



Publicació científica del
Col·legi de Farmacèutics de Barcelona

Vol 80 / Número Especial 2022

Circular

FARMACÈUTICA



Especial
Premis i Beques

Editorial

M. Rosa Ballester

3

Beca col·legial 2020

Cerca de marcadors sèrics pronòstics precoços de disfunció/fallida orgànica en pacients hospitalitzats per COVID mitjançant metabolòmica High-Throughput

M. del Carmen Salgado Martín i José Alcaraz Quiles

4

Premis 2021

Establiment de les bases d'una nova immunoteràpia pel melanoma: ús de vesícules extracel·lulars per encapsular àcids nucleics

Monika Buchholz, Mònica Guarro, Salvador Borrós, Cristina Fornaguera

9

Ús de PCR per la detecció de resistències en *Mycoplasma genitalium* i *Neisseria gonorrhoeae* i diagnòstic d'infeccions vaginals

Patricia García García

14

Recerca de compostos insulino mimètics en l'oli d'oliva

Maria Font-Quer Pellicer

18

Premis ex aequo als treballs de fi de grau

Fibromiàlgia a través de la genètica: desenvolupament d'un algoritme de diagnòstic basat en dades de microarrays.

Manuel Borrego Burón

22

Optimització en l'obtenció d'hupertacrina-tacrina pel tractament de la malaltia d'Alzheimer

Cèlia Comallonga Albareda, José Ignacio Borrell, Raimon Puig de la Bellacasa

27



Vol. 80, núm. Especial Premis i Beques. Gener 2022

Directora i Directora Científica: M. Rosa Ballester Verneda.

Comitè editorial: Anna Bach Faig, Guillermo Bagaria de Casanova, David Conde Estévez, Laura Diego del Río, Maria Perelló Casadó, Xavier Tejedor Ganduxé i Roser Vallès Fernández.

Coordinació editorial: Cristina Rodríguez Caba.

Secretària del Comitè editorial: Maribel Cortés Mor.

Correcció lingüística: Glòria Llopart Sala.

Edició i publicitat: Col·legi de Farmacèutics de Barcelona. c/ Girona, 64-66. 08009 Barcelona. Tel. 93 244 07 10. Fax 93 245 44 31. Correu/e: circular@cofb.net.

Disseny i maquetació: El Metropost, S.L. www.elmetropost.com. La redacció de CIRCULAR FARMACÈUTICA no subscriu necessàriament els punts de vista que els autors reflecteixen en els treballs que signen.

Circular Farmacèutica és una revista que edita el Col·legi de Farmacèutics de Barcelona. El Col·legi és una corporació de dret públic subjecte a la Llei de col·legis professionals, amb domicili al carrer Girona núm. 64, 08009, de Barcelona, CIF Q08660021. Qualsevol persona que accedeixi a aquesta web accepta les condicions d'ús i les prohibicions que es descriuen a continuació i es compromet a no fer res que pugui produir alteració o maldre en el funcionament normal. El Col·legi és propietari del software i disseny gràfic de la revista, n'exerceix els drets d'edició, i és titular dels drets d'explotació dels articles dels autors i de les gràfiques, taules, fotografies, imatges i dibuixos que aquests puguin incorporar. Tots els drets reservats. Queden expressament prohibides totes aquelles activitats que impliquin la reproducció total o parcial dels continguts editats, la distribució, la comunicació pública, la modificació, l'alteració o la descompilació, incloent-hi la forma i l'estructura en les quals es presenten, especialment la simple reproducció i/o la comunicació en forma de resum, ressenya o reproducció en revistes de premsa amb finalitats oneroses o gratuïtes sense haver obtingut l'autorització prèvia del Col·legi. No obstant això, l'usuari pot imprimir, emmagatzemar en un disc del seu ordinador tots els elements, per fer-ne un ús particular. El Col·legi no es responsabilitza del contingut dels articles publicats i no respondrà les reclamacions que es puguin derivar de la qualitat, la fiabilitat o l'exactitud que presenten. Tampoc garanteix que la web estigui lliure de virus informàtics i no es fa responsable dels danys i perjudicis en els sistemes informàtics per anomalies de funcionament per causes alienes a la seva voluntat, fortuïtes o de força major. El Col·legi es reserva el dret de fer les modificacions de continguts, estructura, condicions d'accés i qualsevol altra de qualsevol índole sense avis previ. El Col·legi instarà qualsevol reclamació i/o acció judicial pels danys i perjudicis que un ús inadequat de l'usuari provoqui a la pàgina i per qualsevol actuació il·legítima que conculgui drets de terceres persones. L'activitat del Col·legi com a prestador de serveis de la societat de la informació es regeix per la normativa espanyola i considera els jutjats i tribunals de la ciutat de Barcelona competents per entendre dels conflictes que sorgeixin a conseqüència de la utilització d'aquesta pàgina.

Editorial

M. Rosa Ballester

Un any més presentem els treballs becats i premiats en la convocatòria passada, uns treballs que com podeu comprovar han merescut els premis per l'alta qualitat que tenen i l'aportació científica que fan a diferents àmbits de la nostra professió.

En aquest número presentem els resultats de la beca col·legial premiada en la convocatòria 2021, un treball que ha permès identificar quatre molècules significativament expressades en pacients COVID (KIM1, NCF2, FGR i FOSB), de les quals FOSB ha estat identificat com un marcador pronòstic prometedori i prou interessant per passar-ne l'ús a la clínica.

També oferim els cinc TFG premiats en la mateixa convocatòria. Tot i que les bases estableixen quatre premis als quatre millors TFG, els dos últims finalistes van quedar empatats a la mateixa puntuació i ens va semblar just resoldre l'empat atorgant premis ex aequo a aquests treballs.

A més, hi trobareu una de les dues beques d'investigació premiades a la convocatòria 2020 a la qual li vam concedir una pròrroga de presentació mentre va durar l'estat d'alarma pel COVID-19 i que va ocasionar un retard en el termini per acabar-la.

Com veieu, les beques i els premis del COFB continuen estant a l'alçada de les més prestigioses convocatòries d'ajuts a la recerca del nostre entorn i any darrera any no para de créixer el nombre de projectes presentats per optar-hi.

Aquest interès creixent en les beques i premis col·legials ens ha portat a introduir alguns canvis de cara a la pròxima convocatòria 2022. Concretament, hem acordat dividir la convocatòria de Beques i Premis del COFB en dues.

Una primera **Convocatòria de Premis** (que sortirà publicada al web el mes de març del 2022), amb **tres categories** i quatre premis en total:

1. Un **premi de 1000 €** per a la categoria del **millor article** publicat l'any **2021 en una revista open access amb peer review**
2. Un **premi de 1000 €** per a la categoria al **millor projecte comunitari**
3. Dos **premis al millor TFG** (treball de final de grau) fets per alumnes de les facultats que imparteixen el grau de Farmàcia (UB i URL) cada un de **500 €**.

Una segona **Convocatòria de Beques** (que sortirà publicada al web el mes d'abril de 2022), en què tornem a introduir els dos **premis** de les edicions anteriors, de **9000 €** cada un.

Les noves bases i les noves rúbriques per avaluar cada categoria les trobareu a les convocatòries corresponents un cop es publiquin.

Esperem que aquests canvis us continuïn engrescant i ens permetin compartir moltes alegries.

Moltes felicitats a tots i a totes per la vostra participació, la vostra recerca i per l'empenta i la il·lusió que poseu en els projectes.

Cerca avançada de marcadors sèrics pronòstic de disfunció/fallida orgànica en pacients hospitalitzats per COVID mitjançant metabolòmica High-Throughput

Mari Carmen Salgado

Especialista Laboratori Core,
Hospital Clínic de Barcelona.

José Alcaraz Quiles

Especialista Laboratori Core,
Hospital Clínic de Barcelona.

Paraules clau:
COVID-19.
FOSB.
Biomarcador pronòstic

INTRODUCCIÓ

Cada vegada hi ha més evidència científica del paper que juga la inflamació sistèmica en el curs clínic de la COVID-19^{1,2}. La resposta immune contra el virus porta a l'exacerbació del procés inflamatori i té un efecte directe sobre la microvasculatura dels òrgans que compromet la perfusió i propicia la formació de microtrombes, la reprogramació metabòlica i el dany directe de les cèl·lules que formen el parènquima dels òrgans i, finalment, pot donar lloc a la fallida multiorgànica i la mort del pacient^{3,4}.

Actualment, hi ha molts esforços dedicats a trobar biomarcadors que ajudin a predir el grau d'afectació i el pronòstic dels pacients infectats per COVID-19^{1,5,6}. És imprescindible identificar nous marcadors d'òrgans específics que ajudin a instaurar tractaments dirigits.

En aquest projecte ens vam proposar estudiar un panell ampli de 92 proteïnes amb potencialitat pronòstica, que s'expressen en diferents teixits i òrgans i ofereixen la possibilitat de ser mesurats en plasma. En general, els 92 metabòlits que volíem estudiar incloïen el cribratge de diferents processos clau que afec-

ten la fisiopatologia de la COVID-19 per identificar nous biomarcadors pronòstics precoços de disfunció/fallida orgànica que aconseguissin anticipar els efectes adversos més greus que el curs de la malaltia podien tenir en els pacients hospitalitzats i que aquests es poguessin beneficiar amb antelació de les teràpies existents.

MATERIAL I MÈTODES

Participants de l'estudi i recol·lecció de mostres

Hem inclòs dues cohorts de pacients amb COVID (N=70) i una d'addicional de voluntaris sans (N=18). Una cohort amb COVID greu hospitalitzada a la UCI (COVID CC; N=35) i un altra de COVID hospitalitzada amb evolució favorable sense requeriments de cures intensives (COVID no CC; N=35). De cada pacient en vam obtenir dades demogràfiques, antecedents clínics i analítica d'ingrés (perfil COVID) feta al nostre centre.

Metodologia

Assaig d'extensió de proximitat d'alt rendiment (PEA) per a 92 biomarcadors proteics de dany orgànic amb el panell Proseek® Multiplex Or-

gan Damage d'Olink Proteomics AB (Uppsala, Suècia).

Anàlisi estadística

Els resultats obtinguts en les diferents cohorts van ser comparats utilitzant la prova t de Student no aparellada, l'anàlisi de variància unidireccional, la prova U de Mann-Whitney i la prova Kruskal-Wallis, quan corresponia. Per avaluar la relació entre dues variables contínues vam fer servir el coeficient de correlació d'Spearman per a dades no paramè-

triques. Per estudiar el poder discriminant dels marcadors identificats nous vam fer servir corbes ROC.

RESULTATS

Caracterització de les cohorts incloses en l'estudi

La taula 1 mostra les característiques dels pacients inclosos en l'estudi. Els pacients COVID CC van mostrar resultats significativament alterats amb relació als pacients COVID no CC i als voluntaris sans en la coagulació, l'hemograma, la funció hepàtica

i la inflamació sistèmica. A més, van acumular més requeriments d'oxigenoteràpia, dies d'hospitalització i esdeveniments tromboembòlics.

Expressió relativa de les proteïnes incloses en el panell de marcadors de dany orgànic

Tal com veiem a la taula 2, de les 92 proteïnes analitzades, en vam trobar quatre que estaven sobreexpressades comparant amb el grup de voluntaris sans i que a més mostraven diferències entre el grup COVID, amb

Taula 1. Caracterització dels pacients

	HV N=18	COVID no CC N=35	COVID CC N=34
Edat, anys	60.6 ± 1.9	59.0 ± 2.2	61.2 ± 1.9
Homes, N (%)	8 (44.4)	14 (40.0)	27 (77.0)*,##
Dades de laboratori			
Recompte leucòcits (x109/L)	5.8 (4.7-7.4)	6.5 (4.3-6.1)	9.3 (5.8-13.7)**,##
Recompte plaquetes (x109/L)	199.5 (187.5-229.5)	228.0 (178.0-321.0)	275.0 (219.3-363.5)**
Temps protrombina (%)	99.0 ± 0.9	89.3 ± 1.9***	82.8 ± 1.8***,#
D dímer (ng/mL)	249.8 ± 19.1	737.1 ± 207.3	5379.0 ± 1795.0*,#
Creatinina (mg/dL)	0.9 (0.8-1.0)	0.7 (0.5-0.8)***	0.7 (0.6-0.9)*
Troponina I (ng/L)	2.5 (2.5-4.4)	3.3 (2.5-7.8)	6.7 (3.9-19.2)***,##
ASAT (U/L)	22.2 ± 1.4	46.2 ± 6.4*	50.6 ± 5.6***
ALAT (U/L)	23.6 ± 3.6	57.8 ± 8.6**	63.6 ± 12.1*
GGT (U/L)	26.8 ± 4.1	91.5 ± 18.2**	101.1 ± 14.6***
Bilirrubina (mg/dL)	0.7 (0.4-0.9)	0.5 (0.4-0.6)**	0.5 (0.4-0.6)**
FA (U/L)	65.5 (57.3-81.8)	74.0 (56.0-95.0)	70.0 (57.0-91.0)
LDH (U/L)	156.3 ± 7.8	291.3 ± 9.2***	481.1 ± 26.0***,###
PCR (mg/dL)	0.4 (0.4-0.4)	5.3 (3.2-9.4)***	9.5 (3.5-18.3)***,#
Ferritina (ng/mL)	132.4 ± 24.2	751.0 ± 112.7***	1390.0 ± 158.4***,##
Calci (mg/dL)	9.6 (9.3-9.9)	8.5 (8.2-8.8)***	8.0 (7.7-8.3)***,###
Proteïnes (g/L)	70.5 (66.8-71.3)	64.0 (61.0-67.0)***	59.0 (55.0-63.0)***,###
Dies d'hospitalització	-	5.3 ± 0.4	41.8 ± 6.5###
Requeriments oxigenoteràpia intensiva, N (%)	-	1 (2.9)	29 (85.3)###
Trombosi Venosa Profunda, N (%)	-	0 (0.0)	22 (64.7)###

Les dades es presenten com a mitjana ± SEM, nombre de pacients (%) o mitjana (IQR).
*p < 0.05, **p < 0.005 i ***p < 0.001 per a COVID no CC or COVID CC versus HV.
#p < 0.05, ##p < 0.005 i ###p < 0.001 per a COVID CC versus COVID no CC.
HV: voluntaris sans; COVID no CC: pacients COVID sense necessitat de cures intensives; COVID CC: pacients COVID amb necessitats de cures intensives; AST: aspartat aminotransferasa; ALAT: alanina aminotransferasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa; FA: fosfatasa alcalina; LDH: lactat deshidrogenasa; CRP: proteïna C-reactiva.

un nivell superior de proteïna a més gravetat. Aquestes proteïnes eren la Kidney injury molecule 1 (KIM1), neutrophil cytosol factor 2 (NCF2), Tyrosine-protein kinase Fgr (FGR) i protein fosB (FOSB). D'entre totes aquestes, destacava la FOSB, que presentava un canvi més pronunciat en la concentració de proteïna.

Relació entre els nous marcadors identificats i la disfunció/fallida orgànica en pacients COVID

Per estudiar la relació que hi havia entre la disfunció orgànica present en els pacients COVID greus i els nous marcadors proteics que significativament havien augmentat en aquests pacients (KIM1, NCF2, FGR i FOSB), vam analitzar la correlació que hi havia entre aquestes i els principals paràmetres de laboratori determinats a l'anàlisi COVID que veiem a la taula 3. Entre les quatre proteïnes analitzades, FOSB és la que presentava un valor de correlació superior entre els diferents paràmetres analitzats, especialment amb els marcadors de coagulació temps de protrombina (r:0.48) i D-dímer (r:0.53), amb el marcador inespecífic de dany tissular LDH (r:0.58) i els marcadors d'inflamació PCR (r:0.52) i ferritina (r:0.45).

Capacitat diagnòstica dels nous marcadors identificats en la predicció de més gravetat de la malaltia

Finalment, vam fer un estudi mitjançant corbes ROC per analitzar el punt de tall que dona una major AUC per diferenciar entre els pacients COVID que necessitaven teràpia intensiva (COVID CC) i comparar-los amb aquells que no (COVID no CC). Vam analitzar les proteïnes KIM1, NCF2, FGR i FOSB i altres paràmetres de laboratori de l'anàlisi COVID. Els resultats apareixen a la taula 4. D'entre les quatre proteïnes del panell que van mostrar una expressió diferencial que depenia de la gravetat dels grups COVID, FOSB va ser la que va donar una major AUC (0.706). NCF2, FGR i KIM1 van presentar una AUC de 0.692, 0.687 i 0.672 respectivament. Concretament, FOSB va aconseguir mostrar una sensibilitat i una especificitat del 85,71% i del 88,89% a partir de valors superiors a 1,098 (NPX). En canvi, les tres proteïnes restants amb sensibilitats superiors a 85,71% no van poder arribar a especificitats superiors al 55%. FOSB va aconseguir una millor AUC que la resta de paràmetres de laboratori assajats i només va ser superat per l'LDH, D-dímer, recompte de leucòcits i la ferritina que són els paràmetres que major AUC van presentar, amb 0.893, 0.807, 0.803 i 0.754, respectivament.

DISCUSSIÓ

En aquest moment, la comunitat científica fa grans esforços per trobar

Aquest estudi ha aconseguit identificar FOSB com un potencial marcador predictiu en la malaltia causada per COVID-19

biomarcadors que ajudin a predir el grau d'afectació i el pronòstic dels pacients amb COVID-19.

Els resultats obtinguts en el nostre estudi pel que fa a la caracterització clínica i analítica dels individus inclosos en les cohorts estan en consonància amb els obtinguts en altres estudis en què paràmetres convencionals molt establerts en la pràctica habitual dels laboratoris clínics com la proteïna C reactiva, la procaldonina, el recompte leucocitari, la ferritina, el D-dímer, el temps de protrombina, la troponina I o la LDH, han estat testats amb aquesta finalitat però cap ha aconseguit prou especificitat ni sensibilitat per convertir-se en un predictor pronòstic fiable que aconsegueixi anticipar-se a les fatídiques conseqüències que es produeixen en els pacients més afectats que arriben a ingressar a la UCI⁷⁻⁹.

El nostre estudi ha servit per identificar quatre molècules significativament expressades en pacients COVID que requereixen mesures de vigilàn-

Taula 2. Expressió normalitzada de proteïnes de marcadors de dany orgànic expressada de manera diferenciada entre subjectes sans i pacients amb COVID amb i sense necessitat de cures intensives.

Nom de la proteïna	Abreviatura proteïna	Codi proteïna UniProtKB	HV N=18	COVID no CC N=35	COVID CC N=35
Kidney injury molecule 1	KIM1	Q96D42	8.18 [7.48-8.37]	8.31 [7.42-8.88]	8.82 [8.31-9.54]**,#
Neutrophil cytosol factor 2	NCF2	P19878	3.28 [2.90-3.51]	3.37 [3.16-4.04]	3.89 [3.62-4.43]**,#
Tyrosine-protein kinase Fgr	FGR	P09769	1.88 [1.74-2.22]	2.24 [1.96-3.09]*	2.77 [2.59-3.41]**,#
Protein fosB	FOSB	P53539	0.66 [0.56-0.96]	1.52 [1.26-1.89]***	1.98 [1.57-2.56]**,#

Les dades es presenten com a mitjana (rang interquartil)

*p < 0.05, **p < 0.005 i ***p < 0.001 per a COVID no CC o COVID CC versus HV.

#p < 0.05 per a COVID CC versus COVID no CC.

HV: voluntaris sans; COVID no CC: pacients afectes de COVID sense necessitat de cures intensives; COVID CC: pacients afectes de COVID amb necessitat de cures intensives.

Taula 3. Correlació d'Spearman entre els paràmetres de laboratori i l'expressió normalitzada de proteïnes de marcadors de dany orgànic en subjectes sans i pacients COVID amb i sense necessitat de cures intensives.

Paràmetres de laboratori	MARCADORS DE DANY ORGÀNIC							
	KIM1		NCF2		FGR		FOSB	
	r value	p value	r value	p value	r value	p value	r value	p value
Recompte leucòcits	0.38	<0.0005	0.37	<0.0005	0.35	0.001	0.22	0.042
Recompte plaquetes	0.16	ns	0.30	0.006	0.26	0.014	0.27	0.012
Temps de Protrombina	-0.32	0.003	-0.46	<0.0001	-0.38	<0.0005	-0.48	<0.0001
D dímer	0.37	<0.0005	0.46	<0.0001	0.53	<0.0001	0.53	<0.0001
Creatinina	0.20	ns	-0.14	ns	-0.08	ns	-0.18	ns
Troponina I	0.06	ns	0.21	ns	0.19	ns	0.32	0.002
ASAT	0.20	ns	0.11	ns	0.18	ns	0.34	0.001
ALAT	0.16	ns	0.05	ns	0.09	ns	0.17	ns
GGT	0.28	0.008	0.16	ns	0.14	ns	0.18	ns
Bilirrubina	0.00	ns	-0.19	ns	-0.23	0.030	-0.22	0.030
FA	0.23	0.030	-0.01	ns	0.06	ns	0.00	ns
LDH	0.34	0.001	0.38	<0.0005	0.43	<0.0001	0.58	<0.0001
PCR	0.26	0.014	0.36	0.001	0.38	<0.0005	0.52	<0.0001
Ferritina	0.26	0.014	0.28	0.01	0.35	0.001	0.45	<0.0001

ALAT: alanina aminotransferasa; ASAT: aspartat aminotransferasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa; FA: fosfatasa alcalina; LDH: lactat deshidrogenasa; PCR: proteïna C reactiva.

cia intensiva i aconseguen diferenciar aquest grup tant del grup de voluntaris sans com del grup COVID moderat (KIM1, NCF2, FGR i FOSB).

La primera és el marcador renal de dany tubular, KIM1. Al nostre estudi, els nivells de KIM1 sèrics pugen significativament en els pacients COVID greus, no així en els moderats i, per tant, podria servir com a marcador d'un pitjor pronòstic en aquests pacients. L'interès d'aquesta molècula rau en la major especificitat quant a la detecció de lesions renals agudes comparada amb la creatinina sèrica¹⁰.

La següent proteïna diferencialment augmentada entre els grups COVID ha estat NCF2. Aquesta subunitat de la NADPH oxidasa s'expressa en els neutròfils i serveix per a la defensa primària davant d'infeccions mitjançant la producció d'anió superòxid¹¹⁻¹³. Estudis recents han demostrat que en pacients COVID aquesta proteïna està sobreexpressada i s'ha vist que pot influir directament en l'activació dels limfòcits T i contribuir a deteriorar el parènquima pulmonar¹⁴⁻¹⁵.

Taula 4. AUC ROC per a estimar la precisió global dels principals paràmetres de laboratori KIM1, NCF2, FGR i FOSB que prediuen un pitjor curs de la malaltia entre pacients afectes de COVID amb i sense necessitat de cures intensives

Paràmetre	AUC	95% CI	p
Lactat deshidrogenasa	0.893	0.810-0.976	<0.0001
D-dímer	0.807	0.700-0.914	<0.0001
Recompte de leucòcits	0.803	0.699-0.907	<0.0001
Ferritina	0.754	0.639-0.870	<0.0005
FOSB	0.706	0.583-0.830	<0.005
Troponina I	0.705	0.583-0.827	<0.005
NCF2	0.692	0.565-0.820	<0.01
FGR	0.687	0.560-0.815	<0.05
KIM1	0.672	0.545-0.799	<0.05
Temps de protrombina	0.671	0.542-0.800	<0.05
PCR	0.645	0.5139-0.776	<0.05
GGT	0.600	0.465-0.736	NS
ASAT	0.589	0.454-0.725	NS
Recompte de plaquetes	0.589	0.453-0.725	NS
Creatinina	0.576	0.441-0.571	NS
Fosfatasa alcalina	0.528	0.392-0.665	NS
Bilirrubina total	0.525	0.389-0.661	NS
ALAT	0.509	0.372-0.647	NS

AUC: àrea sota la corba; ALAT: alanina aminotransferasa; ASAT: aspartat aminotransferasa; CI: coeficient interval; GGT: gamma glutamil transpeptidasa; NS: no significatiu; PCR: proteïna C reactiva; ROC: receiver operating characteristic.

D'altra banda, la proteïna FGR és una tirosina quinasa implicada en processos inflamatoris i d'activació immune que s'ha vist sobreexpressada en pacients COVID¹⁶⁻¹⁸.

Finalment, cal destacar el canvi important que vam observar en els nivells circulants relatius de la proteïna FOSB que va ser la que millor va aconseguir diferenciar entre els tres grups d'estudi.

La proteïna FOSB és un factor de transcripció que forma part de la proteïna activadora-1 (AP-1), estretament relacionada amb la regulació immunològica cel·lular T^{19,20}. De fet, diversos estudis demostren una expressió superior de la FOSB en cèl·lules de sistema immunològic en pacients COVID^{21,22}.

Per estudiar la relació entre els quatre marcadors identificats (KIM1, NCF2, FGR i FOSB) i la disfunció/fallida orgànica present en pacients COVID vam fer un estudi de correlació

entre els paràmetres de laboratori més emprats actualment per monitorar els pacients COVID i aquests marcadors. Entre tots, FOSB va presentar la correlació més potent amb marcadors indicatius de fallida d'alteracions en la coagulació, formació de trombes, de dany cel·lular i d'inflamació. És la primera vegada que es demostra l'existència de la relació entre nivells elevats de FOSB i les complicacions que apareixen en pacients COVID.

La potencialitat de l'ús d'aquest marcador nou, FOSB, com a predictor en pacients COVID greus ha quedat reflectida en l'estudi de la capacitat diagnòstica fet mitjançant l'ús de corbes ROC, que ha aconseguit una major àrea sota la corba que alguns dels marcadors clàssics de laboratori que es poden trobar en pacients COVID.

En conjunt, podem concloure que aquest estudi ha aconseguit identi-

ficar FOSB com un potencial marcador predictiu en la malaltia causada per COVID-19. L'estreta relació mostrada entre els nivells elevats d'aquesta proteïna i la disfunció coagulativa, el procés inflamatori sistèmic, el dany tissular, juntament amb l'elevada capacitat diagnòstica mostrada, converteix FOSB en un prometedor marcador pronòstic d'interès per traslladar-ne l'ús a la clínica.

AGRAÏMENTS

Agraïm al Col·legi de Farmacèutics de Barcelona per haver-nos concedit la Beca d'Investigació 2020. També estem molt agraïts al personal d'infermeria de l'Hospital Clínic i als pacients per la seva generosa donació, a la Fundació Glòria Soler pel seu suport en la iniciativa COVIDBANK i al Biobanc HCB-IDIBAPS per a la recollida de dades humanes biològiques i la cessió de dades. ■

Bibliografia

1. Gorbelenya AE, et al. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*. 2020; 5: 536-44.
2. C. Rothe, M. Schunk, P. Sothmann, G. Bretzel, G. Froeschl, C. Wallrauch, et al. Transmission of 2019-nCoV infection from an asymptomatic contact in Germany. *N Engl J Med*, [2020]
3. J.M. Doménech. Teoría y cálculo de probabilidades. Pruebas diagnósticas. Fundamentos de Diseño y Estadística. Ed. Signo [2004].
4. R. Lu, X. Zhao, J. Li, P. Niu, B. Yang, H. Wu, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, [2020]
5. World Health Organization. Diagnostic testing for SARS-CoV-2. Interim guidance. 11 September 2020. Disponible a: <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>
6. van Kasteren, P.B., et al., Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *J Clin Virol*, 2020. 128: p. 104412.
7. Sethuraman, N., S.S. Jeremiah, and A. Ryo, Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA*, 2020.
8. Carter, L.J., et al., Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Cent Sci*, 2020. 6(5): p. 591-605.
9. Aragon-Caqueo, D., J. Fernandez-Salinas, and D. Laroze, Optimization of group size in pool testing strategy for SARS-CoV-2: A simple mathematical model. *J Med Virol*, 2020.
10. Zou, L., et al., SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med*, 2020. 382(12): p. 1177-1179.
11. Wang, W., et al., Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*, 2020.
12. Sutjipto S, H.L., Yant TJ, Mendis SM, Abdad MY, Marimuthu K, Ng OT, Lin C, Chan M et al., The effect of sample site, illness duration and the presence of pneumonia on the detection of SARS-CoV-2 by real-time reverse-transcription PCR. *Open Forum Infectious Diseases*, 2020.
13. Lai, C.K.C., et al., Prospective study comparing deep-throat saliva with other respiratory tract specimens in the diagnosis of novel coronavirus disease (COVID-19). *J Infect Dis*, 2020.
14. Lambert-Niclot, S., et al., Evaluation of a rapid diagnostic assay for detection of SARS-CoV-2 antigen in nasopharyngeal swab. *J Clin Microbiol*, 2020.
15. World Health Organization. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays. Interim guidance. 11 September 2020. Disponible a: <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2-infection-using-rapid-immunoassays>
16. Documento de consenso. Recomendaciones sobre el uso de pruebas antigénicas en el diagnóstico de la infección aguda por SARS-CoV-2 en la segunda onda pandémica: actitud en distintos contextos clínicos. Sociedad científica SEMMC, SEMFYC, SEMES, SEMI, SEQ, SEGG, SEIG, AEPap. *Revista Española de Quimioterapia*. doi:10.37201/req/120.2020
17. The Unity Studies: Early Investigations Protocols. 2020, 27/07/2020; disponible a: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/early-investigations>
18. Caini, S., et al., Meta-analysis of diagnostic performance of serological tests for SARS-CoV-2 antibodies up to 25 April 2020 and public health implications. *Euro Surveill*, 2020. 25(23).
19. Ministerio de Sanidad. Gobierno de España. Estudio Nacional de sero-Epidemiología de la Infección por SARS-CoV-2 en España (ENE-Covid); disponible a: <https://www.mscbs.gob.es/ciudadanos/ene-covid/home.htm>
20. Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19. Organización Mundial de la Salud, 8/04/2020; disponible a: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331713>.
21. Lisboa Bastos, M., et al., Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 2020. 370: p. m2516.
22. Che, X.Y., et al., Antigenic cross-reactivity between severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus and human coronaviruses 229E and OC43. *J Infect Dis*, 2005. 191(12): p. 2033-7.

Bases d'una nova immunoteràpia contra el melanoma: l'ús de vesícules extracel·lulars per encapsular àcids nucleics

INTRODUCCIÓ

El càncer forma part un gran grup de malalties que, en conjunt, representen la segona causa de mort a escala mundial. Es defineix per un creixement incontrolat de cèl·lules anormals o neoplàstiques que s'escampen pels teixits pròxims. La incidència continua augmentant i els casos detectats en homes són principalment de càncer de pulmó, de pròstata, colorectals, d'estómac i de fetge, mentre que en les dones el més comú és el càncer de mama, el colorectal, el de pulmó, el cervical i el tiroide¹. Els últims anys, s'han aconseguit progressos significatius en la comprensió de les bases genètiques i s'han obert oportunitats per fer-ne la prevenció i el tractament. Actualment hi ha la possibilitat d'utilitzar la teràpia gènica per destruir selectivament les cèl·lules tumorals o l'angiogènesi dels tumors. De fet, fins a avui la majoria d'assaigs clínics en teràpia gènica van destinats al tractament del càncer. Aquest fet es deu a diverses causes com la patologia irreversible d'un gran nombre de pacients que fa que els recursos disponibles per a investigació siguin considerables. No obstant això, aquest tipus de teràpia es pot combinar amb la radiació o la quimioteràpia tradicionals per aconseguir l'eficàcia clínica màxima en pa-

cients amb certes formes de càncer². Entre els diferents tipus, el melanoma maligne és un tipus de càncer de pell poc comú però molt agressiu i amb una taxa alta de mortalitat. La incidència del melanoma es calcula en 7-10 persones per cada 100.000 habitants i la incidència ha crescut de forma tan dràstica els últims anys. El diagnòstic precoç és fonamental per aconseguir la curació ja que la previsió empitjora a mesura que hi ha més afectació, especialment ganglionar i metàstasi. Per tant, el melanoma esdevé el centre de noves aproximacions de cara a les teràpies enfocades a l'objectiu com la immunoteràpia ja que el tractament convencional del melanoma (la cirurgia i la quimioteràpia), són mètodes invasius que tenen efectes secundaris greus. En aquest context, l'abordatge de la immunoteràpia consisteix en l'ús de nanovehicles intel·ligents. A més, la nanotecnologia garanteix propietats beneficioses amb una estabilitat alta, una biodisponibilitat millor, un temps de circulació de fàrmacs controlat, un període llarg de circulació de sang, una dosi de l'òrgan selectiu o de la distribució de teixits, un total requerit menor i uns efectes secundaris tòxics mínims³. El darrer informe d'una companyia farmacèutica important, parlava dels beneficis obtinguts en immunoteràpia per tractar el melanoma. Concretament, un

Monika Buchholz

Grup d'Enginyeria de Materials (Gemat), Institut Químic de Sarrià (IQS), Universitat Ramon Llull (URL).

Mònica Guarro

Grup d'Enginyeria de Materials (Gemat), Institut Químic de Sarrià (IQS), Universitat Ramon Llull (URL).

Salvador Borrós

Grup d'Enginyeria de Materials (Gemat), Institut Químic de Sarrià (IQS), Universitat Ramon Llull (URL).

Cristina Fornaguera

Grup d'Enginyeria de Materials (Gemat), Institut Químic de Sarrià (IQS), Universitat Ramon Llull (URL).

Paraules clau:

Immunoteràpia.

Melanoma.

Vesícules extracel·lulars.

Sistemes d'alliberament avançat de fàrmacs.

Nanomedicina.

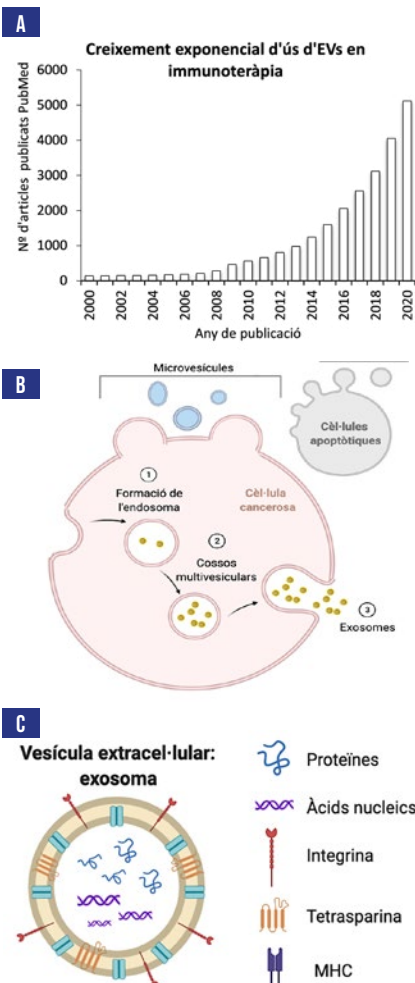
estudi dedicat a la recollida de dades de supervivència amb el seguiment més ampli presentat mai de la combinació d'anticossos monoclonals (els fàrmacs nivolumab i ipilimumab) en pacients amb melanoma avançat o metastàtic⁴. Els resultats d'aquest estudi arriben a la fita màxima atribuïble a aquesta combinació i canvien la manera d'entendre el melanoma metastàtic. Aquest canvi de paradigma que representen les immunoteràpies en el tractament del melanoma ha rebut el suport conjunt de l'Associació Espanyola d'Investigació sobre el Càncer (ASEICA), institució que encara fa molts abordatges nous en immunooncologia i teràpies dirigides a la investigació⁵. Cal destacar, però, que sovint és necessària l'encapsulació dels principis actius perquè tinguin la farmacocinètica i la farmacodinàmica buscades. Així, una de les estratègies terapèutiques més innovadores i esperançadores en nanoimmunoteràpia per tractar el melanoma són les vesícules extracel·lulars, de l'anglès *extracellular vesicles* (EV). En les últimes dues dècades, l'interès per aplicar-les a la immunoteràpia ha augmentat espectacularment com veiem en la **Fig 1. A**. Per tant, podríem dir que les vesícules extracel·lulars són el futur immediat de les teràpies dirigides. El motiu pel qual han aconseguit tant de protagonisme és que aquestes petites vesícules són secretades per cèl·lules tumorals en condicions d'estrès com el càncer i considerades els sistemes més prometedors per vehicular el material genètic ja que són produïdes per cèl·lules de melanoma i tenen propietats intrínseques que permeten atacar directament el tumor. Participen activament en la colonització tumoral de teixits llunyans i tenen una composició típica de proteïnes i lípids. Hi ha tres tipus de vesícules extracel·lulars alliberades caracteritzades per la biogènesi i la

mida: exosomes (50-180 nm), cossos multivesiculars (200-1000nm) i cossos apoptòtics (1000-5000nm)⁷. La **Fig 1.B** il·lustra els diferents mecanismes de biogènesi de les vesícules extracel·lulars i un exemple de la composició de l'exosoma (**Figura 1. C**), com a tipus d'elecció per usar com a sistema d'alliberament controlat de fàrmacs. Aquestes vesícules són reconegudes naturalment com a material fisiològic i com a mediadores de la comunicació intercel·lular a causa de la composició molecular que tenen que inclou proteïnes de superfície que els proporcionen la capacitat de reintegrar-se en el mateix llinatge cel·lular⁹. Per tant, la capacitat de vehicular càrrega biològica funcional a altres cèl·lules els permet intervenir en la intercomunicació cel·lular i la immunomodulació de la regulació de múltiples processos sistèmics i locals. En conseqüència, s'ha dit que la funció principal de les vesícules extracel·lulars recorda el *cavall de Troia*, és a dir, aconsegueix l'objectiu (media el transport directe de càrrega biològica) sense que el cos les detecti com a nocives i les elimini¹⁰. Pel que fa a això i tenint en compte la mida petita i l'origen natural, una comprensió millor del paper de les EV en el mecanisme de patogènesi i l'encapsulació d'àcid nucleic codificant per agents terapèutics poden arribar a ser uns factors terapèutics clau en el futur. En aquest marc, proposem l'ús d'aquestes vesícules extracel·lulars com a portadores d'àcids nucleics que codifiquin, posem per cas per a una citocina proinflamatòria específica, l'activació de la resposta del sistema immunitari contra les cèl·lules tumorals. El principal objectiu d'aquest projecte ha consistit a establir les bases d'una nova immunoteràpia per al melanoma mitjançant l'ús de vesícules extracel·lulars per encapsular àcids nucleics.

Figura 1. EV en investigació biomèdica.

A - creixement exponencial en revisió científica de l'interès en immunoteràpia Font. PubMed 2021.

B - Mecanismes de biogènesi de les EV. Figura adaptada de[8]. C - Composició de l'exosoma



MATERIALS I MÈTODES

Materials

Reactius: PBS (tampó fosfat salí), polisorbat 80 i SDS (sodi dodecil sulfat adquirits a Sigma-Aldrich. Sèrum boví fetal (FBS), Dulbecco Modificat Eagle's Medium (DMEM), tripsina/EDTA, glutamina, penicil·lina i estreptomycin van ser obtinguts de Gibco. Quanti-it™ PicoGreen® dsDNA Reagent kit adquirit a Bionova Científica, S.L., Plasmid GFP (3486 bp) produït i purificat d'E.coli. L'adquisició de vesícules extracel·lulars aïllades era de cultius cel·lulars B16F10 prèviament ultracentrifugades. Tots els procedi-

Les vesícules extracel·lulars com a nano-immunoteràpia innovadora pel tractament del melanoma

ments de cultiu de cèl·lules de melanoma B16F10 es van fer en una campana de flux laminar (Telstar BV-100) per assegurar condicions d'esterilitat i les cèl·lules es van incubar en una atmosfera del 5% de CO₂ a 37°C, 24 hores. La posada a punt de les estratègies de postcàrrega de vesícules extracel·lulars amb plàsmid reporter pGFP van consistir, per una banda, en l'ús de l'electroporador. Les EV van ser carregades amb pGFP mitjançant l'electroporació utilitzant el sistema d'electroporació de multiporador d'Eppendorf. Les característiques dels paràmetres de lliurament modificables incloent-hi la constant de temps, el voltatge real aplicat, l'interval de pols i el temps d'impuls, segons el grau escollit de disrupció de l'estructura de les EV per la qual la formació espontània de porus està guiada i la pGFP es pot encapsular en els EV. Llavors la mescla va ser centrifugada utilitzant Corning. Spin-X. Per altra banda, la permeabilització amb tensioactiu polisorbat 80, amb què les EV van encapsular pGFP utilitzant agitació constant (Wa-

llac 1296-004 Delfia Plateshaker) per assegurar la incubació directa amb el tensioactiu. Sobre la base de l'emissió de fluorescència produïda per l'expressió pGFP (excitació màxima a 495 nm i emissió màxima a 509 nm), la vam poder quantificar a través d'un espectrofotòmetre d'eclipse Cary (Varian). Les imatges de fluorescència de microscopi convencional de pGFP les vam obtenir mitjançant NIS-Elements en el microscopi Nikon Eclipse Ti amb un làser de 488nm a 50 ms. Finalment, l'eficiència de transfecció es va quantificar utilitzant una citometria de flux d'alt rendiment (Novocitià Acea Biociència).

Mètodes

Aïllament i caracterització de vesícules extracel·lulars

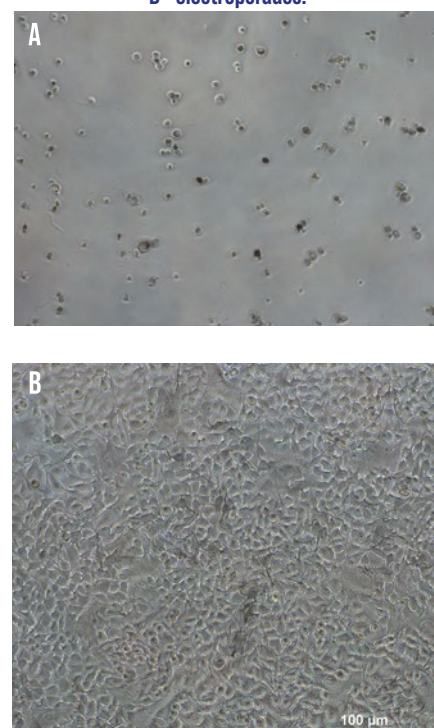
Les vesícules extracel·lulars aïllades es van adquirir dels cultius cel·lulars de B16F10 prèviament centrifugades. Es va establir un mètode senzill de centrifugació de dos passos d'alta velocitat per a l'aïllament eficient dels exosomes de les cèl·lules de melanòcits cultivades. Finalment, la caracterització fisicoquímica de les EV centrifugades el vam fer utilitzant l'anàlisi de seguiment de nanopartícules (NTA) (NanoSight LM10, Malvern Instruments) per avaluar la homogeneïtat amb relació a la mida i la transmissió de criomicroscòpia electrònica (crioTEM) (Jeol2010), per determinar-ne la morfologia. La determinació de la ràtio pGFP:EV va ser possible gràcies a l'avaluació prèvia de la concentració de vesícules extracel·lulars utilitzant l'assaig de Thermo

Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay, formulació compatible amb els detergents i basada en l'àcid bicinchonònic (BCA) per fer la detecció colorimètrica i la quantificació de la proteïna total present a la superfície de les EV i poder determinar la ràtio de plàsmid reporter amb relació a les EV (pGFP:EVs). Aquest mètode combina la reducció ben coneguda de Cu²⁺ a Cu¹⁺ per proteïna en un medi alcalí amb la detecció colorimètrica altament sensible i selectiva del catió cuprós (Cu¹⁺) utilitzant un reactiu únic que conté àcid bicinconic (BCA)¹². El producte de reacció de color porpra d'aquest assaig està format per la quelació de dues molècules de BCA amb un ió cuprós.

Encapsulació d'EV

Les vesícules extracel·lulars van ser carregades amb pGFP mitjançant l'electroporació utilitzant el sistema d'electroporació de multiporador Eppendorf. Van ser diluïdes a diferents ràtios pGFP:EV i transferides a 0,4-cm cubetes i electroporades a 400 V i

Figura 2. Micrografies de camp clar de cèl·lules B16 F10 tractades amb EV A - permeabilitzades i B - electroporades.



Taula 1. Eficiència d'encapsulació. Percentatge de plàsmid reporter (pGFP) encapsulat mitjançant l'electroporació i la permeabilització d'EV amb tensioactiu Polisorbat 80

Mètode usat	Eficiència d'Encapsulació (%)
Electroporació	65%
Permeabilització amb Tensioactius	75%

125 F 60 s. A continuació, les mostres electroporades van ser centrifugades a 10.000 rpm, 5 minuts utilitzant Corning. Spin-X. UF 500 UFL Centrifugal Concentrador, 5.000 MWCO Membrane, 25/Case per aïllar les EV encapsulades amb pGFP per centrifugació diferencial de plasmidi no.

Les vesícules extracel·lulars també van ser carregades amb pGFP utilitzant un reactiu químic, polisorbat 80. Breument, les EV van ser incubades amb Polisorbat 80 i pGFP a temperatura ambient, 10 minuts utilitzant un agitador (Wallac 1296-004 Delfia Plateshaker) per assegurar la incubació directa de les EV amb el tensioactiu.

Confirmar l'encapsulació

Després de la posada a punt dels mètodes postcàrrega, vam quantificar el plàsmid pGFP que no havia estat encapsulat mitjançant el marcatge amb PicoGreen®, una tinció nucleica fluorescent utilitzada amb l'objectiu d'analitzar l'eficiència d'encapsulació (EE%) de l'àcid nucleic dins de les vesícules extracel·lulars. El protocol Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit va permetre de quantificar el dsDNA que continua sent accessible al reactiu fluorescent de tint Pico-

Green® i el total dsDNA. El fluoròfor presenta un màxim d'emissió a 520 nm quan s'uneix específicament a l'ADN de doble cadena intacte (dsDNA), és a dir, un plasmidi no encapsulat, i evita la contribució del senyal de l'ADN degradat, altres contaminants o ADN que no sigui de doble cadena. Utilitzant una única concentració de tint PicoGreen (1:200 dilució) el rang de detecció es va establir entre 25 pg/mL -1000 ng/mL. La fluorescència en les mostres va ser determinada per Cary Eclipse Fluorescència espectrofotòmetre (Varian). El percentatge d'emissió de fluorescència el vam calcular a partir de les corbes de calibratge establertes prèviament per poder diferenciar el plasmidi lliure en el medi del plasmidi encapsulat.

Prova de concepte *in vitro*

Tots els experiments de transfecció *in vitro* amb melanòcits els vam fer amb un 70-80% de confluència en els cultius cel·lulars. El pGFP sense encapsular i les nanopartícules PBAE (Ad Health mat, 2018) encapsulades amb pGFP es van utilitzar com a controls de transfecció negatius i positius respectivament, per a les EV carregades amb pGFP per electroporació i per a l'estratègia de permeabilització del polisorbat 80. Per confirmar que

les EV havien estat capaces de lliurar la pGFP encapsulada de forma exògena a les cèl·lules, els senyals fluorescents de l'expressió pGFP després de la transfecció de 24-48h, van ser monitorats utilitzant microscòpia fluorescent i quantificats per citometria de flux.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

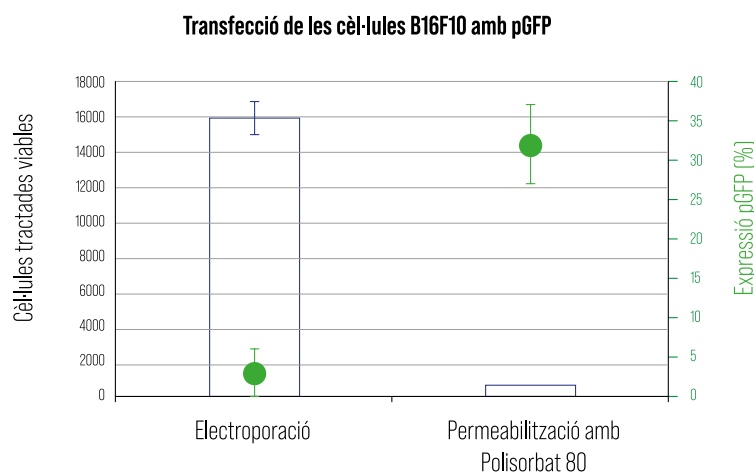
Les EV encapsulen de forma eficient un plàsmid model

Vam avaluar les eficiències obtingudes per l'encapsulació d'àcids nucleics en les vesícules extracel·lulars mitjançant mètodes de postcàrrega o exògens: l'electroporació i la permeabilització. Vam encapsular un plàsmid reporter pGFP com a model, responsable de codificar per a la proteïna verda de fluorescència que va permetre avaluar l'eficiència d'encapsulació i posterior transfecció per la fluorescència emesa per aquea proteïna. El càlcul de l'eficiència d'encapsulació (EE) el vam fer mitjançant un assaig colorimètric. Com mostren els resultats obtinguts **Taula 1**. Tant amb un mètode com amb l'altre, aconseguíem eficiències d'encapsulació molt elevades, superiors al 60%. Un resultat molt encoratjador que ens va fer continuar amb els dos altres candidats.

Biocompatibilitat dels EV carregats

En aquest apartat fer la prova de concepte *in vitro* qualitativa que permetia estudiar la viabilitat cel·lular de les cèl·lules tractades amb les vesícules extracel·lulars carregades usant ambdós mètodes mitjançant microscopia òptica de camp clar. En la **Figura 2** veiem que la viabilitat cel·lular de les cèl·lules tractades amb EV permeabilitzades va quedar compromesa i presentava un recompte de cèl·lules evidentment inferior amb relació a les cèl·lules tractades amb EV electroporades. Aquesta citotoxicitat clara

Figura 3. Percentatge d'expressió pGFP després de 48 hores d' incubació amb EV carregades amb pGFP com a model i viabilitat de cèl·lules tractades en funció del mètode usat per a la càrrega



s'atribueix al tensioactiu Polisorbat 80, d'acord amb articles anteriors¹¹.

Eficàcia de les EV per expressar els àcids nucleics encapsulats

En l'estudi, l'eficiència d'expressió del gen exogen va ser mesurada i confirmada mitjançant citometria de flux un cop transcorregudes 48 hores del tractament. Els resultats els mostra la **Figura 3**. Pel que fa al percentatge de cèl·lules tractades: l'eix primari presenta el recompte total de cèl·lules viables mentre que l'eix secundari representa l'expressió del plasmid reporter pGFP un cop transcorregudes 48 hores. Sobre la base dels resultats obtinguts, el percentatge més alt de l'expressió pGFP és 32% i correspon a les cèl·lules transfectades amb les vesícules permeabilitzades amb el tensioactiu Polisorbat 80. No obstant això, cal tenir en compte que la viabilitat total de les cèl·lules tractades amb EV permeabilitzades és gairebé nul·la. En conseqüència, encara que en percen-

L'electroporació
seria l'estratègia
d'encapsulació
exògena més
prometedora
per encapsular
àcids nucleics.

tatge el nombre de cèl·lules que expressen la proteïna codificada a l'àcid nucleic encapsulat sigui molt menor, l'electroporació seria l'estratègia d'encapsulació exògena més prometedora per encapsular àcids nucleics.

CONCLUSIÓ

Per primera vegada, hem aconseguit encapsular un plàsmid en una EV, amb una eficiència d'encapsulació

molt alta pels dos mètodes testats. No obstant això, l'ús de tensioactius pot tenir efectes citotòxics i afectar la viabilitat cel·lular. Per tant, la conclusió és que l'electroporació és un mètode eficient que obre la porta al disseny de noves teràpies pel melanoma basades en l'ús de vesícules extracel·lulars carregades amb àcids nucleics terapèutics.

AGRAÏMENTS

Aquest projecte ha rebut financiació econòmica del Col·legi de Farmacèutics de Barcelona (COFB) a través del programa Guardó al millor treball de fi de grau de Farmàcia presentat el 2020. També ha rebut el suport del Grup d'Enginyeria de Materials (Gemat), Institut Químic de Sarrià (IQS) i Universitat Ramon Llull (URL). M.G. i S.B. agraeixen el suport econòmic rebut per la Fundació Cellex. Les figures s'han fet amb biorender. ■

Bibliografia

1. C. Moreno Koch. Melanoma. Sociedad Española de Oncología. [Internet] 2004 [consultat 10 de juliol de 2021]; volum 27 (3) 13-15 Disponible a: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037848352004000300001
2. Flórez J. Quimioteràpia antineoplàstica: Jesús Flórez Beledo, coordinador. Farmacología Humana. 6ª ed. Barcelona: Mason; 2014. p. 1197-73[2].
3. Journal I, Factor I. BioMed Research International [J BIOMED BIOTECHNOL]. Comput Math Methods Med [Internet] 2015 [consultat 10 de juliol de 2021]; 2-4. Disponible a: <https://dx.doi.org/10.1155/2015/>
4. Gaceta Médica [Internet]. España: Sandra Pulido. El 77% de los pacientes con melanoma están vivos y sin tratamiento a los seis años con ipilimumab-nivolumab; 2021 [consultat 12 de juliol de 2021]; Disponible a: <https://gacetamedica.com/investigacion/el-77-de-los-pacientes-con-melanoma-estan-vivos-y-sin-tratamiento-a-los-seis-anos-con-la-combinacion-de-ipilimumab-nivolumab/>
5. ASEICA [Internet]. España: Comunicación ASEICA. NdP web Aseica Nuevas vías en Inmuno-Oncología. 2021 [consultat 16 de juliol de 2021]. Disponible from: <https://www.aseica.es/aseica-aborda-nuevas-vias-de-investigacion-en-inmuno-oncologia>
6. Extracellular vesicles - PubMed Timeline Results by Year Search [Internet]. PubMed. 2021 [consultat 16 de juliol de 2021]. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=extracellular%20vesicles&timeline=expanded>
7. Maheshwari R, Joshi G, Mishra DK, Tekade RK. Bionanotechnology in pharmaceutical research. Basic Fundam Drug Deliv. 2018;449- 71
8. Giacobino C, Canta M, Fornaguera C, Borrós S, Cauda V. Extracellular vesicles and their current role in cancer immunotherapy [Internet]. Vol. 13, Cancers. MDPI AG; 2021 [consultat 16 de juliol de 2021]. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34068657/>
9. Van Dommelen SM, Vader P, Lakhal S, Kooijmans SAA, Van Solinge WW, Wood MJA, et al. Microvesicles and exosomes: Opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery [Internet]. Vol. 161, Journal of Controlled Release. 2012 [consultat 16 juliol de 2021]. P. 635-44. Disponible a: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365911010741>
10. Araldi E, Krämer-Albers E-M, Hoen EN-'t, Peinado H, Psonka- Antonczyk KM, Rao P, et al. International Society for Extracellular Vesicles: first annual meeting, Abril 17-21, 2012: ISEV-2012. J Extracell Vesicles. 2012;1(1):19995.
11. Jacob MC, Favre M, Bensa JC. Membrane cell permeabilization with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry. Cytometry. 1991; 12(6):550-8, doi: 10.1002/cyto.990120612
12. Wiechekman, K. et al. Investigation of the bichinchoninic acid protein assay; Identification of the groups responsible for the color formation. Anal Biochem. 1988;175(232):7.

Ús de PCR per la detecció de resistències en *Mycoplasma genitalium* i *Neisseria gonorrhoeae* i diagnòstic d'infeccions vaginales

Patricia García García

Farmacèutica (UB),
màster en ciències hospitalàries

Part dels resultats obtinguts
(*Neisseria gonorrhoeae*) exposats al
congrés de microbiologia ECCMID
de París, França, del 18 al 21 d'abril
del 2020

Paraules clau:
PCR.
Mycoplasma genitalium.
Neisseria gonorrhoeae.
Infeccions vaginales.
Gen *gyr A*.

INTRODUCCIÓ

Les malalties de transmissió sexual (MTS) afecten tota la població sexualment activa i són molt prevalents a tot el món. L'Organització Mundial de la Salut (OMS) les defineix com malalties causades per diferents microorganismes com bacteris, virus i paràsits que es propaguen de persona a persona per contacte sexual, però també hi ha altres vies de contacte com la transplacentària o la directa en el part¹. Totes aquestes patologies són problemes que ens afecten i que requereixen solucions. L'*Agenda 2030 per al desenvolupament sostenible* proposa tractar-les amb mesures específiques. Una, agilitar l'enfocament de tres MTS que requereixen una acció immediata i que és possible controlar: gonorrea (*Neisseria gonorrhoeae*), sífilis (*Treponema pallidum subesp. pallidum*) i papil·loma genital (papil·loma humà)².

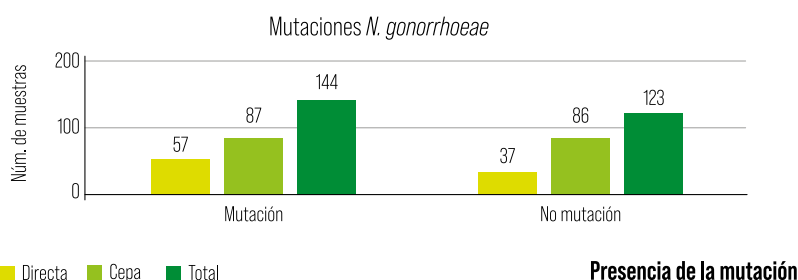
Tradicionalment, el diagnòstic d'aquestes malalties era manual i

complex ja que els microorganismes patògens són exigents i calia tenir la interpretació de professionals de laboratori. Actualment, amb la introducció de les PCR, el procés és més automàtic, ràpid i menys laboriós¹.

Com a patògens més corrents trobem *Mycoplasma genitalium*, causant d'uretritis no gonocòccica en homes i de malaltia pèlvica inflamatòria en dones². El tractament habitual és azitromicina³. *Neisseria gonorrhoeae* que provoca gonorrea i es tracta amb fluoroquinolones^{3,4}. *Candida albicans* i *Trichomonas vaginalis* que són responsables d'infeccions vaginales associades a una disminució de la població de *Lactobacillus*^{4,5}. En cada cas, el tractament depèn del microorganisme en concret⁶, però en tots s'observa un augment creixent de les resistències⁶. L'aparició de resistències antibiòtiques pot implicar fallades del tractament i dificultar el control de la malaltia.

En aquest estudi presentem els resultats de tres projectes relacionats amb la detecció de resistències i de

Figura 1. Resultats de les mutacions per a mostres positives de *M. genitalium*.



La PCR és una eina útil en la detecció de microorganismes i les seves resistències antibiòtiques.

microorganismes típics d'MTS per tècniques de PCR.

OBJECTIU

Avaluar tres equips de diagnosi PCR de detecció de microorganismes i de resistència comparats a antibiòtics: *M. genitalium* i mutacions associades a resistències a azitromicina, *N. gonorrhoeae* i mutacions associades a resistències a ciprofloxacina i equip de diagnòstic d'infeccions vaginals.

MATERIAL I MÈTODES

L'estudi s'ha fet al laboratori de microbiologia d'un hospital terciari universitari, de Barcelona (l'Hospital de la Vall d'Hebron)

- **Resistència de *Mycoplasma genitalium* a azitromicina.** Hem utilitzat 100 mostres positives d'M. Genitalium diagnosticades amb la metodologia tradicional dels serveis d'atenció primària de diferents hospitals i dispositius com el servei "BCN CheckPoint" de Drassanes. L'assaig es basa en la detecció d'M. genitalium i les mutacions genètiques en el gen 23S ARNm causants de la resistència a azitromicina. Per detectar el microorganisme i les resistències vam fer servir un test de PCR nou, a temps real "MG & AziR Assay" (Allplex™)⁷.
- **Resistència de *Neisseria gonorrhoeae* a ciprofloxacina.** Hem treballat amb 275 mostres d'ADN confirmades com a positives per a *N. gonorrhoeae* segons la PCR de detecció d'MTS de la Vall d'He-

bron, també vam fer antibiograma per detectar la resistència a azitromicina excepte en 23 mostres. L'assaig buscava la detecció d'*N. gonorrhoeae* i el marcador de resistència correspon a ciprofloxacina, la presència del gen *gyrA* S91F mutant. Per detectar el microorganisme i les resistències vam utilitzar un test de nou PCR múltiple a temps real anomenat "ResistancePlus GC" (SpeedX)⁸.

- **Diagnòstic d'infeccions vaginals.** Vam treballar amb 100 mostres d'exsudats vaginals de les quals a l'hospital havien fet un diagnòstic manual. Vam fer un prova de PCR múltiple anomenat "Vaginits Screening Assay" a temps real d'Allplex™ i que permet tenir un diagnòstic en menys de quatre hores. Aquest equip de diagnòstic interpreta el resultat en funció de la presència de microorganismes patògens i de la quantitat de Lactobacillus presents⁹.

RESULTATS

Resistència de micoplasma genitalium a azitromicina

Les 100 mostres estudiades corresponien a pacients amb diagnòstic positiu de *M. genitalium* segons el test clàssic de detecció d'MTS. Hi havia 45 pacients asimptomàtics, 36 de simptomàtics i en 19 no constava informació a l'historial.

El test va descobrir *M. genitalium* en 60 mostres. En les 40 restants no va ser capaç de detectar la presència del microorganisme. Segons assen-

yala l'estudi, és probable que aquesta discrepància fos deguda a un error humà en el procediment de recollida de les mostres i en la conservació.

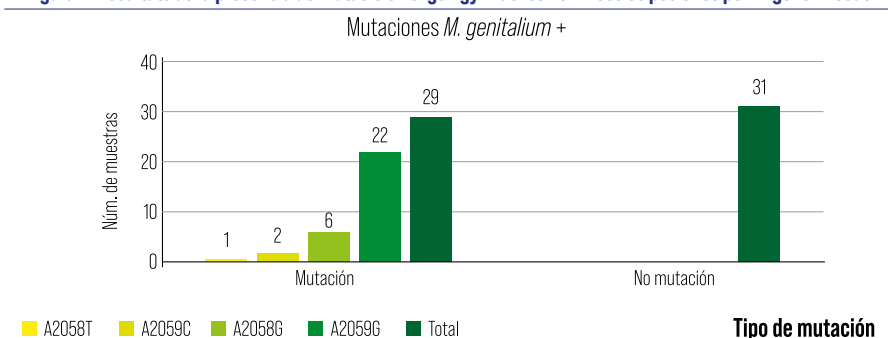
En les 60 mostres positives vam buscar mutacions en el gen 23S, que proporciona resistència a azitromicina: 31 de les mostres no en tenien i 29 presentaven diferents mutacions en el gen, xifra que representa un 48,33% de mostres resistents com veiem en la figura 1.

Resistència de *Neisseria gonorrhoeae* a ciprofloxacina

De les 275 mostres confirmades com a positives segons el departament d'MTS amb el kit testat, en vam detectar 267 de positives per *N. gonorrhoeae*. En les 8 restants no s'hi va trobar cap presència fins i tot després de repetir el test i van quedar excloses. Aquests resultats negatius poden ser deguts a un error humà en la recollida de mostres o a una diferència de sensibilitat entre el kit i el mètode estàndard. De les 267 mostres, el kit va detectar mutacions en el gen *gyrA* i per tant resistència a ciprofloxacina en 144 mostres com veiem en la figura 2.

A part vam fer un antibiograma per a les 275 mostres inicials per detectar-hi manualment la resistència a ciprofloxacina i comparar-la amb els resultats de l'equip de diagnòstic. Segons l'antibiograma, 140 mostres del total presentaven resistència, 112 no en presentaven i en 23 casos l'antibiograma no es va fer i no es va poder comparar. A l'hora de comparar amb el equip de diag-

Figura 2. Resultats de la presència de mutació en el gen *gyrA* de les 267 mostres positives per *N. gonorrhoeae*.



nòstic vam trobar una bona correlació entre els resultats de les dues proves com veiem a la figura 3.

Diagnòstic d'infeccions vaginals

Partiem de 100 mostres d'exsudat vaginal analitzades al laboratori per personal especialitzat mitjançant tècniques clàssiques de cultiu. Després d'aquest diagnòstic vam tenir: 39 mostres diagnosticades de vaginosis bacteriana, 15 de *Candida albicans*, 5 de *Candida spp.* i 5 de *Trichomonas vaginalis*, vam considerar que 30 mostres contenien microorganismes que pertanyien a la microbiota normal i 6 com a microbiota alterada (no tenien biota normal però tampoc presentaven microorganismes patògens).

L'equip diagnòstic va ser testat en una primera classificació de les mostres i després en una classificació final. Els resultats obtinguts en la fase final van ser: 35 mostres de vaginosis bacteriana, 15 de *C. albicans*, 5 de *Candida spp.* i 5 de *T. vaginalis*, 37 mostres amb biota normal i 3 amb biota alterada com veiem a la figura 4.

Finalment, vam comparar els resultats per tots dos mètodes; el percentatge de correlació va ser de 89,7% per a la vaginosis bacteriana, un 50% per a la microbiota alterada i un 100% per a *C. albicans*, *Candida Spp* i *T. vaginalis*.

DISCUSSIÓ

Si tenim en compte que les MTS són malalties molt prevalents, que la resistència a antibiòtics és un fenomen cada vegada més freqüent i que el diagnòstic d'aquestes patologies és manual i laboriós, hem fet aquest estudi per saber els nivells de resistència als antibiòtics i poder millorar el diagnòstic de les infeccions vaginals.

Pel que fa a la detecció de *M. genitalium*, si deixem de banda l'error humà en l'obtenció i la conservació de

Els kits de PCR
testats permeten
la identificació de
Neisseria gonorrhoeae i
Mycoplasma genitalium.
Per a *Neisseria* també
detecten el gen *gyr*
A, important en la
resistència a antibiòtics.

les mostres, podem afirmar que el test té una sensibilitat alta per detectar aquest microorganisme ja que en les 60 mostres avaluades, els resultats van ser molt similars a les del mètode de referència. Pel que fa a l'aparició de mutacions en el gen 23S (48,33% de mostres resistents), els resultats també van ser similars o lleugerament superiors a altres estudis amb els quals els vam comparar¹⁰⁻¹². Aquestes diferències poden ser degudes al fet d'eliminar una part de les mostres i treballar amb una mostra més petita que la resta d'estudis.

Pel que fa a la detecció d'*N. gonorrhoeae*, el test ha demostrat ser molt eficaç a l'hora de detectar el microorganisme ja que pràcticament totes les mostres positives confirmades pel mètode de referència van ser positives per a l'equip de diagnòstic. Pel que fa a l'aparició de resistències, l'equip de diagnòstic va demostrar una correlació molt bona amb l'antibiograma fet a la Vall d'Hebron de manera que els resultats entre els dos mètodes es correlacionaven pràcticament a la perfecció i eren altament concordants. A l'hora de comparar amb altres estudis també vam veure que els resultats tant pel que fa a la detecció del microorganisme com a les resistències eren molt similars en els estudis consultats¹³⁻¹⁵. En general, es pot dir que aquest "kit" presenta una sensibilitat i una especificitat similar als antibiogrames, però té l'avantatge de requerir només quatre hores per obtenir els resultats i poder adoptar el tractament com més aviat millor en comptes de les clàssiques 48 hores d'abans.

Finalment, veiem que l'equip per a infeccions vaginals presenta una bona correlació entre el diagnòstic de rutina i els resultats. Pel que fa a la

Figura 3. Resultats de la comparació de 275 mostres amb l'antibiograma.

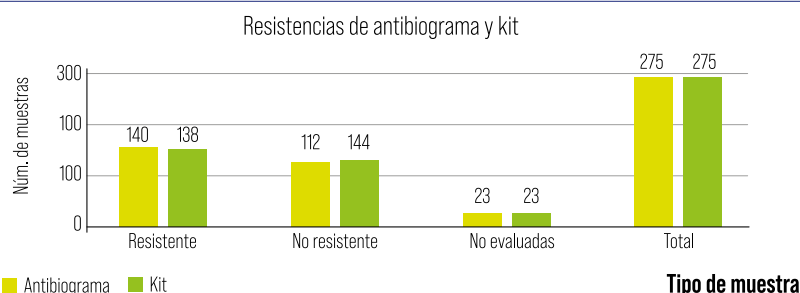
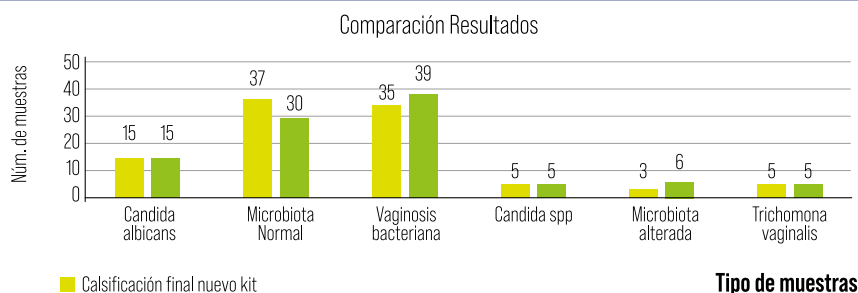


Figura 4. Comparació dels resultats obtinguts pel laboratori vs el kit testat.



interpretació de les infeccions bacterianes en general, hi ha una correlació molt bona entre els resultats de referència i els obtinguts. Cal destacar una discrepància entre alguns casos de “biota normal” i de “vaginosis” ja que l’equip detectava més resultats de la primera i menys de la segona que el diagnòstic de referència. Això pot ser degut al fet que el diagnòstic d’aquestes patologies acostuma a ser manual i per tant subjectiu, en canvi el resultat del test és objectiu i dona resultats més precisos. En general, podem dir que funciona amb la mateixa eficàcia que el diagnòstic de rutina, però que permet obtenir resultats més ràpidament i que també presenta molt bona correlació a l’hora de comparar amb altres estudis^{5,16}.

En resum, les MTS tenen una distribució àmplia gràcies a les característiques clíniques i epidemiològiques intrínseques. L’accessibilitat a les tècniques de diagnòstic ràpid és molt útil per resoldre consultes de forma àgil i establir els tractaments ràpidament. Aquests dos fets permeten controlar la disseminació de les malalties entre la població i són útils tant per als pacients com per a la salut pública.

Les resistències als antibiòtics són un problema freqüent i molt important en el tractament de diferents MTS, de manera que poder discriminar-ne la presència en diferents microorganismes és molt útil per tractar-les posteriorment. Tots dos tests sobre la detecció de resistències permeten

arribar ràpidament a un diagnòstic del microorganisme i són capaçs d’orientar en l’aparició de resistències antibiòtiques. En concret, l’equip diagnòstic d’*N. gonorrhoeae* és fiable per ambdues raons. D’altra banda, l’*M. genitalium* és fiable per detectar resistències i, si obviem l’error humà, és fiable per identificar el microorganisme.

L’equip de diagnòstic de les infeccions vaginals és una alternativa molt viable per substituir la tècnica manual utilitzada actualment. Aquesta possibilitat pot servir per millorar el diagnòstic d’aquesta patologia ja que avui mateix, el temps de detecció és de 24-48 hores i amb aquest equip, el temps d’espera quedaria reduït a quatre. ■

Bibliografia

- World Health Organization. ESTRATEGIA MUNDIAL DEL SECTOR DE LA SALUD CONTRA LAS INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL 2016-2021 [Internet]. Switzerland; 2016. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250253/WHO-RHR-16.09-spa.pdf;jsessionid=C6E4AD09A-CAFB3D2FAACB939A75BAD6E?sequence=1>
- Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D. Brock, biología de los microorganismos [Internet]. 12th ed. Madrid: Pearson Educación; 2009 [cited 2020 Apr 23]. 1259 p. Available from: https://cercabib.ub.edu/iii/encore/record/C__Rb1941986__Sbrock12_Orightresult_U__X1?lang=cat
- Jensen JS, Cusini M, Gomberg M, Moi H. 2016 European guideline on Mycoplasma genitalium infections. J Eur Acad Dermatology Venereol [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2020 Apr 5];30(10):1650-6. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.sire.ub.edu/doi/full/10.1111/jdv.13849>
- Gaydos CA, Beqaj S, Schwebke JR, Lebed J, Smith B, Davis TE, et al. Clinical Validation of a Test for the Diagnosis of Vaginitis. Obstet Gynecol. 2017 Jul 1;130(1):181-9.
- Lynch T, Peirano G, Lloyd T, Read R, Carter J, Chu A, et al. Molecular diagnosis of vaginitis: Comparing quantitative PCR and microbiome profiling approaches to current microscopy scoring. J Clin Microbiol [Internet]. 2019 [cited 2020 Apr 11];57(9). Available from: <https://jcm-asm-org.sire.ub.edu/content/57/9/e00300-19>
- Organization WH. WHO | Report on global sexually transmitted infection surveillance 2018 [Internet]. World Health Organization. World Health Organization; 2018 [cited 2020 Apr 10]. Available from: <https://www.who.int/reproductivehealth/publications/stis-surveillance-2018/en/>
- Seegene Inc [Internet]. 2019 [cited 2020 Oct 4]. Available from: http://www.seegene.com/assays/allplex_mg_n_azir_assay#
- SpeedX | ResistancePlus® GC [Internet]. 2019 [cited 2020 Oct 4]. Available from: <https://plexpcr.com/products/sexually-transmitted-infections/resistanceplus-gc/>
- Seegene Inc [Internet]. 2019 [cited 2020 Oct 4]. Available from: http://www.seegene.com/assays/allplex_vaginitis_screening_assay
- Fernández-Huerta M, Vall M, Fernández-Naval C, Barberá MJ, Arando M, López L, et al. Mycoplasma genitalium macrolide resistance update: Rate among a 2016-2017 cohort of patients in Barcelona, Spain. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2020 Mar 1;38(3):99-104.
- Braam JF, van Marm S, Severs TT, Belousov Y, Mahoney W, Kusters JG. Sensitive and specific assay for the simultaneous detection of Mycoplasma genitalium and macrolide resistance-associated mutations. Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2020 Apr 29];37(11):2137-44. Available from: <https://link-springer-com.sire.ub.edu/article/10.1007/s2Fs10096-018-3350-3>
- Piñero L, Idigoras P, de la Caba I, López-Olaizola M, Cilla G. Guided antibiotic therapy for Mycoplasma genitalium infections: Analysis of mutations associated with resistance to macrolides and fluoroquinolones. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2019 Jun 1;37(6):394-7.
- Ebayan S, Windsor M, Bordin A, Mhango L, Erskine S, Trembizki E, et al. Evaluation of the Resistance-Plus GC (beta) assay: a commercial diagnostic test for the direct detection of ciprofloxacin susceptibility or resistance in Neisseria gonorrhoeae. J Antimicrob Chemother. 2019;74(7):1820-4.
- De Korne-Elenbaas J, Pol A, Vet J, Dierdorp M, Van Dam AP, Bruisten SM. Simultaneous Detection of Neisseria gonorrhoeae and Fluoroquinolone Resistance Mutations to Enable Rapid Prescription of Oral Antibiotics. Sex Transm Dis [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2020 Apr 29];47(4):238-42. Available from: https://journals.lww.com/stdjournal/Full-Text/2020/04000/Simultaneous_Detection_of_Neisseria_gonorrhoeae.5.aspx
- Ellis O, Hemarajata P, Shahkolahi A, Masinde G, Buchs K, Humphries RM, et al. A multisite implementation of a real-time polymerase chain reaction assay to predict ciprofloxacin susceptibility in Neisseria gonorrhoeae. Diagn Microbiol Infect Dis. 2019 Jul 1;94(3):213-7.
- Schwebke JR, Gaydos CA, Nyirjesy P, Paradis S, Kodsi S, Cooper CK. Diagnostic performance of a molecular test versus clinician assessment of vaginitis. J Clin Microbiol [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2020 Apr 30];56(6). Available from: <https://jcm-asm-org.sire.ub.edu/content/56/6/e00252-18>

Recerca de compostos insulinomimètics en l'oli d'oliva

Maria Font-Quer Pellicer

Treball de final de grau de Farmàcia,
Departament de Farmacologia,
Toxicologia i Química Farmacèutica,
Facultat de Farmàcia i
Ciències de l'Alimentació,
Universitat de Barcelona

Paraules clau:
Diabetis.
Oli d'oliva.
Polifenols.
Oleuropeïna.
Oleocanthal.
Oleaceïna
Glucosa.

INTRODUCCIÓ

La diabetis de tipus 2

És una malaltia no transmissible considerada un trastorn metabòlic crònic. L'Organització Mundial de la Salut calcula que el 2014 ja hi havia uns 422 milions d'adults afectats a tot el món i que aquesta xifra s'havia duplicat amb relació al 1980¹. La tendència a centrar-se en aquesta afecció continua ja que està considerada un problema greu de salut pública que contribueix a augmentar la mortalitat i la morbiditat globals.

La diabetis de tipus 2 representa un 80-90% de casos² i es produeix quan l'organisme no pot fabricar de manera òptima l'hormona insulina, l'encarregada de facilitar l'entrada de la glucosa a una sèrie de cèl·lules del cos. L'individu acaba desenvolupant una resistència a l'acció d'aquesta i una entrada deficient de glucosa a les cèl·lules i per això la malaltia cursa amb un excés de sucre sanguini.

Aquest trastorn està directament relacionat a un estil de vida sedentari i també a molts factors de risc que són modificables, per exemple, el tabaquisme, una dieta inadequada o una activitat física insuficient. Establir mesures de prevenció i bons hàbits de vida és el millor tractament per evitar que es desenvolupi.

L'objectiu principal del tractament multimodal és mantenir els nivells de sucre de la sang entre els valors establerts, és a dir, la glucosa sanguínia en dejú entre 70 i 100 mg/dl³. La pauta que el pacient ha de seguir

es basa en un pla d'alimentació saludable i convenient per controlar el pes corporal, una pràctica regular d'activitat física i prendre fàrmacs hipoglucèmics per via oral. Si l'evolució de la malaltia ho requereix, s'haurà d'afegir insulina injectable al tractament. A més, tractar la malaltia amb un pla alimentari adequat resulta extremadament beneficiós per controlar els nivells de glucosa en la sang. És per això que ha augmentat la necessitat de trobar aliments i nutrients que ajudin a controlar-la, especialment que millorin la captació de glucosa.

La dieta mediterrània i l'oli d'oliva

Avui en dia hi ha una evidència àmplia dels beneficis de la dieta mediterrània, especialment pels aliments que inclou i la quantitat de compostos bioactius que ofereix. Aquest pla alimentari té com a base una ingesta de verdura, fruita i llegum notable, la inclusió de peix i làctics i un consum baix de carn. I també el fet que en la mediterrània utilitzem l'oli d'oliva per amanir els plats i per cuinar és un dels punts forts d'aquesta dieta.

L'oli d'oliva conté una matriu extensa de components bioactius associats a beneficis fisiològics per a la salut. S'extreu de la polpa i del pinyol de l'oliva, el fruit de l'olivera (*Olea europaea* L.). Cal saber que és molt millor fer servir oli verge extra obtingut per procediments mecànics ja que els processos de refinat fan perdre gran part dels compostos bioactius. L'evidència científica avala l'ús d'aquest aliment, un exemple, l'estudi PRE-DIMED ha demostrat que una dieta

Tot i que falta integrar els demés resultats de l'equip de recerca, l'abordatge més prometedor en la prevenció i cotractament de la diabetis és l'addició d'oli d'oliva verge extra en la dieta dels pacients.

mediterrània suplementada amb oli d'oliva redueix la incidència de la diabetis de tipus 2 un 52% en participants amb risc cardiovascular elevat⁴. L'estudi dels components de l'oli ha deixat entreveure que el ventall de polifenols, uns compostos fenòlics produïts pel metabolisme secundari del vegetal als quals s'atribueix una acció antioxidant i antiinflamatòria potent, serien els responsables dels beneficis observats per combatre la diabetis.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

Aquest treball forma part d'un projecte multidisciplinari que du a terme el grup de recerca en polifenols de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Bar-

celona, concretament el grup de recerca en toxicologia (GRET) d'aquesta facultat. La hipòtesi principal del projecte és que els polifenols de l'oli d'oliva fan disminuir la resistència a la insulina i la inflamació i milloren la resposta fenotípica dels pacients diabètics. Entre aquestes investigacions, aquest treball contribueix a la recerca experimental mitjançant un model in vitro, per detectar el potencial insulinomimètic de l'extracte d'oli d'oliva i de tres dels seus polifenols per separat.

Així, doncs, el principal objectiu és avaluar experimentalment l'activitat insulinomimètica d'un extracte d'oli d'oliva i d'una varietat de components que se n'obtenen, en particular els polifenols oleuropeïna, oleocanthal i oleaceïna. L'avaluació pretén demostrar que aquests compostos poden augmentar la captació cel·lular de glucosa en embrions de peix zebra (*Danio rerio*) després d'una exposició d'una hora i d'una altra de 24 hores al compost d'estudi.

A més, un objectiu secundari és recopilar evidències mitjançant una revisió bibliogràfica dels beneficis potencials de l'extracte d'oli d'oliva i els seus components en pacients diabètics. Finalment, establir si l'oli d'oliva i els polifenols estudiats poden ser part d'un pla dietètic òptim o emprats com a suplementos en pacients que pateixen diabetis tipus 2.

MATERIALS I MÈTODES

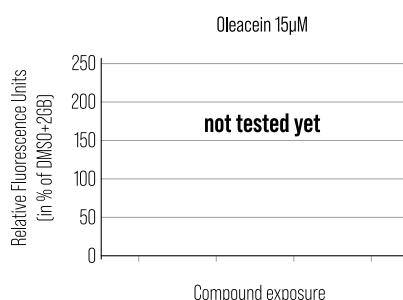
A part dels diferents estris de laboratori, el GRET ens va proporcionar embrions de peix zebra, la glucosa fluorescent 2GB (5-[3,3-dimetil-2-[3-(1,3,3-trimetilindol-1-il)-2-il]prop-2-enilidè]indol-1-il]-1-

[4-[2-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxietil]piperazin-1-il]pentan-1-ona)⁵, un extracte d'oli d'oliva verge extra (5 g extrets amb metanol, després amb hexà i acetonitril i finalment reconstituït en 500 µL de sulfòxid de dimetil (DMSO)), i els compostos oleaceïna 15 µM, oleocanthal 15 µM i oleuropeïna 15 µM.

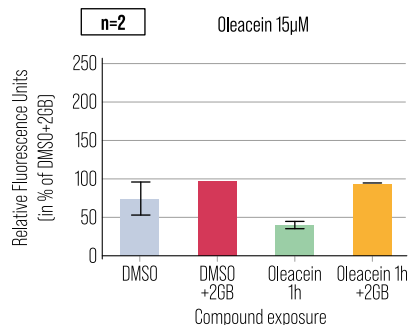
L'avaluació experimental l'hem fet en embrions de peix zebra ja que són una alternativa a l'experimentació animal i tenen un sistema d'homeòstasi de la glucosa similar al dels mamífers. El procediment normalitzat de treball (PNT) que hem seguit és aquell que el company Martí Ducabla Rogés va establir al GRET, basat en el mètode publicat per Lee J⁶ i Park J⁷. Aquest mètode es basa en la possibilitat d'avaluar la capacitat dels diferents extractes per separat i d'incrementar la captació cel·lular de l'anàleg de la glucosa fluorescent 2GB. Posteriorment, aquesta captació s'analitza via l'emissió de fluorescència amb un fluorímetre.

En una placa de 96 pous, vam in-

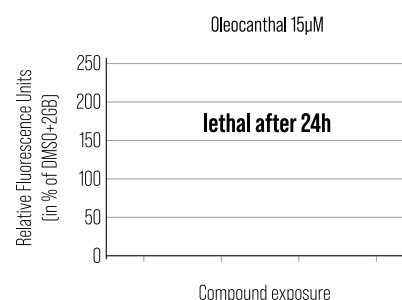
Gràfic 1. Unitats relatives de fluorescència després de l'exposició de 24 h a oleaceïna



Gràfic 2. Unitats relatives de fluorescència després de l'exposició d'1 h a oleaceïna



Gràfic 3. Unitats relatives de fluorescència després de l'exposició de 24 h a oleocanthal



L'oli d'oliva pot resultar un aliment òptim en la dieta de pacients diabètics per la composició rica en molècules antiinflamatòries i antioxidants que conté. A més, resulta una matriu de polifenols que poden representar un efecte sinèrgic.

Introduïm sis embrions en quatre pous diferents. Dos d'aquests pous van ser omplerts amb el compost d'estudi, per exemple oleaceïna al 0,1%, mentre que els altres dos (com a grup control) eren exposats a una solució de Danieu 0,3X pH=7,4. Deixàvem exposat al compost d'estudi 1 o 24 hores. Posteriorment, rentàvem el pou i passàvem a l'exposició d'un dels grups control i d'un dels grups exposats a compost amb la glucosa fluorescent 2GB, tres hores, els altres dos pous eren exposats a DMSO 0,1%. Un cop passat el temps mar-

cat, transvasaven el contingut de cada pou a un eppendorf. En aquell moment ja podíem fer dos rentats del contingut amb la solució de Danieu. Posteriorment, calia deixar sols els embrions i afegir 120 µL de CellLytic M per homogeneïtzar el contingut de manera mecànica amb un pellet. A continuació, centrifugàvem el contingut dels eppendorfs, 10 minuts, per poder transvasar el sobrenedant a uns altres eppendorfs de 0,5 mL i finalment avaluar l'emissió de fluorescència del contingut amb el fluorímetre ($\lambda_{ex}=491$ i $\lambda_{em}=586$ nm). Finalment, vam analitzar estadísticament els resultats amb GraphPad Prism v8 i amb un t-test per comparar els grups en parelles.

RESULTATS

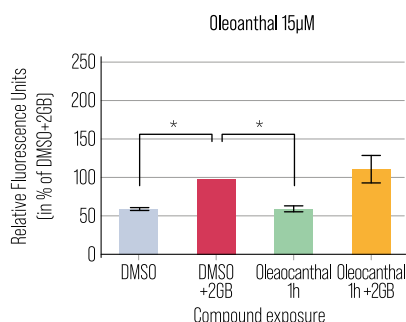
Els resultats de l'avaluació experimental mostren que després de l'exposició d'una hora, cap dels polifenols produïa un increment significatiu de la fluorescència i, per tant, no hi havia un augment en la captació de glucosa. Tot i així, després de l'exposició de 24 h, l'oleuropeïna sí que generava un augment de la fluorescència però no el podem considerar significatiu ja que falten més exposicions per fer l'estudi estadístic. D'altra banda, l'oleocanthal va resultar letal per als embrions, per tant,

no vam poder avaluar-ne l'efecte en la captació de glucosa. Pel que fa a l'avaluació de l'oleaceïna passades 24 hores, l'avaluació no va ser possible a causa del tancament dels laboratoris per l'estat d'alarma causat per la pandèmia de COVID-19, per aquest motiu manquen reproduccions de l'experiment.

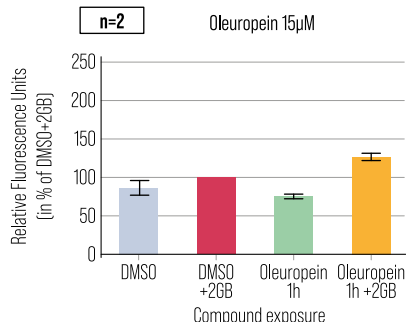
El resultat més prometedori el va demostrar l'exposició a oli d'oliva, ja que després d'una hora hi va haver un increment en l'emissió de fluorescència, però no és estadísticament significatiu. Pel que fa a l'exposició de 24 h, hi ha un increment amb un p-valor de 0,07, si bé tampoc es pot considerar significatiu perquè hi ha una desviació elevada en els resultats, però es podrien fer més avaluacions per afinar l'evidència per saber si aquest increment es pot considerar significatiu o no.

A aquests resultats cal afegir-hi els extrets gràcies a l'anàlisi de la revisió bibliogràfica. Aquesta suggereix que l'oli d'oliva pot resultar un aliment òptim en la dieta de pacients diabètics per la composició rica en molècules antiinflamatòries i antioxidants que conté. A més, resulta una matriu de polifenols que poden representar un efecte sinèrgic. Els estudis experimentals mostren que l'oli d'oliva va un 13% associat a una reducció del risc de tenir diabetis, amb una dosi

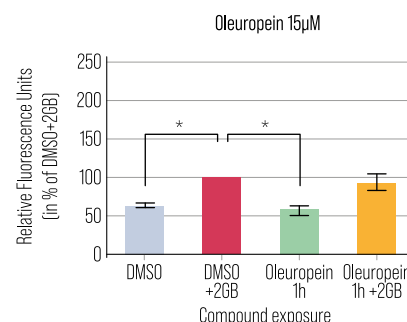
Gràfic 4. Unitats relatives de fluorescència després de l'exposició d'1 h a oleocanthal



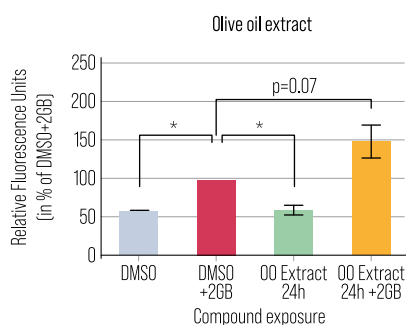
Gràfic 5. Unitats relatives de fluorescència després de l'exposició de 24 h a oleuropeïna



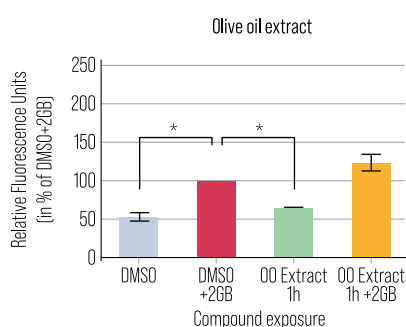
Gràfic 6. Unitats relatives de fluorescència després de l'exposició d'1 h a oleuropeïna



Gràfic 7. Unitats relatives de fluorescència després de l'exposició de 24 h a oli d'oliva



Gràfic 8. Unitats relatives de fluorescència després de l'exposició d'1 h a oli d'oliva



de 15-20 grams al dia (8), a més d'altres d'efectes antidiabètics com la reducció de l'hemoglobina glicosilada o de la glucosa plasmàtica en dejú

en pacients que han fet dietes amb oli d'oliva. Pel que fa a l'oleuropeïna, l'oleocanthal, i l'oleaceïna, aquests han mostrat efectes indirectes amb què poder aconseguir bons resultats en l'abordatge d'aquesta malaltia, sobretot pel aspecte antioxidant i antiinflamatori que té. Cal destacar que el polifenol amb resultats més prometedors és l'oleuropeïna.

DISCUSSIÓ

Gràcies a la recopilació de resultats podem afirmar que l'oli d'oliva pot resultar un aliment òptim en la dieta de pacients diabètics ja que té un paper essencial en la intervenció nutricional per al conjunt en polifenols i és fàcil d'incorporar a l'alimentació diària. La recomanació que proposem pel que fa a prevenció i co-tractament de la diabetis de tipus 2, és que un pla dietètic òptim podria ser la dieta mediterrània amb una ingesta diària de 20 grams d'oli d'oliva. Pel que fa als polifenols estudiats, no n'hi ha cap que presenti una activitat insulinomimètica per si sol, circumstància que podria ser deguda al fet que els components de l'oli d'oliva

tenen efecte sinèrgic entre ells. Tot i així mostren efectes prometedors en la recerca bibliogràfica que podrien comparar-se a l'addició de més reproduccions de l'experiment que van ser limitades per l'arribada de la pandèmia de COVID-19.

CONCLUSIONS

L'oli d'oliva és l'extracte amb propietats insulinomimètiques més esperançadores tot i així cal més recerca per avaluar els fet. S'ha de tenir en compte que encara que els polifenols no mostrin una activitat insulinomimètica significativa, sí que hi ha evidència publicada de les altres propietats antioxidants, antiinflamatòries i anti-diabètiques que poden tenir un paper beneficiós en el tractament multimodal de la diabetis, especialment en el cas de l'oleuropeïna. Tot i així, fins que no obtinguem els altres resultats dels companys de recerca, no podem establir que el millor abordatge en la prevenció i el co-tractament de la diabetis és l'addició d'oli d'oliva verge extra a la dieta dels pacients. ■

Bibliografia

- World Health Organization. Global Report on Diabetes [Internet]. Vol. 978, Isbn. 2016. [consulta, 1 de juliol de 2021]. Disponible a: http://www.who.int/about/licensing/%5Chttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf
- Clínic Barcelona. Què és la Diabetis Tipus 2? [Internet]. [Consulta, 1 de juliol de 2021]. Disponible a: <https://www.clinicbarcelona.org/ca/asistencia/malalties/diabetis/diabetis-tipus-2>
- (PCAG) APCAG. Standards of medical care in diabetes-2019 [Internet]. Vol. 37, Clinical Diabetes Journal. 2019. [Consulta, 1 de juliol de 2021]. Disponible a: <https://doi.org/10.2337/cd18-0105>
- Salas-Salvadó J, Bulló M, Babio N, Martínez-González MÁ, Ibarrola-Jurado N, Basora J, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with the mediterranean diet: Results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial. Diabetes Care. 2011;34(1):14-9.
- PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 101779005; [consultat 6 de juliol de 2021]. Disponible a: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/101779005>
- Lee J, Jung DW, Kim WH, Um JI, Yim SH, Oh WK, et al. Development of a highly visual, simple, and rapid test for the discovery of novel insulin mimetics in living vertebrates. ACS Chem Biol. 2013;8(8):1803-14.
- Park J, Um JI, Jo A, Lee J, Jung DW, Williams DR, et al. Impact of molecular charge on GLUT-specific cellular uptake of glucose bioprobes and in vivo application of the glucose bioprobe, GB2-Cy3. Chem Commun. 2014;50(66):9251-4.
- Schwingshackl L, Lampousi AM, Portillo MP, Romaguera D, Hoffmann G, Boeing H. Olive oil in the prevention and management of type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of cohort studies and intervention trials. Nutr Diabetes [Internet]. 2017;7(4):1-6. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1038/nutd.2017.12>

Fibromiàlgia a través de la genètica: desenvolupament d'un algoritme de diagnòstic basat en dades de microarrays

José Manuel Borrego Burón
Graduat en Farmàcia
(Universitat de Barcelona)

INTRODUCCIÓ

La síndrome de la fibromiàlgia (FM) és una malaltia multifactorial incapacitant. Es caracteritza per la presència de dolor musculoesquelètic profund i difús associat a altres manifestacions subjectives com fatiga, trastorns del son, ansietat i depressió en intensitats variables. La preocupació principal d'aquesta síndrome prové del fet que encara se'n desconeixen les causes. En els darrers anys hi ha hagut diverses hipòtesis i avenços en la fisiopatologia, però encara no hi ha consens sobre l'arrel del problema. Neuprez et al.¹ afirmen que els mecanismes potencials inclouen predisposició genètica, amplificació central, fracàs del control inhibitori i aferències nocicep-

tives perifèriques. A part d'això, ja fa temps que els investigadors informen de l'existència d'una susceptibilitat familiar a FM i suggereixen que pot ser atribuïble a factors genètics². Una investigació més profunda hauria d'ampliar aquesta informació i aportar llum a les causes. Diferències genètiques i transcriptòmiques en pacients d'FM i els controls informació haurien de servir per trobar informació nova i demostrar que poden ser una eina diagnòstica objectiva i precisa.

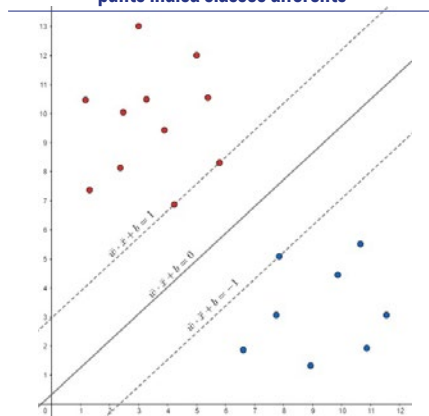
OBJECTIUS

Aquest estudi tenia dos objectius principals. El primer, aprendre a dissenyar i a instaurar un algoritme discriminador selectiu de dades de micromatris d'ADN de pacients amb FM. En segon lloc, avaluar possibles causes fisiopatològiques i com poden servir aquestes dades genètiques en el diagnòstic o el tractament.

MÈTODES

Després d'una cerca en diverses bases de dades genètiques (NCBI PubMed, NCBI dbSNP, NCBI GEO, OMIM, Catàleg GWAS, Catàleg PheWAS) a la base de dades GEO vam trobar tres estudis rellevants de la malaltia amb dades de microarray disponibles: expressió gènica³, metilació d'ADN⁴ i expressió de microARN⁵. En endavant ens hi referim com a EG, MA i EM, respectivament.

Figura 1. Exemple d'una classificació SVM bidimensional en què la línia central representa la funció de decisió i les línies de punts, els marges límit designats pels vectors de suport (punts sobre els marges). El color dels punts indica classes diferents



Paraules clau:
Fibromiàlgia.
Genètica.
Microarrays.
Diagnòstic.
Machine learning.

El disseny de l'algoritme

El diagnòstic d'un pacient es pot modelar per mitjà d'un problema de classificació de manera que assignant una sèrie de valors a algunes variables, podem decidir si corresponen a un pacient o a un control sa. Aquestes variables poden ser els nivells de glicohemoglobina en sang per diagnosticar la diabetis o la pressió arterial per a la hipertensió. El desenvolupament de les tècniques de *microarray* ofereixen oportunitats interessants per a la classificació mitjançant dades genètiques⁶. En aquests casos, les dades d'entrada són un vector que consisteix en N variables: les sondes que marquen expressió gènica o metilació en un punt del genoma, per exemple.

En aquests casos, el nombre de variables acostuma a ser molt alt (milers de gens) i el nombre de pacients i controls molt petit en comparació, aleshores pot sorgir el problema de l'*overfitting*. És fàcil trobar un model que separi les dades d'entrenament però que classifiqui malament les dades noves. Per evitar això és habitual reduir la dimensionalitat de les dades. A més, tenint en

compte que l'objectiu és construir proves diagnòstiques per facilitat logística i econòmica, hem de seleccionar només un grup reduït de gens.

Un dels mètodes més utilitzat és el rànquing de variables⁶. Si totes les variables es puntuen segons una funció de rànquing, podem seleccionar-les ordenadament. Podem seleccionar un nombre k de les variables més ben puntuades i deixar fora la resta. Si anem variant de forma recursiva el nombre k , podem buscar el subconjunt òptim de variables per al model, és a dir, buscar quines sondes de la micromatriu (*microarray*) seran més útils com a eina diagnòstica sense haver d'utilitzar els milers de sondes.

Per decidir la funció de rànquing, vam tenir en compte que si bé els coeficients de correlació són molt útils per determinar els gens més diferenciats entre pacients i controls, no necessàriament són els més discriminants⁶. Per sistema, un bon criteri de rànquing de variables no és un bon rànquing de conjunts de variables. Per aquest motiu vam decidir-nos a utilitzar màquines de suport vectorial (SVM per a les sigles en anglès).

SVM

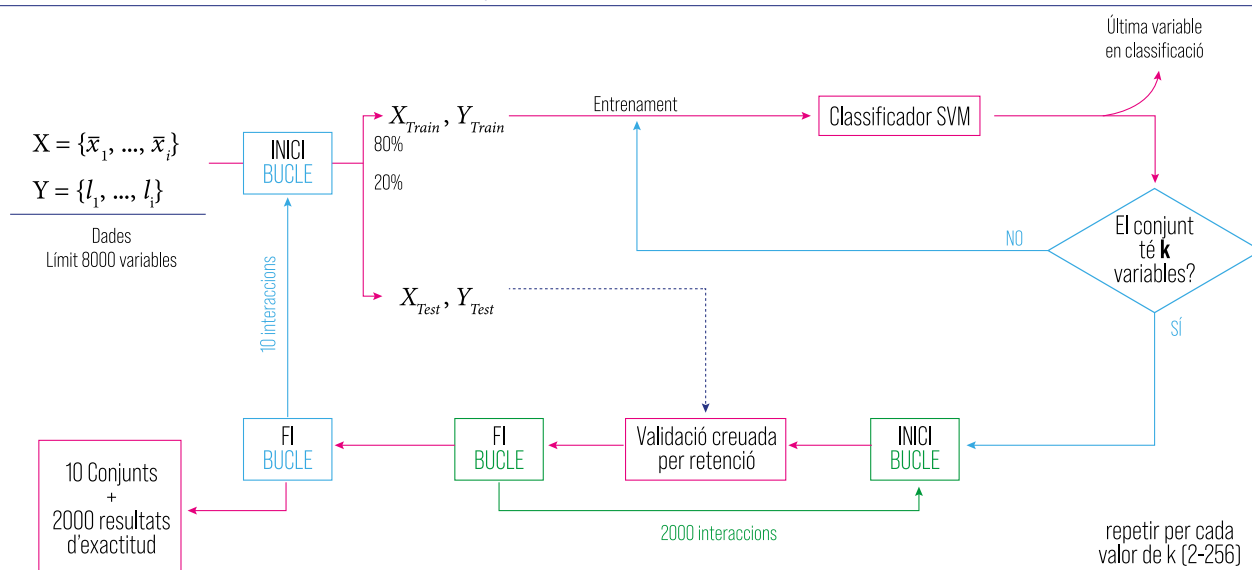
Les SVM són models d'aprenentatge automàtic que localitzen punts experimentals de dues categories. Per fer això es divideixen per un marge clar al més ampli possible. Més formalment, una SVM construeix un hiperplà o conjunt d'hiperplans en un espai d'alta dimensió⁷, tal com veiem en l'exemple en 2D de la figura 1.

Per tant, podem utilitzar el model SVM per calcular el rànquing de cada variable i eliminar de forma recursiva les menys importants. Aquest procediment és l'eliminació recursiva de variables basada en SVM (SVM-RFE)⁸.

Validació interna

El model SMV resultant hauria de classificar punts experimentals nous en una de les dues classes i, com a tal, actuar com a criteri diagnòstic. Tot i així, és essencial provar i validar el rendiment i si no és factible mitjançant un estudi addicional, s'ha de recórrer a mètodes de validació interna²⁸. Per a restriccions computacionals vam decidir aplicar mètodes de validació creuada en comptes de mètodes de bootstrapping.

Figura 2. Esquema de l'algoritme per determinar el subconjunt òptim de sondes que discriminin entre pacients i control donades unes dades X i Y , on X consisteix en els valors de cada sonda i Y la classe de cada individu



Algorisme final

Després d'aquestes consideracions, vam implementar l'algorisme final amb Python 3.7.6 per als conjunts de dades EG i EM. En primer lloc, les dades es van normalitzar i definir en conjunts X i Y amb els vectors del perfil d'expressió i les etiquetes de classe (pacient/control) respectivament per a cada mostra. Aquests conjunts els vam dividir en un subconjunt per a l'entrenament i un altre per a la validació. A continuació, vam fer l'SVM-RFE: entrenant el classificador SVM i eliminant de forma recursiva la variable amb el rànquing més baix fins a aconseguir un nombre k de variables. La exactitud del model s'avaluava mitjançant 2000 iteracions de validació encreuada amb retenció. Aquest procediment es va repetir 10 vegades per cada nombre k entre 2 i 256. El procés final el mostra la figura 2.

En primer lloc, vam aplicar l'algorisme sobre les dades d'EG (amb 33.297 variables) i el fet d'incloure'n més de 8.000 excedia la potència computacional disponible. Per això vam ordenar les variables segons una prova exacta de Fisher i vam incloure les primeres 8.000 per l'algorisme.

Anàlisi general de dades de *microarray*

A part d'aplicar l'algorisme sobre les dades EG i EM, en paral·lel a l'algorisme seleccionant, vam analitzar els tres conjunts de dades de les 250 sondes més diferenciades entre pacients i controls.

Vam introduir els resultats dels conjunts EG i MA a la base de dades STRING per crear una xarxa d'interacció de proteïnes per avaluar possibles vies fisiopatològiques de la malaltia. Vam descarregar la informació de la base de dades per integrar la informació sobre la diferència en expressió en FM.

La matriu d'adjacència conjunta amb la llista d'atributs de node va ser processada al programa *Gephi*. El resultat va ser una gràfica (figura 3) en

què estan representades les proteïnes i les interaccions i el valor d'expressió. El gruix de les arestes indica la confiança de la interacció segons la base de dades STRING i el color dels nodes indica la diferència entre pacients i controls (vermell i blau per al gens més diferenciats i verd per als no diferenciats). Els nodes els vam distribuir mitjançant l'algorisme de distribució ForceAtlas 2 per identificar millor els clústers.

DISCUSSIÓ

Resultats de l'algorisme

Conjunt de dades EG

Amb la inclusió de les 8.000 variables més diferenciades (per les restriccions computacionals), la exactitud mitjana obtinguda en aquest conjunt de dades va ser del 85,63% (IC 81,72-89,54%). No obstant això, la exactitud augmentava considerablement al voltant de 50-100 variables i dequeia quan

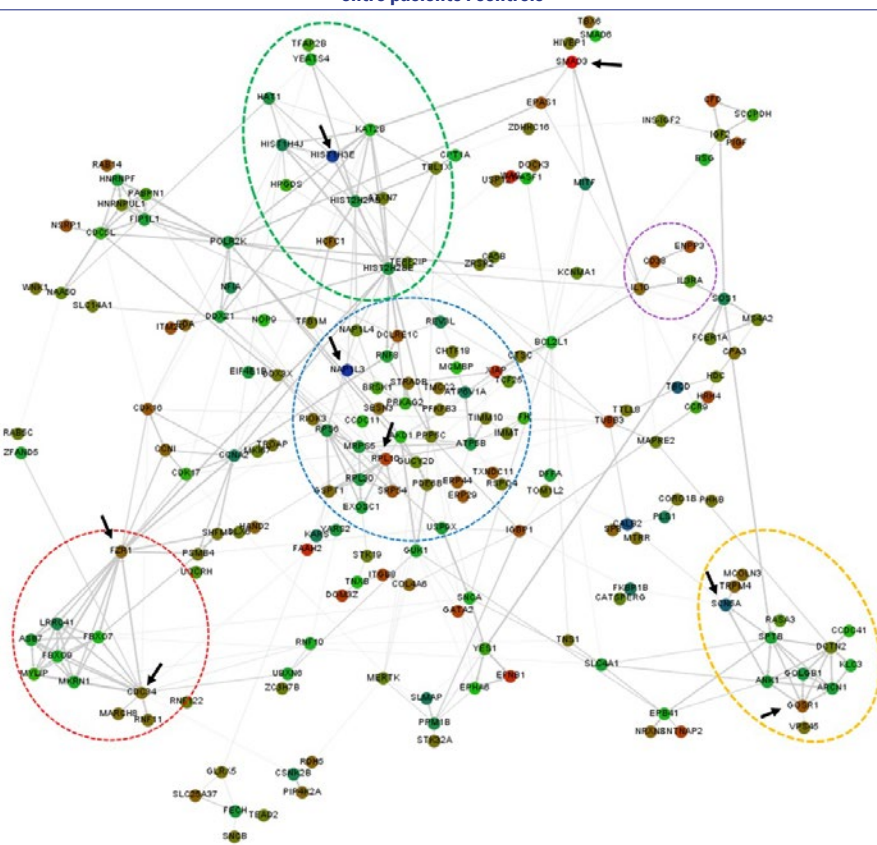
només seleccionàvem 10-20 variables. La exactitud més elevada corresponia als conjunts amb 56 sondes: 95,72% (IC 95,55-95,90%).

En comparar quines 56 variables se seleccionaren entre les 10 iteracions de l'algorisme, vam observar que no totes coincidien. Aquest fet no és gens estrany atesa la natura estocàstica del model. Tanmateix, una característica que sí que destaca és que no es corresponen amb les sondes més diferenciades de tot el conjunt de dades EG. De fet, la majoria cauen en l'extrem inferior de la distribució del coeficient de Fisher com veiem a la figura 4. Aquest resultat confirma encara més la idea que els gens més diferenciats no necessàriament proporcionen la millor exactitud discriminatòria.

Conjunt de dades ME

El conjunt de dades original era només de 1.212 variables amb coefi-

Figura 3. Xarxa d'interacció de proteïnes de les dades EG, MA i STRING. El gruix de les arestes indica el nivell d'evidència i el color dels nodes el fold change (vermell per FC<0, verd per FC=0 i blau per FC>0). Les línies de punts representen clústers, de definició general, de gens notablement diferenciats entre pacients i controls



cients d'expressió per a 21 mostres (11 pacients i 10 controls). No obstant això, a la base de dades d'alguns registres constaven com a nuls de manera que vam decidir no incloure qualsevol variable amb menys de 10 mostres o menys de 5 a cada classe. En fer-ho, el conjunt de dades final contenia 454 variables.

L'exactitud mitjana obtinguda va ser del 98,95 % (IC 98,66 – 99,23%). Aquest valor i la manca d'una relació directa entre el nombre de sondes i la exactitud és clarament diferent dels resultats anteriors, com veiem a la figura 5. En discriminar entre els pacients amb FM i els controls, el conjunt de dades de microRNA mostra resultats d'exactitud estadísticament més alta ($p < 0,0001$) que el conjunt de dades d'expressió d'ARN. La exactitud màxima correspon als conjunts amb 20 variables: 98,95% (CI 98,88 -99,01 %).

Anàlisi general

Si analitzem amb més profunditat la xarxa d'interacció obtinguda a la secció 3.2, veiem que buscàvem nodes amb un gran nivell de diferenciació (colors vermell i blau) i, preferiblement, moltes arestes de pes alt, és a dir, amb moltes interaccions amb evidència suficient (indicades amb fletxes en la figura 3). Gràcies a la base de dades GeneCards vam obtenir informació de la funció o de les propietats de cada gen rellevant i dels veïns per identificar possibles vies de desregulació. Amb aquesta anàlisi vam identificar cinc clústers no especí-

fics que representen grups de gens altament relacionats i amb una diferència rellevant entre pacients d'FM i controls. El conjunt marcat en color verd inclou proteïnes relacionades amb la regulació de la transcripció de l'ADN mentre que el conjunt blau conté proteïnes encarregades de l'*splicing* de mRNA i rRNA. Certes proteïnes relacionades amb la ubiquitina i la formació del citoesquelet estan incloses en el conjunt vermell mentre que altres proteïnes relacionades amb el citoesquelet i la membrana constitueixen el conjunt groc. Finalment, proteïnes relacionades amb la inflamació s'inclouen al conjunt violeta.

A part d'aplicar l'algoritme de classificació amb les dades EM, també vam classificar les variables segons el grau de variació entre pacients i controls. La gran majoria de sondes rellevants estaven menys expressades en pacients. Entre aquestes vam trobar interaccions i funcions biològiques documentades per a: miR-145, miR-451. Hu et al.⁹ van demostrar el paper crucial del miR-145 en la regulació de la senyalització mediada per TNF- α i la degradació de la matriu del cartílag en articulacions. Perfils d'expressió de miRNA de condrocits van mostrar que l'expressió de miR-145 va ser ràpidament regulada ja que eren estimulats amb una administració de TNF- α . Curiosament, Ohgidani et al.¹⁰ van estudiar els nivells d'expressió de TNF- α al sistema nerviós central en pacients amb FM que transformen cèl·lules sanguínies en cèl·lules semblants a

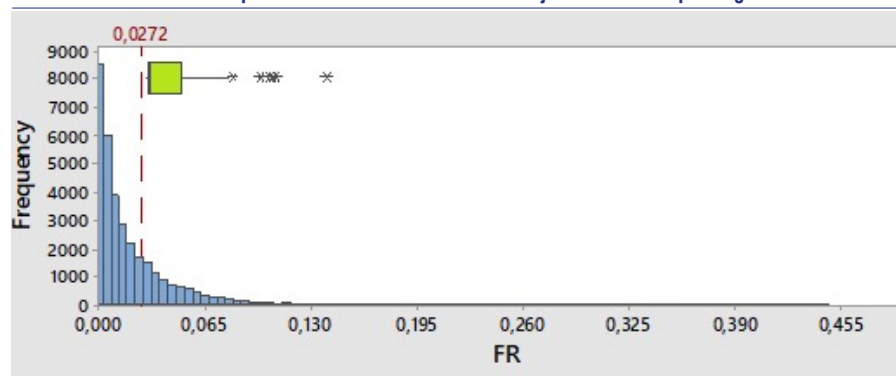
les micròglies. Van trobar que el TNF- α estava hiperexpressat en aquestes cèl·lules en les mostres de pacients d'FM. A més, van descobrir que hi havia una correlació moderada entre la regulació a l'alça de l'expressió de TNF- α i els paràmetres clínics del dolor subjec-tiu i altres manifestacions mentals. Per tant, la hipoexpressió de miR-145 coincideix amb la hiperexpressió de TNF- α . També, segons Sun et al.¹¹, miR-451 pot alleujar el dolor inflamatori crònic inhibint la inflamació mediada per l'activació de micròglies mitjançant senyalitzacions per TLR4. El seu equip va utilitzar un model murí de dolor inflamatori i els resultats mostren que l'expressió de miR-451 es va reduir en micròglies espinals. La neuroinflamació mediada per micròglies a la medul·la espinal és clau en la patogènesi del dolor inflamatori crònic. A més, van confirmar els efectes antiinflamatoris de miR-451 per la inhibició de l'alliberament de citocines proinflamàto-ries induïdes per l'activació microglial incloent-hi IL-6, IL-1 β i TNF- α . La regulació a la baixa de miR-145 i miR-451 que mostra a FM podria ser sinèrgica en la regulació de vies inflam-atòries.

Finalment, entre els miRNA seleccionats per l'algoritme, és interessant destacar informació sobre miR-150. Ji et al.¹² van explorar el potencial paper d'aquest miRNA en la regulació del procés de dolor neuropàtic en un model de rata amb lesió crònica del nervi ciàtic i van demostrar que la sobreexpressió de miR-150 va alleujar molt el desenvolupament del dolor neuropàtic i va reduir l'expressió de citocines inflamàto-ries, COX-2, IL-6 i TNF- α incloses.

CONCLUSIONS

- En la majoria dels estudis revisa era recurrent trobar que hi ha una determinada desregulació en la funció del sistema neuronal i de les vies inflam-atòries en els pacients d'FM.
- Els miRNA són participants clau en el curs fisiopatològic del dolor neuropà-

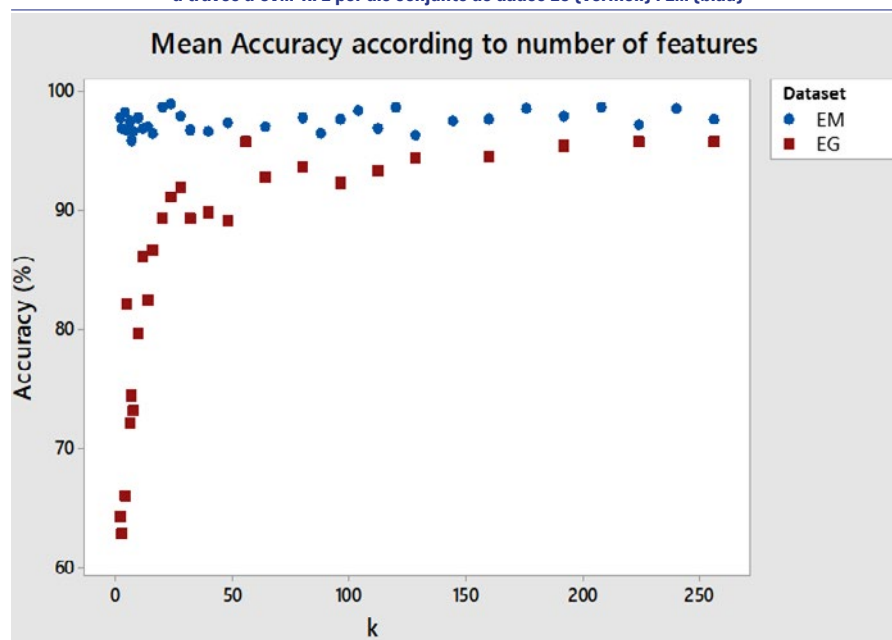
Figura 4. Histograma de coeficient de Fisher (FR) de totes les sondes al conjunt EG amb un diagrama de caixa de FR per les 56 sondes incloses al subconjunt seleccionat per l'algoritme



tic. Hem trobat que la via reguladora del TNF- α /miR-145 podria ser un factor important en l'etiologia de l'FM. A més, atès que la sobreexpressió de miR-150 sembla alleujar el desenvolupament del dolor neuropàtic i redueix l'expressió de citocines inflammatòries, amb el TNF- α inclòs, també podria contribuir a la relació anterior. La hipoeexpressió de miR-145 i miR-451 podria ser sinèrgica en la regulació de vies inflammatòries.

- Tenint en compte que algunes de les alteracions epigenètiques observades en FM podrien causar una desregulació important en certes proteïnes i en ARN no codificant, podrien ser objectius potencials de tractament. Evidències d'efectes antiinflamatoris i analgèsics en dolor neuropàtic en models animals després de l'administració de certs miRNA en són un exemple.
- L'algoritme SVM-RFE avaluat mitjançant validació encreuada amb retenció va proporcionar un conjunt de 56 sondes d'ARN amb una exactitud del 95,72% i un conjunt de 20 sondes de microARN amb el 98,95%. Segons els nostres resultats, el miRNA pot ser més bon biomarcador genètic per diagnosticar l'FM. Són necessaris més estudis i assaigs clínics per avalu-

Figura 5. Diagrama d'exactitud mitjana del model segons el nombre de variables a través d'SVM-RFE per als conjunts de dades EG (vermell) i EM (blau)



lar la capacitat diagnòstica real.

- No obstant aquests resultats, l'algoritme necessita millores addicionals com la implementació de tècniques de validació interna i estratègies d'optimització millors. No vam poder incloure tants punts de dades com s'esperava i els resultats de les sondes de miRNA es basen en un conjunt de dades molt limitat. Els resultats de l'algoritme no pretenen ser concloents sinó que serveixin com a guia per a futurs estudis sobre l'ús de patrons

d'expressió gènica i de miRNA en el diagnòstic.

- Encara falten estudis genètics amb una mida de mostra gran i amb criteris d'exclusió precisos (tenir en compte les comorbiditats de l'FM). La investigació genètica d'FMS tot just comença, però els resultats semblen prometedors. Esperem que futurs treballs permetin conèixer finalment l'etiologia de la fibromiàlgia i proporcionar uns diagnòstic i tractament precisos i útils. ■

Bibliografia

1. Neuprez A, Crielaard JM. Fibromyalgie: État de la question en 2017. *Rev Med Liege*. 2017;72(6):288-94.
2. Buskila D, Sarzi-Puttini P, Ablin JN. The genetics of fibromyalgia syndrome. *Pharmacogenomics*. 2007;8(1):67-74.
3. Jones KD, Gelbart T, Whisenant TC, Waalen J, Mondala TS, Iklé DN, et al. Genome-wide expression profiling in the peripheral blood of patients with fibromyalgia HHS Public Access. *Clin Exp Rheumatol*. 2016;34(2):89-98.
4. Ciampi De Andrade D, Maschietto M, Galhardoni R, Gouveia G, Chile T, Victorino Krepschi AC, et al. Epigenetics insights into chronic pain: DNA hypomethylation in fibromyalgia - A controlled pilot-study. *Pain*. 2017;158(8):1473-80.
5. Cerdá-Olmedo G, Mena-Durán AV, Monsalve V, Oltra E. Identification of a MicroRNA signature for the diagnosis of fibromyalgia. *PLoS One*. 2015;10(3):1-14.
6. Guyon I, Weston J, Barnhill S, Vapnik V. Gene selection for cancer classification using Support Vector Machines. *Lect Notes Comput Sci (including Subser Lect Notes Artif Intell Lect Notes Bioinformatics)*. 2008;5139 LNBI:62-72.
7. Hastie T, Tibshirani R, Friedman J. 12. Support Vector Machines and Flexible Discriminants. In: *The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference, and Prediction*. 2nd ed. Springer Series in Statistics Trevor; 2008. p. 417-55.
8. Adorada A, Permatasari R, Wirawan PW, Wibowo A, Sujiwo A. Support Vector Machine - Recursive Feature Elimination (SVM - RFE) for Selection of MicroRNA Expression Features of Breast Cancer. 2018 2nd Int Conf Informatics Comput Sci ICICoS 2018. 2019;(1):165-8.
9. Hu G, Zhao X, Wang C, Geng Y, Zhao J, Xu J, et al. MicroRNA-145 attenuates TNF- α -driven cartilage matrix degradation in osteoarthritis via direct suppression of MKK4. *Cell Death Dis*. 2017;8(10):e3140.
10. Ohgidani M, Kato TA, Hosoi M, Tsuda M, Hayakawa K, Hayaki C, et al. Fibromyalgia and microglial TNF- α : Translational research using human blood induced microglia-like cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-6.
11. Sun X, Zhang H. miR-451 elevation relieves inflammatory pain by suppressing microglial activation-evoked inflammatory response via targeting TLR4. *Cell Tissue Res*. 2018;374(3):487-95.
12. Ji LJ, Shi J, Lu JM, Huang QM. MiR-150 alleviates neuropathic pain via inhibiting toll-like receptor 5. *J Cell Biochem*. 2018;119(1):1017-26.

Optimitzar l'obtenció d'hupertacrina-tacrina per tractar la malaltia d'Alzheimer

INTRODUCCIÓ

L'any 1906, el neuròleg i psiquiatra alemany Alois Alzheimer va descriure una malaltia neurodegenerativa que provocava un deteriorament progressiu i inhabilitant de funcions cognitives com la memòria, la comprensió, el llenguatge, l'atenció, el raonament i el judici a la qual van anomenar malaltia d'Alzheimer (MA)¹. Actualment, aquesta malaltia inclou un 60/70% de casos de demència que l'any 2019 van afectar al voltant de 50 milions de persones². Tot i ser una malaltia molt estudiada, encara no se sap exactament el motiu pel qual es desencadena ja que hi ha diverses hipòtesis que mantenen el front obert: la colinèrgica, la de la cascada amiloide i la tau.

La recerca de fàrmacs nous contra l'MA és molt activa però la gran diversitat d'hipòtesis fa augmentar la dificultat de trobar compostos eficaços per als pacients que la pateixen, per això neix el concepte *multidiana*, en anglès *Multi-Target Directed Ligands (MTDL)*, amb l'ob-

jectiu de promoure activitat en diversos centres bioquímics alterats, en aquest cas, a l'MA³. Aquesta visió considera que l'Alzheimer no el causa un sol factor com diuen les hipòtesis sinó que es deu a una combinació de tots.

L'any 1993, la tacrina va ser el primer fàrmac aprovat per l'*US Food and Drug Administration* (FDA, tradueïble com Administració d'Aliments i Fàrmacs dels Estats Units) per tractar l'MA. Malgrat que l'activitat inhibidora de l'acetilcolinesterasa (AChE) era molt elevada, també provocava hepatotoxicitat alta motiu pel qual va ser retirada del mercat. La recerca de substàncies ja conegudes com a inhibidores d'AChE i butirilcolinesterasa (BuChE) va portar al Grup de Química Farmacèutica (GQF) d'IQS a fixar-se en una altra substància: la huperzina A (HupA), un producte natural extret de la planta *Huperzia serrata*. Aquest compost és un inhibidor natural de l'AChE utilitzat per alentir el progrés de l'MA i compta amb l'avantatge de tenir una tolerabilitat elevada i també efectes neu-

Cèlia Comallonga

Grup de Química Farmacèutica (GQF), Departament de Química Orgànica i Farmacèutica, IQS School of Engineering, Universitat Ramon Llull, Barcelona.

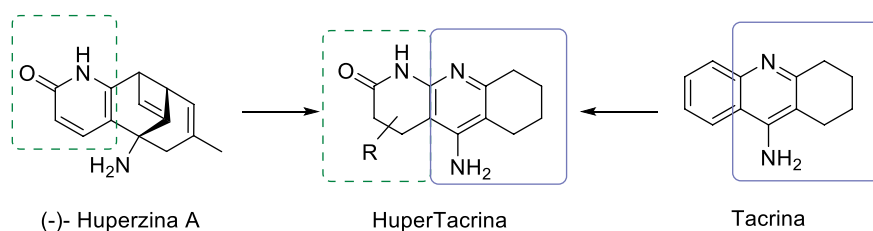
José Ignacio Borrell

Grup de Química Farmacèutica (GQF), Departament de Química Orgànica i Farmacèutica, IQS School of Engineering, Universitat Ramon Llull, Barcelona.

Raimon Puig de la Bellacasa

Grup de Química Farmacèutica (GQF), Departament de Química Orgànica i Farmacèutica, IQS School of Engineering, Universitat Ramon Llull, Barcelona.

Figura 1. Estructures de la (-)-huperzina A, HuperTacrina (HT) i tacrina



Paraules clau:
Alzheimer.
Hupertacrina.
Tacrina.

roprotectors⁴.

Així, el GQF d'IQS en col·laboració amb el Laboratori de Química Mèdica de l'Institut de Química Orgànica General del CSIC van decidir juxtaposar la tacrina i la huperzina A i formar una nova família de compostos, les hupertacrine (HT) (figura 1)⁵. En una segona iteració per obtenir hupertacrine⁶, vam aconseguir l'HT deshidrogenada en la posició α,β de carbonil (HT1) que fa que aquell anell sigui pla, circumstància que permet un augment de la similitud estructural amb l'huperzina A. Malauradament els rendiments baixos de la síntesi en limitaven l'obtenció i en conseqüència dificultaven l'objectiu següent del GQF, unir l'HT1 i la tacrina en una cadena hidrocarbonada de sis carbonis per formar un heterodímer i estudiar-ne l'activitat com a molècula *MTDL*⁷. L'esquema 1 mostra la ruta de síntesi de l'heterodímer hupertacrina-tacrina i es pot veure que es tracta d'un procés convergent que consta de sis etapes. D'una banda la tacrina se sintetitza i s'uneix a l'espaiador de sis baules de carboni i per altra s'obté l'HT1. Finalment, aquestes dues unitats s'uneixen per donar la molècula objectiu. En un treball anterior⁷ vam aconseguir obtenir aquest producte

Aquesta malaltia
inclou un 60/70%
de casos de demència
que l'any 2019
van afectar al voltant
de 50 milions
de persones.

però només amb un rendiment per sota de l'1%. Ens plantejem com a objectiu optimitzar tots els processos de síntesi de l'heterodímer hupertacrina-tacrina 9.

QUÍMICA

Una de les premisses a tenir en compte és que en tractar-se d'una ruta de síntesi de moltes etapes, calia garantir una gran puresa en tots els intermedis per facilitar les reaccions següents i evitar la formació de productes secundaris. En cada etapa analitzem el producte obtingut per ¹H-RMN amb garantia d'alta puresa espectroscòpica.

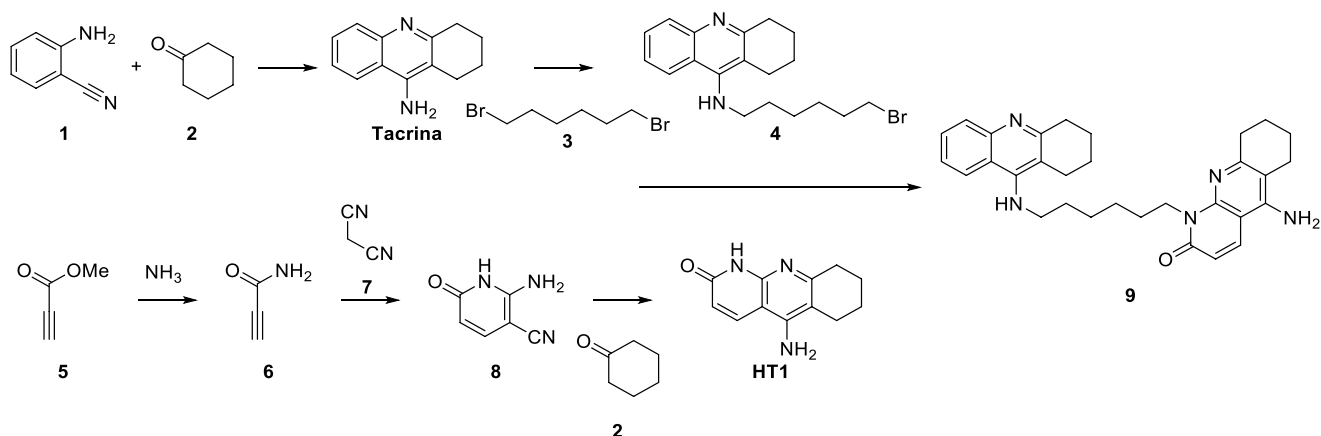
Si bé es veritat que la tacrina és un producte amb una síntesi àmpliament estudiada, per coherència amb

l'anterior treball⁷ desenvolupat al GQF d'IQS, vam sintetitzar amb la mateixa metodologia que consisteix en una reacció de Friedländer entre 2-aminobenzonitril (1) i ciclohexanona (2) catalitzada per triclorur d'alumini que actua com a àcid de Lewis. Com que és una reacció d'equilibri que genera aigua com a subproducte és molt important usar toluè com a dissolvent i emprar un col·lector Dean-Stark per eliminar l'aigua per separació azeotròpica i forçar la reacció cap a productes. Posteriorment, vam fer una hidròlisi alcalina amb una dissolució d'hidròxid de sodi 2M i després d'extraccions líquid-líquid amb cloroform vam obtenir una tacrina de gran puresa amb un rendiment del 35%.

Sobre la base a la reacció descrita a la bibliografia⁸, d'entrada vam barrejar la tacrina amb hidròxid de potassi per ionitzar la molècula per, en segona instància, afegir-hi l'1,6-dibromohexà (3) i permetre la substitució nucleòfila de tipus 2 (S_N2). Després d'analitzar el cru de reacció per ¹H-RMN vam poder observar molts subproductes per als quals vam requerir una columna cromatogràfica per obtenir el producte 4 amb un rendiment del 14%.

A l'altra banda de la síntesi con-

Esquema 1. Esquema de reacció reduït que mostra els diferents intermedis de la reacció per obtenir el compost hupertacrina-tacrina 9.



vergent, la primera etapa per sintetitzar la hupertacrina HT1 consisteix en la formació de la propiolamida (6) a partir de propiolat de metil (5) i amoníac aquós. En aquesta etapa vam introduir tres millores amb relació als treballs anteriors: a) una reducció del temps de reacció a menys de la meitat és dir, passar de 4 a 1,5 hores, b) condicions menys extremes, treballar a $-45\text{ }^{\circ}\text{C}/-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ en comptes de $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$; c) recuperar el producte mitjançant extraccions líquid-líquid d'acetat d'etil, operació que permet eliminar el dissolvent a menor temperatura i per tant evitar que es formi la impuresa d'1,3,5-tricarboxamida de benzè. Aquestes tres millores van permetre obtenir propiolamida(6) amb un 87% de rendiment i de molta puresa. Posteriorment, produïm una addició de tipus Michael del malononitril (7) sobre la propiolamida (6) en medi bàsic de metòxid de sodi seguit d'una posterior ciclació i neutralització amb àcid clorhídric 2M. En aquesta etapa vam observar que l'ordre d'adició dels reactius era crucial i vam millorar el rendiment de la reacció al

Les aportacions metodològiques d'aquest treball han permès aconseguir una millora notable del rendiment d'obtenció de la HuperTacrina HT1, un 55% de rendiment global de tres etapes de síntesi comparat amb l'1% descrit abans.

80% amb relació al 8% descrit anteriorment. Finalment, per obtenir l'hupertacrina HT1, tornem a fer una reacció de Friedländer per a la qual és molt important treballar amb tots els reactius i dissolvents ben secs. En aquesta etapa, una millora en l'aïllament del producte va permetre

obtenir HT1 amb un rendiment del 79% comparat amb 18% descrit anteriorment.

Una vegada sintetitzades les estructures HT1 y 4, vam fer la reacció de substitució entre els dos fragments. Si bé per anàlisi d' ^1H -RMN vam observar la formació del producte buscat 9, la irrupció de la pandèmia de la COVID-19 i els confinaments consegüents van impedir-ne la purificació i l'optimització d'aquesta darrera etapa de síntesi.

CONCLUSIONS

Les aportacions metodològiques d'aquest treball han permès aconseguir una millora notable del rendiment d'obtenció de la HuperTacrina HT1, un 55% de rendiment global de tres etapes de síntesi comparat amb l'1% descrit abans. Aquesta millora serà molt útil ja que en futurs treballs permetrà sintetitzar amb més facilitat molts més heterodímers, variar la cadena espaïadora entre les dues unitats de tacrina i d'hupertacrina HT1 i estudiar l'efecte sobre l'activitat biològica. ■

Bibliografia

- Hippius, H.; Neundörfer, G. The Discovery of Alzheimer's Disease. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2003, 5 (1), 101-108.
- WHO. Dementia <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> [accessed Jun 17, 2020].
- Mesiti, F.; Chavarria, D.; Gasp ar, A.; Alcaro, S.; Borges, F. The Chemistry Toolbox of Multitarget-Directed Ligands for Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* 2019, 181, 111572. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111572>.
- Li, J.; Wu, H. M.; Zhou, R. L.; Liu, G. J.; Dong, B. R. Huperzine a for Alzheimer's Disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd 2008. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005592.pub2>.
- Chioua, M.; Perez, M.; Bautista-Aguilera, O.; Yanez, M.; Lopez, M.; Romero, A.; Cacabelos, R.; Bellacasa, R.; Brogi, S.; Butini, S.; Borrell, J.; Marco-Contelles, J. Development of HuperTacrines as Non-Toxic, Cholinesterase Inhibitors for the Potential Treatment of Alzheimer's Disease. *Mini-Reviews Med. Chem.* 2015, 15 (8), 648-658. <https://doi.org/10.2174/1389557515666150219130156>.
- Balmori, A.; Chioua, M.; de la Bellacasa, R. P.; Estrada-Tejedor, R.; Ismaili, L.; Marco-Contelles, J.; Borrell, J. I. 5-Amino-6,7,8,9-Tetrahydrobenzo[b][1,8]Naphthyridin-2[1H]-One: The First Example of a New Family of HuperTacrines for Alzheimer's Disease Therapy. *ChemistrySelect* 2017, 2 (8), 2605-2610. <https://doi.org/10.1002/slct.201700289>.
- Montufo, D.; Borrell, J. I.; Puig de la Bellacasa, R. Síntesis de Derivados de Hupertacrina Para El Tratamiento de La Enfermedad Del Alzheimer. Treball de Fi de Màster, IQS, Universitat Ramon Llull, 2018.
- Więckowska, A.; Kołaczkowski, M.; Bucki, A.; Godyń, J.; Marcinkowska, M.; Więckowski, K.; Zaręba, P.; Siwek, A.; Kazek, G.; Głuch-Lutwin, M.; Mierzejewski, P.; Bienkowski, P.; Sienkiewicz-Jarosz, H.; Knez, D.; Wichur, T.; Gobec, S.; Malawska, B. Novel Multi-Target-Directed Ligands for Alzheimer's Disease: Combining Cholinesterase Inhibitors and 5-HT6 Receptor Antagonists. Design, Synthesis and Biological Evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 2016, 124, 63-81. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.016>.



cofb.org