



V CICLO DE CONFERENCIAS

INVESTIGACIÓN  
Y  
SIGLO XXI

**Sergio Erill Sáez**

Catedrático de Farmacología

Director Científico de Laboratorios Esteve, S.A.

**Jaume Piulats Xancó**

Director del Laboratorio de Bioinvestigación Merck



REAL ACADEMIA NACIONAL de FARMACIA

Reservados todos los derechos. Ni la totalidad ni parte de este libro puede reproducirse o transmitirse por ningún procedimiento electrónico o mecánico, incluyendo fotocopia, grabación magnética o cualquier almacenamiento de información y sistema de recuperación, sin permiso escrito del editor.

© Fundación José Casares Gil  
Farmacia, 11 - 28004 Madrid  
Teléfs. 91 531 03 07 / Fax: 91 531 03 06

Depósito Legal: M-30085-2005

Impreso en España

Edición: Junio 2005

Diseño y Maquetación: D&P

Imprime: 3d3

# ÍNDICE

---

## **Nuevos y viejos métodos de descubrimiento de medicamentos**

*Profesor D. Sergio Erill Sáez* .....7

Catedrático de Farmacología

Director Científico de Laboratorios Esteve, S.A.

30 de enero de 2003

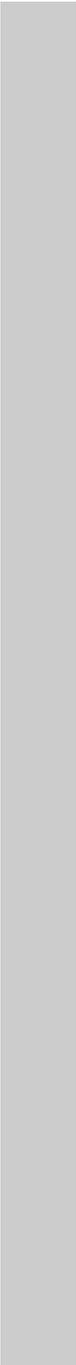
## **Nuevas aportaciones a la terapia oncológica**

*Profesor D. Jaume Piulats Xancó* ..... 15

Director del Laboratorio de Bioinvestigación Merck

24 de abril de 2003





# NUEVOS Y VIEJOS MÉTODOS DE DESCUBRIMIENTO DE MEDICAMENTOS

*Profesor D. Sergio Erill Sáez*

Catedrático de Farmacología  
Director Científico de Laboratorios Esteve, S.A.  
(30 de enero de 2003)

---



Hace algo más de medio siglo, el ritmo de descubrimiento de nuevos medicamentos alcanzó tal magnitud que se ha hablado, con notable propiedad, de una auténtica revolución farmacéutica<sup>1</sup>. Lógicamente, fueron numerosos los factores que incidieron en esta coyuntura, pero cabe resaltar un elemento que, a mi juicio, fue fundamental: el poder de la observación atenta y cuidadosa. En este sentido, es del todo ilustrativo que los hipoglucemiantes orales se desarrollaran a partir de la observación de hipoglucemia en pacientes con fiebre tifoidea tratados con una sulfamida en fase de investigación. Detectar el efecto hipoglucemiante en este tipo de pacientes, en plena postguerra y con la dieta que se recomendaba en aquel tiempo, no deja de resultar admirable.

En cualquier caso, los hipoglucemiantes orales no constituyen ni mucho menos un ejemplo aislado. La clorpromacina fue el primer antipsicótico gracias a la observación cuidadosa de sus efectos en pacientes mentalmente sanos, y el haloperidol fue el resultado de una atención a los efectos centrales de una serie de productos derivados de la meperidina que se pretendía fueran analgésicos más potentes que aquélla. Por citar sólo un caso más, los primeros fármacos realmente antidepressivos, la iproniacida y la imipramina y las series a las que dieron lugar, nacieron también de la perspicacia de los profesionales sanitarios que atendían a pacientes con otro tipo de trastornos.

A este poder de la observación hay que añadir el papel que representó la implicación en la investigación de la industria farmacéutica de personalidades como Waksman y su programa de antibióticos, que le mereció el Premio Nobel, y Karl Beyer con su trabajo sobre diuréticos, ambos en Merck Sharp and Dohme; de James W Black, también Premio Nobel, que desarrolló los beta-bloqueantes en ICI y luego la cimetidina en SKF, y de Roy Vagelos, también en MSD. Dos de los nombres de esta corta lista merecen particular atención. Por una parte, la promoción de Vagelos desde director de investigación a CEO de la compañía, en 1985, lo que quizás marca la cumbre del papel de los científicos en las grandes empresas farmacéuticas. Por otra, el hecho de que ICI dejara escapar a Black (o lo echara, que versiones en este sentido no faltan) justo en el momento de la introducción de los pri-

meros beta-bloqueantes, lo que quizás hace intuir el sentido que tendrán las decisiones sobre investigación en el entorno del cambio de siglo.

Parece increíble lo lejanas que quedan las palabras de Vagelos<sup>2</sup> referidas a la investigación sobre el SIDA y pronunciadas en 1994: *My opinion is that the cure, the real cure of any disease will come from an observation that may be totally unrelated to a focused applied program. And so the best thing that the government could do is to continue to stimulate the off-the-wall types of research that come from people who are not told what to do. And people who develop real insight into following their own leads and their own hunches and are allowed to dream.* Hoy lo que domina es el dictamen de la consultoría. Las grandes, y pequeñas, consultoras se han lanzado a preconizar rígidos modelos de actuación, que son seguidos al pie de la letra dada la respetabilidad que concede el desorbitado monto de la factura. Estos modelos y orientaciones se aplican tanto a la actividad comercial como a la de investigación, y el ritmo de los cambios tanto en las empresas como en las propias consultoras hace que nadie experimente rubor alguno cuando se comprueba, tan sólo 5 años más tarde, que los modelos han resultado inútiles o incluso nefastos. Para todo hay respuesta: se pueden recomendar entonces nuevos modelos o acudir al summum de las soluciones, las fusiones y adquisiciones.

El propósito anunciado siempre, a bombo y platillo, tras la creación de estas mega-empresas, es el incremento de las posibilidades de desarrollar nuevos medicamentos que cubran las necesidades de la medicina o que contribuyan a mejorar la calidad de vida y satisfacción personal de la gente. Lamentablemente, todo tiene un “pero” y el pero en este caso es que una gran compañía sólo puede desarrollar productos de ventas millonarias, los famosos “blockbusters” de la jerga en uso. Para ello se toman decisiones radicales, se destinan cantidades estremecedoras a la investigación y no se para en gastos para hacerla dirigida al mercado y absolutamente rimbombante.

Quizás valga la pena reproducir textualmente las palabras de quien ocupó un alto cargo de investigación en una multinacional europea:

*Creative individuals are being driven out of the industry and being replaced by functionaries who parrot strategic maxims...Research is being driven by lawyers, financial experts, salesmen and market strategists who are completely unable to develop new ideas... It is doubtful whether there are any senior executives who understand the problem<sup>3</sup>.*

En efecto, pocos recuerdan, o quieren recordar, que en el pasado los estudios de mercado casi siempre fracasaron en la identificación de auténticos blockbusters (caso de los beta-bloqueantes, de los antagonistas H<sub>2</sub>, del omeprazol, etc) pero éste es un problema con el que los investigadores de la industria farmacéutica han tenido que convivir desde tiempos inmemoriales. Más grave, probablemente, ha sido el proceso de “comercialización” de la investigación. No son tan sólo los consultores los que han descubierto que los altos ejecutivos de las empresas farmacéuticas son su mercado más apetecible y les han vendido reorientaciones de la investigación que han acabado con empresas líderes y admiradas hace una década. Otros han descubierto también el potencial de vender allí.

Como dice Horrobin<sup>4</sup>, *...in their uncertainty and lack of self-confidence the top managers have fallen for every new high-tech unproven wizardry making extravagant promises. They have invested billions before there has been any evidence at all that the techniques will be successful.*

Al hilo del desarrollo de la nueva biología y partiendo de una versión “biotech” del cuento de la lechera: un gen - un RNA - una proteína - un fármaco, han proliferado los encuentros que, con el nombre de symposium, management forum, senior executives meeting, etc no son más que auténticos “Tupperware parties” en donde se les convence de que hay soluciones para todo y que, claro está, estas soluciones están a la venta. Química combinatoria, criba de alto rendimiento, simulaciones por ordenador y todo el hardware y software que ello requiere están a disposición de los grandes capitanes de empresa. Ahora se les ofrece la posibilidad de competir no tan sólo en el tamaño del yate o del avión privado, sino también en la maquinaria que han comprado.

En las palabras del editor de la revista *Scrip*<sup>5</sup>, *over the past two decades, companies have embraced the concepts of combinatorial chemistry, high throughput and mass screening, genomics, proteomics, rational drug design, and a whole raft of other new technologies in order to be ever more certain about the outcome of their research efforts. In truth, the number of new compounds coming out of the laboratories is no greater and their quality is no better than in the past. All we can say is that they are costing a lot more to discover, and that the pharmaceutical industry has gone into merger mode to keep the new R&D monster fed.*

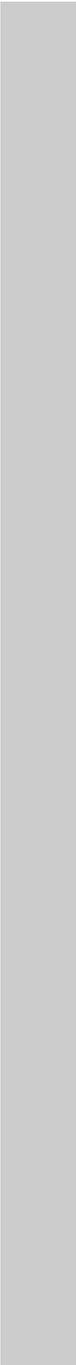
¿Y los resultados? Quien se acuerda de que el famoso “*Computer-assisted Drug Design*” no produjo un solo fármaco que dependiera estrictamente del mismo. ¿Cuál ha sido la productividad real (producto en el mercado o en fase III de investigación clínica) de la química combinatoria y del *High Throughput Screening*? En un congreso sobre *High-throughput Technologies*, celebrado en Cambridge en 1999, la respuesta de los asistentes a la pregunta “*How many leads have you got from combinatorial chemistry and high-throughput screening?*” fue un unánime: Ninguno<sup>6</sup>. Al parecer tanto da. Las ventas y las fusiones darán lugar a un cambio de actores y la casualidad y, sobre todo, productos provenientes de empresas más modestas y más creativas aportarán algún que otro producto susceptible de desarrollo.

Ojalá.

## Referencias

1. Lasagna L. The pharmaceutical revolution: Its impact on science and society. *Science* 1969; 166: 1227-1233
2. "Roy Vagelos on AIDS Research and Drug Development," GMHC Treatment Issues, March 1994
3. J Drews, ed. *In Quest of Tomorrow's Medicine*, Springer-Verlag, New York, 1999
4. Horrobin DF. Innovation in the pharmaceutical industry. *J Royal Soc Med.*93: 341-345, 2000
5. Brown P. The maddening world of R&D. *Scrip Magazine* 3-4, January 2000
6. Lahana R. How many leads from HTS? *Drug Discovery Today* 4: 447-448; 1999





# NUEVAS APORTACIONES A LA TERAPIA ONCOLÓGICA

*Profesor D. Jaume Piulats Xancó*

Director del Laboratorio de Bioinvestigación Merck.  
(24 de abril de 2003)

---



## INTRODUCCIÓN

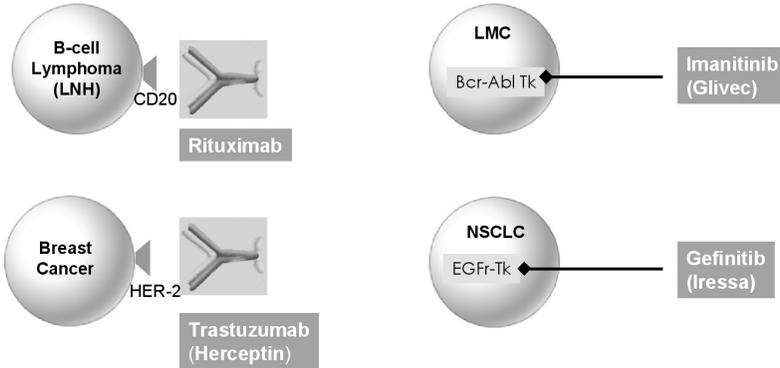
Con el término cáncer agrupamos a un conjunto de más de cien enfermedades que comparten la característica común de pérdida de los mecanismos fisiológicos de regulación del crecimiento y diferenciación celular.

El tratamiento del cáncer se basa en la utilización adecuada de tres herramientas: la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia. La experiencia actual en el manejo de estas estrategias terapéuticas ha permitido avances significativos en el control de la enfermedad. Así, en el cáncer de pulmón, los protocolos que utilizan combinaciones de fármacos quimioterapéuticos han mostrado tasas de respuesta entre 30% y un 60% de los pacientes. Igualmente, la quimioterapia de combinación ha obtenido éxitos notables en el cáncer de mama metastásico.

Sin embargo, estos éxitos parciales no deben enmascarar que el cáncer continúa siendo la segunda causa de mortalidad infantil y adulta en los países desarrollados. Durante 2002 fallecieron en España, por cáncer, 95.000 personas; el cáncer de mama es la primera causa de muerte en las mujeres y en los hombres es el de pulmón. Otro dato importante es que de 600.000 casos de cáncer localizado se curan el 95% con regímenes de radio y quimioterapia, pero de 600.000 casos de cáncer metastásico el porcentaje cae al 11,5% de curación.

Consecuentemente, el cáncer continúa siendo un desafío para la profesión farmacéutica y médica; muestra de ello es que actualmente se están valorando, a distintos niveles de investigación preclínica y clínica, más de 400 nuevos fármacos. Recientemente, el arsenal terapéutico se ha enriquecido con nuevos agentes de los que destacaríamos 1) el RITUXIMAB, anticuerpo monoclonal contra la molécula CD20, indicado en el tratamiento del linfoma de célula B (LNH), 2) el TRASTUZUMAB (Herceptin), anticuerpo monoclonal frente a HER-2, fundamentalmente indicado en el cáncer de mama, 3) el IMANITINIB (Glivec) inhibidor de la tirosin kinasa de Bcr-Abl para la leucemia mieloide crónica (LMC) y 4) el Gefinitib (Iressa) inhibidor de la tirosin kinasa del EGFR e indicado en cáncer de pulmón (NSCLC).

New available agents



© Merck Farma y Química, S.A. Editor: Dr. Jaume Puiglat

**Fig. 1 Nuevos agentes bioterapéuticos para el tratamiento del cáncer.**

Una característica común a estos cuatro nuevos fármacos es que todos van dirigidos a una diana muy específica, lo que los diferencia de la quimioterapia clásica. Pues bien, este criterio, la selectividad en el mecanismo de acción, es lo que caracteriza la investigación farmacológica actual y define el término de Bioterapia. Los nuevos agentes serán productos de síntesis o de origen biológico, pero lo más importante es que están dirigidos a una diana terapéutica específica.

Actualmente se están finalizando los ensayos clínicos con un grupo de nuevos compuestos de los que destacaríamos: el BEVACIZUMAB (Avastin, de Genentech), anticuerpo monoclonal anti-VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), agente antiangiogénico para cáncer de pecho, y nuestro CETUXIMAB (Erbix, de Merck / Imclone) un monoclonal anti-EGFR indicado en cáncer colorrectal, pulmón (NSCLC), cabeza y cuello, páncreas y pecho. Muy posiblemente estos fármacos estarán disponibles el 2004.

## Agents in late stage development



Generic	Drug	Activity	Primary indication	Developer
Cetuximab	Erbitux	Anti-EGFr	Colorectal, NSCLC H/N, pancreatic, breast	Imclone/Merck KGaA
Bevacizumab	Avastin	Anti-VEGF	Breast	Genentech (Roche)
Thalidomide	Thalomid	Anti-TNF $\alpha$ (?)	Melanoma	Celgene
Erlotinib (OSI-774)	Tarceva	Anti-EGFr	NSCLC	OSI
AE-940	Neovastat	VEGF path inh. MMP inh. Apoptosis inductor	Renal carcinoma	Aeterna

© Merck Farma y Química, S.A. Editor: Dr. Jaume Puigats

**Fig. 2 Fármacos de interés que se encuentran en las últimas fases de estudio clínico.**

Es decir, que el mensaje positivo que deseamos transmitir es el logro, en los últimos años, de una nueva generación de fármacos altamente específicos que serán una ayuda importante en el control terapéutico de la enfermedad.

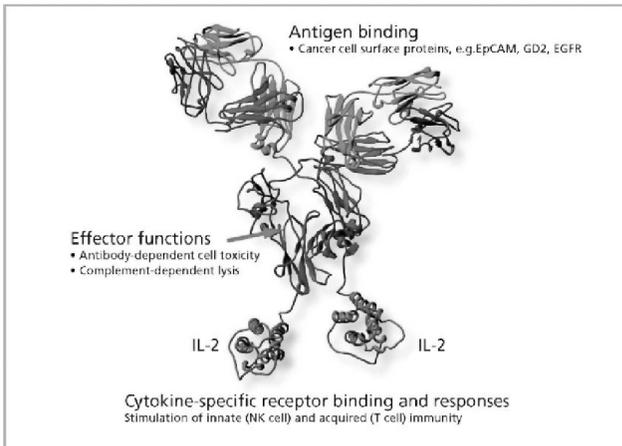
## INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA EN MERCK

Nuestro grupo, el Laboratorio de Bioinvestigación (LBI) de Merck Farma y Química, S.A., filial de Merck KGaA (Alemania), y sito en el Parc Científic de Barcelona, está formado por 40 profesionales especializados en oncología experimental, que participan en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, investigando en las áreas de inmunoterapia, modulación del ciclo celular y control de la angiogénesis tumoral.

Representantes de la inmunoterapia son el Cetuximab (Erbitux) (anti-EGFR), citado anteriormente; es un monoclonal desarrollado en cola-

boración con Imclone (USA). Los resultados clínicos obtenidos con este anticuerpo serán presentados el próximo mes de junio, durante la celebración del Congreso de la ASCO en Estados Unidos, y posiblemente comercializado el próximo año. Otro agente inmunoterapéutico que puede pasar muy pronto a la fase de ensayos clínicos es una vacuna terapéutica, preparada en el LBI, basada en el gangliósido GD3 característico del melanoma maligno. Otra estrategia inmunoterapéutica es la utilización de inmunocitocinas o proteínas de fusión formadas por un anticuerpo unido a una citocina, por ejemplo IL-2, con lo que se consigue un efecto dual: la capacidad de reconocimiento de la célula tumoral por parte del anticuerpo y la capacidad efectora de la citocina en el microambiente tumoral.

## Immunocitokines



© Merck Farma y Química, S.A. Editor: Dr. Jaume Puiglat

**Fig. 3 Inmunocitocinas: proteínas de fusión formadas por un anticuerpo unido a una citocina.**

El LBI mantiene varias líneas de investigación orientadas al estudio de dianas terapéuticas relacionadas con los mecanismos del ciclo celular y la apoptosis; en este caso los proyectos se encuentran en un estudio de investigación básica y necesitan más tiempo para su desarrollo.

Finalmente, quisiera hacer referencia a la estrategia antiangiogénica en la que nuestro laboratorio es centro de referencia del grupo Merck.

## INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL

Pocos campos en la investigación básica oncológica han experimentado un crecimiento tan explosivo como el de la angiogénesis tumoral. La angiogénesis se puede definir como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos pre-existentes, mientras que el término vasculogénesis define el desarrollo de estructuras vasculares en el embrión a partir de células precursoras. La angiogénesis es un proceso complejo en el que participan principalmente la matriz extracelular (ECM) y las células endoteliales (EC) y que está regulado por factores angiogénicos: inductores e inhibidores.

### Angiogénesis: un delicado equilibrio



#### PRO- ANGIOGENICOS

VEGF  
FGF  
PDGF  
TGF $\beta$   
TGF $\alpha$   
EGF  
IL-8  
...



#### ANTI- ANGIOGENICOS

Endostatin  
Angiostatin  
Trombospondin  
IFN $\alpha$   
f-PF4  
anti-Thrombin III  
...

© Merck Farma y Química, S.A. Editor: Dr. Jaume Puigats

**Fig. 4** Angiogénesis: un delicado equilibrio entre los factores proangiogénicos y antiangiogénicos.

La angiogénesis fisiológica tiene lugar en la cicatrización de heridas y en la vascularización del endometrio durante el ciclo menstrual. Sin

embargo, la neovascularización representa también un componente importante en muchos procesos patológicos tales como cáncer, arterioesclerosis, psoriasis, retinopatía diabética y endometriosis.

Un mayor conocimiento de los mecanismos angiogénicos se traducirá en dos ventajas principales: la primera, la oportunidad de establecer la angiogénesis tumoral como un factor pronóstico en la evaluación de la enfermedad oncológica, y en segundo lugar el descubrimiento de nuevas dianas farmacológicas para la terapia oncológica.

Un factor clave en el control de la angiogénesis tumoral está relacionado con el crítico equilibrio entre los reguladores angiogénicos positivos (inductores) y negativos (inhibidores). Entre los factores angiogénicos positivos cabe resaltar el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), mientras que los principales reguladores negativos endógenos estarían representados por la angiostatina y la trombospondina. Sin embargo, esta aparente simplicidad enmascara procesos más complejos en los que están implicados muchos factores adicionales. En este sentido cabe resaltar el papel del receptor de Vitronectina (integrina  $\alpha\beta_3$ ) y de las enzimas proteolíticas (meteloproteinasas).

Los trabajos pioneros del grupo de Folkman, en los años 70, establecieron que el crecimiento y la diseminación metastásica de los tumores sólidos dependen de la formación de nuevos vasos sanguíneos y por lo tanto establecieron una nueva base para la terapia del cáncer. Ha sido necesario esperar más de veinte años para acumular el suficiente conocimiento sobre los mecanismos de neovascularización, para que la comunidad científica haya podido diseñar nuevas estrategias terapéuticas basadas en los procesos de vascularización tumoral. Actualmente, esta estrategia constituye uno de los enfoques farmacológicos más prometedores para el control de la enfermedad neoplásica.

El objetivo de este capítulo es ofrecer una revisión actualizada sobre el conocimiento actual de los mecanismos de neovascularización y de las estrategias terapéuticas basadas en la modulación de la angiogénesis tumoral.

## **MECANISMOS DE NEOVASCULARIZACIÓN TUMORAL**

A partir de los trabajos de Folkman sabemos que un tumor no puede crecer más allá de 1-2 mm<sup>3</sup> sin inducir un aporte de riego sanguíneo adicional. En otras palabras el crecimiento del tumor es dependiente de la angiogénesis tumoral. Este proceso está controlado por la misma célula tumoral a través de la secreción de factores angiogénicos que iniciarán la activación de la célula endotelial. A su vez, la célula endotelial activada también produce factores de crecimiento paracrinos para el tumor. Esta interacción o conversación entre el tumor y las células endoteliales representa una de las características principales de la angiogénesis tumoral. Una segunda característica es el delicado balance en la producción de factores inductores e inhibidores endógenos de la neovascularización. Las células normales secretan niveles bajos de inductores y altos niveles de inhibidores. Sin embargo, al progresar a estadios más malignos, las células tumorales inclinan este equilibrio hacia un fenotipo angiogénico.

Actualmente se considera que la angiogénesis tumoral se establece a lo largo de tres etapas diferenciadas: inducción-iniciación, proliferación-invasión y maduración-remodelación. En la primera etapa, los inductores angiogénicos, tales como factores de crecimiento o citoquinas, son secretados por las mismas células tumorales. Estos factores estimulan la proliferación e invasión vascular promoviendo el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos hacia la masa tumoral. Un resultado asociado a la invasión celular reside en importantes cambios en la expresión de moléculas de adhesión que permiten a las células endoteliales interactuar con el estroma circundante dondequiera que la célula endotelial proliferare e invada. Alternativamente, la señalización mediada por las moléculas de adhesión asegura supervivencia, proliferación e invasión celular continuadas. Las etapas tardías implican una parada en la proliferación, una diferenciación celular y la formación de la estructura tubular y del lumen que conduce a la circulación sanguínea. Se modifica la lámina basal y el nuevo vaso sanguíneo es rodeado por los pericitos y las células musculares lisas.

## INDUCTORES DE LA ANGIOGÉNESIS

La mayoría de los inductores angiogénicos, como en los casos de los sistemas VEGF/VEGFR y FGF/FGFR, son parte de un complejo sistema que implica ligandos solubles y receptores endoteliales.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es uno de los principales factores angiogénicos puesto que es el primer factor producido durante la embriogénesis en el control de la vasculogénesis y la angiogénesis. Por otra parte, es el único factor de crecimiento descrito hasta la fecha cuyos ratones knock-out no son viables. VEGF, inicialmente identificado por su capacidad de aumentar la permeabilidad vascular (también llamado VPF), demostró ser un mitógeno en células endoteliales y también ha sido descrito como potente inductor de la angiogénesis in vivo. Se han descrito hasta 4 isoformas diferentes de VEGF, las cuales interactúan con hasta tres receptores específicos, que se encuentran sobre-expresados en las células endoteliales tumorales.

La familia de factores de crecimiento fibroblástico (FGF) está formada por hasta nueve factores solubles y cuatro receptores transmembranales. Entre los factores, el FGF básico y FGF ácido son las formas más extensamente estudiadas.

Actualmente se conocen hasta seis isoformas distintas de las llamadas angiopietinas, factores angiogénicos que participan en la neovascularización tumoral. Mientras que Ang-1 y Ang-3 son agonistas del receptor Tie-2; Ang-2 y Ang-4 se describen como antagonistas del receptor Tie-2. Las angiopietinas son secretadas principalmente por las células mesenquimales, especialmente los pericitos, los cuales participan en la diferenciación de células endoteliales.

Tanto el factor del crecimiento transformador beta (TGF $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), presentan actividades angiogénicas duales. Ambos factores inhiben la proliferación de las células endoteliales in vitro pero, en cambio, estimulan la angiogénesis in vivo. Se ha propuesto que TGF $\beta$  induce angiogénesis vía un mecanismo indirecto: es altamente quimiotáctico para los monocitos y otras células acceso-

rias que, a su vez, secretan los factores angiogénicos que serían mitogénicos para las células endoteliales.

El factor del crecimiento transformador alfa (TG $\alpha$ ) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) comparten un 40% de homología y ambos interactúan con el receptor de EGF. Ambos factores estimulan la proliferación de células endoteliales, inducen la migración y la formación de estructuras capilares *in vitro*, e inducen angiogenesis *in vivo*.

Actualmente está demostrado que los receptores de adhesión celular median procesos de adhesión, de proliferación, de migración y de invasión celular implicados en la cascada angiogénica. Por tanto, la angiogenesis depende no sólo de factores del crecimiento sino que también está influenciada por las moléculas de adhesión celular. La interacción entre las células tumorales y las células endoteliales en el tumor es altamente dependiente de la acción de las moléculas de adhesión celular. La inhibición farmacológica de estas moléculas de adhesión retarda notablemente la angiogenesis y el crecimiento tumoral.

Se han descrito hasta cuatro familias diferentes de receptores de adhesión celular; clasificadas en función de sus características bioquímicas y estructurales en selectinas, inmunoglobulinas, cadherinas e integrinas. Sin embargo, las integrinas representan el caso más estudiado y documentado de participación en procesos de angiogenesis tumoral.

Las integrinas son receptores heterodiméricos transmembranales formados por una cadena alfa asociada de manera no covalente a una cadena beta. Actualmente se han identificado hasta 15 subunidades alfa y 8 subunidades beta, las cuales pueden combinarse para dar hasta 20 integrinas diferentes. Los ligandos de las integrinas incluyen fibronectina, colágeno, laminina, vitronectina, trombospondina, fibrinógeno y otros. Varias integrinas reconocen la secuencia tripeptídica Arg-Gly-ASP (RGD) en los ligandos.

Las células endoteliales expresan componentes de las subfamilias  $\beta$ 1,  $\beta$ 3 y  $\beta$ 5; y el estímulo de estas células con bFGF *in vitro* causa una sobreexpresión de las integrinas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 3. La integrina  $\alpha$ v $\beta$ 3, también conocida

como el receptor del vitronectina (VNR) presenta una muy baja expresión en vasos sanguíneos quiescentes, pero se sobre-expresa hasta niveles muy altos después del estímulo por factores angiogénicos. In vitro, tanto anticuerpos monoclonales contra las subunidades  $\alpha v$ ,  $\beta 3$  o  $\alpha v\beta 3$ , como péptidos sintéticos que contienen la secuencia RGD afectan el crecimiento microvascular en el modelo de anillos de aorta de rata en geles de fibrina. Además, los mismos antagonistas de  $\alpha v\beta 3$  in vivo, son capaces de bloquear la angiogénesis inducida por citoquinas y tumores humanos en varios modelos tales como la membrana corioalantoidea en embriones de pollo, córnea de conejo, retina de ratón, ratones inmunodeprimidos y ratones quiméricos con transplantes de piel humana.

## **EL PAPEL DEL RECEPTOR VITRONECTINA EN ANGIOGÉNESIS**

La integrina  $\alpha v\beta 3$ , puede ser considerado el miembro más promiscuo de la familia de las integrinas. Puede reconocer cualquiera de los siguientes ligandos: vitronectina, fibronectina, fibrinógeno, laminina, colágeno, factor von Willebrand, osteopontina, trombospondina, tenascina, adenovirus penton base, sialoproteína de hueso, MMP2, y otras proteínas que contengan la secuencia RGD. Esta característica confiere a cualquier célula que exprese  $\alpha v\beta 3$  la habilidad de adherirse, proliferar y migrar en casi cualquier matriz que se pueda encontrar. Como se ha mencionado anteriormente, VNR presenta una baja expresión en tejidos normales pero aumenta en células endoteliales activadas. Además,  $\alpha v\beta 3$  también se expresa en algunos tumores invasivos como en las últimas fases de los glioblastomas y melanomas malignos. Es interesante observar cómo la sobre-expresión de  $\alpha v\beta 3$  guarda buena correlación con el grado de malignidad e invasión en melanomas: aunque los melanocitos normales y nevi, así como los melanomas no invasivos en fase de crecimiento radial (RPG) son negativos para la expresión de  $\alpha v\beta 3$ ; tanto los melanomas invasivos en fase de crecimiento vertical (VPG) como los metastáticos son altamente positivos. De hecho, esta expresión diferencial ha sido propuesta como un factor pronóstico. Además, otros autores han estudiado, en base a modelos experimentales, el uso de la integrina  $\alpha v\beta 3$  como un objetivo terapéutico en lesiones de melanoma.

Esta expresión de  $\alpha\beta_3$  tan altamente restringida y su elevada expresión durante la neovascularización sugiere que podría tener un papel funcional en angiogénesis. De este modo, los antagonistas de  $\alpha\beta_3$  (tanto anticuerpos monoclonales como péptidos cíclicos con RGD) evitaron la formación de vasos sanguíneos en varios modelos de angiogénesis *in vitro* e *in vivo*.

Estudios recientes han esclarecido los posibles mecanismos por medio de los cuales los antagonistas  $\alpha\beta_3$  inhiben la angiogénesis. Tanto los anticuerpos monoclonales como los péptidos RGD cíclicos inducen selectivamente la muerte celular programada (apoptosis) en células endoteliales activadas angiogénicamente *in vivo*. Inicialmente se mostró que  $\alpha\beta_3$  proporciona señales de supervivencia cuando interactúa con colágeno desnaturalizado. Estudios posteriores demostraron que la administración sistémica de antagonistas  $\alpha\beta_3$  fomenta la apoptosis en el desarrollo y no durante la quiescencia de los vasos sanguíneos. Todos estos resultados apoyan la hipótesis de un papel clave de la integrina  $\alpha\beta_3$  en la angiogénesis tumoral, y por lo tanto, sitúan a  $\alpha\beta_3$  como diana terapéutica en el tratamiento anti-neoplásico.

Las evidencias experimentales que apoyan un papel de las integrinas  $\alpha_v$ , especialmente la  $\alpha\beta_3$ , en el control de la angiogénesis tumoral están aumentando. De hecho, existen muchos trabajos que prueban que el bloqueo de esta integrina por medio de distintas estrategias sirve para bloquear la angiogénesis inducida por un tumor y consecuentemente el crecimiento del propio tumor. Varias disintegrinas de veneno de serpiente, por ejemplo, inhiben la angiogénesis y el crecimiento tumoral por un bloqueo selectivo de  $\alpha\beta_3$  en células endoteliales. Otros agentes, antagonistas de  $\alpha\beta_3$ , como el Cilengitide (un péptido RGD cíclico también denominado EMD 121974) y peptidomiméticos sintéticos son también potentes inhibidores de la angiogénesis y del crecimiento tumoral. También tienen una acción significativa péptidos derivados de la matriz extracelular (fragmentos de moléculas naturales no activas angiogénicamente), que inhiben  $\alpha\beta_3$  y, por lo tanto, la angiogénesis y el crecimiento tumoral. Algunos ejemplos son tumstatina, canstatina, arresten e incluso angiostatina y endostatina. Otro asunto sin duda importante se refiere al hecho de que tanto los

fármacos anti-inflamatorios no esteroides inhibidores de Cox2, así como las terapias clínicas que usan TNF e IFN $\gamma$ , están asociadas a la supresión de la función y de la señalización de la integrina  $\alpha v \beta 3$  en células endoteliales. Finalmente, la integrina  $\alpha v \beta 3$  también se ha utilizado para estrategias de dianización del tumor y técnicas de imagen para visualización de la angiogénesis tumoral.

## **PROTEASAS**

La angiogénesis no está sólo regulada por la acción de factores de crecimiento y moléculas de adhesión celular, sino que también está influenciada por muchas otras moléculas. Entre ellas, las enzimas que degradan la matriz extracelular proveen el medio apropiado para la migración de las células endoteliales a través del estroma adyacente. Existen al menos tres familias principales de enzimas proteolíticas que podrían participar en la angiogénesis y en la progresión tumoral: las proteasas de serina (incluida la urokinasa activadora del plasminógeno (uPA)), las metaloproteasas de matriz y las proteasas de cisteína (cathepsinas B y L).

Estudios recientes de Folkman demostraron que un fragmento de plasminógeno (la angiostatina) actúa como un inhibidor endógeno de angiogénesis. Otros grupos sugirieron que uPA, metaloelastasa de macrófagos, elastasa de páncreas o incluso metaloproteinasas podrían ser las enzimas responsables de la generación de la angiostatina.

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) forman una familia de endopeptidasas dependientes de zinc con un amplio espectro de actividad que pueden ser clasificadas como colagenasas, gelatinasas y estromalinas dependiendo de su especificidad de sustrato. La sobre-expresión de MMPs puede detectarse en tejido tumoral o en estroma adyacente pero no en tejido normal. De igual manera, la sobre-expresión de MMPs en células endoteliales in vitro fue también descrita tras la estimulación con bFGF or TNF $\alpha$ . Tanto los inhibidores naturales, conocidos como inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs) como los inhibidores sintéticos de MMPs han sido descritos como fármacos antiangiogénicos y antimetastásicos. Recientemente, MMP2 ha sido colocalizado

con  $\alpha v\beta 3$  en células endoteliales activadas in vivo apoyando la importancia de ambas moléculas en la angiogénesis.

## ENFOQUES TERAPÉUTICOS

Tal como se ha descrito anteriormente, la angiogénesis es un proceso con varias fases en el cual muchos puntos clave pueden ser susceptibles de intervención terapéutica. Nuestro actual conocimiento sobre la relación entre células tumorales y endoteliales nos permite definir objetivos específicos para una terapia. Por lo tanto, los mitógenos endoteliales liberados por células tumorales; los factores de crecimiento tumoral segregados por células endoteliales; las proteasas liberadas por ambas poblaciones para degradar el estroma local; el papel fundamental de algunas integrinas como  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha v\beta 5$ , en la proliferación celular endotelial y migración y finalmente, los inhibidores naturales de angiogénesis endógena contribuyen a la neovascularización y son por tanto objetivos potenciales para la modulación farmacológica.

Las ventajas teóricas de la terapia anti-angiogénica incluirían:

- 1 la esperada baja toxicidad de los agentes antiangiogénicos específicos debido al bajo turnover de las células endoteliales en tejidos normales en comparación con el de las células implicadas en la angiogénesis tumoral y la reducción del riesgo de desarrollar resistencia a la droga debido a la estabilidad del genoma de la célula endotelial.
- 2 el efecto dual de la terapia cuando la diana escogida se expresa tanto en las células tumorales como endoteliales (ej. Metaloproteinasas, expresión  $\alpha v\beta 3$  en melanoma y células endoteliales). Este último punto se indica claramente en una reciente publicación donde Folkman y sus colaboradores han tenido en cuenta dos mecanismos, directo e indirecto, para los inhibidores de angiogénesis. Los inhibidores directos de angiogénesis deberían ser los agentes que actúan sobre la célula endotelial, bloqueando su locomoción y/o proliferación; mientras que los agentes indirectos actúan sobre las células tumorales inhibiendo la producción de un factor angiogénico.

Ejemplos de antagonistas directos son analizados en los apartados siguientes: inhibición de la proliferación/migración de la célula endotelial e inhibición de la formación del tubo celular e inducción de apoptosis. También se deben tener en cuenta los agentes duales, actuando en las células endoteliales y tumorales. Ejemplos de los inhibidores de angiogénesis indirectos son interferon alpha y Herceptin, los cuales inhiben la producción por células tumorales de bFGF y VEGF, respectivamente. Recientemente se ha descrito una nueva familia de drogas antiangiogénicas, las cuales están dirigidas a destruir los vasos sanguíneos de tumores. Una representación de los llamados VTA (vascular targeting agents) es la combretastatina A<sub>4</sub>, la cual está en estudio clínico Fase II.

Algunos de los ensayos clínicos con fármacos potencialmente antiangiogénicos han dado resultados decepcionantes. Así, los ensayos con SU5416 en cáncer colorectal se han detenido. Igualmente Avastin, un anticuerpo monoclonal anti-VEGF no alcanzó sus objetivos en ensayos fase III en cáncer de mama.

Estos ejemplos preliminares fallidos nos señalan que es muy importante tener en cuenta dos aspectos para el futuro desarrollo de la terapia antiangiogénica. Primero el establecimiento de unos protocolos de tratamiento específicos para este tipo de agentes y segundo la definición de marcadores (surrogate markers) que permitan medir la actividad antiangiogénica de las drogas durante el tratamiento. Respecto al primer punto es necesario hacer hincapié en que las dosis bajas y frecuentes de las actuales drogas quimioterapéuticas, tales como la vinblastina, han mostrado actividad antiangiogénica y mejorado el control del crecimiento tumoral. A este programa de quimioterapia antiangiogénica se le ha llamado Terapia Metronómica. Por tanto, el diseño de nuevos protocolos clínicos para la terapia antiangiogénica es primordial. Respecto al segundo tema, la medida de marcadores como el VEGF, VCAM-1 y los progenitores de células endoteliales circulantes (CD133+, VEGFR-3+) parecen ser los marcadores óptimos para controlar la terapia antiangiogénica.

La actual investigación preclínica y clínica puede resumirse en los siguientes enfoques: inhibición de la proliferación/migración de la

célula endotelial, inhibición de los enzimas proteolíticos involucrados en la degradación de ECM; y la inhibición de la formación de tubo celular e inducción de apoptosis.

## **INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN/MIGRACIÓN DE LA CÉLULA ENDOTELIAL**

Algunos de los representantes de esta estrategia son TNP-470 y carboxyamidotriazole (CAI). TNP-470 es un análogo de la fumagillina, un antibiótico producido por el hongo *Aspergillus fumigatus*. El mecanismo antiproliferativo del TNP-470 en la célula endotelial es desconocido, pero parece afectar la fase tardía G1 del ciclo celular, induciendo una parada del mismo por una inactivación de las kinasas ciclo-dependientes (cdks), las cuales fosforilan la proteína retinoblastoma pRb. TNP-470 se ha probado en ensayos de fase I en pacientes con tumores sólidos refractarios y también en pacientes con SIDA con sarcoma de Kaposi. Los ensayos en Fase II en varios tumores y los ensayos en Fase III en cáncer pancreático se están llevando a cabo actualmente. Recientemente se ha demostrado que el TNP-470 regula la expresión del antígeno próstata-específico en pacientes con cáncer de próstata andrógeno-independiente haciendo que el uso clínico de este marcador sea un problema. El carboxyamidotriazole inhibe el influjo del calcio en las células e inhibe el crecimiento del tumor y la angiogénesis.

Desde que el VEGF apareció como un factor clave en la angiogénesis varios enfoques terapéuticos han intentado inhibir la angiogénesis bloqueando tanto VEGF, como el receptor VEGF ó la señalización inducida por la interacción VEGF-VEGFR. De esta forma los anticuerpos monoclonales contra VEGF fueron usados en modelos de crecimiento de tumores in vivo. Se encontró que estos anticuerpos ejercían un potente efecto inhibitor en el crecimiento de al menos tres diferentes líneas de células tumorales humanas in vivo sin afectar el crecimiento de las células tumorales in vitro. Actualmente el anticuerpo monoclonal humanizado Bevacizumab (Avastin) (anti-VEFG) está siendo probado en las fases clínicas II y III. Otros estudios muestran la eficacia de esta estrategia en diferentes modelos in vivo. Otros potentes inhibidores de la angiogénesis tumoral son pequeñas moléculas sintéticas

diseñadas para bloquear la señalización tras la activación de VEGFR. Un claro ejemplo de este tipo de inhibidores de angiogénesis es el compuesto SU6668 que bloquea la fosforilización de tirosina bajo la señal de VEGFR, FGFR y PDGFR.

Este enfoque podría incluir los conocidos inhibidores endógenos de la angiogénesis como la angiostatina y endostatina que han sido probados en ensayos clínicos en fase I y en fases I/II respectivamente. Estos compuestos no solo inhiben angiogénesis sino que mantienen los tumores y metástasis en un estado latente por medio de un incremento en el nivel apoptótico de las células tumorales. Y lo que es más importante, la terapia antiangiogénica experimental con endostatina revela una ausencia de resistencias al fármaco en contraste con la quimioterapia estándar. Este trabajo ha provocado desde su publicación nuevas expectativas y un interés por una terapia angiogénica del cáncer. Recientemente el grupo de Folkman ha propuesto una novedosa terapia génica con angiostatina, endostatina o una proteína de fusión de ambas moléculas. De nuevo, la terapia antiangiogénica mostró unos efectos antitumorales a través del mantenimiento de un estado latente de las micrometástasis. Sin embargo, aunque angiostatina y endostatina han alcanzado los datos preclínicos más prometedores en el campo de la terapia antiangiogénica, estos resultados no han podido ser corroborados por otros grupos.

## **INHIBICIÓN DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS**

Los inhibidores de proteinasa podrían bloquear la actividad proteolítica de las células endoteliales activadas y también de las células tumorales migratorias. Tanto los inhibidores naturales (TIMPs) como los inhibidores sintéticos de las metaloproteinasas han sido descritos como potenciales antiangiogénicos así como drogas antimetastásicas. Sin embargo el progreso más significativo se ha producido en el campo de los inhibidores sintéticos de MMPs (MMPiS).

La primera generación de inhibidores sintéticos de metaloproteinasas está representada por los compuestos conocidos como Galardin y Batismastat. Ambos agentes mostraron una pobre biodisponibilidad

oral, pero Batismastat entró en los ensayos clínicos de fase I usando una vía intraperitoneal en pacientes con ascitis malignos o la vía intrapleural en paciente con exudados pleurales malignos. Una nueva generación de inhibidores de metaloproteinasas oralmente activos incluye el compuesto Marimastat el cual ya ha sido probado en ensayos clínicos de fase II en 232 pacientes. La biodisponibilidad oral es en este caso muy buena y los principales efectos secundarios observados fueron mialgias y artralgias de origen desconocido. Sin embargo no se ha podido demostrar ninguna eficacia clínica con ninguno de los nuevos inhibidores. De acuerdo con Zucker y sus colaboradores, en retrospectiva, el fracaso de MMPi en alterar la progresión de la enfermedad en el cáncer metastásico pudo haber sido anticipado ya que los MMPi parecen ser importantes en las etapas tempranas de la progresión del cáncer (invasión local y micrometástasis) y puede que no sean precisos una vez la metástasis se ha establecido. Nuevas investigaciones han permitido un mejor entendimiento del papel de las MMPs en biología tumoral y angiogénesis, estableciendo una función dual en la angiogénesis tumoral: algunas MMPs son necesarias para romper la membrana basal en la primera etapa de la angiogénesis mientras que otras MMPs están implicadas en la generación o liberación de las moléculas pro y antiangiogénicas.

## **INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DEL TUBO CELULAR E INDUCCIÓN DE APOPTOSIS**

Finalmente un tercer enfoque persigue bloquear la formación de vasos e inducir la apoptosis de la célula endotelial. Aunque muchos compuestos anti-angiogénicos caen dentro de esta categoría, ya han sido revisados en secciones anteriores (inhibición de proliferación celular endotelial). De esta forma nos centraremos en los inhibidores de la integrina  $\alpha\beta 3$ .

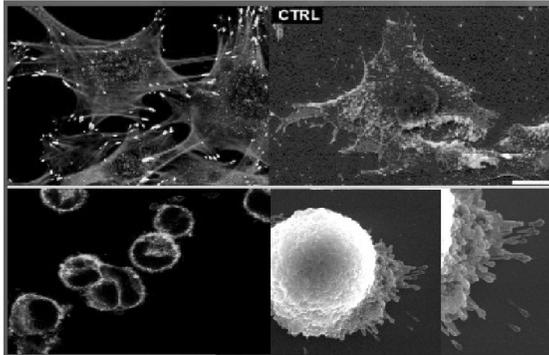
Los antagonistas de  $\alpha\beta 3$  evitan la formación de los vasos sanguíneos en diversos modelos de angiogénesis *in vitro* e *in vivo*. Este bloqueo de la angiogénesis también da como resultado la modulación del crecimiento tumoral. Además, debido a la nula expresión de  $\alpha\beta 3$  en la vasculatura quiescente, los antagonistas no afectan a los vasos sanguí-

neos normales, siendo así poco probable que sean tóxicos o tengan efectos secundarios. La mayoría de estos estudios se llevaron a cabo utilizando bien un anticuerpo monoclonal llamado LM609 dirigido al heterodimero  $\alpha\nu\beta 3$ ; bien un anticuerpo monoclonal dirigido a la subunidad  $\alpha\nu$  llamado 17E6, reconociendo así, tanto  $\alpha\nu\beta 3$  como  $\alpha\nu\beta 5$ ; o bien mediante un pentapéptido cíclico ó heptapéptidos que contienen la secuencia RGD. En concreto, el uso de moléculas de bajo peso molecular tales como los péptidos RGD cíclicos es interesante por dos motivos: por la relativa facilidad con que alcanzan los vasos tumorales y porque son compuestos sintéticos, con la consiguiente ventaja que supone su bajo costo de producción. Algunos autores llevaron a cabo una aproximación mixta para obtener novedosos antagonistas del receptor vitronectina. Por medio de la tecnología de *phage display* varios grupos crearon bibliotecas de anticuerpos de cadena sencilla con bucles que contenían heptapéptidos. De este modo, se identificaron nuevas secuencias altamente activas. Además, cuando esas construcciones se probaron in vivo se dianizaron en los vasos sanguíneos del tumor. El anticuerpo monoclonal LM609 se ha humanizado (Vitaxin) y continúan los ensayos clínicos en fase II. Nuestro grupo ha desarrollado el anteriormente mencionado anticuerpo monoclonal anti- $\alpha\nu$  17E6 así como péptidos RGD cíclicos que han demostrado una potente inhibición de las dianas  $\alpha\nu\beta 3$  y  $\alpha\nu\beta 5$ . La investigación preclínica llevada a cabo con los dos compuestos ha confirmado su efectividad como agentes antiangiogénicos y, de este modo, el péptido RGD cíclico (EMD 121974) llamado Cilengitide en la actualidad se encuentra en ensayos clínicos de fase II.

***In vitro* activity of  $\alpha v$ -integrin antagonists**



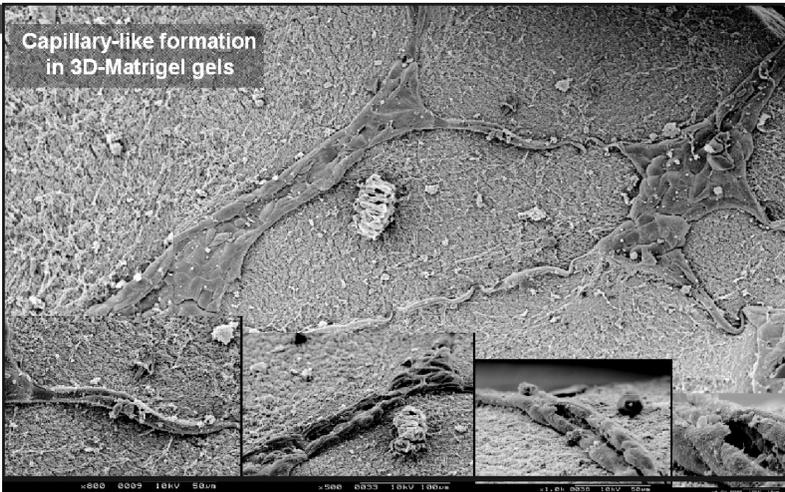
**Destabilization of focal contacts**



© Merck Farma y Química, S.A. Editor: Dr. Jaume Puigats

**Fig. 5** Actividad *in vitro* de los antagonistas de las integrinas  $\alpha v$ : inducen la desestabilización de los contactos focales de la célula.

***In vitro* activity of  $\alpha v$ -integrin antagonists**



© Merck Farma y Química, S.A. Editor: Dr. Jaume Puigats

**Fig. 6** Actividad *in vitro* de los antagonistas de las integrinas  $\alpha v$ : inhibición de la formación de capilares.

## CONCLUSIONES

La progresión de los tumores a la malignidad y el establecimiento de la metástasis dependen claramente de la inducción de la neovascularización. En otras palabras, las células de un tumor que se está desarrollando progresarán sólo si adquieren el fenotipo angiogénico necesario para atraer a los nuevos vasos de los que depende su malignidad. En este capítulo hemos repasado los distintas vías implicadas en el proceso referido como cambio angiogénico. Un paso clave es el delicado equilibrio existente entre los inhibidores naturales y los inductores de la angiogénesis. La inclinación de la balanza a un lado u otro favorecería la inhibición de la angiogénesis o estimularía la neovascularización. La investigación actual en la terapia antiangiogénica está comprometida en la búsqueda de novedosos y potentes inhibidores, lo que podría llevar hacia nuevos fármacos terapéuticos para el tratamiento del cáncer.

La investigación clínica preliminar con la primera generación de agentes antiangiogénicos ha producido resultados algo decepcionantes. Este hecho, considerado junto al creciente conocimiento de los mecanismos básicos que dirigen a la angiogénesis tumoral tiene al menos tres interpretaciones diferentes. Primero, existe la necesidad de aproximación de la investigación básica a la investigación clínica. Recientemente, Kerbel y Folkman han revisado este tema resaltando dicha necesidad crucial. En segundo lugar, el diseño de ensayos clínicos debería considerar la evolución clínica de la diana seleccionada. Esto significa que las terapias dirigidas a objetivos moleculares muy específicos necesitan de una selección previa y muy cuidadosa de la indicación tumoral y de los pacientes. De esta forma, el nuevo fármaco tendría un potencial farmacológico más realista. La tercera lectura es que quizá la intervención terapéutica sobre la angiogénesis tumoral no se puede realizar con un solo agente farmacológico. Así, esta idea nos conduce a un tratamiento adyuvante para controlar las enfermedades relacionadas con el cáncer. La terapia antiangiogénica mejoraría la acción, tanto de la quimio y radioterapia, como de la nueva inmunoterapia en enfermos de cáncer debido a la acción sobre diferentes

compartimentos dentro de un mismo tumor, incluyendo las células endoteliales, tumorales y accesorias, así como el estroma. Por lo tanto, esta estrategia podría imitar los inhibidores endógenos de la angiogénesis, tales como la angiostatina, manteniendo en estado latente al tumor y, consecuentemente, esta terapia podría facilitar una estrategia que tienda hacia la cronicidad de esta enfermedad de forma similar a los tratamientos de la diabetes y del SIDA.



Socios de la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real  
Academia Nacional de Farmacia a quien expresamos nuestra sincera  
gratitud por su mecenazgo:

CAJA MADRID

————— ○ —————

Farmaindustria

————— ○ —————

Laboratorios Rovi

————— ○ —————

Alcaliber S. A.

Almirall Prodesfarma

Bristol-Myers Squibb, S.L.

Fundación Aventis

Grupo Ferrer Internacional

Industrial Farmacéutica Cantabria

Laboratorios Esteve

Laboratorios Lilly

Laboratorios Menarini

Novartis Farmacéutica

Tedec-Meiji Farma S.A.

————— ○ —————

Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos

Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid

————— ○ —————

Colegios Oficiales de Farmacéuticos de: A Coruña, Alicante, Badajoz,  
Barcelona, Bizkaia, Burgos, Cáceres, Cádiz, Ciudad Real, Girona,  
Palencia, Principado de Asturias, Santa Cruz de Tenerife, Tarragona,  
Toledo y Zaragoza.

