Venezuela.
- Ministerio del Poder Popular para la Salud. Anuario de Mortalidad 2012, Venezuela.
- Moschella SL. 2004. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. *J Am Acad Dermatol* 51:417-426.
- Organización Mundial de la Salud. Lepra. Nota descriptiva. Abril del 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs101/es/>
- Park H, Jang H, Kim C, Chung B, Chang C, Park S, Song S. 2000 Detection and identification of mycobacteria by amplification of the internal transcribed spacer regions with genus-and species-specific PCR primers. *J Clin Microbiol* 38: 4080-4085.
- Ramaprasad P, Fernando A, Madhale S, Rao JR, Edward VK, Samson PD, Klatser PR, de Wit MY, Smith WC, Cree IA. 1997. Transmission and protection in leprosy: indications of the role of mucosal immunity. *Leprosy Rev* 68(4):301-315.
- Ramos-e-Silva M, Ribeiro de Castro M C. 2004. Infecciones por micobacterias. En: *Dermatología*, Bologna J L, Jorizzo J L, Rapini RP, editores. Primera Edición. Madrid, Elsevier España p. 1145-1164.
- Sehgal V, Sardana K, Dogra S. 2007. Management of complications following leprosy: an evolving scenario. *J Dermatolog Treat* 18:366-374.
- Silva E, Iyer A, Ura S, Lauris JR, Naafs B, Das PK, Vilani-Moreno F. 2007. Utility of measuring serum levels of anti-PGL-I antibody, neopterin and C-reactive protein in monitoring leprosy patients during multi-drug treatment and reactions. *Trop Med Int Health* 12:1450-8.
- World Health Organization. 2012. *Weekly Epidemiological Record* 34(87):317-328.
- Yoder L D, Guerra IE. 2001. *Hansen's Disease. A guide to management in the United States*. Hansen's Disease Foundation.



Bioética: Una visión general

Bioethics: An overview

MARÍA MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN

Resumen

La Bioética y el Consentimiento Informado son conceptos estrechamente relacionados. La Bioética se ocupa de los aspectos éticos de la práctica médica y la investigación científica, mientras que el Consentimiento Informado es una manifestación concreta de los principios éticos en la atención médica, que garantiza el respeto a la autonomía y dignidad de las personas. El Consentimiento Informado implica que el paciente reciba información completa y comprensible sobre su diagnóstico, tratamiento o participación en una investigación, incluyendo los beneficios, riesgos y alternativas disponibles. El paciente debe tener la capacidad de comprender la información proporcionada y tomar una decisión informada y voluntaria sobre su atención médica. En el ámbito de la atención médica, el Consentimiento Informado es una expresión tangible del respeto a la autonomía de las personas. Es un proceso mediante el cual el paciente otorga su consentimiento para la realización de un procedimiento médico o quirúrgico, basado en una comprensión adecuada de la información proporcionada por el médico. El Consentimiento Informado es un derecho fundamental de todo paciente y está respaldado por leyes y regulaciones en muchos países. En el contexto de la Bioética, el Consentimiento Informado es especialmente relevante en situaciones en las que se realizan tratamientos experimentales o se llevan a cabo investigaciones científicas con seres humanos.

Palabras clave: Bioética, Consentimiento Informado, no maleficencia, beneficencia, autonomía, justicia

Abstract

Bioethics and informed consent are closely related concepts. Bioethics deals with the ethical aspects of medical practice and scientific research. At the same time, informed consent is a concrete manifestation of ethical principles in medical care, which guarantees respect for the autonomy and dignity of people. Informed consent implies that the patient receives complete and understandable information about their diagnosis, treatment, or participation in research, including the benefits, risks, and available alternatives. The patient must have the ability to understand the information provided and make an informed and voluntary decision about their medical care. In health care, informed consent is a tangible expression of respect for people's autonomy. It is a process by which the patient gives consent for a medical or surgical procedure based on an adequate understanding of the information provided by the doctor. Informed consent is a fundamental right of every patient and is supported by laws and regulations in many countries. In the context of bioethics, informed consent is especially relevant in situations where experimental treatments are carried out, or scientific research is carried out with human beings.

Keywords: Bioethics, Informed Consent, non-maleficence, beneficence, autonomy, justice

Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Correspondencia: mmsalazarb@gmail.com

Orcid: [0000-0002-4439-9856](https://orcid.org/0000-0002-4439-9856)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.1-2.9](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.1-2.9)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 20/06/2024

Aprobación: 25/06/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(1y2): 126-140. 2024

Ética y Bioética

La palabra Ética procede del griego **ethos**, que quiere decir costumbre, hábito, la manera de hacer o adquirir las cosas. La Real Academia Española define ética, en su cuarta acepción, como el “conjunto de normas morales que rigen la conducta de la persona en cualquier ámbito de la vida”. Así, se puede diferenciar entre ética profesional, cívica o deportiva, por ejemplo. **Ethos** hace referencia a la actitud de la persona hacia la vida. Significó una morada; más tarde, en la época de Aristóteles (384-322, A. C.), el término se personalizó para señalar el lugar íntimo, el sitio donde se refugia la persona. Por su parte, la palabra “moral” viene del latín *moralis*, relativo a las costumbres y tiene hasta siete acepciones en el diccionario de la Real Academia Española de la Lengua, siendo la primera de ellas: “Perteneiente o relativo a las acciones de las personas, desde el punto de vista de su obrar en relación con el bien o el mal y en función de su vida individual y, sobre todo, colectiva” (Sánchez, 2022).

Ética y moral se manejan de manera ambivalente. Sin embargo, los dos términos no significan lo mismo, puesto que mientras “la moral tiende a ser particular, la ética tiende a ser universal”. En términos prácticos, podemos aceptar que la ética es la disciplina que se ocupa de la moral, de algo que compete a los actos humanos exclusivamente, y que los califica como buenos o malos, si son libres, voluntarios, conscientes. Así mismo, puede entenderse como el cumplimiento del deber. Es relacionarse con lo que uno debe o no debe hacer.

La moral es el conjunto de valores y normas que llevan al hombre a obrar en relación con el bien y el mal, mientras que

la ética es el estudio, la reflexión, de esas conductas (Sánchez, 2022).

La Ética Médica

La Ética Médica es una disciplina que se ocupa del estudio de los actos médicos desde el punto de vista moral y que los califica como buenos o malos, a condición de que ellos sean voluntarios y conscientes. La ética médica orienta la conducta de los médicos hacia el bien, busca lo correcto, lo ideal y la excelencia. Se considera que este concepto es mucho más amplio, ya que debe adoptarse bajo el enfoque de una medicina integral, es decir en lo físico, mental y social y no solamente en el acto clínico de la relación médico - paciente, tal y como lo ha venido manejando la Bioética. Por lo tanto, la ética médica comprende todos los problemas éticos de las profesiones de la salud, aquellos derivados de la investigación, los problemas sociales de la salud pública y del ambiente (Rubí Salazar, 2010). El término “Actos médicos” hace referencia a aquellos que el profesional de la medicina hace en el desempeño de su profesión: Los actos que lleve a cabo en función de su vida privada, caerán en el campo de la Ética General, la que permite juzgar los actos de cualquier persona.

El neologismo Bioética fue acuñado por Van Rensselaer Potter, destacado bioquímico, investigador en el área de la oncología básica en la Universidad de Wisconsin, quien lo utilizó por primera vez en Estados Unidos en el año 1970, en un artículo publicado en la revista *Perspectives in Biology*. Con este término aludía a los problemas que el desarrollo de la tecnología plantea a un mundo en plena crisis de valores. Potter publicó el libro “Bioética, La Ciencia de la Supervivencia” (*Bioethics*,

The Science of Survival) (Potter, 1970) y un año después publicó el libro "Bioética, Un Puente hacia el Futuro" (*Bioethics, A Bridge to The Future*) (Potter, 1971). En estas dos publicaciones Potter sostenía la necesidad de crear una nueva disciplina que favoreciese la unión entre la Biología y la Ecología con el estudio de los valores de tal manera que estos se constituyeran en el futuro de los humanos (Schmidt, 2008).

Según el diccionario de la Real Academia Española de la Lengua, la Bioética se define como "La aplicación de la ética a las ciencias de la vida". La Bioética surge como un intento de establecer un puente entre la ciencia experimental y las humanidades (Potter, 1971). De ella se espera una formulación de principios que permita afrontar con responsabilidad las posibilidades que hoy ofrece la tecnología (Potter, 1998). Según Reich (1978) la Bioética es el estudio sistemático de la conducta humana en el ámbito de las ciencias de la vida y de la salud, analizada a la luz de los valores y los principios morales humanos. Para comprender cabalmente el alcance de la propuesta de Potter hay que tener presentes las coordenadas culturales en las que surge la Bioética, estas pueden resumirse en: por un lado, la crisis ecológica, que pone de manifiesto la crisis de uno de los aspectos centrales del proyecto moderno - el dominio de la naturaleza- y por otro, la necesidad de superar la separación entre las ciencias de la naturaleza y del espíritu. La Bioética es una nueva disciplina surgida a raíz de los recientes y grandes adelantos científico-tecnológicos y de los cambios operados en la sociedad contemporánea. La Bioética ha pasado a significar más que un campo concreto de la investigación humana en la intersección entre la ética y las ciencias de la vida, es también una disciplina académica,

una fuerza política en la medicina, en la biología y en los estudios del medio ambiente; también significa una perspectiva cultural importante (Wilches Flórez, 2011).

La ética médica, elaborada por la misma profesión, es tan antigua como la medicina misma. La Bioética actual forma parte de una corriente internacional que surge a partir de los años 70s extendiéndose a todos los países. La incorporación de profesionales y elementos sociales de diferente formación a los equipos de trabajo contribuye al enriquecimiento de esta disciplina (Hatton y col., 2008),

La Bioética ha servido para fundamentar éticamente la investigación en los seres humanos, ha contribuido a transformar el modelo paternalista de relación con los pacientes y ha cambiado significativamente la toma de decisiones médicas.

El campo de reflexión Bioética ha llegado a abarcar todo tipo de problemas relacionados con la vida, problemas relacionados con organizaciones sanitarias generando más discusiones sobre la justicia y la distribución de los recursos. También se ha generado una Bioética ambiental o global. Sin embargo, así como la Bioética ha avanzado en cuanto a sus campos de actuación, hay que tener cuidado porque ese mismo desarrollo ha llevado a la proliferación de libros, folletos, charlas, simposios, conferencias, programas de opinión, entre otros, que no necesariamente contribuyen al desarrollo de la Bioética, sino que más bien pueden crear confusión.

¿Por qué estudiar la Bioética?

Muchos profesionales de la salud desean encontrar una solución adecuada

a los dilemas éticos que se plantean en la práctica clínica. Estos dilemas también se plantean en los Comités de Bioética, en la docencia de pre o postgrado en ciencias de la salud o en disciplinas como el derecho, la política, en los asuntos ambientales, en la gestión, en el periodismo científico, o en el contexto de trabajos de investigación con seres humanos.

El objetivo de la Bioética es educar y buscar la transformación del hombre para el ejercicio del bien como resultado de una acción reflexiva, consciente y responsable. Su finalidad es elaborar un pensamiento fundamentado en la ética, que responda a deliberaciones sustentadas en la razón, a fin de ofrecer criterios éticos a la hora de tomar decisiones que afecten a la vida. En el caso que en los procesos de investigación ocurran daños a personas, animales u otros organismos vivos y al ambiente, serán aplicadas las leyes penales vinculadas a esos delitos, vigentes en el país. El esfuerzo mayor en Bioética debe ir dirigido a la formación de un criterio moral asumido desde la responsabilidad (Beauchamp y Childress, 2011).

La Bioética apareció en una época en que la filosofía moral tradicional y la deontología clásica de las profesiones habían mostrado sus limitaciones y su falta de relevancia para resolver los nuevos problemas causados por el desarrollo de la ciencia y la tecnología.

Principios de la Bioética

El principio bioético más elemental y sobre el que se basan los enumerados anteriormente es el "respeto a la dignidad de la persona" basado en un enfoque

integral y humanista de la asistencia sanitaria. En cuanto a las características de la Bioética Beauchamp y Childress (2011) distinguen cuatro principios: no maleficencia, beneficencia, autonomía y justicia, que son fundamentales en la relación de la persona con el ambiente que lo rodea, particularmente el ambiente médico. Los cuatro principios de la Bioética han sido definidos así:

Autonomía - respeto por el individuo y su capacidad para tomar decisiones acerca de su propia salud y su futuro. Las acciones que incrementan la autonomía se consideran deseables y las que la disminuyen se consideran indeseables.

Beneficencia - acciones entendidas para beneficiar al paciente u otras personas

No maleficencia - acciones entendidas para no causar daño al paciente o a otras personas

Justicia - siendo justo con toda la comunidad en términos de la consecuencia de una acción

En el campo de la Bioética se considera la **confidencialidad** como un derecho del individuo a mantener su información personal de manera reservada y poder decidir en qué momento y a qué tipo de personas debe ser revelada esta información y lo más importante qué tipo de información se está dispuesto a revelar. La confidencialidad es la garantía que la información personal será protegida para que no sea divulgada sin consentimiento de la persona. Dicha garantía se lleva a cabo por medio de un grupo de reglas que limitan el acceso a esta información. La confidencialidad no es un principio por sí misma, sino que está ligada a varios

principios bioéticos. La confidencialidad muestra respeto por la autonomía del individuo y su derecho a controlar la información relacionada con su salud. Supone la cesión del paciente de una parte reservada de sí mismo y los principios éticos de autonomía y no maleficencia están íntimamente ligados con su preservación. Al mantener en secreto la información acerca de la salud del paciente, el médico está actuando con **beneficencia**. Revelar la información sin el consentimiento del paciente puede ser dañino. Si un médico fuera a revelar a terceros información privilegiada acerca de la enfermedad de un paciente, sería **maleficencia**. Mantener la confidencialidad puede representar la no maleficencia. La **no maleficencia** se refiere a no producir daño al sujeto u objeto de la intervención (Código de Bioética y Bioseguridad, 2002, 2008).

Aspectos bioéticos de la investigación en humanos

La Bioética favorece el cambio adecuado en los comportamientos y actitudes que obligan a médicos y otros integrantes del equipo de salud a promover una relación médico-paciente más saludable, amén de permitir generar cambios en los modelos de salud cuya prioridad es ofrecer el mejor servicio a los pacientes. Toda investigación o experimentación realizada entre seres humanos debe hacerse de acuerdo con tres principios éticos básicos: Respeto a las personas, la búsqueda del bien y la justicia. La búsqueda del bien consiste en lograr los máximos beneficios y de reducir al mínimo el daño y la equivocación. La Bioética en la investigación en humanos es uno de los aspectos más tratados cuando de Bioética se habla o se escribe. La Bioética

en la investigación también es conocida como Bioética clínica. La importancia de la Bioética en la investigación radica en garantizar el respeto por la dignidad y los derechos de los seres humanos y los animales utilizados en los estudios, así como en promover la integridad científica y la confianza pública en la investigación (Sánchez González, 2013). Para ello se busca la aplicación de los principios básicos de la Bioética a la investigación en humanos (El Informe Belmont, 1979). La Bioética regula situaciones éticas frente a la vulnerabilidad de la autonomía y confidencialidad de los seres humanos que participan en una investigación, así como el uso adecuado de las muestras biológicas con fines de investigación y la aplicación de metodologías que no vulneren los principios bioéticos, a saber:

La Autonomía: Principio reconocido internacionalmente como una consecuencia del progreso moral de la humanidad. El reconocimiento del derecho a la vida, la dignidad y demás valores que han enaltecido al hombre como responsable de su existencia ha determinado un nuevo principio referido a la potestad humana para tomar decisiones en torno a su vida personal, por ser racional y consciente, por poder distinguir entre el bien y el mal y orientar sus acciones para conseguir lo que desea. De esta manera se adoptan los siguientes criterios relacionados con la autonomía: a. La dignidad de la persona es un valor extensivo a su integridad física y psicológica, cuyo respeto trasciende los fines de la investigación; b. La investigación con humanos sólo podrá realizarse con el consentimiento previo y libre de la persona, y deberá estar basado en información suficiente y veraz. En el caso de personas no aptas para consentir es necesario obtener

el consentimiento de sus representantes habilitados.

La Beneficencia: La experimentación en organismos vivos y su ambiente sólo podrá realizarse legítimamente para mejorar la calidad de vida de los sujetos de estudio y de la sociedad presente y futura, en proporción con el riesgo calculado. En la investigación clínica, el propósito debe ser mejorar los procedimientos diagnósticos, terapéuticos y preventivos, y la comprensión de la etiología y la génesis de la enfermedad.

No maleficencia: Todo proyecto de investigación debe ser precedido por una valoración cuidadosa de los riesgos predecibles para cualquier organismo vivo y el ambiente, frente a los posibles beneficios que se espera obtener. Es inaceptable que se realicen proyectos de investigación cuando se presuma la posibilidad de riesgos que no puedan ser asumidos a la luz del conocimiento existente. Igualmente, se debe interrumpir cualquier experimento cuando se compruebe que los riesgos son mayores que los posibles beneficios. En la investigación clínica y en la experimentación con humanos y animales se debe respetar una prudente proporción entre el riesgo implícito probable y el beneficio para el sujeto que es objeto de la intervención o manipulación.

La Justicia: La investigación se concreta en darle a cada uno lo que le corresponde; determina la necesidad de no establecer discriminaciones originadas por motivos de cualquier índole, ya sea política, religiosa, racial, económica, social, institucional o cualquier otra; debe practicarse la imparcialidad y equidad con todos los organismos vivos y su ambiente. El bien de la persona debe entenderse evitando dos

extremos: el de un supuesto poder ilimitado del individuo sobre sí mismo (moralmente no es legítima la decisión libre de un sujeto que tenga como consecuencia el sacrificio de su dignidad) y el de la sumisión del individuo a los dictámenes de interés colectivo o institucionales.

Dos casos que ilustran el ¿Porqué la Bioética?

Los dos casos que se presentan a continuación son parte del inicio de la justificación de la Bioética como una disciplina que relaciona los seres humanos y las actividades, aun no entendidas para el momento, influenciadas por la tecnología emergente.

EL CASO TUSKEGEE (1932-1972)

Este caso es considerado como relevante al contribuir con el origen de la Bioética. En 1932 la sífilis era una epidemia preponderante en las comunidades rurales del sur de Estados Unidos. Consecuentemente, las autoridades crean un programa especial de tratamiento para esta enfermedad en el Hospital de Tuskegee, el único hospital para personas de raza negra que existía hasta entonces. Debido a esto, la sección de enfermedades venéreas del PHS (Servicio Público de Salud) de los Estados Unidos, decide llevar a cabo un estudio sobre la evolución de la sífilis (1932-1972). Debido a que la sífilis estaba haciendo estragos en la población sureña de los Estados Unidos de Norte América, a través del Instituto Médico de la Universidad de Alabama junto con el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos se inició un estudio de esta enfermedad conocido como *The Tuskegee Study of*

Untreated Syphilis. El proyecto comenzó en 1932 y su objetivo fue determinar, mediante autopsia, los efectos de la sífilis en el organismo. Fueron seleccionados cuatrocientos varones de raza negra de escasos recursos infectados con sífilis, y doscientos hombres de raza negra sanos, como grupo control. Su objetivo principal, era comparar la salud y longevidad de la población sifilítica no tratada, con el grupo control, y así observar su evolución. A los sujetos seleccionados para el estudio y que estaban enfermos no se les trató su enfermedad, sin embargo, se les ofrecieron algunas ventajas materiales, entre ellas que recibirían alimentación gratuita y apoyo para gastos funerarios. Además, no se les informó acerca de la naturaleza de su enfermedad y sólo se les dijo que tenían la sangre mala. A veces, se suministraba solo aspirina, pues querían determinar si la sífilis producía efectos diferentes entre blancos y negros. Al final, 128 pacientes fallecieron con ceguera, parálisis, tumores y locura; 40 de las esposas de estos pacientes fueron infectadas y 19 niños nacieron con sífilis congénita. Al comienzo del estudio, la penicilina no estaba disponible, pero en 1947 ya era un recurso ampliamente empleado para el tratamiento de la sífilis. Aun así, los pacientes que participaron en el estudio fueron privados del tratamiento con antibióticos. Más tarde se demostraría que sin el antibiótico la esperanza de vida de la persona infectada se reducía en un 20%. Por supuesto, aun no se hablaba de la Bioética y menos del Consentimiento Informado (Reverby, 2001; Brandt, 1978). La investigación continuó sin cambios sustanciales y se publicaron trece artículos en revistas médicas hasta que, en 1972, el periodista J. Heller publicó un artículo sobre este estudio en el New York Times, momento en el que comenzó la polémica

sobre la ética de la experimentación en sujetos humanos, y producto de la controversia se vieron obligados a finiquitar la investigación. La justificación que dieron los investigadores fue que no hacían más que observar el curso natural de la enfermedad, sin ocasionar daño alguno. Los sucesos citados condujeron a la elaboración del Informe Belmont (1979), y al establecimiento del Consejo Nacional para la Investigación Humana y los consejos Institucionales de Revisión de Protocolos de Investigación.

ESTUDIO DE WILLOWBROOK O ESCUELA DE NIÑOS CON DEBILIDAD MENTAL (1967)

En el período de 1950 a 1970 se realizó una investigación conocida como el Estudio de Willowbrook. En éste, se analizó un grupo de niños con retraso mental, que estudiaban con régimen de internado en la Escuela Estatal de Willowbrook, en Staten Island en Nueva York, y que presentaban una alta incidencia de hepatitis. Se decidió estudiar el curso natural de la enfermedad sin tratamiento alguno. De manera preferencial, en la escuela se aceptaban niños con retraso mental portadores de hepatitis y una exigencia para la admisión a esta institución, que tenía cupos limitados, era que los padres o representantes dieran su consentimiento para realizar la investigación en sus hijos. Este estudio trataba de determinar el período de infectividad de las hepatitis infecciosas. En esta institución se daba de forma endémica una variedad poco agresiva de hepatitis, se llevó a cabo una inducción artificial de la enfermedad y cientos de niños fueron inoculados para que contrajeran la hepatitis. Los padres dieron su consentimiento para la inyección intramuscular del virus, pero

no se les informó nada acerca de los considerables riesgos que se correrían con ello (Simón-Lorda y col., 2014).

Durante el desarrollo de este estudio tampoco existía la Bioética y ni se hablaba sobre el Consentimiento Informado, que en el caso de menores debían dar los representantes para una intervención médica. Los experimentos con los virus de la hepatitis, en los menores con discapacidad mental de la Escuela Pública de Willowbrook en Nueva York, constituyen uno de los casos cuyo debate fue crucial para el desarrollo de la ética de la investigación moderna y para el florecimiento de la ética en salud pública. La cuestión de la legitimidad ética de la investigación con menores, el presunto beneficio obtenido con los experimentos, el papel del consentimiento paterno y su grado de libertad, el hecho del contagio deliberado de la enfermedad y el contexto de hacinamiento y discriminación en el que se realizaron las investigaciones fueron elementos claves del debate (Simón-Lorda y col., 2014).

El Consentimiento Informado

De acuerdo con los principios de la Bioética es necesario entender su relación con el *Consentimiento Informado*. La importancia para la salud de los pacientes y de los sujetos de investigación se establece en el *Consentimiento Informado*, un acto por el cual el médico describe al paciente, de la manera más clara posible, el estado de salud y el procedimiento a seguir, detallando los beneficios y riesgos que ello implique.

El *Consentimiento Informado* es un término que traduce un derecho del

paciente. Su principal objetivo, y tal vez el único, es proteger la autonomía del paciente, principio que ya fue definido. El *Consentimiento Informado* es una exigencia ética y un derecho reconocido por la legislación de los diferentes países donde la Bioética es conocida y desarrollada como elemento importante de la vida. Es una forma distinta de resolver el problema de quien toma las decisiones ya que hasta ahora las decisiones médicas habían dependido del criterio exclusivo del médico (Simón-Lorda y col., 2012).

El Consentimiento Informado tiene sus raíces legales en 1947 con el Código de Núremberg, a través del cual se juzgó a un grupo de médicos acusados de realizar experimentos caracterizados como crímenes en contra de la humanidad, cometidos contra prisioneros de guerra en campos de concentración nazis durante la Segunda Guerra Mundial, los cuales se realizaban sin información o consentimiento sobre los riesgos a los que se enfrentaban las víctimas. En relación con el Consentimiento Informado como manifestación del respeto a la autonomía del paciente, hay que hacer referencia al Documento de Voluntad Anticipada o testamento vital o Living Will, directrices anticipadas o *advance directives*. Aparece en Estados Unidos a partir de la sentencia dictada en 1957 por el Tribunal Supremo de California en el caso *Salgo vs. Leland Stanford Jr. University Board of Trustees*, en el que se declaró la "obligación de indemnizar cuando se traspasaban los límites del consentimiento otorgado por el paciente o bien se ocultaba una prohibición suya"; el caso consistía en un enfermo, Martín Salgo, con arteriosclerosis al que se le practicó una aortografía traslumbar sin su consentimiento y sufrió

una parálisis permanente, por lo que demandó a su médico por negligencia. La Corte encontró que el médico tenía el deber de revelar al paciente todo aquello que le hubiera permitido dar su consentimiento inteligente en el momento que se le propuso el procedimiento. Desde entonces comenzó a contemplarse la posibilidad de que el Consentimiento Informado fuera considerado como un derecho del paciente. Así, del campo jurídico pasó al campo de la ética médica.

Un paso más en el desarrollo de la doctrina del Consentimiento Informado se dio en 1969 en los Estados Unidos, con el juicio *Nantasen versus Kline*. Después de una mastectomía, la señora Kline fue sometida a terapia con cobalto, sufriendo una profunda y extensa quemadura en el hemitórax izquierdo, lo cual no le había sido advertido por su médico. En este caso, el médico, actuando de buena fe y buscando el beneficio para su paciente, violó la autodeterminación de ésta.

El Consentimiento Informado ha llegado a convertirse en un derecho humano individual que debe añadirse a la lista clásica, junto al derecho a la vida, a la salud, a la libertad y a la propiedad, el derecho a la intimidad y a morir con dignidad. Todos estos derechos están fundamentados en la autonomía y es el elemento central de la relación con el paciente en la asistencia médica o en los proyectos de investigación.

¿Es el Consentimiento Informado un punto aislado de los conceptos o principios bioéticos? ¿Qué relación hay entre los principios de la Bioética y el *Consentimiento Informado* escrito?

El Consentimiento Informado constituye el resultado tangible de esta nueva forma

de relación clínica, en donde se plasman claramente los cuatro principios de la Bioética principista, a saber; autonomía, beneficencia, justicia y no maleficencia. Estos principios necesitan estar presentes, porque la toma de decisiones no quedará a merced exclusiva del paciente bajo la premisa de un modelo autonomista de relación clínica, sino que ahora se requiere que aquellas sean tomadas conjuntamente por sus protagonistas, en donde, por un lado, el paciente aportará sus preferencias y valores en base al ejercicio de su autonomía, en tanto el profesional aportará la técnica y el conocimiento en busca de la beneficencia, y juntos determinarán el mejor actuar. Por su parte, los principios de no maleficencia y justicia constituirían el marco que determina las limitaciones en el abanico de decisiones a tomar.

El Consentimiento Informado significa que a los pacientes se les debe proporcionar información importante, como los riesgos y beneficios posibles de un procedimiento o tratamiento médico, una prueba genética o un ensayo clínico, con el fin de que pueda tomar una decisión informada acerca de su participación. La naturaleza de los tratamientos debe ser informada en el lenguaje que el paciente pueda entender. El Consentimiento Informado es un proceso en curso, el paciente puede entrar en un estudio y continuará hasta que reciba una información sobre el tratamiento que afectaría su deseo de continuar en el mismo. El Consentimiento Informado incluye la comprensión y el deseo de participar en el estudio o someterse a un procedimiento y no de firmar una planilla. Los posibles participantes en un proyecto de investigación deben entender el propósito, los procedimientos, los riesgos y beneficios potenciales de su

participación, y las alternativas a la misma. Mientras el documento da esta información, el paciente o el participante debe tener la oportunidad de discutir cualquier pregunta con un miembro experto del equipo de investigación (Donoso y Plana, 2014).

El Consentimiento Informado consta de dos partes:

a. *Derecho a la información*: la información brindada al paciente debe ser clara, veraz, suficiente, oportuna y objetiva acerca de todo lo relativo al proceso de atención, principalmente el diagnóstico, tratamiento y pronóstico del padecimiento. De la misma manera es importante dar a conocer los riesgos, los beneficios físicos o emocionales, la duración y las alternativas, si las hubiera.

El proceso incluye comprobar si el paciente ha entendido la información, propiciar que realice preguntas, dar respuesta a éstas y asesorar en caso de que sea solicitado.

Los datos deben darse a personas *competentes* en términos legales, edad y capacidad mental. En el caso de personas *incompetentes* por limitaciones en la conciencia, raciocinio o inteligencia; es necesario conseguir la autorización de un representante legal. Sin embargo, siempre que sea posible, es deseable tener el asentimiento del paciente.

b. *Libertad de elección*: después de haber sido informado adecuadamente, el paciente tiene la posibilidad de otorgar o no el consentimiento, para que se lleven a cabo los procedimientos. Es importante privilegiar la autonomía y establecer las condiciones necesarias para que se ejerza el derecho a decidir. Cuando se trata

de un procedimiento de riesgo mayor al mínimo, el consentimiento debe ser expresado y comprobado por escrito, mediante un formulario firmado y será parte del expediente clínico (Guía Nacional para la Integración y el Funcionamiento de los Comités de Hospitalarios de Bioética. Comisión Nacional de Bioética. Secretaría de Salud, 2010).

Las situaciones en que se requiere el Consentimiento Informado escrito son las siguientes:

- Hospitalización en pacientes psiquiátricos, por mandato judicial, urgencia, peligro de quienes viven con él y riesgo de suicidio, entre otros.
- Intervención quirúrgica.
- Procedimientos para el control de la fertilidad.
- Participación en protocolos de investigación.
- Procedimientos diagnósticos o terapéuticos que impliquen riesgos físicos, emocionales o morales.
- Procedimientos invasivos.
- Procedimientos que produzcan dolor físico o emocional.
- Procedimientos socialmente invasivos y que provoquen exclusión o estigmatización.

En los casos de urgencias en los que no existe la oportunidad de hablar con los familiares, y tampoco es posible obtener la autorización del paciente, el médico puede actuar por medio del *privilegio terapéutico*

hasta estabilizarlo y entonces poder informarle al paciente o a sus familiares. Esto debe quedar bien fundamentado en el expediente clínico. No debe llevarse a cabo un procedimiento en contra de la voluntad de un paciente competente, aun cuando la familia lo autorice.

El Consentimiento Informado deberá contener los siguientes elementos:

1. *Título del proyecto* y aclarar que se trata de una investigación.
2. *Identificación de los investigadores y de las instituciones participantes.* Se debe incluir una sección que contenga el nombre, y número telefónico de los investigadores, así como las instituciones a las que están adscritos. En esta sección debe indicarse el nombre del investigador a quien el participante puede consultar en caso de dudas o de que se presenten efectos adversos o complicaciones, así como su número telefónico y los horarios en los que lo puede localizar. También deberá incluir el nombre, el teléfono y horario del presidente del comité de ética para cualquier duda del participante acerca de sus derechos y su participación en la investigación.
3. *Un resumen del protocolo de investigación.* Este deber ser sucinto y escrito en un lenguaje accesible al candidato y deberá contener los siguientes puntos:

a) Propósito del estudio. En esta sección se debe asentar claramente el propósito científico de la investigación, los objetivos y los antecedentes importantes que avalan la investigación.

b) Tipo de proyecto. El candidato debe ser informado acerca de la naturaleza del proyecto para el cual se pide su participación. Se debe señalar el tipo de investigación, si se trata de estudios piloto, toxicológicos o terapéuticos.

c) Metodología. En esta sección se explicarán los procedimientos a seguir y la duración de estos; así como la participación del individuo de estudio. En esta sección se explicará a los participantes si los procedimientos son de tipo experimental o de uso clínico corriente.

d) Riesgos potenciales y posibles molestias del estudio. En esta sección se informará al candidato de los riesgos y molestias que podrían presentarse durante el estudio y de las medidas que se tomaran para minimizarlos o eliminarlos.

e) Posibles beneficios. Debe señalarse si hay beneficios directos posibles para el participante. Por ejemplo, en el caso de maniobras terapéuticas si serán beneficiosas o no. El beneficio potencial no debe ser exagerado y debe señalarse si es al nivel individual o colectivo y si el estudio contribuirá al avance de la ciencia.

En ningún caso, el avance de la ciencia es un beneficio/incentivo por encima del interés de los participantes. En algunos casos es necesario aclarar que no habrá beneficios directos para él, pero que probablemente en el futuro se pueda ayudar a otras personas con su padecimiento.

f) El uso del placebo está en debate, sin embargo, si hubiese casos en los que se fuera a utilizar, es necesario aclarar con detalle y cuidado lo que significa el placebo y los criterios de selección; utilizando un lenguaje sencillo y accesible.

g) Procedimientos alternativos a los propuestos en el proyecto. Cuando el proyecto incluya medidas terapéuticas, el participante debe ser informado del tratamiento alternativo, específicamente debe indicársele cuál es el tratamiento de elección vigente. Así mismo, debe señalarse qué consecuencias acarrearía su participación en el proyecto de investigación para su enfermedad.

h) Manejo de la información obtenida. En esta sección se debe informar al participante que la información obtenida no será divulgada sin su permiso por escrito, que cuando sea pertinente de acuerdo con el proyecto no se compartirá con pares, pareja, padres, empleadores, entre otros que, en caso de generarse grabaciones, se destruirán al terminar el estudio, entre otros asuntos.

i) Participación y abandono del proyecto. Debe ser asentado que la participación en la investigación es completamente voluntaria y que el candidato puede retirarse del estudio en el momento que así lo desee. Debe señalarse que la negativa a participar o retirarse del estudio no le perjudicará. También debe ser informado que el investigador responsable podría dar por terminada su participación en el estudio cuando las circunstancias así lo ameriten, por ejemplo, si surgieran eventos adversos durante el curso del estudio.

j) Reparación de daño o compensación. Debe estar asentado que el investigador responsable se asegure la existencia de mecanismos y montos disponibles para, en su caso, la reparación de daño y compensación. (https://www.uv.mx/psicologia/files/2017/12/la_carta_del_consentimiento_informado.pdf)

La Hoja de Información al Paciente

La hoja de información al paciente y Consentimiento Informado (HIP/CI) es un documento que debe contener la información necesaria y suficiente para que las personas a las que se propone la participación en una investigación puedan consentir de manera autónoma e independiente. La exigencia de información deberá apuntar no sólo al diagnóstico, sino que también: al pronóstico, a las alternativas del tratamiento, a sus posibles complicaciones, e incluso, al carácter de adecuados o no de los medios con que se cuenta para realizar la respectiva intervención médica. Debe estar escrita en un lenguaje sencillo y accesible, sin tecnicismos excesivos. Las personas participantes deben tener el tiempo necesario para reflexionar y consultar con amigos o familiares antes de tomar una decisión. Si la persona interesada decide participar, deberá firmar el Consentimiento informado, al igual que el investigador responsable y un testigo.

Certificación del Consentimiento

El Consentimiento Informado es el documento en que se plasma un proceso fundamental en toda investigación científica con humanos. Durante este proceso, se informa apropiadamente al sujeto acerca de los posibles riesgos y beneficios personales, así como de la relevancia científica de la investigación. Consta de la Hoja de las Firmas, si es que la persona acuerda participar en el estudio. Esta Hoja debe ir firmada por el Paciente o Participante, el investigador y un testigo.

Debe entregarse al paciente una copia de todo el Consentimiento Informado.

Los principios de la Bioética y el Consentimiento Informado

La relación entre los principios de la Bioética y el Consentimiento Informado es sumamente importante, por eso se hace necesario la comprensión de lo que significa el Consentimiento Informado a la luz de la evolución de la relación médico-paciente o participante en una investigación. Por eso también es sumamente importante la enseñanza de la Bioética en los diferentes niveles académicos de todas aquellas disciplinas que tienen relación con la Bioética.

Habitualmente, se indica a la autonomía como el soporte del nuevo modelo de relación clínica, como la forma operativa de ésta. Beauchamp y Childress (2011) definen el principio de autonomía como "la obligación de respetar los valores y opciones personales de cada individuo en aquellas decisiones básicas que le atañen de forma vital. Supone incluso el derecho a equivocarse a la hora de hacer uno mismo su propia elección".

Por su parte, el informe Belmont, fue redactado por la Comisión Nacional para La Protección de los Sujetos Humanos de la Investigación Biomédica y Conductual, 1979 (*National Commission for the Protection of Human Subjects of Biomedical and Behavioral Research, 1979*), y parte de una concepción del ser humano como agente autónomo, esto es, "individuo capaz de deliberar sobre sus objetivos personales y actuar bajo la dirección de esta deliberación". Este mismo informe señala que el principio de respeto a las personas se

divide en 2 prerequisites morales: el que reconoce la autonomía y el que requiere la protección de aquellos cuya autonomía está disminuida.

Los tiempos actuales exigen superar aquella perspectiva donde el enfermo es visto como un sujeto incapaz (obviamente aquí se excluyen todas aquellas condiciones clínicas en las cuales hay problemas con la competencia del enfermo efectivamente y las decisiones de éste deben ser asumidas por alguien que sea responsable por el enfermo). En caso de que este sea un interlocutor válido y responsable de sus acciones, debe tomar sus propias decisiones ya que es imposible establecer derechos y deberes sin autonomía porque, "solamente si las personas pueden elegir sus conductas podemos calificarlas y juzgarlas".

En el momento actual parece que hemos acabado convenciéndonos de que el principio de autonomía es igual a Consentimiento Informado. No es así, el Consentimiento Informado no representa a la autonomía sino más bien es una consecuencia de ella. En Medicina, la autonomía expresa un derecho, el derecho a definir lo que es salud y lo que es una necesidad de salud. Se trata de un derecho humano. Este derecho va acompañado de los deberes que imponen la beneficencia, la no maleficencia y la justicia por parte del profesional.

La autonomía tiene que estar presente para que la beneficencia se manifieste correctamente, porque la salud y la enfermedad, la vida y la muerte, no son sólo hechos médicos o biológicos, sino que son hechos cargados de valores. Hoy en día en Medicina y en la vida diaria se les da una gran importancia a los valores ya que en caso contrario la medicina podrá

ser técnicamente muy correcta, pero probablemente no está cumpliendo con los principios de la Bioética.

Desde siempre los médicos han propendido a la beneficencia para con los enfermos, eso no ha cambiado con la instauración de este nuevo modelo de relación clínica, lo que ha cambiado es la forma como ésta debe ser buscada. Desde Hipócrates hasta hoy la medicina ha tenido un norte, la beneficencia de los pacientes, sin tomar en consideración la omnipresencia del paternalismo médico. Hay que tomar en cuenta que beneficencia sin autonomía es paternalismo y se debe evitar.

Hoy en día se continúa exigiendo como meta del quehacer sanitario la beneficencia de las personas que buscan ayuda médica, pero en la persecución de la beneficencia se exige tener en cuenta lo que el paciente entiende por tal. Si bien en la mayoría de los casos las decisiones de los pacientes pueden concordar con lo que indica la técnica y la literatura, en otras situaciones la realidad será diferente, especialmente cuando la enfermedad es inmanejable y ha generado una búsqueda de sentido. Para los pacientes la enfermedad no sólo constituye un problema orgánico, sino que también es una crisis espiritual, entendiendo lo espiritual "como el conjunto de aspiraciones, convicciones, valores y creencias que permiten a cada persona orientar sus proyectos de vida".

Es necesario cambiar el rumbo y dejar de ver el Consentimiento Informado como un obstáculo más que sortear, y comenzar a entenderlo como la manera operativa de esta nueva forma de relación clínica,

la cual permanecerá en el tiempo. En consecuencia, "lo que debe hacerse será el resultado de la ponderación prudente de las obligaciones derivadas del respeto a la autonomía y a la beneficencia, en un marco preestablecido por la no maleficencia y la justicia"

Como conclusión a esta aproximación a la Bioética podemos destacar que el Consentimiento Informado es un derecho reconocido por las leyes de muchos países y, por encima de todo, es un valor moral porque se deriva de principios éticos básicos y puede tener consecuencias muy beneficiosas. El Consentimiento Informado debe dejar de tomarse como algo molesto o una amenaza para el profesional de la salud, puede tomarse como una oportunidad para una relación más plena con los enfermos o con los sujetos de investigación clínica. También debe pensarse como una posibilidad de satisfacer las necesidades de los pacientes, además de saber y tener la oportunidad de decidir.

El conocimiento de la Bioética es fundamental en la formación del profesional, como se dijo antes, en los diferentes niveles académicos, en todos los ambientes como se presume hoy, pero es particularmente importante en la Bioética Clínica por lo que ello implica para la salud y el desarrollo de la humanidad. La formación en Bioética forma parte de la competencia del profesional de la salud; es por este motivo que un objetivo fundamental es proporcionar elementos de juicio y de reflexión a los futuros profesionales para comprender los debates en Bioética que se producen en el contexto sanitario y social.

Referencias Bibliográficas

- Beauchamp TL, Childress JF. 2011. Principios de Ética Biomédica. *Bioética & Debat* 17(64): 1-7.
- Brandt AM. 1978. Racism and Research: The Case of the Tuskegee Syphilis Study. *Hastings Center Report* 8: 21-29.
- Código de Bioética y Bioseguridad. 2002. Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias. Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. 2da. Edición.
- Código de Bioética y Bioseguridad. 2008. Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias. Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. 3ª. Edición. Disponible: http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/49316/codigo_bioetica_bioseguridad_fonacit.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Donoso SC, Plana ZS. 2014. Principios Bioéticos involucrados en el Consentimiento Informado. *Int J Med Surg Sci* 1(1): 94-99.
- El Informe Belmont. 1979. Principios éticos y orientaciones para la protección de sujetos humanos en la experimentación. Observatori de Bioètica i Dret. Parc Científic de Barcelona. Disponible: <https://www.bioeticayderecho.ub.edu/archivos/norm/InformeBelmont.pdf>
- Guía Nacional para la Integración y el Funcionamiento de los Comités de Hospitalarios de Bioética. 2010. Comisión Nacional de Bioética. Secretaría de Salud. Disponible: https://www.conbioetica-mexico.salud.gob.mx/interior/temasgeneral/consentimiento_informado.html
- Hatton RC, Chavez ML, Jackson E, Maurey J, Barriere SL, Couchenour R, Evens RP, Gunning K, Hume AL, Hutchison LC, Matzke GR, Noviasky JA, Rospond RM, Kelloway JS, Stevenson JG, Vanderveen RP, Verme-Gibboney CN, Walters D. 2008. Pharmacists and industry: guidelines for ethical interactions. *American College of Clinical Pharmacy. Pharmacotherapy* 28(3):410-420.
- Potter VR. 1970. Bioethics, the science of survival. *Perspectives in Biology and Medicine* 14(1):127-53.
- Potter VR. 1971. *Bioethics: Bridge to the Future*. Prentice Hall Pub, New York. p. 205. ISBN-10: 0130765058, ISBN-13: 978-0130765055.
- Potter VR. 1998. *Bioética Puente, Bioética Global y Bioética Profunda*. Cuadernos del Programa Regional de Bioética No. 7, Organización Panamericana de la Salud (OPS), Editorial Kimpres, Bogotá, Colombia.
- Reich WT. 1978. (Editor) *Encyclopedia of Bioethics*. Editorial The Free Press Div. Macmillan Publ Co. USA p. 484 ISBN-10: 0029260604, ISBN-13 : 978-0029260609.
- Reverby SM. 2001. More than Fact and Fiction. *Cultural Memory and the Tuskegee Syphilis Study. Hastings Center Report* 31: 22-28.
- Rubí Salazar JL. 2010. Ética, moral, ética médica y Bioética. *Dialogo Bioético. Bioética y Salud* p.13-18.
- Sánchez González MA. 2013. *Bioética en Ciencias de la Salud*. Editorial Masson, Elsevier. p. 441. ISBN 978-84-458-2116-9, Depósito Legal B-21-306-2012.
- Sánchez M. 2022. Cuál es la diferencia entre ética y moral. *El Mundo*. Disponible: <https://www.elmundo.es/como/2022/01/03/61d2c60ae4d4d88e668b45a0.html>
- Schmidt L. 2008. Van Ressenaler Potter: Un paradigma de vida. *Revista de Bioética Latinoamericana Mérida, Venezuela* 001 (1).
- Simón-Lorda P, Barrio-Cantalejo IM. 2012. Consentimiento Informado. En Beca JP, Astete C. *Bioética Clínica*. Santiago de Chile, Chile. p. 192-204. Disponible: <https://www.bioeticaweb.com/juan-pablo-beca-y-carmen-astete-bioetica-clinica/>
- Simón-Lorda P, Barrio-Cantalejo IM, Peinado-Gorlat P. 2014. El Caso Willowbrook: Ética, Investigación y Salud Pública. *Spanish Journal of Critical Bioethics*. Disponible: <http://elpajaroquecruza.blogspot.com.es/>
- Wilches Flórez AM. 2011. La propuesta Bioética de Van Ressenaler Potter cuatro décadas después. *Opción Año 27 (66): 70-84*. ISSN 1012-1587. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=31022314005>

La Revista de la Facultad de Farmacia fue creada en 1959 y constituye una publicación periódica, arbitrada, de aparición semestral, destinada a promover la difusión de artículos científicos en el área de las ciencias de la salud, así como en áreas básicas y aplicadas relacionadas con la obtención, ensayos, análisis, usos y producción de medicamentos, alimentos, cosméticos, tóxicos y sustancias relacionadas.

Está basada en la existencia de un Comité Editorial, consistente en un editor-director, editores asociados y una Comisión Editorial. Los manuscritos que publica pueden ser de autores nacionales o extranjeros, residentes o no en Venezuela, en español o inglés. Los manuscritos deben ser trabajos inéditos y su aceptación por el Comité Editorial implica que no ha sido publicado, ni está en proceso de publicación, en otra revista en forma parcial o total. Igualmente podrán ser publicadas Revisiones o Cartas al Editor. Los manuscritos enviados a la Revista de la Facultad de Farmacia serán revisados por el Comité Editorial y —si reúnen la calidad científica y cumplen con las normas de presentación necesarias—, serán sometidos a un proceso de arbitraje externo por personas con competencias similares a las de los productores del trabajo (pares) para su debida evaluación. Queda entendido que el Comité Editorial puede rechazar un manuscrito, sin necesidad de acudir al proceso de arbitraje, si no se incumple con lo mencionado.

El manuscrito deberá ir acompañado de una carta de solicitud firmada por el autor responsable. En caso de ser aceptado, el Comité Editorial no se hace responsable del contenido expresado en el trabajo publicado. Aquellos manuscritos que no se acojan a las condiciones indicadas o que

sean rechazados por dos de los árbitros que dictaminen sobre su calidad y contenido, no serán publicados y serán devueltos a los autores.

FORMA Y PREPARACIÓN DE LOS MANUSCRITOS

Para la publicación de trabajos científicos en la Revista de la Facultad de Farmacia, los mismos estarán de acuerdo con los requisitos originales para su publicación en revistas biomédicas, según el Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (2012, 2013¹). Además, los editores asumen que los autores de los artículos conocen y han aplicado en sus estudios la ética de experimentación (Declaración de Helsinki, y el Código de Bioética y Bioseguridad, 2da. edición, 2002, del Ministerio de Ciencia y Tecnología y el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Los manuscritos deben ser enviados a los correos de contacto indicados en http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff/about/contact o directamente al correo del editor: astern88@gmail.com. Deben estar en formato Word, en hoja tamaño carta a doble espacio, con letra Arial 12. Asegúrese de que no haya dobles espacios en blanco a lo largo del texto.

Todas las páginas deben ser numeradas correlativamente, empezando por el título. El número de la página deberá colocarse en el ángulo superior derecho de cada página. Su longitud no debe exceder de veinte páginas, excluyendo el espacio destinado a figuras, tablas y leyendas. Cada uno de los componentes del original deberá comenzar en página aparte, en la secuencia siguiente:

¹ http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html;
http://bvs.sld.cu/revistas/recursos/vancouver_2012.pdf

- a. Página del título, nombre completo de(l) (los)autor(es), su filiación institucional y su email. Todo autor debe declarar su número ORCID².
- b. Resumen y palabras clave.
- c. Texto (Introducción, materiales y métodos, resultados, discusión, conclusiones y recomendaciones).
- d. Agradecimientos. En esta sección se describirán los agradecimientos a personas e instituciones, así como los financiamientos.
- e. Conflicto de interés. Debe declararse la existencia o no de conflicto de interés por el autor o los autores del estudio.
- f. Referencias bibliográficas.
- g. Tablas: cada una de las tablas en páginas aparte, completas, con título en la parte superior y llamadas al pie de la tabla.
- h. Figuras: cada una en página aparte con su título en la parte inferior.
- i. Leyenda de las figuras.

1. La página del título deberá contener: Título del artículo en español e inglés, conciso e informativo, no mayor de veinte palabras. Primer nombre e inicial del segundo nombre y apellido(s) de los autores (con una llamada para identificar al pie de página al autor responsable de la correspondencia, indicando su dirección electrónica). Afiliación institucional y número de ORCID de cada uno de los autores.

2. La segunda página debe contener un resumen en español e inglés, con un máximo de 250 palabras. El texto debe dar una visión general del trabajo, señalar meramente el propósito, los métodos y los hallazgos. No se deben citar referencias. El

resumen debe hacer énfasis en los aspectos nuevos e importantes del estudio o de las observaciones. Inmediatamente después del resumen, proporcionar o identificar como tales 3 a 10 palabras clave que ayuden a los indexadores en la construcción de índices cruzados de su artículo y que puedan publicarse con el resumen; utilice los términos del encabezamiento temático [Medical SubjectHeading (Mesh)] del Index Medicus.

3. En cuanto al texto, debe dividirse en: Introducción, materiales y métodos, resultados, discusión, conclusiones y recomendaciones. La introducción debe contener lo esencial para situar el problema y la justificación del trabajo utilizando las referencias más relevantes. Los materiales y métodos deben contener la descripción breve y clara que permita la comprensión y la reproducibilidad del trabajo. En caso de técnicas y métodos clásicos ya publicados, se debe indicar sólo la referencia. Los resultados deben ser presentados en forma clara y precisa, con un mínimo de discusión o interpretación personal. Todas las figuras y tablas deben ser citadas en el texto. La discusión debe ser restringida a la interpretación de los resultados y eventualmente a comparar con los resultados de otros autores. Las conclusiones pueden ser incluidas dentro de la discusión; sin embargo, se puede hacer una sección aparte, indicando de forma clara y concisa los nuevos hallazgos. Se pueden incluir recomendaciones de aplicación práctica. Los agradecimientos deben hacerse a las personas o instituciones que han hecho contribuciones al estudio.

² <https://orcid.org/>

4. Referencias bibliográficas: Las mencionadas a lo largo del texto deben citarse de la siguiente manera:

- Un autor: «...fueron publicadas por González (1968)» o bien, «Se han publicado las características de... (González, 1968)».
- Dos autores: ...Álvarez y Martínez (1986),...(Álvarez y Martínez, 1987)
- Tres o más autores: ...Martínez y col. (1986), ...(Martínez y col., 1986)

Use las letras para distinguir entre varios trabajos del mismo autor o autores y año: ...(González y Pérez, 1990a,b).

Utilice punto y coma para separar autores de diversos trabajos y colóquelos en orden cronológico:...(Mijares, 1975; Brenes y Rodríguez, 1961; Zimmermann y col., 2003).

La lista de referencias bibliográficas llevará por título «Referencias bibliográficas» y su ordenamiento será alfabético manteniendo las estructuras mostradas en los siguientes ejemplos dependiendo del tipo de bibliografía. Deberán ser citados todos los autores de cada referencia.

ARTÍCULO EN REVISTA:

Ávila JL. 1983. New national approaches to Chagas disease chemotherapy. *Interciencia* 8: 405-417.

Ávila JL, Ávila A, Muñoz E. 1981. Effect of allopurinol on different strains of Trypanosomacrusi. *Am J Trop Med Hyg* 39(3): 769-774.

LIBROS:

Hermanson G. *Bioconjugate Techniques*. 2da ed. Elsevier: San Diego, Ca, USA, 2008.

CAPÍTULOS EN LIBROS:

Peters W, Robinson B. Parasitic infection models. In: *Handbook of antimalarial models of infection*. Eds: Zak O, Sande M. Academic Press: London, 1999. pp. 757-773.

Berry EP. Croton. In: *Flora of the Venezuelan Guayana*. Vol. 5: Eriocaulaceae-Lentibulariaceae. Eds: Berry P, Yatskievich K, Holst B. Missouri Botanical Garden Press: USA, 1999. pp. 111-133.

TESIS O TRABAJOS DE ASCENSO:

Rodríguez Caballero RL. Contribución al estudio de targuá (*Croton gossypiifolius Vahl*). Tesis de Licenciatura. Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias, San José, Costa Rica, 1946.

RESÚMENES EN CONGRESOS:

Muelli M. Cosméticos ecológicos y naturales ¿garantía para los consumidores?. XVIII Congreso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos. COLAMIQC, Guatemala, 2007.

5. Tablas: todas deben estar citadas en el texto, en mayúscula y sin abreviar (Ejemplo: Tabla I), deben presentarse en páginas separadas, a espacio sencillo, y numeradas correlativamente en números romanos con el título en la parte superior. No se debe duplicar material del texto o de las figuras. En caso necesario coloque material explicativo en notas al pie de la tabla y no en el encabezamiento; explique en notas al pie de la tabla las abreviaturas no estandarizadas o utilizadas; identifique claramente las variables tales como desviación estándar (D.S.) y error estándar de la media (E.E.M.); cite cada

tabla en orden correlativo dentro del texto; cite la fuente de información al pie de la tabla si ésta no es original.

6. Figuras: todas deben estar citadas en el texto, en mayúscula y sin abreviar (Ejemplo: Figura 1, Figuras 2 y 3). Estas deben ser de buena calidad, incrustadas en el texto con su leyenda, o bien en archivos aparte en formato .jpg a una resolución de 300 ppp, en cuyo caso deberán estar identificadas con el número de la figura y el apellido del autor principal (Ejemplo: Figura 1-Matos.jpg). En este último caso las leyendas de las figuras deberán presentarse en página aparte a espacio sencillo colocando el número que corresponde a cada figura. Las fotografías de especímenes anatómicos, de lesiones o de personas, deberán tener suficiente nitidez como para identificar claramente los detalles importantes. En caso de fotografías de personas evite que el sujeto sea identificable, o acompañe de la autorización escrita de la misma. Cuando se usen símbolos y fechas, números o letras para identificar partes en las figuras, identifíquelas y explique cada una en la leyenda. Si se trata de fotomicrografía, indique la escala e identifique el método de coloración.

7. Fórmulas y ecuaciones: deben presentarse claramente para su reproducción.

Lista de comprobación de preparación de envíos:

Como parte del proceso de envío, se les requiere a los autores que indiquen que su envío cumple con todos los siguientes elementos, y que acepten que envíos que no cumplan con estas indicaciones pueden ser devueltos al autor.

1. La petición no ha sido publicada previamente, ni se ha presentado a otra revista (o se ha proporcionado una explicación en Comentarios al editor).
2. El fichero enviado está en formato Open Office, Microsoft Word.
3. Se han añadido direcciones web para las referencias donde ha sido posible.
4. El texto tiene interlineado doble; el tamaño de fuente es 12 puntos; se usa cursiva en vez de subrayado (exceptuando las direcciones URL).
5. El texto cumple con los requisitos bibliográficos y de estilo indicados en las Normas para autores.

DECLARACIÓN DE PRIVACIDAD

Los nombres y direcciones de correo-e introducidos en esta revista se usarán exclusivamente para los fines declarados por esta revista y no estarán disponibles para ningún otro propósito u otra persona.