

INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

LA PIEDRA DE ROSSETTA DE LA BIOLOGÍA Y SU IMPACTO EN LA FARMACIA

DISCURSO DEL
EXCMO. SR. D. RAFAEL SENTANDREU RAMÓN

LEÍDO EN LA SESIÓN DEL DÍA 14 DE NOVIEMBRE DE 2013
PARA SU INGRESO COMO ACADÉMICO DE NÚMERO

Y CONTESTACIÓN DEL
EXCMO. SR. D. CÉSAR NOMBELA CANO



Madrid, 2013

**INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA**

**LA PIEDRA DE ROSSETTA DE
LA BIOLOGÍA Y SU IMPACTO
EN LA FARMACIA**

DISCURSO DEL

**EXCMO. SR. D. RAFAEL SENTANDREU RAMÓN
LEÍDO EN LA SESIÓN DEL DÍA 14 DE NOVIEMBRE DE 2013
PARA SU INGRESO COMO ACADÉMICO DE NÚMERO**

Y CONTESTACIÓN DEL

EXCMO. SR. D. CÉSAR NOMBELA CANO



MADRID - 2013

ISBN: 978-84-940609-7-7 - Depósito legal: M. 28.402-2013

Impreso en Realigraf, S. A. - Pedro Tezano, 26. 28039 Madrid

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
LA PIEDRA DE ROSETTA DE LA BIOLOGÍA	12
HORMONAS	15
Somatostatina (GHIH).....	16
Insulina	16
Glucagón.....	18
Hormona del crecimiento (hGH)	19
HORMONAS CON MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES	20
Eritropoietina (EPO).....	21
Factor de crecimiento de las plaquetas (PDGF).	21
Gonadatrofinas.....	21
CITOCINAS: OTRAS PROTEÍNAS DE GRAN DE INTERÉS TERAPÉUTICO	22
VACUNAS.	23
Vacunas preparadas con técnicas tradicionales	24
Vacunas de ADN recombinante.....	26
Gripe	27
Poliomielitis	27
Vacunas con modificaciones postransduccionales.....	27
Expresión de antígenos inmunizantes de microorganismos patógenos en microorganismos no patógenos	28
Expresión de antígenos inmunizantes de microorganismos patógenos en plantas	28
Vacunas sintéticas	29
Vacunas de ADN	30
Infecciones importantes para las que carecemos de vacunas	31
Vacunas contra el cáncer	36
Desarrollos actuales en la producción de vacunas.....	39
Movimiento ciudadano contra las vacunaciones	40

FARMACOGENÉTICA Y FARMACOGENÓMICA: BASES RACIONALES PARA EL DISEÑO DE NUEVAS DROGAS.....	41
Factores que afectan la actividad de los fármacos.....	42
Bases racionales para el diseño de fármacos personalizados	45
PRODUCTOS TERAPÉUTICOS PRODUCIDOS POR LOS MICRORGANISMOS DIRECTAMENTE EN EL HOMBRE	49
El microbioma humano	49
Alimentos funcionales	58
La píldora viva.....	61
Artículos destacados con temática sobre el microbioma o metagenómica publicados por grupos españoles.....	62
GENES CON INTERÉS TERAPÉUTICO (terapia génica)	62
Terapia génica en células somáticas.....	65
Terapia génica del cáncer	69
Grupos españoles trabajando en terapia génica.....	70
ARN antisentido y triplices	71
Identidad conceptual entre la terapia génica y los procedimientos tradicionales utilizados en el tratamiento de enfermedades.....	73
Olimpiada genética.....	74
TERAPIA GÉNICA EN CÉLULAS GERMINALES Y CIGOTOS	75
LA SOCIEDAD ANTE LA GÉNICA DEL <i>HOMO SAPIENS</i>	76
BIBLIOGRAFÍA	80
Discurso de contestación del Excmo. Sr. D. César Nombela Cano.....	87

*El ideal debe ser nuestro compromiso
directo con la razón, la tolerancia
humanista y la implicación social.*

(Anónimo)

INTRODUCCIÓN

Excelentísimo Sr. Presidente de nuestra Real Academia

Excelentísimas Señoras Académicas

Excelentísimos Señores Académicos

Señoras y señores

Amigas y amigos

Como es tradicional en el acto de recepción de un nuevo académico de número de esta docta corporación, el Académico electo debe leer el discurso de ingreso correspondiente. Ésta es la razón por la que hoy tengo el honor y la responsabilidad de dirigirme a ustedes en este acto.

Mis próximas palabras son de agradecimiento para todos los Académicos que depositaron su confianza en mi elección y que voy a personificar en los que acreditaron mis méritos presentando mi candidatura: los Excms. Sres. Académicos Julio Rodríguez Villanueva, Ángel Villar del Fresno y César Nonbela Cano. Con los tres me une una relación muy estrecha creada durante mis andaduras tanto académicas como científicas. Con el Prof. Julio Rodríguez Villanueva desarrollé mi tesis doctoral en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Este centro fue en su día, en los años 50 y 60 del siglo pasado, el vivero que ayudó al despliegue de la Biología fundamental en nuestro país, y hoy continúa siéndolo en muchos aspectos. Posteriormente, a mi regreso a España, trabajé 10 años en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Salamanca que él dirigía. El Prof. J. Rodríguez Villanueva, junto con su esposa la Dra. Isabel García Acha, Profesora de Investigación del CSIC, han sido maestros y amigos, maestros y amigos de los que he aprendido no solo a trabajar en el laboratorio, sino a idealizar la ciencia y la docencia como las actividades humanas más gratificantes por la capacidad creativa que implican; además, me enseñaron el comportamiento ético que debe regir nuestra vida como personas. No debo olvidar que la transformación de los estudios de la Microbiología en las Facultades como asignatura inicialmente aplicada a la de una disciplina científica fundamental, sin perder por ello su parte aplicada, en nuestro país, se debe en gran parte a la acti-

vidad como científico y como docente del Dr. Julio Rodríguez Villanueva. Con el Prof. Ángel Villar tengo un deber de reconocimiento muy particular ya que nos conocimos al final de la década de los 70 del siglo pasado en la entonces recién creada Facultad de Farmacia en la Universidad de Valencia. Ángel fue el primer catedrático que se incorporó a la nueva Facultad y el que les habla, el segundo. Desde el momento de mi incorporación como catedrático y como Decano de la Facultad, tuve su ayuda y consejo como compañero y como vicerrector de la Universidad como así mismo de su esposa Margarita, farmacéutica de hospital. Ángel me ayudó a solucionar muchos de los problemas más acuciantes que se me presentaron en esa etapa de mi vida como Decano de la nueva Facultad y como docente e investigador. Mi gratitud, finalmente, al Profesor César Nombela Cano; iniciamos nuestra amistad en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Salamanca y durante muchos años colaboramos en diversos temas de investigación como así mismo posteriormente siendo ya catedráticos, él de la Universidad Complutense de Madrid y yo de la de Valencia. Nuestros trabajos de investigación siempre han estado muy próximos y nuestras relaciones han sido siempre excelentes, incluyendo a nuestras esposas y compañeras, Nohely y Toyi, como así mismo con el resto de los miembros de su equipo de trabajo en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense. Un agradecimiento especial, además, por quien movido por la amistad que nos une ha escrito la contestación a este discurso de ingreso en un periodo de máximo trabajo como Rector de la Universidad Internacional Menéndez Pelayo de Santander.

Quiero hacer ahora una mención especial a mi familia. Mi más profundo agradecimiento a mi padre, farmacéutico de oficina de farmacia, que de acuerdo con mi madre, me empujó a continuar mi formación académica después de obtener mi licenciatura en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. En ningún momento escatimaron su comprensión y ayuda por la deriva de mi trabajo profesional, primero por la realización de mi tesis doctoral y después por mis largas estancias tanto en la Universidad de Cambridge en el Reino Unido como en la Universidad de Rutgers en el estado de New Jersey en los Estados Unidos (EEUU). Quiero agradecer al Prof. D.H. Northcote, Fellow de la Royal Society y director de mi tesis doctoral en la Universidad de Cambridge, y al Prof. J.O. Lampen, director que fue del Waksman Institute de la Universidad de Rutgers, Nueva Jersey, en EEUU, ambos grandes ilustrados, por su gran influencia en mi trayectoria científica. Mi reconocimiento más íntimo y profundo a mi esposa y compañera, la Dra. María Victoria Elorza, Investigadora Científica del CSIC y discípula también del Prof. Julio Rodríguez Villanueva. Gran parte del éxito de mi trabajo profesional se lo debo a ella; ha sido parte imprescindible en los trabajos desarrollados por nuestro grupo de investigación y ha compartido conmigo situaciones difíciles y momentos de grandes alegrías como el de hoy. Por último quiero recordar especialmente a la Dra. Isabel García Acha, siempre próxima tanto en aspectos científicos como personales, a mis

compañeros tanto del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid como de la Universidad de Salamanca y a mis discípulos de las Universidades de Salamanca, La Laguna y Valencia, en los que siempre encontré el apoyo desinteresado en los momentos en que los he necesitado.

El ser admitido como Académico de Número representa para mí una etapa muy importante no una meta de mi vida como investigador y docente ya que con ello asumo nuevos retos de los que intentaré salir con éxito con la ayuda de mis compañeros de Academia. De un modo simbólico, esta acogida que intentaré abordar con éxito hoy como Académico de Número, se me presenta como la oportunidad de realizar un nuevo viaje a bordo de un nuevo velero, nuestra Real Academia, ya que veleros que he utilizado anteriormente, durante mi actividad como profesor universitario e investigador de base, alcanzaron básicamente sus metas. Pero, no olvidemos, que un velero requiere, además, vientos favorables para que pueda arribar a buenos puertos, vientos representados por el trabajo conjunto que debo realizar con los Académicos de esta Real Corporación; en otras palabras, como Ulises en la Odisea, vientos que me permitan arribar a puertos antes ignorados y que me acerquen un poco más a esa Ítaca ideal, como dice Konstantínos Kaváfis en los bellos versos de su poema. ¿Y por qué me ilusiona este viaje? Porque creo que el nuevo velero, la Academia, y los vientos favorables, mis compañeros, me van a acercar a nuevas metas. Esto lo puedo deducir observando las trayectorias científicas de los académicos, tanto de los actuales como de los que me han precedido en esta Real Corporación, y que como Académico Correspondiente he podido conocer en diversas ocasiones y a través de los años. Como ejemplo citaré al Excmo. Sr D. Guillermo Tena Núñez, académico de número que tan brillantemente ocupó la medalla 18 para la cual he sido elegido que fue Dr. en Farmacia y licenciado en Medicina y centró sus estudios en toxicología y alcanzó un nivel profesional excepcional, habiendo ocupado entre otras posiciones la de Director General del Instituto de Toxicología, Académico correspondiente de la Real Academia de Farmacia de Barcelona, Académico de la «International Academy of Legal Medicine and Social Medicine», Miembro Correspondiente Extranjero de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires (Argentina), Primer Presidente de Honor de « Association Européenne des Centres de Lutte contre les Poisons», Presidente de Honor de la Asociación Latinoamericana de Toxicología, Presidente de Honor de la Asociación Latinoamericana de Centro de Información y Asistencia Toxicológica, Presidente Honorario del Ateneo de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Buenos Aires (Argentina), Miembro de Honor del Centro Nacional de Información y Asistencia Toxicológica de la República Argentina, Miembro de Honor de la Asociación Colombiana de Toxicología, Miembro de Honor de la Sociedad de Toxicología de Venezuela, Socio de Honor de la Asociación Bioquímica Argentina, fundador de la «Association Européenne des Centres de Lutte contre les Poisons». Perteneció a la Orden Civil de Sanidad y estuvo en posesión, entre otras, de la Gran Cruz de San Raimundo de Peñafort.

Permítanme, que después de conocer los méritos del Dr. Guillermo Tena Núñez me sienta sobrecogido por la responsabilidad de sucederle en la medalla 18 de esta Real Corporación. Es extremadamente doloroso que para ser elegido para ocupar una medalla en esta Real Academia, aquel que con tantos méritos la ha ocupado previamente tenga que desaparecer. Pero no debemos olvidar que el avance de la ciencia se asemeja a una cadena en crecimiento constante, que viene del pasado y se extiende hacia el futuro; una cadena en la que cada nuevo descubrimiento, cada nueva hipótesis, es un eslabón de metal puro que se añade a la ciencia. Con este simbolismo tan hermoso me comprometo a trabajar en esta Real Corporación para que así sea. Precisamente si algo caracteriza a esta docta Corporación es el esfuerzo diario por la actualización constante del conocimiento científico junto al debate sereno de las nuevas hipótesis y su crítica constructiva. Como nos dice el artículo primero de sus estatutos, sus fines son: “Fomentar la investigación y el estudio de las ciencias farmacéuticas y sus afines”. Y para ello, en mi opinión, no debemos olvidar que la Ciencia con mayúscula: “es un diálogo permanente del investigador con la naturaleza, en su laboratorio, en el medio ambiente, y un intercambio de opiniones con sus pares. Nunca un monólogo que podamos proseguir independientemente”.

Por todo ello supone para mí un gran honor el ser admitido como Académico de Número en ésta Real Corporación, y a la vez una gran satisfacción que se acrecienta por el hecho de que mi ingreso se produzca en un lugar como éste y en presencia de compañeros, amigos y familiares.

Es indudable que el desarrollo del discurso de ingreso en esta Real Academia entraña dificultades significativas, pero una que quisiera evitar es que resultara de interés exclusivo para los iniciados en la Microbiología, ciencia a cuya enseñanza e investigación he dedicado toda mi actividad. Por ello, he seleccionado como contenido de mi exposición una serie de reflexiones sobre algunos de los avances recientes de la Biología y de los problemas éticos derivados de los mismos.

Hace años que me preocupa la incidencia de los avances científicos sobre el desarrollo y futuro de nuestra Sociedad, no solo de los aspectos positivos, que son muchos, sino también de aquellos otros que pueden incidir de una manera negativa.

Es indudable que el reto científico-tecnológico es uno de los más importantes a los que se enfrenta la Sociedad de este principio del siglo XXI y que la tecnología no es más que la aplicación práctica del conocimiento científico. Según algunos autores: «la Ciencia y la Tecnología actúan simbióticamente y la Ciencia sin la Tecnología se vuelve estéril». Aunque no sabemos cuál es el tipo de relación existente entre Ciencia y crecimiento económico, se tiene el convencimiento de que la investigación juega un papel instrumental y básico en el mismo. Teniendo en

cuenta estas consideraciones, no es difícil comprender que en un mundo como el actual, altamente tecnificado, el mayor valor añadido que tiene una Sociedad es el correspondiente a los científicos que posee. Sin embargo, no debemos perder de vista que nuestra Sociedad tiene también otros valores, y entre ellos, los culturales (artistas, intelectuales,...) deben ocupar un lugar significativo. Por ello, creo, que las Reales Academias, entre ellas la de Farmacia, que forman el Instituto de España, deben tener como misión la formación de la Sociedad en todos estos aspectos.

Aunque el desarrollo de las Ciencias experimentales ha sido continuo durante la Historia de la Humanidad, la progresión que ha tenido lugar durante el último siglo ha sido exponencial. El conocimiento de las leyes por las que se rige la Naturaleza ha ayudado a mejorar las condiciones de vida del hombre, independizándole de los avatares inherentes al medio que le rodea. Aun cuando cada descubrimiento realizado y cada nueva ley descifrada en los siglos precedentes han contribuido a ello, los conocimientos adquiridos recientemente están modificando nuestra Sociedad con una intensidad que nunca tuvieron los obtenidos anteriormente.

Cuatro son las revoluciones científicas que marcaron el siglo XX, a saber: la derivada del conocimiento del átomo y de su contenido energético, los avances de la física con el espectacular desarrollo de los ordenadores y demás máquinas «inteligentes», la conquista del espacio exterior y los nuevos conocimientos biológicos.

En este discurso voy a centrarme en analizar algunos aspectos del desarrollo de la Biología que inciden, y que en un futuro próximo van a incidir con mayor intensidad, en nuestra Sociedad, e incluso en la evolución de nuestra propia especie. Me centraré particularmente en aquellos extremos a los cuales la Microbiología ha contribuido de una manera especial como son la Biología y Genética Moleculares, y en su aplicación práctica, que es la Biotecnología. Veremos no sólo las posibilidades que tiene la nueva Biología a la hora de solucionar algunos de los grandes problemas de la Humanidad como son la salud y la enfermedad, sino también alguno de los grandes retos que plantea su aplicación desde un punto de vista práctico y las implicaciones éticas que se derivan. Como se ha dicho en repetidas ocasiones: «...nada es más peligroso que un profesional ignorante, igual que nada es más dañino que un intelectual carente de sentido ético».

Quisiera llamar la atención sobre el hecho de que tradicionalmente muchos de los aspectos del desarrollo científico se han juzgado o desde una moral fundamentalmente religiosa o como principios considerados naturales. De esto ha surgido la Ciencia que hoy denominamos Bioética y que no es más que la interpretación racional de los nuevos conocimientos biológicos y su aplicación práctica. Para el oncólogo estadounidense Van Reuselaer Potter (1987) la Bioética, consiste en servirse de las Ciencias Biológicas para mejorar la calidad de vida y podemos definirla como una nueva rama de la Ciencia que «intenta conseguir una integración total y adecuada entre dos realidades: la vida y la ética».

Actualmente la necesidad de implementar una Bioética universal se agiganta debido a la importancia los nuevos desarrollos científicos:

1. El avance de la tecnología genética que permite actualmente modificar, eliminar o añadir fragmentos del material genético de un modo ilegítimo en todos los seres vivos incluyendo al hombre.
- 2) La posibilidad de diseñar o crear células a “la carta” en un próximo futuro.
- 3) El avance de la neurociencia que incluye no solo la curación de patologías si no que abre nuevas posibilidades de actuación sobre el hombre como es su “mejoramiento”, esto es, el perfeccionamiento de las capacidades humanas interviniendo directamente en el cerebro.

La revolución biológica se produce como resultado de la convergencia de los avances científicos de las ciencias biomédicas tradicionales y los de la Biología Molecular y la Genética.

En el caso de la Biomedicina, la introducción de las vacunas y los antibióticos junto con la posibilidad de disponer de recursos como los trasplantes de órganos, la utilización de nuevas drogas, etc., ha conducido a un aumento espectacular de la esperanza de vida. Así, una persona que celebre su 70 aniversario hoy, aquí en Madrid, tiene una expectativa de vida de al menos unos 15 a 20 años, y se espera que en un futuro próximo esta expectativa se aumente aún más.

En 1935 Trotsky escribió en su diario durante el exilio: «llegar a la ancianidad es una de las cosas más inesperadas que le puede suceder a un hombre». Hoy podemos asegurar que llegar a la ancianidad es una de las cosas probables que nos puede ocurrir. Este aumento en las expectativas de vida ha producido el envejecimiento de la Sociedad y un aumento de la población, provocando unos cambios sociales y unas cargas económicas muy significativas.

Otros problemas que se plantean como resultado de los avances de la Biomedicina tradicional tienen que ver con el denominado «encarnizamiento terapéutico» y la eutanasia de tipo activo, pasivo y social; ésta última consistente en no aplicar a determinados enfermos (por ejemplo a los mayores de 70 años), las medidas necesarias para su curación por problemas de estructura sanitaria o planteamientos económicos.

En el otro extremo de la vida los problemas se han proyectado con el desarrollo de las técnicas de reproducción asistida: inseminación y fecundación artificiales, implantación, congelación y manipulación de embriones humanos, utilización terapéutica de órganos o tejidos de origen fetal, utilización de células troncales, etc...

La segunda línea de avances que ha contribuido a la revolución biológica es la que se relaciona con el desarrollo de la Biología y Genética Moleculares y algunos aspectos del mismo serán descritos a continuación.

La Microbiología, la Bioquímica, la Biología Molecular y la Genética han experimentado un desarrollo espectacular en los últimos 70 años, que no solamente han hecho posible avanzar de una manera considerable en el conocimiento de los mecanismos por los que se rigen las reacciones químicas que tienen lugar en el interior de las células, sino también en la comprensión de las leyes implicadas en los mecanismos de herencia de los seres vivos. Estos estudios se desarrollaron inicialmente utilizando como modelos experimentales diversos microorganismos y virus, y dada su sencillez relativa (*Escherichia coli* contiene una cantidad de ADN aproximadamente unas 800 veces menor que la que posee una célula humana) han conducido a la adquisición de un conocimiento considerable sobre los mecanismos naturales implicados en el intercambio de material genético entre células. Como resultado de estos estudios, el hombre ha obtenido los conocimientos necesarios para provocar el trasvase de material genético, de un modo ilegítimo, entre células procedentes de distintos niveles de complejidad biológica. En paralelo con el inicio del desarrollo de la Genética Molecular y a partir de la década de los cuarenta del siglo pasado, los microorganismos fueron introducidos en la industria, como agentes productores de diversas sustancias de interés farmacéutico. La entrada de los microorganismos en la industria farmacéutica produjo una renovación tan profunda que se puede hablar de una verdadera revolución industrial. Las cadenas o algunas de las reacciones que originan el flujo metabólico de una célula microbiana son utilizadas como laboratorios de producción de diversos fármacos.

El conocimiento de los mecanismos bioquímicos y genéticos que rigen los microorganismos y otros seres vivos puede ser explotado biotecnológicamente por la industria farmacéutica. La Biotecnología puede definirse como «el uso integrado de la bioquímica, microbiología y de la ingeniería genética a fin de obtener aplicaciones tecnológicas (industriales) de las capacidades de los microorganismos». En un sentido más amplio puede definirse como la disciplina que «incluye cualquier tecnología que usa organismos vivos o parte de ellos a fin de obtener o modificar productos para mejorar plantas o animales o «desarrollar» organismos más específicos». Dado que entre los académicos de nuestra Real Corporación se encuentran especialistas en aspectos muy diversos de la Ciencia, he considerado conveniente dar unas pinceladas sobre conceptos básicos de la Biología como son los mecanismos por los que sé que rige la transferencia del material genético entre células bacterianas.

LA PIEDRA DE ROSETTA DE LA BIOLOGÍA

Desde la aparición del hombre sobre la tierra, el desarrollo de la Biología ha permitido profundizar cada vez más en el conocimiento de las características de los seres vivos y de las leyes por las que se rigen. Inicialmente fue la observación simple, posteriormente el estudio de su Anatomía, su Fisiología, Bioquímica y actualmente su Biología Molecular y Genética. Ésta ha sido una de las Ciencias que más se ha beneficiado de los avances científicos de la Biología Molecular. La publicación en 1953 por J.D. Watson y F.H. Crick en la revista Nature de la estructura del material genético, de la molécula del ácido desoxirribonucleico (ADN), representó un hito histórico que difícilmente podemos valorar en toda su extensión. Lo verdaderamente significativo del modelo propuesto estriba en que ha permitido explicar en términos moleculares cómo las características típicas de una especie pasan de generación en generación, y el porqué de la unicidad y variabilidad de los individuos dentro de cada especie. Dado que éstos son los procesos básicos que gobiernan la historia de los seres vivos puede decirse que desde el punto de vista biológico, sólo la teoría de la Evolución y de los mecanismos implicados propuestos por Darwin tiene una importancia semejante.

El ADN, la molécula «maestra» de la vida, se encuentra presente en todas las células de los seres vivos independientemente de su nivel de complejidad biológica, desde bacterias, algas, hongos,... hasta mamíferos. La molécula de ADN es extraordinariamente sencilla desde el punto de vista químico: la forman un azúcar, un grupo fosfato y cuatro bases nitrogenadas (adenina, timina, guanosina, y citosina). Estas sustancias se combinan entre sí y dan lugar a una estructura formada por dos cadenas complementarias enrolladas en hélice, una alrededor de la otra, que recuerda a la de una escalera de caracol en las que cada cadena está constituida por la unión de complejos azúcar-fosfato. A cada molécula de azúcar se le une una base que es complementaria a la que se encuentra en la otra cadena; si en una se encuentra una adenina en la otra habrá una timina y si es una guanina la complementaria será una citosina. Durante la división celular las dos cadenas se separan y sirven de modelo para la síntesis de otra complementaria; una de las hélices completa quedará en la célula madre y la otra, idéntica a la anterior, pasará a la célula hija (herencia). Este mecanismo, a pesar de su sencillez, origina dos moléculas idénticas a partir de la hélice original. Desde el punto de vista funcional, la molécula de ADN recuerda a las cintas magnetofónicas, a los discos de DVD, a un lápiz electrónico (pen drive); éstos vistos externamente son uniformes y, sin embargo, cada fragmento informa o codifica un sonido, conjunto de sonidos o una imagen. En el caso del ADN nos encontramos ante una situación semejante; es una molécula larga, aparentemente uniforme en la que, sin embargo, cada fragmento (gen) es, gracias a la secuencia de las cuatro bases, un mensaje químico que dice cómo deben articularse los aminoácidos para dar origen a otro tipo de macromo-

lécúlas básicas, las proteínas. Éstas son utilizadas en la construcción de las estructuras de las células y encargadas de catalizar las reacciones químicas que tienen lugar en ellas. En otras palabras: el ADN es un mensaje escrito en un alfabeto de tipo morse, en el que se encuentran cifradas las propiedades generales de cada especie que se transmite por herencia. Dentro de cada especie las pequeñas modificaciones (mutaciones) que ha experimentado el ADN son las responsables de las características específicas de cada individuo. Además, el programa genético no se lee de principio a fin sino que solamente se utiliza la información requerida en cada momento y por tanto, puede compararse a un libro de instrucciones del que se consultan las páginas en función de las necesidades.

Todo esto se sabía desde hace varias décadas, pero lo que es muy significativo en Biología es la capacidad actual del científico de manipular directamente la molécula de ADN alterando, eliminando o añadiendo información a la contenida originalmente. Paul Berg, de la Universidad de Stanford, fue el primer investigador que obtuvo moléculas híbridas de ADN procedentes de dos orígenes biológicos distintos (Jackson, *et al.*, 1972). Mediante técnicas enzimáticas complejas consiguió abrir el ADN circular de un virus bacteriano, el bacteriófago lambda, y el de un virus de los antropoides denominado SV40 y unirlos formando una molécula única. Con este experimento acababa de nacer la era de la ingeniería genética, del ADN recombinante, y todo el potencial que esta nueva tecnología es capaz de ofrecer.

Sin embargo, los experimentos siguientes diseñados por Berg y sus colaboradores levantaron una fuerte polémica en el pequeño mundo de científicos «iniciados». Al experimento de construcción de un virus híbrido seguiría el de su introducción en *E. coli*, una bacteria muy extendida y que se encuentra normalmente como comensal inocuo en el intestino del hombre.

El SV40 es un virus aparentemente no patógeno para los monos, pero causa tumores cuando parasita otros animales como ratones y hámster y transforma las células humanas en cancerosas. La pregunta que se hicieron aquellos pocos científicos fue: ¿Qué ocurriría si las células de *E. coli*, conteniendo el virus híbrido, se escaparan del laboratorio y colonizaran el intestino del hombre? Ante la posibilidad de que se produjera un accidente biológico de consecuencias impredecibles, Berg y sus colaboradores decidieron posponer sus experimentos. Además, convencieron a otros investigadores para que suspendieran los suyos voluntariamente mientras no se tuvieran condiciones experimentales adecuadas que evitarán cualquier contingencia. Este grupo de científicos se reunió en Asilomar (California), en 1975, para estudiar los problemas derivados de la nueva tecnología y un microbiólogo, Roy Curtiss de Birmingham (Alabama), propuso que se continuaran los experimentos pero utilizando una estirpe de *E. coli* con una serie de defectos genéticos tales que hiciera imposible su crecimiento y multiplicación fuera del laboratorio. Además, y como medida complementaria, los Institutos Nacionales de la Salud de

los EEUU exigieron una serie de normas de cumplimiento obligado para todos aquellos que quisieran trabajar en este campo de investigación, reglas que fueron prácticamente abolidas en 1980.

Paralelamente a los trabajos de Berg, Stanley Cohen, del Stanford Medical Center, y Herbert Boyer, de la Universidad de California en San Francisco, descubrieron los plásmidos, pequeñas moléculas circulares de ADN independientes de los cromosomas celulares, y las enzimas de restricción, cuchillas enzimáticas capaces de cortar las moléculas de ADN en lugares específicos. Estas enzimas cortan la molécula de ADN de tal manera que en cada una de las dos bandas que forman la hélice de la molécula dejan una pequeña secuencia de bases complementarias (extremos cohesivos) que tienen tendencia a unirse entre sí cerrando el círculo de nuevo.

La utilización de las enzimas de restricción posibilita la unión de fragmentos de ADN de procedencia diversa, de un virus, de una levadura o del hombre. Cortando con una enzima de restricción determinada un plásmido y el ADN de otra procedencia se obtienen fragmentos con extremos cohesivos que permiten formar moléculas híbridas o quimeras.

Lo verdaderamente significativo de estos descubrimientos es que las moléculas híbridas son tratadas por las bacterias y otras células de igual manera que las suyas propias tanto para multiplicarlas como para expresar las proteínas codificadas por ellas. Además y en el caso de las bacterias, como se multiplican a gran velocidad, después de un corto período de tiempo podemos obtener las sustancias codificadas por el ADN heterólogo en cantidades significativas.

El que los científicos puedan manipular la herencia de los microorganismos y también la del resto de los seres vivos ha puesto en manos del hombre unas posibilidades técnicas nunca soñadas previamente.

El hombre, al descifrar las leyes mediante las cuales se rige la Naturaleza, ha intentado aplicarlas en su propio beneficio. Por lo tanto, no es de extrañar que desde el momento en que Berg realizó sus experimentos, los investigadores rápidamente tomaran conciencia de las grandes posibilidades que abrían las nuevas técnicas genéticas y de la posible «construcción» de microorganismos capaces de actuar como «fábricas» para la síntesis de todo tipo de sustancias químicas. Hoy los científicos «construyen» bacterias capaces de producir hormonas, vitaminas, insecticidas; otras son capaces de eliminar residuos de petróleo o sustancias químicas que difícilmente se degradan de un modo natural; algunas se utilizan en minería, agricultura, etc, etc... Pero dadas las características de este discurso, es obvio que esta relación no puede ser exhaustiva y por ello, nos centraremos exclusivamente en la obtención de algunas sustancias de interés farmacológico mediante microorganismos y su utilización directa y de los genes como tales.

HORMONAS

Las hormonas se encuentran entre las moléculas reguladores más importantes producidas por el organismo de los mamíferos.

Tradicionalmente el término “hormona” se definen como: toda sustancia que producida y liberada por una glándula específica es capaz de interaccionar con un receptor presente en una célula diana y producir cambios en la misma. Las hormonas viajan por el organismo utilizando el sistema circulatorio y, de las conocidas, al menos unas diez son actualmente utilizadas en la práctica médica diaria (insulina, glucagón, hormona del crecimiento, etc., ...). Dada la dificultad que entrañaba su obtención a partir de los sustratos naturales, las hormonas se convirtieron en candidatas idóneas para su producción por fermentación bacteriana.

Tradicionalmente han existido cuatro técnicas para la producción de hormonas polipeptídicas:

1. Extracción de productos humanos o animales.
2. Síntesis química.
3. Producción por células animales en cultivo de tejidos.
4. Producción por fermentación microbiana después de la aplicación de técnicas de ingeniería genética.

Históricamente era la longitud de la cadena peptídica el factor más importante para decidir cuál era la mejor tecnología para su producción industrial. En 1965 se sintetizó la insulina con una cadena de 51 amino ácidos y cuatro años después, en 1969, la ribonucleasa con 124 amino ácidos. Sin embargo, el interés industrial de la síntesis química de hormonas y otros polipéptidos activos disminuyó al desarrollarse las técnicas de ingeniería genética. No obstante, la síntesis o modificación química de las hormonas conserva gran interés en la producción de polipéptidos activos distintos de los naturales, más sencillos, con otros amino ácidos, modificaciones éstas que pueden variar la actividad de la hormona haciendo que el organismo retrase su hidrólisis, modifique su actividad biológica, etc. En la actualidad las hormonas polipeptídicas de alto peso molecular se obtienen por fermentación, usando bacterias “construidas” mediante técnicas genética específicas. La abundancia en la obtención de hormonas mediante técnicas de ADN recombinante ha permitido identificar su estructura química y determinar su función fisiológica, aspectos que anteriormente encontraban dificultades debido a un suministro limitado.

Entre los requerimientos que se exigen a una hormona obtenida por ingeniería genética se encuentran los siguientes:

1. La secuencia de aminoácidos debe ser idéntica a la de la hormona humana.
2. La hormona recombinante debe estar libre de pirógenos procedentes de la bacteria utilizada en su fabricación.
3. La hormona debe carecer de productos secundarios, incluyendo sustancias de estructura similar que pudieran tener otros efectos.

Además, como se trata de un sistema vivo y cambiante, se requiere una seguridad estricta de que, como consecuencia de su origen genético, las moléculas obtenidas en los distintos procesos no sean susceptibles de sufrir variaciones,

Somatostatina (GHIH)

Esta hormona llamada también “hormona inhibidora de la hormona del crecimiento” (growth hormone-inhibiting hormone, GHIH) regula el sistema endocrino con interacción con neurotransmisores y con la proliferación celular y actúa inhibiendo la liberación de varias hormonas, entre ellas la del crecimiento humano.

La somatostatina humana fue la primera hormona humana clonada. Esta hormona es un péptido de 14 amino ácidos que, junto con otras hormonas proteicas, es sintetizada en el hipotálamo. La somatostatina se transporta por la sangre a la glándula pituitaria, que es la que controla la liberación de insulina y bloquea la acción de la hormona del crecimiento humano. Herbert Boyer y colaboradores del City Hope National Medical Center y la Universidad en California iniciaron en 1977 los estudios de esta hormona con vistas a su clonaje. El gen de la hormona no había sido aislado de células humanas pero se conocía su secuencia amino ácida y una vez conocido el código genético se obtuvo la secuencia de bases correspondiente y se construyó un plásmido híbrido de pBR322 con la secuencia correspondiente y un fragmento del operon lac (Itakura, *et al.*, 1977). Cuando el plásmido fue transferido a células de *E. coli*, éstas secretaron una somatostatina completamente igual que la humana. Lo verdaderamente interesante es que cada célula de *E. coli* era capaz de producir 10.000 moléculas de la hormona. Roger Guillemin, premio Nobel en 1977, fue el científico que descubrió la somatostatina y necesitó 500.000 hipotálamos de cerebro de oveja para obtener unos 5 mg de la hormona purificada (Brazeau, *et al.*, 1974). El clonaje en *E.coli* produce un rendimiento extraordinario ya que con ocho litros de la suspensión bacteriana se puede obtener una cantidad similar.

Insulina

La insulina es una hormona polipeptídica producida por las células β de los islotes de Langerhans responsable de regular los niveles de glucosa en sangre.

Cuando el organismo no sintetiza suficiente cantidad de esta hormona se produce un estado dependiente de la misma que se denomina diabetes melitus.

Las insulinas de origen animal que se utilizaban tradicionalmente en el tratamiento de la diabetes difieren ligeramente en su secuencia de aminoácidos de la insulina humana y aunque la mayoría de dichas insulinas controlan los principales síntomas del diabético, producen efectos secundarios como son la retinopatía, nefropatía y neuropatía. Además, la diabetes de Tipo 1 sitúa al paciente en riesgos muy importantes como son enfermedades cardiovasculares e incluyendo la posibilidad de sufrir un infarto (Nathan, 1993).

La insulina humana producida por bacterias es capaz de contrarrestar estas anomalías, por lo que actualmente solo se utiliza en clínica la hormona obtenida por técnicas recombinantes.

La primera insulina sintetizada por ingeniería genética fue la de rata que realizaron a cabo Walter Gilbert y Lydia Villa-Komaroff, de la Universidad de Harvard. Estos científicos observaron en 1977 un tumor de las células β de páncreas de rata que producía cantidades importantes de insulina; aislaron el mRNA de las células tumorales y con una transcriptasa inversa obtuvieron el cDNA correspondiente con el que construyeron un plásmido que portaba los genes de resistencia a penicilina y a tetraciclina y que se utilizó para transformar bacterias. Mediante técnicas inmunológicas señalaron que tanto la penicilinasa como la insulina de rata eran secretadas al medio de cultivo y demostraron posteriormente que lo que realmente se secretaba era una proteína híbrida penicilinasa-insulina, que con la tripsina se podía liberar la insulina activa de rata. Posteriormente se demostró que el producto obtenido en bacterias era capaz de influenciar el metabolismo de los azúcares en adipocitos como la insulina natural de rata. Por primera vez las bacterias habían sintetizado la auténtica insulina de rata (Villa-Komaroff *et al.*, 1978).

A principios de la década de los 80, Geneteeh anunció la síntesis de insulina humana obtenida de bacterias y posteriormente Eli-Lilly la introdujo en el mercado.

Desde el punto de vista histórico tiene interés comentar que en julio de 1980 en el Hospital Guy's de Londres se seleccionaron 17 voluntarios que recibieron una inyección de insulina que no procedía de cerdos o vacas sino de bacterias. Era la primera vez que se probó en pacientes humanos una sustancia obtenida por ingeniería genética y la autorización para uso médico de la insulina recombinante se produjo dos años más tarde. La empresa Hoechst procesaba anteriormente once toneladas de páncreas de cerdo diarias procedente de 100.000 animales de matadero para obtener insulina, y con la introducción de la insulina recombinante dejó de producirla en el año 2005. Es importante reseñar que un diabético necesitaba en aquella época y anualmente el páncreas de 50 cerdos para controlar su enfermedad.

Desde el punto de vista económico la aplicación de las técnicas microbiológicas en la fabricación de insulina ha cambiado sustancialmente el valor de mercado de dicha hormona. La demanda de insulina siempre ha sido muy elevada y se suponía que en el año 2.000 existían al menos 171 millones de diabéticos en el mundo y se espera que sean 370 millones en 2030 (Wild, *et al.*, 2004).

De lo expuesto puede deducirse que el valor de mercado de la insulina utilizada es muy elevado en millones de euros anuales. El uso clínico de la insulina producida por bacterias fue aprobado en 1982, primero en los EEUU y posteriormente en Alemania Federal, Reino Unido y Holanda, hecho que tuvo un enorme interés terapéutico por varias razones:

1. Suministro de la hormona sin problemas.
2. Eliminación del peligro de transferir enfermedades procedentes del páncreas de los animales.
3. Economía en su producción una vez amortizado el capital inicial utilizado en su desarrollo.

La obtención de la insulina por técnicas recombinantes ha facilitado la obtención de otras insulinas que presentan cambios en su secuencia de aminoácidos y cuya finalidad es la modificación de parámetros de su actividad biológica. Hoy se utilizan:

1. Insulinas con propiedades farmacológicas específicas como son las que actúan más rápidamente o por el contrario, las que su actividad se muestra mucho más lenta.
2. Insulinas que presentan una mayor actividad y que requieren un uso más limitado de la hormona.

Glucagón

Las actividades biológicas del glucagón tienden a oponerse a las de la insulina, específicamente en lo referente al metabolismo. Uno de sus efectos más significativos es el aumentar los niveles de glucosa en sangre, es decir, evitar la hipoglucemia. Esta hormona es sintetizada en las células α de los islotes de Langerhans y almacenada en vesículas de secreción de las que se libera cuando se produce una bajada de la glucosa en sangre. Tradicionalmente, como en el caso de la insulina, se obtenía de páncreas de vacas y cerdos y como en el caso de la insulina, hoy se obtiene por técnicas de ADN recombinante. Mientras que la empresa Novo Nordisk lo obtiene de una cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae*, Eli Lilly lo prepara utilizando una cepa de *E. coli*.

Hormona del crecimiento (hGH)

Esta hormona es muy versátil, ya que además de su utilidad en casos de deficiencia en el crecimiento se usa también en el tratamiento de la insuficiencia renal crónica y en personas de edad evanzada.

La hormona se obtenía por extracción de la glándula pituitaria de cadáveres, glándula que se encuentra en la base del cráneo, pero el procedimiento dejó de utilizarse en 1985 cuando se demostró su relación con la enfermedad Creutzfeldt-Jakob, la enfermedad de las vacas locas, enfermedad neurológica poco frecuente pero mortal. Ese año un hombre joven que había recibido el tratamiento con la hormona quince años antes murió de la enfermedad y los investigadores concluyeron que la había contraído a partir de los extractos de pituitaria infectados con el prión responsable de la enfermedad. Posteriormente se demostró en 72 niños en Francia la relación entre la enfermedad y el tratamiento con los extractos de pituitaria. Afortunadamente en ese momento diversos grupos de investigación ya habían obtenido preparaciones de la hormona recombinante en bacterias y la obtenida de cadáveres dejó de utilizarse.

Hoy se supone que más de 20.000 pacientes reciben esta hormona que se obtuvo en 1980 por primera vez de *E.coli* siendo comercializada inicialmente por Genentech. Esta hormona recombinante difería de la humana en que contenía una metionina adicional. Hoy este problema ha sido resuelto y la hormona recombinante presenta la misma secuencia que la producida por la pituitaria.

Es interesante comentar dos aspectos históricos relacionados con la hormona del crecimiento: el primero relativo a la investigación científica básica y el segundo a su utilización práctica.

En relación con la investigación científica básica sabemos que investigadores de la Universidad de California en San Francisco clonaron el gen de la hormona del crecimiento humano en 1978 y la Universidad patentó este hallazgo inmediatamente. Uno de los investigadores implicados en la clonación de la hormona empezó a trabajar posteriormente en Genentech llevándose una muestra del gen. Esa muestra, según aseguró la Universidad, permitió a la empresa desarrollar un medicamento llamado protropina para el tratamiento del enanismo y que proporcionó ganancias por valor de 2.000 millones de dólares en 20 años (1997). Genentech mantuvo, en cambio, que la protropina había sido fruto de investigaciones de la propia empresa provocando un largo proceso judicial sobre este particular. El tribunal, en la primavera de 1997, le dio la razón a la Universidad de California, pero, como hacía falta unanimidad, se programó una nueva vista para el 3 de enero del año siguiente. Genentech prefirió un acuerdo extrajudicial y pagar a la Universidad 200 millones de dólares. El acuerdo alcanzado especificaba que 30 millones de dólares se destinaban al Fondo General de la Universidad de California, 85 millones

de dólares a los cinco científicos que habían hecho el trabajo básico fundamental, 50 millones de dólares para un nuevo pabellón de investigación en el campus de la Universidad de California en San Francisco que llevaría el nombre de Genentech y 35 millones de dólares para apoyar la investigación de la Universidad de California (Genentech Press Release, 2012).

En relación con la hormona del crecimiento y su utilización práctica comentaré lo ocurrido en el caso de Lionel Andrés Messi Cuccittini, considerado por diversos organismos deportivos, incluida la FIFA (Blatter, 2013), diversos entrenadores y la prensa en general, como «el actual mejor jugador del mundo».

Messi a los nueve años medía 1,27 metros y su historial clínico aseguraba que padecía una deficiencia importante en la síntesis de la hormona del crecimiento. Messi precisaba un tratamiento médico por valor de 2,000 dólares que el Club Atlético River Plate de Argentina se negó a financiar como pedía su padre para dejar el Newell's Old Boys. La carrera del futbolista quedaba en manos del club que invirtiera los 2.000 dólares que costaba el tratamiento con la hormona del crecimiento.

El 8 de enero del año 2001 se firmó un documento con el Futbol Club Barcelona por el que se garantizaban siete millones de pesetas al padre del jugador en concepto de un puesto de trabajo dentro del fútbol base, siendo esa cantidad una manera de encubrir una ficha para Messi, y se aseguraba, además, el pago del tratamiento hormonal a Messi.

Messi firmó recientemente con el Futbol Club Barcelona una cláusula de permanencia hasta el 2016 por valor de 250 millones de euros.

HORMONAS CON MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES

Actualmente, además de la somatostatina, insulina, glucagón y hormona del crecimiento, que son sintetizadas directamente por técnicas recombinantes, otras hormonas que también se obtienen por medios microbiológicos pero que además deben modificar su estructura primaria mediante cambios post-traduccionales. Estas hormonas después de su síntesis deben sufrir modificaciones que las bacterias no pueden realizar, como es la adición de cadenas glucídicas. Las levaduras, igual que las células superiores, pueden hacerlas en algunos casos, pero en otros casos solo pueden ser sintetizadas correctamente en cultivos celulares animales o humanos.

Entre las hormonas que requieren cambios post-traduccionales se encuentran la eritropoietina, el factor de crecimiento de las plaquetas y las gonadotropinas.

Eritropoietina (EPO)

Es una hormona cuya estructura primaria es la de una glicoproteína producida por los riñones. Esta proteína estimula la producción de los eritrocitos a partir de células madre. La hormona humana tiene un peso molecular de 36 kDa y de ellos el 60 % es carbohidrato y se obtenía originalmente del suero y orina humanos. Las bacterias producen la parte proteica exclusivamente por lo que la EPO pierde gran parte de su actividad biológica al ser eliminada rápidamente del plasma sanguíneo.

La EPO que se usa actualmente en clínica se obtiene por técnicas recombinantes, utilizando sobre todo células CHO (Chinese hamster ovary). Esta enzima recombinante presenta exactamente la misma secuencia primaria como una actividad biológica indistinguible de la hormona natural y su valor de mercado actual es superior los 2.000 millones de €.

Factor de crecimiento de las plaquetas (PDGF).

Este factor es un agente que promueve la división de distintos tipos celulares incluidos fibroblastos, células de la musculatura lisa y la formación de los vasos sanguíneos (angiogenesis). Es importante señalar que una angiogénesis descontrolada es una de las características del cáncer. El PDGF se produce por técnicas recombinantes en *S. cerevisiae*.

Gonadotrofinas

Las gonadotrofinas forman una familia de hormonas en las que las gónadas son su diana básica. Estas hormonas directa o indirectamente regulan la función reproductiva y en algunos casos el desarrollo de las características sexuales secundarias. La producción endógena insuficiente de algún miembro de la familia afecta negativamente la función reproductiva, situación que puede ser solucionada con la administración exógena de la hormona correspondiente. Muchas de estas hormonas son sintetizadas en la pituitaria aunque algunas se producen de los tejidos asociados y en los reproductivos.

Las dos principales gonadotropinas son la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH). Ambas hormonas constan de dos cadenas peptídicas (una cadena α y una cadena β) unidas por enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. La LH y la FSH comparten cadenas α casi idénticas, mientras que la cadena β proporciona la especificidad para las interacciones con los receptores.

La fracción glucídica de estas hormonas juega un papel directo y central en su biosíntesis, secreción, vida media en el suero y potencia. Además, unida a la

subunidad α juega un papel importante en el ensamblaje del dímero, en su estabilidad como así mismo en la secreción de la hormona. El azúcar asociado a la subunidad β , aunque también contribuye al ensamblaje de la hormona, parece jugar un papel más importante en el mecanismo de eliminación de la hormona circulante.

Aunque inicialmente se pensó que la pituitaria humana era el órgano idóneo como fuente de estas hormonas resultó, sin embargo, no ser adecuado desde el punto de vista médico debido a las pequeñas cantidades presentes. La orina de las mujeres post-menopáusicas contiene cantidades significativas tanto de FSH como LH por lo que sirvió inicialmente como la más importante fuente para su obtención.

Hoy estas hormonas son producidas por tecnología del ADN recombinante. Los genes o cADN que codifican gonadotropinas de varias especies han sido secuenciados y expresados en varios sistemas recombinantes particularmente líneas de células de mamíferos. rhFSH producida en células CHO se ha demostrado que es efectiva desde el punto de vista clínico.

Estas hormonas presentan una secuencia de aminoácidos idéntica a la molécula humana y aunque su componente glucídico difiere ligeramente cuando se administran a pacientes son bien toleradas y no aparecen efectos secundarios significativos. Las hormonas no producen una respuesta inmunológica importante y su vida media en el plasma es similar a la de las hormonas nativas. rhFSH ha demostrado ser eficiente para estimular el crecimiento folicular en mujeres que sufren hipogonadismo por falta de la hormona y es igualmente útil en el tratamiento de hombres que sufren problemas similares.

CITOCINAS: OTRAS PROTEÍNAS DE GRAN INTERÉS TERAPÉUTICO

Las citocinas es un grupo muy variado de proteínas reguladoras cuya clasificación actualmente aún no es definitiva. Las citocinas se sintetizan en cantidades minúsculas en el organismo, actuando como factores químicos de comunicación entre distintos tipos celulares y produciendo su efecto uniéndose a receptores específicos, fenómeno que se acompaña con cambios en los procesos de transducción de mensajes genéticos.

En el presente trabajo citare exclusivamente las citosinas más representativas y subrayaré que prácticamente todas ellas se obtienen por tecnología recombinante.

Los interferones (IFN) fueron las primeras citocinas que se descubrieron y entre sus actividades biológicas se encuentra:

1. Inducir resistencia al ataque por virus.

2. Regular el sistema inmunológico.
3. Regular aspectos del crecimiento y diferenciación de varios tipos de células.
4. No todos los IFN son responsables de todas las actividades

La producción de los primeros interferones se realizó en los años últimos de la década de los 70 del siglo pasado a partir de cultivos celulares y en la década de los 80 se obtuvieron ya por técnicas recombinantes. Actualmente las aplicaciones médicas de los interferones continúan creciendo.

Otra familia de citocinas son las interleucinas, glicoproteínas que actúan como factores reguladores. Como ocurrió con los interferones, también se obtuvieron inicialmente a partir de distintas líneas celulares pero su obtención en cantidades adecuadas para su estudio biológico se logró con la tecnología recombinante.

Otra citocina de interés es el factor de la necrosis tumoral que, entre otras actividades:

1. Regula el sistema inmunitario en respuesta a bacterias Gram negativas.
2. Regula la inflamación.
3. Presenta toxicidad selectiva frente a determinados tumores.
4. Participa en ciertas situaciones patológicas como son el shock séptico, caquexia y anorexia.

Actualmente este factor también se obtiene en *E. coli* con tecnología recombinante.

Por último, no debemos olvidar que algunos factores de crecimiento también pueden clasificarse como citocinas y que se obtienen en *E. coli* o *S. cerevisiae*.

VACUNAS

Las vacunas pueden ser consideradas, junto con los antibióticos, uno de los mayores éxitos de la medicina. Fue a finales del siglo XVIII cuando Edward Jenner (1801) descubrió que material infectado procedente de las pústulas de vacas era capaz de inmunizar frente a la viruela e introdujo la palabra “vacuna”.

El sistema inmune de los vertebrados se caracteriza por ser un mecanismo adaptativo que permite que cada individuo produzca proteínas con una reactividad específica y de células que pueden reconocer y destruir un número elevadísimo de sustancias extrañas. El conjunto de estos mecanismos, denominado

“respuesta inmune”, es esencial para la supervivencia del individuo y constituye el principal sistema de defensa frente a microorganismos patógenos y también frente a las células cancerosas.

La vacunación tiene por finalidad utilizar los mecanismos del sistema inmune natural frente a agentes extraños y para ello utiliza el antígeno o mezcla de antígenos para inducir la respuesta inmune. Las vacunas han erradicado la viruela y han permitido controlar enfermedades como la difteria, la poliomielitis, o el sarampión. No olvidemos, sin embargo, que el procedimiento no es perfecto, ya que la seguridad de una vacuna no puede garantizarse totalmente. Hoy se proyectan programas de vacunación no solo en países en desarrollo sino también en el primer mundo. Basta decir que más de 500.000 personas mueren anualmente en los EEUU por infecciones que podrían haberse evitado con la correspondiente vacunación. Entre estas infecciones se encuentra la neumonía producida por neumococos y la gripe.

Vacunas preparadas por técnicas tradicionales

Muchas vacunas han sido preparadas tradicionalmente utilizando proteínas tóxicas (por ejemplo: toxina diftérica) y neutralizando su toxicidad por distintos procedimientos. El producto obtenido recibe el nombre de “toxoides” y provoca en el organismo la respuesta inmune con la formación de anticuerpos humorales y la respuesta mediada por células.

La preparación tradicional de vacunas se refiere a los procedimientos desarrollados anteriormente a la llegada de la tecnología del ADN recombinante y lo que es importante señalar es que un número significativo de estas vacunas aún tiene uso médico.

Las tecnologías utilizadas se resumen en seis métodos según el antígeno utilizado:

1. Bacterias vivas atenuadas como es el caso del *Mycobacterium tuberculosis*.
2. Bacterias muertas o inactivadas como en el caso del *Vibrio cholera*.
3. Virus vivos atenuados como en el caso de la fiebre amarilla.
4. Virus inactivados como en la hepatitis A.
5. Toxoides como la vacuna contra el tétanos.
6. Antígenos derivados del patógeno como en el caso de las vacunas contra el pneumococo y *Haemophilus influenzae*.

Tabla 1. Algunas vacunas preparadas por técnicas tradicionales

Carbunco	Antígeno de <i>Bacillus anthracis</i> de filtrados del cultivo
Vacuna BCG	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> atenuado
Brucelosis	Extracto antigénico de <i>Brucella abortus</i>
Colera	Células muertas de <i>Vibrio cholera</i>
Difteria	Toxoide obtenido con formaldehido de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
<i>Haemophilus influenza</i>	Polisacárido capsular de <i>H. influenza</i> tipo b
Meningitis meningocócica	Antígeno polisacárido de la superficie de uno o más cepas de <i>Neisseria meningitidis</i>
Peste	<i>Yersinia pestis</i> muerto con formaldehido
Neumonía neumocócica	Antígenos polisacáridicos de la superficie de diferentes serotipos de <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Tetanos	Toxoide obtenido con formaldehido de <i>Clostridium tetani</i>
Tifus	<i>Salmonella typhi</i> muerto
Tosferina	<i>Bordetella pertussis</i> muerto
Hepatitis A	Virus de la hepatitis A inactivado con formaldehido
Hepatitis B	Suspensión de antígeno de superficie obtenido de plasma de enfermos de hepatitis B
Poliomielitis (Sabin, oral)	Virus de la poliomielitis atenuado
Poliomielitis (Salk, parenteral)	Virus de la poliomielitis inactivado

En el caso de las vacunas antivíricas es importante comentar las ventajas, los inconvenientes y las consecuencias de su utilización. La inmunización contra las infecciones víricas se obtiene por inyección de virus que estimula la producción de anticuerpos capaces de neutralizar al agente patógeno; el virus inyectado no causa infección puesto que se ha atenuado o inactivado previamente. Los virus atenuados

no dejan de comportarse en ciertas ocasiones como organismos vivos, capaces de cambiar genéticamente, lo que puede acentuar su virulencia. Incluso en ausencia de mutaciones, el virus podría tener efectos desconocidos a largo plazo, comparable con los de los virus «latentes». Esta posibilidad desaparece al inactivar el virus, aunque en estos casos se han llegado a producir infecciones debido a la administración de virus insuficientemente inactivados.

Tanto los virus atenuados como los inactivados han de ser cultivados a fin de obtener las vacunas, por lo que están expuestos a que un accidente provoque la diseminación de agentes patógenos. Además, puesto que los virus solo se replican en sistemas vivos, han de mantenerse en cultivos celulares que pueden contener sustancias nocivas que pasen inadvertidas, especialmente otros virus.

Vacunas de ADN recombinante

Con el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante ha sido posible la obtención de proteínas de la superficie de prácticamente cualquier patógeno y en cantidades adecuadas. Los genes son clonados y cuando los polipéptidos respectivos se purifican del organismo productor, frecuentemente *E. coli* o *S. cerevisiae*, pueden usarse como vacunas en forma de subunidad. En esta técnica, en lugar de presentar un organismo entero al sistema inmune, un fragmento del patógeno se utiliza para desencadenar respuesta inmune específica. Los ejemplos incluyen la vacuna de subunidades contra el virus de la hepatitis B, que contiene exclusivamente las proteínas de la superficie del virus.

Las vacunas obtenidas mediante esta tecnología presentan ventajas importantes sobre los métodos tradicionales. Entre éstas podemos citar las siguientes:

1. La producción de los antígenos no presenta problemas de patogenicidad ya que el péptido utilizado ha sido expresado mediante tecnología recombinante en un organismo no patógeno. Este procedimiento evita, además, la posibilidad de que el antígeno pueda contener un agente patógeno no detectado.
2. La producción de la subunidad a utilizar en la vacuna se encuentra en cantidades no limitantes. Previamente la producción de algunos antígenos por la tecnología tradicional se encontraba limitada por la dificultad para obtener el material de partida.
3. Con una vacuna constituida básicamente por un péptido definido y con una secuencia de amino ácidos absolutamente constante se evitan efectos secundarios no deseados.

En 1986 la Food and Drug Administration (FDA) aprobó la primera vacuna recombinante que estaba constituida por un antígeno de superficie de la hepatitis B. Actualmente un número significativo de vacunas recombinantes se encuentran

en uso clínico diario al haber sido aprobadas por las autoridades sanitarias y entre ellas se encuentran la que provoca protección contra la hepatitis B, comercializada por Merck; contra la hepatitis B, difteria, tétano y pertusis, por SmithKline Beecham; inmunización contra hepatitis A y B, por Glaxo SmithKline; inmunización frente *Haemophilus influenzae* tipo B y hepatitis B, por Pasteur Merieux MDS, etc, etc,..)

Las vacunas más importantes desde el punto de vista sanitario y económico son, probablemente, la vacuna contra la gripe y contra la poliomielitis.

Gripe

La gripe está causada por un virus que muta, produciéndose cambios en su estructura antigénica y para su prevención se podría crear un banco de genes que permitiera la obtención de las vacunas necesarias en cada momento. Por otro lado, el material genético que codifica varios antígenos gripales podría introducirse en un microorganismo como *E. coli*, del cual por fermentación se podría obtener una vacuna contra varios antígenos.

Poliomielitis

La poliomielitis es una enfermedad que en el pasado tullía a 350.000 niños al año en 125 países y que actualmente es solo endémica en Nigeria, Pakistán y Afganistán, afectando el año pasado solamente a 223 niños. Los científicos suponen que si la poliomielitis no se erradica definitivamente puede ocurrir, como con otras enfermedades, que se extienda de nuevo y pueda volver a infectar a cientos de miles de niños. Precisamente por eso, Bill Gates creó la iniciativa llamada “Plan Global para la Erradicación de la Polio” y ha conseguido la participación de gobiernos y magnates como la del alcalde de Nueva York, Michael Bloomberg y la de Carlos Slim, el hombre más rico del mundo (Agencia EFE, 2013). La Fundación Gates prevé contar con un presupuesto de unos 5.500 millones de dólares para lograr su objetivo en seis años. Sin embargo, hay que considerar que el principal problema ahora para la erradicación total de la polio no es tanto la falta de recursos o dinero, sino evitar problemas más serios como la alarma social creada por determinados sectores al decir que la vacunación representa exclusivamente un mecanismo de control por parte de los países ricos sobre esas sociedades. En relación a esto debemos recordar que en el año pasado, 2012, veinte trabajadores sanitarios fueron asesinados por participar en campañas de inmunización en Pakistán.

Vacunas con modificaciones pottransduccionales

En ocasiones los antígenos no pueden ser producidos por las bacterias ya que éstas, como en el caso de las hormonas, no introducen cambios post-transduc-

cionales, y en esta situación, se recurre a células de *S. cerevisiae* o de mamíferos. En el primer caso se encuentra el antígeno que se utiliza en la vacunación contra la hepatitis B y para ello se clonó el gen de una proteína de su cubierta y se expresa en un vector multicopia en *S. cerevisiae*. La levadura no solo es capaz de expresar el gen sino producir unas partículas que son similares a las que se encuentran en la sangre de los pacientes.

La inmunidad conferida por las vacunas vivas es invariablemente superior a la que confiere el material carente de vida. La ingeniería de los microorganismos podría convertirse en fuente de producción de antígenos de gran potencia, ofreciendo a largo plazo una mayor inmunidad.

Expresión de antígenos inmunizantes de microorganismos patógenos en microorganismos no patógenos

En este tipo de vacunas el gen que codifica un antígeno de superficie del patógeno se incorpora al patrimonio genético propio del agente no patógeno. Cuando éste se multiplica expresa el antígeno en su superficie y puede inmunizar contra el agente patógeno sin riesgo alguno. En general, los vectores utilizados son capaces de producir una respuesta tanto celular como humoral significativamente fuerte.

Un experimento de este tipo se realizó con un virus vaccinia (vacunal) al que se le había insertado el gen del antígeno de la superficie del virus de la rabia. En este caso el proceso estaba orientado a inmunizar a zorros y otros animales que sirven de reservorio del virus de la rabia. Para ello se modificó un virus vaccinia mediante la inserción del gen que codifica una proteína de superficie y se le añadió a pedazos de carne que fueron utilizados como fuente de alimentación. Este experimento fue el primero que se realizó en Europa a fin de controlar la extensión de la rabia.

Expresión de antígenos inmunizantes de microorganismos patógenos en plantas

Además de su utilización tradicional como productoras de medicinas naturales, hoy es posible modificar genéticamente las plantas a fin de que produzcan productos farmacéuticos. Así, plantas transgénicas que expresen antígenos procedentes de microorganismos patógenos ofrecen muchas ventajas como sistema de producción de bajo coste. Esta tecnología puede contribuir al desarrollo de programas globales de vacunación y pueden tener un impacto dramático en la salud de los países en vía de desarrollo. Entre las ventajas de utilizar plantas se destacan las siguientes:

1. El coste de cultivar plantas es bajo.
1. Los mecanismos de recogida de las plantas no tienen problemas técnicos.
1. En principio no existe límite al número de plantas o superficie a emplear.

Estudios realizados en animales demuestran que con la ingestión de plantas transgénicas que expresan vacunas de subunidades se induce la expresión de anticuerpos específicos no solo en mucosas sino también en el suero sanguíneo.

Actualmente diversos grupos de investigación intentan obtener vacunas a partir de plantas que expresan el antígeno correspondiente. El objetivo ideal es que en un futuro puedan ser administradas por vía oral. Se tratará de vacunas cosechables y comestibles con muchas ventajas: serán baratas y fáciles de producir masivamente, no necesitarán condiciones de conservación especiales y, si son para animales, se podrán administrar junto con el pienso, simplificando las campañas de vacunación.

Otra aplicación de las plantas de gran calado en farmacia es su utilización en la introducción de modificaciones post-traduccionales en algunas drogas que necesitan cambios en su estructura primaria para tener una actividad mejor como fármacos. Estas modificaciones son responsables de cambios en su función, localización, estabilidad e interacciones dinámicas con otras moléculas. Las plantas están ganando una aceptación creciente como un sistema de expresión de proteínas recombinantes, y sobre todo cuando requieren cambios post-traduccionales debido a su condición de organismos eucarióticos. La glicosilación es, sin duda alguna, el mecanismo más ampliamente utilizado; sin embargo, otros cambios en las proteínas recombinantes, como hidroxilación y lipidación, son importantes en la obtención de proteínas recombinantes de alta calidad, ya sea su uso como reactivo científico o como un producto farmacéutico. Los cambios introducidos ofrecen una amplia gama de opciones para el diseño racional de productos humanizado (bioequivalente), mejorado (biomejorados) o novedosos (Webster and Thomas, 2012).

Vacunas sintéticas

Una perspectiva adicional para la obtención de vacunas es la utilización del análisis computarizado para la determinación de la secuencia de aminoácidos que forman el polipéptido más pequeño con capacidad antigénica de una partícula vírica. Mediante este método ha sido posible sintetizar químicamente péptidos y obtener anticuerpos. Esta técnica ha sido aplicada con resultados iniciales en el caso de la hepatitis B y con ella, se obtienen vacunas multivalentes que pueden reemplazar a las clásicas vacunas bacterianas y víricas. Mientras que las proteínas tienen que ser producidas en un entorno celular, los péptidos pueden ser sintetizados

químicamente pero son a menudo débilmente inmunogénicos. Por esta razón, una mezcla de péptidos se puede utilizar junto con virus inactivados como es una de las vacunas comercializada por SmithKline Beecham contra la hepatitis B, aunque también se usan más a menudo proteínas recombinantes enteras a fin de incrementar la respuesta inmune.

Las vacunas sintéticas pueden aplicarse también en otras enfermedades infecciosas como es el caso de la tuberculosis.

Vacunas de ADN

El primer trabajo sobre la utilización de genes, moléculas de ADN desnudo, orientado a obtener una respuesta inmune frente a la proteína codificada lo publicaron Tang y colaboradores en la revista Nature en 1992. Los autores introdujeron el ADN directamente en células de la piel de ratones utilizando microproyectiles de oro recubierto con el ADN adecuado y encontraron que los ratones producían anticuerpos contra el antígeno codificado. Este resultado generó una gran excitación en el mundo científico y ese mismo año en una reunión sobre vacunas celebrada en Cold Spring Harbor Laboratory se presentaron tres trabajos sobre los resultados obtenidos con el uso de vectores de ADN capaces de producir las respuestas tanto humoral como celular frente a agentes patógenos y antígenos tumorales. Ulmer y col. (1993), de los laboratorios Merck y Fynan y col. (1993) de la University of Massachusetts Medical School, insertaron en un plásmido bacteriano el gen que codifica la nucleoproteína del virus A de la gripe junto con elementos reguladores de la transcripción y traducción en eucariotas. Al inyectar el plásmido por vía intramuscular en ratones, se desencadenó una fuerte reacción inmunitaria contra la nucleoproteína. De ello, los autores deducían que el ADN había penetrado en las células y se había expresado. Basta pues una simple administración de ADN que codifica un antígeno para reproducir los efectos protectores obtenidos mediante vacunación con virus muertos o atenuados.

La inmunización con ADN podría representar una forma más potente y eficaz de desencadenar respuestas inmunitarias. Las células absorben el ADN plasmídico y expresan el gen que codifica el antígeno que interese. En este punto el antígeno puede seguir dos rutas diferentes:

1. Puede ser secretado y, por tanto, inducir la formación de anticuerpos a la manera de las subunidades proteicas.
2. Puede ser procesado intracelularmente y los fragmentos antigénicos presentados en la superficie de la célula en el contexto de los compuestos del complejo principal de histocompatibilidad de clase I, estimulando así la respuesta de linfocitos T citotóxicos.

Actualmente, he de señalar que no se acaba de entender completamente el porqué de la respuesta inmunitaria tras la inyección del ADN y el proceso se encuentra bajo una intensa investigación. Diversos autores han conseguido reforzar la respuesta inmune variando las condiciones experimentales. Cuatro vacunas para uso veterinario utilizando ADN ya han sido aprobadas en los EEUU, lo que sugiere que en un futuro próximo y previa optimización de la técnica pueda abrirse su uso en humanos.

Desde el punto de vista industrial, la vacunación con ADN simplificaría los procesos de producción de las vacunas. No habría que preparar y purificar el antígeno, tareas caras y duras. Los laboratorios farmacéuticos podrían dedicarse al diseño y purificación de plásmidos. Este tipo de vacunas podría entenderse como una forma más potente y eficaz de activar el sistema inmunitario y de combatir enfermedades infecciosas contra las cuales han fracasado otros tipos de vacunas.

Después de un periodo de relativa baja actividad en este campo, se detecta, actualmente, un aumento del interés por las posibilidades de desarrollar vacunas de ADN incluyendo vacunas contra determinados tipos de cáncer y ello debido a una optimización del ADN utilizado como inmunógeno y con nuevas formulaciones de los adyuvantes. Kulkarni y col (2013) han utilizado como inmunógeno en el caso de una vacuna contra el SIDA el gen HIV-1 p24(gag) con ADN de zonas conservadas del gen y han encontrado un aumento muy significativo en los niveles de la respuesta tanto celular como humoral.

Como resumen podemos concluir que por las distintas técnicas de obtención de vacunas, un número importante de enfermedades infecciosas se encuentran controladas, pero los niveles de eficiencia en ocasiones varían en relación a la población y a la región específica de nuestro planeta.

Infecciones importantes para las que carecemos de vacunas

Según diversos autores, de todas las vacunas incluidas en la Tabla 2 se necesitan con mayor urgencia, sobre todo en los países en vías de desarrollo, la de la malaria, la tuberculosis y la del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Sin embargo los patógenos responsables evitan la detección inmunológica y/o exhiben una variabilidad genética muy grande.

Tabla 2. Vacunas necesarias y que carecemos actualmente (Walsh, 2004)

<i>Campylobacter</i>
<i>Chlamydia</i>
Citomegalovirus
Dengue
Epstein-Barr (mononucleosis)
<i>Helicobacter pylori</i> : úlceras gastrointestinales
Hepatitis C
Herpes Simplex
SIDA
Gripe (vacuna universal que reemplace la vacuna anual)
Virus sinticial respiratorio
Streptococo grupo A y B
Shigella
Tuberculosis
Malaria

Malaria

La malaria sigue siendo en la actualidad la enfermedad infecciosa más devastadora; aproximadamente el 40% de la población del mundo se encuentra en riesgo y la OMS, estimaba en el año 2010 que los casos de malaria documentados eran de 219 millones y que ese año murieron entre seiscientos mil y un millón doscientos mil los afectados, siendo la mayoría niños de zonas endémicas de Africa (Nayyar *et al.*, 2012).

A pesar de los datos anotados, éstos no son reales debido a que no tenemos información real de la situación en áreas rurales y, a que en muchos casos esas muertes no son documentadas. La enfermedad se desarrolla fundamentalmente

en zonas deprimidas y constituye una barrera importante en el desarrollo económico de las comunidades que habitan en dichas zonas.

La malaria es producida por la transmisión de varias especies del género *Plasmodium* fundamentalmente *P. falciparum* and *P. vivax*, y cuyo vector es un mosquito femenino de la especie *Anopheles* que con su picadura introduce al protista en la sangre a través de la saliva. El protista en la sangre viaja hasta el hígado en donde madura y se reproduce. Después el parásito se libera de los hepatocitos e invade los glóbulos rojos y se inicia el desarrollo de la etapa de la infección en la sangre, lo que produce los síntomas clínicos, tales como fiebre, la anemia, e incluso la malaria cerebral. Esta enfermedad ha jugado un papel importante en el desarrollo de la cultura, incluyendo, en la evolución del hombre. Así, los individuos heterocigóticos para la hemoglobina S presentan unos eritrocitos cuya membrana citoplasmática es anormal, produciéndose la salida del ion potasio y no permitiendo el desarrollo del *P. falciparum* de modo que son resistentes a la malaria.

Desde hace años existe un gran interés por parte de la OMS en desarrollar una vacuna efectiva. La primera vacuna sintética y la primera contra un parásito fue la SPf66 desarrollada por el científico colombiano Manuel Elkin Patarroyo en 1987. La vacuna fue probada en una colonia de monos *Aotus trivirgatus* de la región amazónica. La composición de esta vacuna presentaba una combinación de antígenos de los esporozoitos (utilizando la repetición CS) y merozoitos del parásito. Esta vacuna, sin embargo, resultó no ser suficientemente eficiente. La siguiente vacuna desarrollada fue la CSP que inicialmente parecía suficientemente prometedora como para someterse a los ensayos. También se basaba en la proteína circumsporozoito, pero además tenía la proteína recombinante (Asn-Ala-Pro15Asn-Val-Asp-Pro)₂-Leu-Arg(R32LR) unida covalentemente a una toxina purificada *Pseudomonas eruginosa* (A9). Sin embargo, se demostró en una fase temprana la falta total de inmunidad protectora. En un artículo publicado en la revista *The Lancet* en 1997 por un grupo de científicos americanos se concluía que «la vacuna no es eficaz y debe suprimirse».

Posteriormente se han desarrollado otras vacunas pero sus eficiencias siempre han sido limitadas como la ensayada por el español Pedro Alonso en el Instituto de Salud Global de Barcelona, denominada RTSS, y que ha contado con la ayuda de la Fundación Bill y Mellinda Gates.

La dificultad para obtener vacunas contra enfermedades producidas por parásitos en general es que su ciclo biológico es complejo y se desarrollan en al menos dos hospedadores diferentes. La secuenciación del genoma de *P. falciparum* aún no ha facilitado la identificación de dianas que sean realmente efectivas para el desarrollo de nuevas vacunas.

Entre las nuevas alternativas para la obtención de una vacuna, hoy se orienta al control del vector mediante manipulación genética del *Anopheles*. Los

avances en las tecnologías genéticas hacen posible la introducción de ADN exógeno en el genoma del mosquito de tal manera que reduzca su expectativa de vida o que le conviertan en resistentes a las especies del *Plasmodium*. Otra posibilidad es manipular y liberar grandes poblaciones de mosquitos masculinos estériles, a fin de que éstos reduzcan en el medio ambiente la población de mosquitos hembras generación tras generación y la repetición del proceso pueda eventualmente eliminar la población diana (Raghavendra *et al.*, 2011).

Otro mecanismo de control de la malaria se deduce del trabajo desarrollado por el grupo de investigación de Zhiyong Xi de la Universidad de Michigan. El control del plasmodio lo realiza la bacteria simbiótica *Wolbachia* cepa wAlbB presente en el *Anopheles* y que se transmite por vía materna. La bacteria es capaz de inducir altos niveles de incompatibilidad citoplásmica con el plasmodio y los resultados descritos confirman el establecimiento de una infección estable de la bacteria *Wolbachia* durante varias generaciones en *Anopheles stephensi*. Éste es un vector importante de la malaria responsable de la mayor parte de los casos de la enfermedad en el sureste asiático. Además, esta cepa de *Wolbachia* confiere al mosquito resistencia al parásito del paludismo humano *Plasmodium falciparum* (Bian *et al.*, 2013).

Sin embargo es extraordinario el resultado publicado el pasado mes de agosto por Hoffman y colaboradores en la revista Science. Éstos han descrito una nueva vacuna denominada PfSPZ [*Plasmodium falciparum* (Pf) y esporozoitos (SPZ)] y que los primeros ensayos sugieren que es absolutamente eficaz. Ésta utiliza los esporozoitos que normalmente infectan las glándulas salivares del mosquito y que excitan, una vez en el torrente circulatorio y gracias a su capacidad de reproducirse en el cuerpo humano, a su sistema inmune sin causarle la enfermedad (Seder, *et al.*, 2013; Kastenmüller, *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos demuestran que los niveles de anticuerpos solubles como así mismo de células T en sangre son dependientes de la dosis y que para obtener una protección adecuada se requiere la administración de cinco dosis intravenosas obteniéndose en este caso una protección total. Según la opinión de los propios científicos que han desarrollado la nueva vacuna aún falta mucho por hacer, aunque consideran que lo obtenido representa ya un avance muy significativo.

El investigador Pedro Alonso no ha escatimado elogios al trabajo de Hoffman y su equipo pero piensa en dos inconvenientes significativos en la utilización práctica de esta vacuna en su forma actual: 1º) La vacuna para dar los mejores resultados requiere cinco inyecciones intravenosas, y 2º) que los esporozoitos deben mantenerse en nitrógeno líquido. Pedro Alonso sugiere, reconociendo el gran éxito obtenido, que ahora los investigadores deben reducir la dosis y buscar vías de administración alternativas.

A pesar de la necesidad urgente de una vacuna contra la malaria, debo añadir, que algunas ONG como la Drugs for Neglected Diseases initiative (Iniciativa para la obtención de Medicamentos para Enfermedades Olvidadas) decidieron orientar su trabajo en enfermedades alternativas después de la Fundación Bill y Melinda Gates y el Fondo Mundial decidieran financiar directamente proyectos específicos contra la malaria.

Tuberculosis

El control de la tuberculosis es también una prioridad para la medicina de hoy. Ésta afecta a 30 millones de individuos y mueren unos 3 millones anualmente lo que la convierte en una enfermedad de alto riesgo responsable de un número de defunciones excesivamente elevado. La OMS estima que solo en Europa existían en 2011 medio millón de personas afectadas y se supone que su número está actualmente en aumento. La tuberculosis provoca en Europa la muerte de unas 40.000 personas anualmente y el problema se agrava con la aparición de nuevas cepas resistentes. La tuberculosis supone una carga económica significativa para las arcas de la UE ya que se calcula anualmente un gasto superior los 6.000 millones de €.

Actualmente en España se registran unos 10.000 casos al año de tuberculosis en parte motivado por la llegada de emigrantes procedentes de países con tasas altas de la enfermedad y por sus condiciones de vida, (hacinamiento, mala alimentación, pobreza, falta de higiene) que provocan un aumento significativo de pacientes.

En Francia se ha detectado también un aumento importante de casos de tuberculosis, fenómeno agravado por haberse encontrado cepas resistentes alternativas procedentes de Rusia y otros países de Europa oriental.

Diversos factores impiden el desarrollo de nuevas vacunas contra la tuberculosis y entre los que podemos citar se encuentran la falta de modelos animales adecuados, de marcadores que demuestren la eficacia de la vacuna y, el requerimiento de pruebas costosas y lentas en los grupos sociales implicados. Diversos autores creen que se obtendrán vacunas realmente eficaces en los próximos años y ello debido a los avances espectaculares de las tecnologías biológicas, la aparición en nuevos modelos animales y del proceso patológico de la enfermedad como así mismo debido a una coordinación mayor entre los científicos del área (Meyer y McShane, 2013; Ruzo et al., 2012; Rowland *et al.*, 2013).

Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)

Otra vacuna necesaria es contra el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) producido por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) que fue

identificado en 1983. Las dificultades más importantes para la obtención de una vacuna eficiente en este campo son las siguientes:

1. El virus presenta una gran variación genética.
2. El virus destruye los linfocitos T helper.
3. Aunque se produce una cierta respuesta inmune, ésta no es suficiente para destruir el virus.
4. Muchas células infectadas no expresan el virus, por lo que el sistema inmune no las detecta.
5. Las células conteniendo el DNA proviral lo transmiten directamente.

Vacunas contra el cáncer

No quisiera terminar este apartado sin comentar los esfuerzos que se dedican a obtener vacunas contra el cáncer, esfuerzos que están orientados a reforzar la capacidad natural del organismo para defenderse de las células cancerosas mediante el sistema inmunitario. La identificación de antígenos de superficie de algunos tipos de cáncer abre la posibilidad de desarrollar anticuerpos específicos capaces de destruir las células tumorales. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha identificado varios microorganismos como carcinogénicos; los principales se encuentran reseñados en la Tabla 3 siguiente (International Agency for Research on Cancer, 2011).

Teóricamente, la administración previa de los antígenos de la superficie de las células tumorales o de los microorganismos carcinogénicos puede inmunizar al individuo frente a un cáncer específico. Estudios previos han demostrado que frecuentemente es necesario el uso de adyuvantes fuertes ya que los antígenos originales presentan poca capacidad de inducir la respuesta inmune.

Actualmente disponemos de dos tipos de vacunas contra el cáncer:

1. Vacunas preventivas o profilácticas, cuya finalidad es impedir que se inicie un cáncer en personas sanas.
2. Vacunas terapéuticas, cuya finalidad es la de tratar de eliminar las células cancerosas reforzando las defensas naturales del organismo.

Este segundo tipo de vacuna tiene como finalidad que se detenga el crecimiento de cáncer o que eliminen aquellas células que no fueron destruidas con tratamientos alternativos.

Las vacunas profilácticas se orientan a provocar la respuesta inmune contra los microorganismos responsables o que ayudan a que se produzca el tumor correspondiente. Estas vacunas son semejantes a las vacunas tradicionales. Los investigadores están desarrollando vacunas sintéticas de los antígenos en el laborato-

rio para usarlas en vacunas profilácticas. Estas vacunas sintéticas tienen por finalidad estimular la respuesta inmune y para ello la estructura química de los antígenos es modificada previamente.

Tabla 3. Microorganismos y tipos de cáncer con los que están más estrechamente relacionados.

Gérmenes infecciosos	Tipo de organismo	Cáncer relacionado
Virus de hepatitis B (VHB)	Virus	Carcinoma hepatocelular
Virus de hepatitis C (VHC)	Virus	Carcinoma hepatocelular
Tipos 16 y 18 de los virus del papiloma humano (VPH), así como otros tipos de VPH	Virus	Cáncer de cuello uterino (cérvix); cáncer vaginal; cáncer vulvar; cáncer orofaríngeo (cánceres de la base de la lengua, de amígdalas o de garganta superior); cáncer de ano; cáncer de pene; carcinoma de células escamosas de la piel
Virus de Epstein-Barr (VEB)	Virus	Linfoma de Burkitt; linfoma no Hodgkin; linfoma de Hodgkin
Virus del herpes asociado con el sarcoma de Kaposi (VHSK), también conocido como virus del herpes humano 8 (VHH8)	Virus	Sarcoma de Kaposi
Virus linfotrópico humano de células T tipo 1 (VLHT-1)	Virus	Leucemia o linfoma de células T en adultos
<i>Helicobacter pylori</i>	Bacteria	Cáncer de estómago; linfoma gástrico de tejido linfoide asociado con la mucosa (MALT)
Esquistosomas (<i>Schistosoma hematobium</i>)	Parásito	Cáncer de vejiga
Trematodo hepático (<i>Opisthorchis viverrini</i>)	Parásito	Colangiocarcinoma

El Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud de los EEUU con fecha del 15 de Noviembre de 2011 confirmaba que la FDA ha aprobado dos tipos de vacunas profilácticas (contra el virus de la hepatitis B y contra los virus del papiloma humano tipos 16 y 18, los cuales son responsables de 70% de los casos de cáncer de cuello uterino o cérvix) y dos terapéuticas [una que protege contra la infección por el virus de hepatitis B (VHB) y otra utilizada en el tratamiento de cáncer de próstata metastático].

En el grupo de las vacunas profilácticas se encuentran *Gardasil*[®] y *Cervarix*[®], que protegen contra la infección por dos tipos de virus del papiloma humano (VPH) —los tipos 16 y 18— y que causan aproximadamente 70% de todos los casos de cáncer de cuello uterino (cervical o de cérvix) a nivel mundial. Los tipos 16 y 18 de VPH causan también algunos cánceres de vagina, vulva, ano, pene y orofaringe (Parkin *et al.*, 2002). Gardasil es producida por Merck, y se compone de cuatro tipos diferentes de antígenos proteicos en forma de “partículas similares a virus” (*virus-like particles, VLP*), que corresponden a los tipos de VPH 6, 11, 16 y 18, afirmándose por ello que es una vacuna “cuadrivalente” (Lowy DR and Schiller JT, 2006). La segunda vacuna, Cervarix, ha sido producida por GlaxoSmith-Kline y es bivalente.

Hoy se sabe que estas vacunas también confieren protección contra otros virus próximos (HR-VPH), aunque las vacunas difieren en el grado de protección cruzada. El mecanismo mediante el cual se produce esta protección cruzada es actualmente desconocido (Draper *et al.*, 2013).

Otra vacuna profiláctica protege contra la infección por el virus de hepatitis B (VHB) responsable de un tipo de cáncer de hígado y fue aprobada en 1981, siendo la primera vacuna preventiva vírica comercializada con éxito. En la actualidad, la mayoría de los niños en los Estados Unidos son vacunados contra el virus de la hepatitis B a los pocos días de su nacimiento (U.S. Centers for Disease Control and Prevention, 2005). La segunda vacuna (Provenge, producida por Dendreon) es para el tratamiento de cáncer en algunos hombres con cáncer de próstata metastático. Esta vacuna está orientada a estimular la respuesta inmunitaria a la fosfatasa ácida prostática del propio paciente utilizando antígenos extraídos directamente del mismo, si bien los resultados han sido relativamente limitados (Parmiani *et al.*, 2007).

Actualmente, y en distintos países se encuentran investigadores desarrollando vacunas contra varios tipos de cáncer y algunas de ellas se encuentran ya en estudios clínicos finales.

Desarrollos actuales en la producción de vacunas

Como es sabido, las vacunas eficaces son aquellas capaces de inducir adecuadamente las respuestas humoral y celular, responsables de la protección frente a la infección y por tanto, frente a la enfermedad. Hoy se modifican las técnicas clásicas introduciendo variables que conducen a una verdadera revolución en el descubrimiento de vacunas capaces de encontrar soluciones a la variabilidad y a la capacidad de evadirse de la respuesta inmune de determinados microorganismos (D'Argenio DA and Wilson CB. 2010). Estas modificaciones se basan en la información adicional obtenida por los científicos en tres líneas de investigación concretas: descubrimiento de nuevos antígenos, utilización de nuevos adyuvantes (Cooper et al., 2008) y rutas de suministro de la vacuna y en el desciframiento de nuevos mecanismos de la respuesta inmune (Koff, 2013).

Con referencia al primer aspecto, el descubrimiento de nuevos antígenos, los investigadores utilizan la denominada "vacunación reversa".

Vacunación reversa

Dado que hoy conocemos la secuencia completa del genoma de múltiples microorganismos patógenos, esta información ayuda a los investigadores a encontrar dianas que permiten la obtención de vacunas de las que carecemos actualmente. Para ello se identifican, a través de la secuencia de ADN, los genes que codifican proteínas con capacidad antigénica potencial. Una vez identificados, estos genes se clonan en un microorganismo no patógeno que expresa las proteínas antigénicas. Éstas son secretadas o se incorporan a la superficie del microorganismo productor y se inyectan a ratones de los que se obtendrán los antiseros correspondientes. Finalmente, se determinará su capacidad neutralizadora o de producir la lisis del microorganismo patógeno original. Esta técnica se denomina "vacunación reversa", denominación que fue propuesta por Rappuoli y colaboradores (Rappuoli, 2000; Sette y Rappuoli, 2010).

En relación con la identificación de nuevos antígenos, hoy contamos con algoritmos que nos permiten identificar epítomos específicos, como se ha demostrado en el caso del virus vaccinia, y que nos permiten conocer los componentes capaces de inducir protección en el caso de la vacuna contra la viruela. Antígenos que son reconocidos por CD4+ difieren de aquellos reconocidos por CD8+ y esta información se está utilizando en vacunación reversa a fin de obtener vacunas que no son específicas de antígeno sino de epítomo (Moutaftsi *et al.*, 2006, 2007).

Conociendo la secuencia del genoma, y mediante técnicas bioinformáticas, Piza y col. (2000) seleccionaron un pequeño grupo de proteínas de un total de unos 600 antígenos potenciales de la superficie de *Neisseria meningitidis* B, agente

productor del 50 % de las meningitis meningocócicas, y el resultado fue la obtención de una vacuna multivalente con resultados muy satisfactorios. Un resultado similar ha sido descrito también en el caso de una cepa de *Streptococcus pneumoniae* hemolítico (Tettelin, *et al.*, 2006) y de otra de *E. coli* patógena intestinal (Moriel, *et al.*, 2010).

Es importante razonar que mediante la vacunación reversa se identifican antígenos que las bacterias patógenas no expresan normalmente en las condiciones de cultivo *in vitro* y que pueden ser definitivos en la obtención de nuevas vacunas realmente protectoras (Asgarian-Omran *et al.*, 2013).

Para terminar este apartado sobre vacunas cabría añadir que las técnicas de secuenciación del genoma de los microorganismos y de los virus son cada vez más eficientes, rápidas y económicas, y se cree que la información obtenida facilitara el conocimiento de sus características biológicas de un modo mejor que por el cultivo *in vitro* tradicional. Se supone que en los próximos 3 a 5 años la secuenciación del ADN y el ARN en una muestra clínica será, en los hospitales, una cuestión de rutina. Actualmente ya los análisis genómicos y metagenómicos están facilitando conocer a nivel molecular la diversidad microbiana que se encuentra en distintos nichos ecológicos y fundamentalmente en el hombre. Este conocimiento va a facilitar la identificación de determinantes moleculares de virulencia y el comportamiento de las cepas patógenas en tiempo real. También va a proporcionar una visión más directa de cómo los agentes patógenos se propagan y causan la enfermedad ayudando a identificar dianas de interés terapéutico y por tanto la obtención de nuevos antígenos fundamentales para la preparación de vacunas más eficientes.

Entre los aspectos a tener en cuenta en el estudio del microbioma humano como base para una medicina más personalizada destaca precisamente el relacionado con el desarrollo de nuevas vacunas, ya que aquel puede verse como un factor limitante en la utilización de determinados modelos animales (Virgin *et al.*, 2009).

Movimiento ciudadano contra las vacunaciones

No quisiera terminar este apartado sin comentar la existencia de un movimiento ciudadano en contra de las vacunaciones. Algunas personas presuponen que es preferible pasar la enfermedad a fin de inmunizarse. Las tesis contrarias a la vacunación infantil se extendieron inicialmente apoyadas por el artículo del médico británico Andrew Wakefield 1998 en *The Lancet*, en el que se vinculaba la vacuna vírica triple (contra el sarampión, las paperas y la rubeola) con el autismo. Fruto de este estudio, las tasas de vacunación en Gran Bretaña descendieron a la vez que se incrementaron los casos de sarampión. Dos años después, *The Lancet* retiró el artículo de Wakefield al demostrarse que las conclusiones pu-

blicadas eran erróneas. Sin embargo todavía hoy se detectan brotes de paperas en los colegios privados de la Gran Bretaña por no utilizar la vacuna correspondiente (Calvert *et al.*, 2013).

Entre los sectores que participan de estas tesis en nuestro país se encuentran personas con estudios elevados, incluyendo a sanitarios, y se concentran, según algunas encuestas, en la franja mediterránea. Se piensa que esta posición se asocia fundamentalmente con grupos sociales que defienden la medicina natural.

Los científicos y responsables sanitarios debemos enfatizar los riesgos derivados de este posicionamiento. Históricamente, el haber eliminado la viruela y muchas de las plagas que barrieron históricamente continentes enteros se debió a la introducción de la vacunación masiva y en este sentido hemos de resaltar el riesgo derivado de la extensión del movimiento anti-vacunación.

FARMACOGENÉTICA Y FARMACOGENÓMICA: BASES RACIONALES PARA EL DISEÑO DE NUEVAS DROGAS

Uno de los problemas con los que se enfrentan las autoridades sanitarias es la necesidad de mejorar la seguridad y eficacia de los medicamentos debido a las reacciones adversas, incluida la muerte, que estas pueden provocar. En los EEUU se contabilizan anualmente en sus hospitales más de 100.000 muertes y 2 millones de reacciones adversas graves (Lazarou , Pomeranz and Corey. 1998).

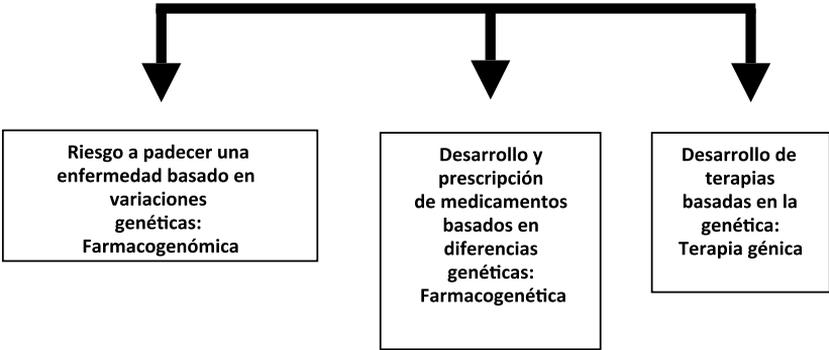


Fig. 1. *La información genética y su relación con la farmacogenómica, la farmacogenética y la terapia génica*

La información obtenida con la secuenciación del genoma a nivel individual puede ayudarnos a detectar enfermedades específicas (farmacogenómica), a desarrollar fármacos individualizados (farmacogenética) o a facilitar la información sobre la necesidad de introducir cambios de genes específicos (terapia génica).

La farmacogenómica y la farmacogenética son disciplinas de suma importancia y como muchos de los aspectos que comento derivan de los avances de la genética y sus técnicas analíticas:

1. La farmacogenética, que es la rama de la ciencia que estudia la variabilidad genética de un individuo en su respuesta específica a determinados fármacos.
2. La farmacogenómica es la ciencia que estudia las bases moleculares y genéticas de las enfermedades y como consecuencia la posibilidad de desarrollar nuevos tratamientos terapéuticos (Roses, 2000).

Los medicamentos son capaces de controlar determinadas enfermedades pero frecuentemente son responsables de efectos secundarios no deseados capaces de provocar un aumento en la morbilidad y mortalidad de los pacientes además de un aumento de los costes de salud. Ello se debe a que se admite que el comportamiento de un grupo de pacientes ante una droga eficaz y bien tolerada es extensible a todos los individuos como si formaran parte de un conjunto homogéneo. La experiencia clínica diaria señala que medicamentos que son excelentes en algunos pacientes resultan, sin embargo, ineficaces o causan secuelas no deseadas en otros, secuelas que pueden ser incluso mortales. En algunos casos sabemos que la falta de eficacia de algunas drogas es realmente elevada como ocurre con el tratamiento de determinadas enfermedades como el Alzheimer (entre el 30 % y el 60%), la hipertensión (entre el 10 y el 70%) o la esquizofrenia (entre el 25 y el 75%).

Estas variaciones individuales en la respuesta a determinados fármacos puede deberse a la influencia de:

1. Factores exógenos, como son la dieta del individuo o la ingestión de agentes xenobióticos como el café, el tabaco, el alcohol, medicamentos, etc.
2. Factores endógenos que son los derivados de su composición genética, incluyendo la edad y el sexo.

Factores que afectan la actividad de los fármacos

¿Qué ocurre cuando administramos un fármaco? La respuesta del organismo al fármaco es proceder a su eliminación directamente, sin modificación alguna, o bien modificándolo mediante reacciones químicas que se denominan biotransformaciones. Éstas conducen a la formación de metabolitos que pueden ser biológicamente activos o inactivos.

En las biotransformaciones participan una treintena de familias de enzimas cuya actividad depende del polimorfismo genético específico del paciente, lo

que resulta en proteínas con una actividad bioquímica diferente frente a las drogas. Como resultado de ese polimorfismo encontramos pacientes con los siguientes fenotipos:

1. Metabolizadores lentos. La enzima codificada carece de actividad o es solo limitada.
2. Metabolizadores normales. Son portadores de al menos una copia del gen activo.
3. Metabolizadores rápidos. Tienen duplicado el gen activo o mutado provocando un aumento de actividad de la enzima codificada.
4. Metabolizadores muy rápidos. Tienen multiplicado el gen activo o se encuentra mutado provocando un aumento aun mayor de actividad de la enzima codificada.

¿Qué tipo de cambios sufren los fármacos en el organismo?

1. El principio activo sufre, originalmente, cambios en su estructura primaria; cambios en los que participan reductasas, oxidasas e hidrolasas, por lo que el fármaco es oxidado, reducido o hidrolizado (reacciones de fase I).
2. El principio activo modificado por las reacciones de fase I sufren nuevos cambios catalizados por transferasas que transfieren grupos metilos, sulfatos,...etc. (reacciones de fase II) .

Como ejemplo de las actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo de drogas citaré el citocromo P450, la glutatión S-Transferasa (GST) y la tiopurina metiltransferasa (TPMT). Además, hay que considerar que tanto los transportadores como los receptores de los fármacos tienen también un efecto importante regulando la actividad final de las drogas.

Según María Teresa Donato, del Centro de Investigación del Hospital La Fe de Valencia (Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia): “el citocromo P450 es el principal responsable del metabolismo oxidativo de los xenobióticos. No se trata de una enzima única, sino de una familia de hemoproteínas presentes en numerosas especies vivas, desde bacterias a mamíferos, y de las que ya se han identificado más de 2.000 alelos diferentes. Todas las enzimas P450 conocidas se agrupan en familias y subfamilias en función de la similitud en la secuencia del ADN que las codifica”. Podemos decir, por tanto, que el P450 2D6 es una de esas superfamilias y probablemente el polimorfismo genético mejor caracterizado. Ésta fue la primera enzima humana metabolizadora de drogas clonada y caracterizada a nivel molecular.

El citocromo P450 2D6 es responsable de la biotransformación de un gran número de agentes terapéuticos, entre los que se encuentran drogas utilizadas en

el tratamiento de enfermedades psiquiátricas, neurológicas y cardiovasculares. En la actualidad han sido descritos más de 75 alelos del gen *CYP2D6*. Se considera que una dosis diaria de 20-50 mg de nortriptilina, un antidepresivo tricíclico cuyos efectos adversos son debidos a su actividad anticolinérgica, es suficiente para un paciente metabolizador pobre, y sin embargo, un paciente metabolizador muy rápido es aquel que herede múltiples copias del gen y en este caso requeriría más de 500 mg al día con el incremento de los efectos adversos secundarios como son agitación, vómitos, rigidez muscular, taquicardia, shock, estupor,...

Las bases genéticas de la variabilidad en la actividad enzimática del producto del gen *CYP2D6* se encuentran en sus distintos alelos. Este gen se halla localizado en el cromosoma 22, y la actividad de la proteína codificada va desde la normal a una incrementada, disminuida o incluso a una falta total de actividad catalítica (Tabla 4).

Tabla 4

Alelos del gen <i>CYP2D6</i> y actividad enzimática (Droll et al; 1998).	
Alelo	Actividad CYP2D6
<i>CYP2D6*1</i>	normal
<i>CYP2D6*2</i>	incrementada
<i>CYP2D6*3</i>	nada
<i>CYP2D6*4</i>	nada
<i>CYP2D6*5</i>	nada
<i>CYP2D6*9</i>	disminuida
<i>CYP2D6*10</i>	disminuida
<i>CYP2D6*17</i>	disminuida

Es interesante indicar que se han encontrado factores étnicos en la variabilidad de la actividad enzimática de esta proteína. En pacientes de la raza blanca se detecta una actividad metabolizadora escasa solo entre un 10 y un 60 %. La actividad de esta enzima es aún más baja en grupos asiáticos (2%) (Australian Medicines Handbook (AMH) 2004), solo inferior en pacientes negros (Gaedigk, et al., 2002)

siendo, sin embargo, la población de oriente medio y la africana las que presentan un metabolismo ultrarrápido (McLellan, *et al.*, 1997).

Otras enzimas directamente implicadas en biotransformaciones son la glutatión S-transferasa (GST) y la tiopurina metiltransferasa (TPMT). La primera inactiva metabolitos reactivos. El glutatión reacciona con muchos xenobióticos cuyos metabolitos oxidativos son tóxicos. Los genes que codifican estas enzimas son altamente polimórficos y la eficacia o toxicidad en la quimioterapia del cáncer depende del gen *GST-M1* o del gen *GST-T1*.

En cuanto a la tiopurina metiltransferasa (TPMT), es de interés señalar que fue una de las primeras utilizada en el estudio la implicación de la variación genética en el metabolismo de las drogas. Esta enzima metaboliza la 6-mercaptopurina y azatioprina, dos fármacos utilizados en una amplia gama de patologías que van desde la leucemia infantil a enfermedades autoinmunes. En los pacientes con una deficiencia en la actividad de TPMT el metabolismo de la tiopurina debe realizarse por otras vías, una de las cuales conduce a un metabolito que es tóxico en altas concentraciones para la médula ósea. La deficiencia de TPMT afecta a un pequeño porcentaje de personas, aunque gravemente. Una de cada trescientas personas tienen dos alelos variantes y la actividad TPMT falta, por lo que estas personas necesitan sólo 6-10% de la dosis estándar de la droga, y, si son tratados con la dosis completa, están en riesgo de una alteración grave o supresión de la actividad de la médula ósea. En el caso de estos enfermos su genotipo predice cuál va a ser el resultado del tratamiento clínico.

Además de los factores relacionados con la estructura primaria de las drogas y las enzimas metabolizadoras, se encuentran otros factores como son los transportadores y los receptores de los fármacos. Los primeros son responsables directos sobre los procesos de absorción, distribución y excreción de los medicamentos y en el caso de los receptores son garantes de aquellos mecanismos que deben unir las drogas físicamente a las células diana o a proteínas involucradas en la respuesta farmacológica. En todos estos procesos el efecto final de la droga dependerá de los alelos de los genes implicados.

Bases racionales para el diseño de fármacos personalizados (farmacogenética)

Muchos investigadores dan por hecho, después de lo descrito en los párrafos anteriores, que la prescripción de drogas en un futuro próximo debe basarse en la información genética de cada paciente.

¿Cuál es la razón a nivel genético del efecto diferencial de las drogas en pacientes distintos? Es el conocimiento de la genética del paciente el que informa

de la respuesta diferencial a las drogas y ese marcaje se encuentra fundamentalmente en el conocimiento de las mutaciones que se detectan por los SNP (acrónimo del polimorfismo de un único nucleótido, se pronuncia snip) cuya presencia en un gen puede pasar desapercibida, ser causante de una enfermedad o alterar el metabolismo de los fármacos.

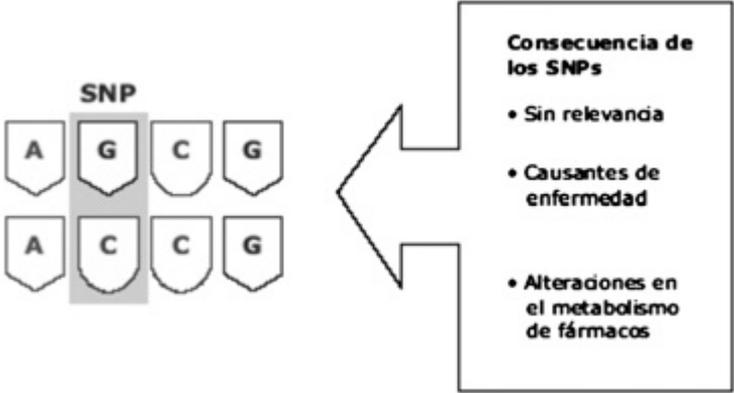


Fig. 2.

La identificación de SNP en el genoma humano es la base del diseño de las preparaciones farmacéuticas que denominamos farmacogenéticas. Con el conocimiento de la localización de los SNP en determinados genes podemos diseñar fármacos a la medida del paciente. Ante esta realidad, quizá las farmacias deban suministrar en un futuro próximo menos fármacos, ya que serán más específicos. Cuando se limite el uso de un fármaco a un grupo de pacientes éste deberá etiquetarse de la siguiente manera: «Este fármaco solo para pacientes con genotipo 54». Algunas empresas farmacéuticas tienen miedo de que esta aproximación a la medicación por los clínicos plantee nuevas exigencias por parte de las autoridades sanitarias en la legalización de nueva drogas o preparados farmacéuticos. Además, los intereses de las empresas farmacéuticas están en juego, ya que estarán interesadas en desarrollar fármacos para un perfil genético amplio y que no expresen interés en otros fármacos cuyo perfil genético de los pacientes sea reducido y especulen que no son viables económicamente.

Laboratorios farmacéuticos como Abbot, Merck, GlaxoSmithKline y otros han tipado genotípicamente a pacientes con varias enfermedades a fin de desarrollar drogas que interfieran específicamente con la actividad del producto génico directamente implicado o responsable de la enfermedad. En el año 2001 ya se habían identificado unos 50 millones de SNP, en el genoma humano (Sherry *et al.*, 2001) y, como los SNPs se encuentran altamente conservados en una población durante la evolución, esta información sirve como marcador de la población correspondiente y por lo tanto de su genotipado.

Las bases de datos de SNP son varias y sirven y servirán para el desarrollo de drogas personalizadas. Hoy los investigadores cuentan con varias que son y serán las plataformas que ayuden al diseño de las nuevas preparaciones farmacogenéticas. Entre las bases actuales de SNPs he de destacar las siguientes:

1. *dbSNP*, desarrollada por el National Center for Biotechnology Information de los EEUU.
2. SNPedia, con la anotación del genoma personal, interpretación y análisis.
3. OMIM, describe la asociación entre los polimorfismos y las enfermedades.
4. Human Gene Mutation Database, que informa de las mutaciones de genes que causan o se asocian con enfermedades de tipo hereditario y snps funcionales.
5. La oficial del Proyecto Internacional HapMap, en la que se encuentran identificados snps marcadores capaces de determinar los haplotipos presentes en cada individuo.

En algunos países hoy ya es posible estudiar más de un millón de polimorfismos o la expresión de más de 25.000 genes por paciente participante en estudios clínico y con costes asequibles. Este tipo de investigación aún no ha producido cambios en la práctica diaria pero hay clínicos empiezan a pensar que es necesario.

En este punto quisiera sugerir los principios que en relación con la farmacogenética y farmacogenómica deberán tenerse en cuenta en un futuro próximo en nuestros hospitales y que en parte están siendo adoptados ya en otros países (Brockmöller y Tzvetkov, 2008):

1. Cuando la seguridad de una droga dependa de polimorfismos genéticos, la mejor alternativa es retirarla del mercado o conocer los polimorfismos específicos del paciente.
2. Las características farmacogenéticas y farmacogenómicas de un grupo étnico son las razones más importantes para considerar la actividad diferencial de las drogas a utilizar.
3. La aplicación de los conocimientos farmacogenéticos no debe basarse exclusivamente en el genotipo, ya que en ocasiones lo importante es el fenotipo del paciente.
4. Muchos polimorfismos pueden tener consecuencias positivas o negativas en la salud humana dependiendo del contexto y protocolo a que se someta el paciente.

5. Todo farmacólogo debe conocer los antecedentes y las consecuencias clínicas de los polimorfismos implicados en el metabolismo de las drogas más importantes.
6. La farmacogenética presenta, como tecnología relativamente compleja y novedosa, dificultades y retrasos en la aplicabilidad de sus conocimientos a la clínica.
7. Necesitamos conocimientos farmacogenéticos adicionales, además del estudio a nivel de genes específicos, para poder comprender las razones de las variaciones de la actividad de las drogas a nivel individual.
8. Los clínicos van a necesitar, debido a la información masiva en farmacogenética que se espera en un futuro relativamente próximo, conocimientos bioinformáticos significativos a fin de poder detectar las diferencias que se presentan a nivel individual.
9. Además de los conocimientos relacionados con la secuencia genómica y de las proteínas, son también importantes los procesos epigenéticos a fin de poder comprender la variabilidad de la respuesta a las drogas tanto en los aspectos positivos como en los adversos.
10. El futuro de la investigación farmacogenética y farmacogenómica debe ser un combinado de los estudios de los SNPs genómicos, de los conocimientos clínicos junto con la experimentación *in vitro* y *ex vivo* en células, organismos modelo y en el hombre.

La tarjeta farmacogenética

Actualmente, empresas de varios países comercializan la tarjeta farmacogenética individual. Ésta permite al titular compartir su perfil genético con todos los profesionales sanitarios a fin de determinar la prescripción de fármacos más adecuada. Entre esas empresas se encuentran, por su proximidad, el centro médico EuroEspes en España y GoldFarma en Portugal,

Los datos incorporados en estas tarjetas se obtienen con un sencillo test genético, elaborados a partir de sangre o de epitelio bucal del individuo. La tarjeta EuroEspes ha sido lanzada al mercado con un precio medio de entre 200 y 300 € e incorpora un listado de los medicamentos más aconsejables para su titular, como resultado del análisis personal de genes implicados en el metabolismo de los fármacos. Se estima que la utilización de este tipo de tarjetas debe reducir el gasto en medicamentos de un modo significativo ya que según los propios autores «con el uso de esta tarjeta se pueden ahorrar entre 2.500 y 3.500 millones de euros al año en gasto farmacéutico»,

En este contexto quisiera destacar los estudios que sobre los tipos de variantes genéticas relacionadas con los “SNPs” realiza el Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO).

Por último, quiero subrayar que los estudios de farmacogenética tienen como objetivo exclusivamente mejorar la respuesta a los fármacos de un paciente a nivel individual. La farmacogenética no pretende modificar la dotación genética del individuo mediante la introducción de material exógeno o alteración del ADN genómico sino solamente utilizar las drogas del modo más eficiente. Sin embargo, se pueden plantear problemas éticos en relación con la codificación de las muestras, su almacenamiento, el control de acceso a la información genética, el derecho a saber y a no saber, la discriminación en cualquier ámbito de trabajo y los intereses de las compañías de seguros.

Como complemento de todos los problemas éticos derivados del marcaje genético del individuo quiero comentar lo publicado hace unos años en un artículo por la “British Medical Association” en el que algunos investigadores sugerían que el avance en el conocimiento de la farmacogenética social puede derivar en el diseño de armas de “limpieza étnica” capaces de reconocer grupos sociales específicos y exterminarlos. Estas armas funcionan con agentes especialmente creados que reconocen secuencias específicas de ADN.

PRODUCTOS TERAPÉUTICOS PRODUCIDOS POR LOS MICROORGANISMOS DIRECTAMENTE EN EL HOMBRE

El microbioma humano

En este apartado me extenderé sobre algunos aspectos cuyo impacto en la salud se apreciará en los próximos años, en un futuro próximo. Recuerdo, además, que esta Real Corporación celebró el pasado 25 de Abril una mesa redonda bajo el nombre de “Sinbiogénesis y bacteriomas” y en la que participaron el Excmo. Sr. Académico y Vicepresidente de nuestra Academia, Don Antonio R. Martínez Fernández, el Prof. Andrés Moya Simarro y el que les habla, que expuso parte de las ideas y resultados que les presentaré a continuación.

Permítanme inicialmente introducir dos definiciones:

1. El microbioma humano es el acervo total de microorganismos (bacterias, virus, hongos, y protozoos), sus genes y genomas dentro y/o sobre cuerpo humano.
2. El metagenoma humano es el conjunto de genes y atributos funcionales codificados por los microorganismos presentes dentro y/ o sobre el cuerpo humano.

El estudio del microbioma humano tuvo su origen en las experiencias realizadas hace más de un siglo con animales libres de gérmenes, gnotobióticos o axénicos, y en los que se encontraron que su desarrollo presentaba anomalías significativas. Entre éstas se detectó que el sistema inmunitario se desarrollaba pobremente, que los órganos humanos que tienen poblaciones naturales de bacterias, y específicamente el trato intestinal, se desarrollaba anormalmente, presentando una pared muy delgada, problemas cardiacos y muy susceptibles a los gérmenes patógenos. Es interesante destacar que muchas de las características que presentan los animales gnotobióticos se encuentran también como resultado de un tratamiento con antibióticos. Ante esta observación los investigadores se preguntaron:

¿Qué microorganismos se encuentran en nuestro tracto intestinal?

¿Qué están haciendo estos microorganismos?

Sin embargo, muchos de los gérmenes que pueblan nuestro organismo no crecen *in vitro*, en condiciones de laboratorio, por lo que hubo que esperar hasta la aparición de las técnicas genéticas adecuadas que permitieran su estudio.

Fue necesario primero que Watson y Crick propusieran en 1953 la estructura del material genético y segundo, el desarrollo posterior de técnicas que permiten su secuenciación masiva, rápida y económica para que se pudiera abordar el estudio de los microorganismos *in situ*, en su nicho ecológico, sin necesidad de su cultivo *in vitro*.

Woese y Fox, en 1977, propusieron que la secuencia del gen de 16S de ARN ribosómico de los organismos procariotas podía utilizarse en la taxonomía bacteriana. Posteriormente se demostró que el gen equivalente de 18S de los eucariotas también es válido en la taxonomía de los organismos superiores incluyendo al *Homo sapiens*. Por otro lado, el desarrollo de las técnicas genéticas ha permitido determinar el total de los genes que se encuentran en un nicho ecológico, sin necesidad de crecer los microorganismos en el laboratorio, y deducir los productos codificados.

Hoy sabemos que el cuerpo humano tiene unas 10 veces más células bacterianas que células propias aunque se piensa que aquellas solo representan unos 200 gramos (algunos autores estiman que pudieran llegar incluso a 1.500 gramos), pero es importante reseñar que no son patógenos y que viven en armonía y simbiosis con nosotros (Madigan, 2012).

En el año 2001 el premio Nobel Joshua Lederberg sugirió que los microorganismos que habitan en el cuerpo humano, y que llamó microbioma, deberían ser incluidos como parte de su genoma debido a la influencia tienen sobre su fisiología.

En 2007 los Institutos Nacionales de la Salud de los Estados Unidos presentaron el proyecto del microbioma humano (NIH HMP Working Group, 2009).

Éste es un proyecto de los Institutos Nacionales de la Salud de los EEUU que se inició con la finalidad de caracterizar completamente la microbiota humana y determinar su papel en la salud y en la enfermedad. Además del proyecto de los EEUU, se creó el International Human Microbiome Consortium, (IHMC), cuyos trabajos se iniciaron oficialmente en setiembre de 2008 con 10 países participantes. En sus estatutos se especifica que este consorcio se encuentra abierto a cualquier proyecto de investigación que esté de acuerdo con los principios incorporados en sus Estatutos.

El proyecto del Microbioma Humano del NIH está constituido por cuatro subproyectos que pretenden:

1. Estudiar los genomas de microorganismos previamente identificados y utilizarlos como referencia para el resto de los encontrados durante el proyecto.
2. Estudiar la diversidad de genes ribosómicos de 16S del ARN, es decir, el estudio taxonómico de todos los microorganismos identificados y no identificados previamente.
3. Determinar el metagenoma en diversos nichos ecológicos del hombre, es decir, el tipo de genes, enzimas, etc. de todos los microorganismos del cuerpo humano.
4. Demostrar la correlación entre el microbioma en la salud y la enfermedad en el hombre.

En la Tabla 5 se muestran algunos de los proyectos financiados en este último grupo, el investigador principal y la Universidad en la que se desarrolla la investigación.

Tabla 5. Algunos proyectos financiados por el HMP para demostrar la correlación existente entre el microbioma en la salud y en la enfermedad.

Project Title	Principal Investigator(s)	Institution(s)
Evaluation of the cutaneous microbiome in psoriasis	Martin J Blaser	New York University School of Medicine
The Vaginal Microbiome: Disease, Genetics and the Environment	Cynthia Nau Cornelissen, Lindon J Eaves, Jerome Frank Strauss, Gregory A Buck	Virginia Commonwealth University
Diet, Genetic Factors, and the Gut Microbiome in Crohn's Disease	Frederic D Bushman, James D Lewis, Gary D Wu	University of Pennsylvania

Tabla 5. Algunos proyectos financiados por el HMP para demostrar la correlación existente entre el microbioma en la salud y en la enfermedad (Continuación).

Project Title	Principal Investigator(s)	Institution(s)
The Role of the Gut Microbiota in Ulcerative Colitis	Eugene B Chang, Folker Meyer, Thomas M Schmidt, Mitchel L Sogin, James M Tiedje, Vincent B Young	University of Michigan at Ann Arbor
Urethral Microbiome of Adolescent Males	Dennis J Fortenberry	Indiana University-Purdue University at Indianapolis
The Thrifty Microbiome: The Role of the Gut Microbiota in Obesity in the Amish	Alan R Shuldiner, Claire M Fraser-Liggett	University of Maryland Baltimore
Metagenomic Analysis of the Structure and Function of the Human Gut Microbiota in Crohn's Disease	Claire M Fraser-Liggett	University of Maryland Baltimore
Effect of Crohn's Disease Risk Alleles on Enteric Microbiota	Ellen Li	Washington University
Metagenomic study of the human skin microbiome associate with acne	Huiying Li	University of California Los Angeles
Foregut microbiome in development of esophageal adenocarcinoma	Karen E Nelson, Zhiheng Pei	New York University School of Medicine
The Microbial Ecology of Bacterial Vaginosis: A Fine Scale Resolution Metagenomic	Jacques Ravel	University of Maryland Baltimore
Skin Microbiome in Disease States; Atopic Dermatitis and Immunodeficiency	Julia Segre	U.S. National Human Genome Research Inst
The human virome in children and its relationship to febrile illness	Gregory A Storch	Washington University

El proyecto se inició una vez decididos los puntos de toma de muestra, fijándose éstos en cinco: nariz, boca, piel, tracto gastrointestinal y urogenital (Fig. 3).

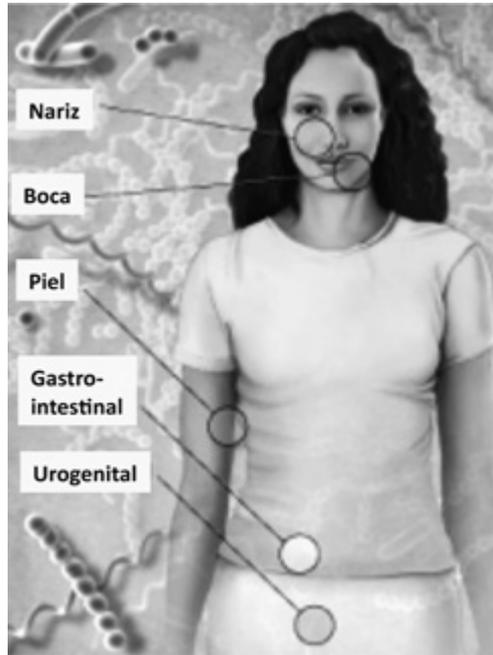


Fig. 3. Localización en el cuerpo humano de los puntos de toma de muestra para investigar el microbioma.

Las tomas de muestras se han realizado en individuos sanos de diferentes etnias y sexo y son tratadas para obtener la información siguiente (Fig 4):

1. Identificación de los microorganismos conocidos para su utilización como referencia.
2. Muestras metagenómicas para :
 - 2.1. Secuenciación de los genes ribosómicos de 16S que generan la información necesaria para la clasificación taxonómica de microorganismos.
 - 2.2. Secuenciación del resto de genes y así obtener información sobre los productos codificados por la comunidad microbiana.

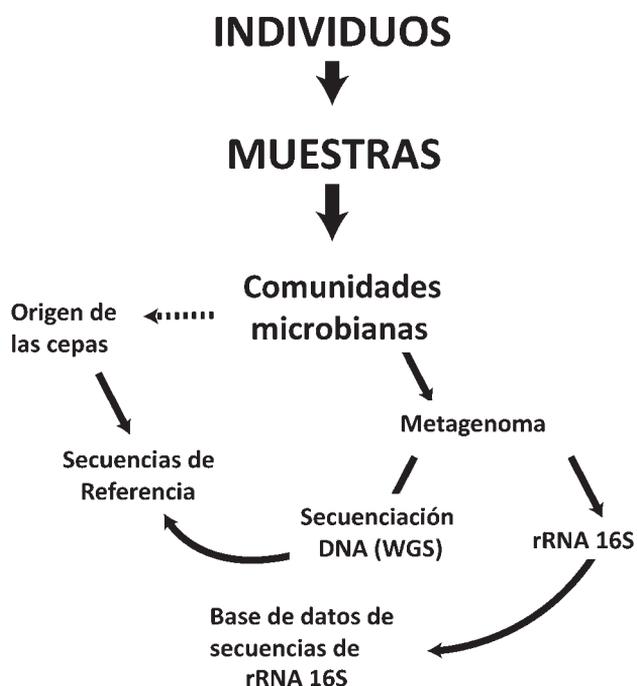


Fig 4. NIH HMP Working Group. 2009

El estudio ha demostrado que cerca de 29% de la microbiota detectada se encuentran en el tracto gastrointestinal, un 26% corresponde al oral, un 21 % a la piel, un 14% a los conductos aéreos y un 9% al conducto urogenital.

Los resultados más significativos obtenidos hasta Julio de 2012 se encuentran resumidos en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6. Integrated Microbial Genomes (Human Microbiome Project, NIH)

Genome Count

Situación	Bacterias	Archaea	Eukariotas	Plásmidos	Virus	Fragmentos	Muestras	Total
Completos	2113	154	37	1186	2809	654	11	6964
Borrador	2282	22	151	0	0	0	1307	3762
Borrador incompleto	818	20	0	0	0	0	6	844
Total	5213	196	188	1186	2809	654	1324	11570

**Tabla 6. Integrated Microbial Genomes (Human Microbiome Project, NIH)
(Continuación).**

DNA Statistics

ADN	Bacteria	Archaea	Eukariotas	Plásmidos	Virus	Fragmentos	Muestras
N.º de bases	19,973,243,520	486,756,223	38,339,700,746	33,593,255	87,874,492	22,728,454	468,223,015,710
N.º de bases codificantes	17,366,625,378	421,416,512	13,542,144,779	25,510,621	77,231,272	19,704,224	61,046,023,461
N.º de bases G+C	10,395,502,588	242,228,003	14,621,934,711	16,238,213	39,337,990	14,530,743	233,578,796,134
Andamio (scaffolds)	491,303	2,195	1,110,165	1,187	4,286	654	2,665,160,933
Total	47,735,862,789	1,150,402,933	66,504,890,401	75,343,276	204,448,040	56,964,075	765,512,996,238

Tabla 7. Integrated Microbial Genomes (Human Microbiome Project, NIH)

Gene Statistics

Genes	Bacterias	Archaea	Eukariotas	Plásmidos	Virus	Fragmentos	Muestras	Total
Total Genes	19,120,368	511,261	2,765,661	34,055	97,817	11,865	2,731,369,547	2,753,910,574
Total genes que codifican proteínas	18,753,624	500,085	2,663,440	34,014	96,642	11,846	2,701,550,724	2,723,610,375
Total genes transferidos horizontalmente	1,056,398	34,762	230,413	3,059	18,313	1,045	0	1,343,990
Genes fusionados	802,847	14,650	30,017	1,599	507	286	0	849,906
Genes como componentes de fusión	1,798,693	75,858	54,462	0	0	0	0	1,929,013
Genes con péptido señal	1,432,935	10,408	230,193	3,051	6,200	1,695	10,767,765	12,452,247
Genes con segmentos transmembranales	4,392,471	106,479	489,777	6,102	13,150	1,850	6,816,716	11,826,545
Total genes que codifican ARN	366,564	11,176	49,355	41	1,175	19	29,818,823	30,247,153
Genes de rARN	50,289	1,031	2,852	3	1	10	22,935,473	22,989,659
5S	17,896	373	938	0	0	3	313,380	332,590
16S	15,950	315	28	0	0	3	8,972,849	8,989,145
18S	0	0	193	1	0	0	56	250
23S	16,284	321	24	0	0	3	13,648,994	13,665,626

**Tabla 7. Integrated Microbial Genomes (Human Microbiome Project, NIH)
(Continuación).**

Gene Statistics

Genes	Bacterias	Archaea	Eukariotas	Plasmidos	Virus	Fragmentos	Muestras	Total
Total Genes	19,120,368	511,261	2,765,661	34,055	97,817	11,865	2,731,369,547	2,753,910,574
Genes tARN	282,297	8,966	37,065	1	1,094	9	4,398,701	4,728,133
Otros genes ARN	33,978	1,179	9,438	37	80	0	2,465,195	2,509,907
Pseudogenes	123,492	8,602	36,559	0	32	23	0	168,708
Genes obsoletos	1,036	1,056	6	5	1	0	0	2,104
Genes revisados	2,284	8,187	8	9	0	1	641	11,130

Entre el gran número de artículos publicados sobre el microbioma del hombre, considero que tres destacan lo realizado hasta el momento de su publicación por el consorcio (Human Microbiome Project Consortium). Dos de ellos aparecieron en Junio de 2012 y fueron publicados en la revista Nature y el tercero fue publicado el año anterior en la revista Nature Reviews of Microbiology. Los dos primeros están firmados por 248 autores pertenecientes a 80 laboratorios. En el primero de ellos se presentan los datos obtenidos por triplicado de una población de 242 adultos sanos sobre la base de muestras procedentes de 15 o 18 localizaciones del organismo y que han generado 5.177 perfiles taxonómicos microbianos a partir de los genes de 16S y más de 3,5 terabases de secuencias metagenómicas. Además se han aislado y secuenciado 800 cepas de referencia. En conjunto, estos datos, según los autores, son el mayor recurso que describe la abundancia y variedad del microbioma humano (Human Microbiome Project Consortium 2012. doi: 10.1038/nature11209).

El segundo artículo mencionado se describe que el microbioma humano difiere notablemente, incluso en los individuos sanos, en los microbios que ocupan hábitats tales como el intestino, la piel y la vagina. Gran parte de esta diversidad permanece sin explicación a pesar de la dieta, el medio ambiente, el patrimonio genético del hospedador y la exposición temprana a microbios (Human Microbiome Project Consortium. 2012. doi: 10.1038/nature11234).

El tercero de los artículos a que hecho referencia incluye los estudios realizados sobre el microbioma de la piel y en su resumen se dice: “La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, colonizado por una gran cantidad de microorganismos, la mayoría son inofensivos o incluso beneficiosos para su anfitrión. Las respuestas inmunes innata y adaptativa de la piel pueden modular la microbiota, pero la microbiota también funciona en la educación del sistema inmune. Es ne-

cesario ampliar nuestro conocimiento sobre la participación de los microorganismos en los trastornos de la piel humana a fin de encontrar nuevos enfoques terapéuticos utilizando tanto microorganismos como agentes antimicrobianos para una mejor comprensión del microbioma de la piel (Grice and Segre, 2011).

La interpretación a nivel personal de los resultados fundamentales expuestos en esos trabajos puede resumirse en los siguientes puntos:

1. El microbioma se adquiere individualmente en cada generación mientras que el genoma humano se recibe de los padres.
2. El microbioma tiene carácter dinámico, modificándose su composición durante la vida del individuo. El microbioma se adquiere al nacer siendo diferente en el parto normal que el que se adquiere cuando el parto es por “cesárea”. Los cambios se inician durante los dos primeros años en paralelo con la evolución de la dieta de los niños. Posteriormente se adapta y estabiliza en los adultos y se modifica de nuevo en la ancianidad.
3. El microbioma es específico y nos confiere propiedades que solo conocemos parcialmente (educa al sistema inmunitario, produce un efecto positivo sobre enfermedades autoinmunes como en la diabetes juvenil, etc.).
4. El microbioma se altera en caso de enfermedad, pero la presencia de organismos patógenos no siempre significa un estado patológico ya que el individuo puede no padecer la enfermedad.
5. El microbioma del intestino contiene aproximadamente 5 millones de genes (el genoma del hombre tiene unos 22.000) pero se conoce muy poco acerca de lo que hacen o cómo interactúan (el hombre para digerir carbohidratos complejos tiene solo unas pocas enzimas, el microbioma más de 100).
6. La relación entre el microbioma humano y el medio ambiente es directa debido a tres factores:
 - 6.1. transferencia horizontal de genes entre las bacterias del microbioma humano y las del medio ambiente.
 - 6.2. modificación con la edad y prácticas sociales.
 - 6.3. uso de antibióticos.

Es interesante comentar el resultado obtenido al analizar el microbioma de los japoneses en comparación con el de los europeos y americanos. Los primeros presentan algunas actividades que no se encuentran en los otros dos grupos. En el caso de los japoneses se ha demostrado la presencia de genes procedentes del alga

nori (término japonés usado para referirse a variedades comestibles de diversas especies del genero *Porphyra* y en algunos casos de cianobacterias) que forma parte del *sushi*, alimento diario con una base de arroz de muchos japoneses, y que se encuentra en su tracto intestinal por transferencia horizontal.

En cuanto a las modificaciones debidas a la edad, ya se han descrito en el punto segundo; y en lo que se refiere a las prácticas sociales basta citar que se puede variar por dieta alimentaria o determinados hábitos como son entre otros, el exceso de limpieza durante la lucha. Según algunos investigadores, el hábito de la ducha frecuente puede empobrecer el microbioma en especies beneficiosas y provocar un enriquecimiento en flora perjudicial. En cuanto al tratamiento con antibióticos, baste recordar que solamente se conservan y multiplican los microorganismos que poseen genes de resistencia y de ahí la necesidad de reconstruir el microbioma mediante probióticos.

Actualmente podemos decir que el microbioma tiene funciones importantísimas, entre las que cabe destacar lo que contribuye a nuestro metagenoma y su posible efecto positivo sobre enfermedades autoinmunes como en la diabetes juvenil, colitis ulcerativa, artritis reumatoide, distrofia muscular, esclerosis múltiple, la enfermedad de Crohn (Virgin y Todd, 2011), fibromialgia e incluso algunos investigadores creen que quizás tenga influencia en el desarrollo de algún tipo de cáncer. Otros aspectos de la posible participación del microbioma pueden estar relacionados con la obesidad, que podría agravarse por la ausencia de alguna especie microbiana determinada. Finalmente, dado que los microorganismos pueden modificar la producción de neurotransmisores presentes en nuestro cerebro, logran, en consecuencia, suavizar aspectos de la esquizofrenia, depresión, desorden bipolar y otros desequilibrios mentales debidos a las variaciones en la concentración de sustancias neuroactivas.

Los objetivos actuales del consorcio HMP podemos resumirlos en tres:

1. Utilizar los cambios que se producen en el microbioma como marcador de enfermedades específicas.
2. Utilizar el microbioma con fines terapéuticos, por producir sustancias antibacterianas, antiinflamatorias y otras moléculas pequeñas de interés terapéutico.
3. Construir un nuevo microbioma por ingeniería genética (biología de sistemas) capaz de estimular las células T, citocinas, factores antimicrobianos, facilitar la liberación de drogas, etc.

Alimentos funcionales

Alimentos funcionales son aquellos que proporcionan a la salud efectos beneficiosos superiores a los que producen los alimentos tradicionales.

Los estudios realizados en el proyecto del microbioma humano han supuesto un relanzamiento de las investigaciones sobre el beneficio de determinado tipo de sustancias o de microorganismos que pueden ayudar a mejorar la salud humana. Se conocía este efecto beneficioso pero los estudios realizados con el microbioma lo confirman. A este respecto se utilizan tres tipos de complementos alimentarios: prebióticos, probióticos y simbióticos.

1. Prebiótico es toda sustancia que resiste el pH ácido del estómago, la hidrólisis enzimática y la adsorción gastro-intestinal; es, además, no digerible y estimula selectivamente el crecimiento y la actividad de las bacterias que contribuyen a la salud del hospedador (Gibson, *et al.*, 2004) o un componente alimenticio no viable que provoca efectos benéficos para la salud del hospedador modulando la microbiota (Piñeiro, *et al.*, 2008).
2. Probióticos son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren beneficio a la salud de sus hospedadores (FAO-WHO, 2002).
3. Los simbióticos combinan en sus formulaciones la unión de prebióticos y probióticos, lo que permite aprovechar más los beneficios de ambos.

Como ejemplo del interés que tienen para la salud la utilización de los probióticos y sus implicaciones económicas citaré un par ejemplos. El primero lo encontramos en la empresa Biópolis. Ésta fue fundada en 2003 como un *spin-off* del CSIC. Los científicos de Biópolis aislaron una cepa *Bifidobacterium longum* ES1 en un niño de tres meses de edad, sano y sometido a lactancia materna. Posteriormente esos científicos demostraron que esta cepa bacteriana presenta la propiedad de resistir el paso por el tracto digestivo, la secreción de bilis y se adhiere a la mucina que recubre el tracto digestivo. Esta cepa es capaz de generar una respuesta antiinflamatoria frente a péptidos del gluten e inhibe parcialmente el crecimiento de bacterias patógenas aisladas de heces de enfermos celíacos. Actualmente la Central Lechera Asturiana comercializa Pro Celiac, un producto pensado para la comunidad celíaca que incorpora precisamente la cepa probiótica *Bifidobacterium longum* ES, aislada por Biópolis (Laparra y Sanz, 2010; Laparra *et al.*, 2012).

El segundo ejemplo se refiere a los resultados obtenidos con el estudio del microbioma y que sugieren que la obesidad se encuentra asociada con una reducción, en el tracto intestinal, del número de bacterias Gram-negativas, específicamente Bacteroidetes, y un incremento en algunas bacterias Gram-positivas Firmicutes (Ley, *et al.*, 2006). Se ha demostrado, además, que la microbiota intestinal de los individuos obesos presenta una diversidad menor que la de los no obesos (Turnbaugh, *et al.*, 2009). La revista Science publicó este pasado mes de septiembre que las bacterias del género bacteroides obtenidas del intestino humano son res-

ponsables, al menos en ratones, de la peculiaridad de estar grueso o delgado, y que en este caso último caso, protegen contra las consecuencias de la acumulación de grasa corporal (Ridaura, *et al.*, 2013).

Según lo publicado por Didier Raoult en la revista Nature Reviews of Microbiology en el año 2009, los yogures y otras bebidas lácteas con probióticos que se comercializan desde hace más de quince años son responsables en gran parte de la epidemia de obesidad que presentan los niños en países europeos. La empresa Danone que comercializa los yogures Activia y Actimel aseguraba en el año 2012 en una nota de prensa que las bacterias en el primero ayudan a aliviar el estreñimiento y que Actimel (DanActive en EEUU y Canadá) poseía bacterias que refuerzan el sistema inmunitario.

La Comisión Federal de Comercio de los EEUU señaló que no existían evidencias científicas que avalasen las bondades que la marca anunciaba en su publicidad y por tanto exigió eliminarla a menos que fueran comprobadas por la FDA. Entre esas propiedades se decía que estos productos ayudan a evitar resfriados y gripes, o que contribuyen a la regulación del tracto intestinal. Dannon Co, la empresa filial estadounidense de la francesa Danone, aceptó pagar 21 millones de dólares por exagerar las propiedades saludables de su yogur Activia y la bebida láctea DanActive.

La manipulación de la microbiota intestinal, a través de la administración de probióticos y antibióticos, ha sido utilizada para estimular el crecimiento en animales de granja durante más de 40 años y está regulada por la FDA en EEUU y por la Comisión Europea. En este caso la administración se hace sin la adición de antibióticos. Los probióticos utilizados incluyen Firmicutes, y en particular *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* y *Enterococcus spp.*

El Dr. Raoult en este contexto comentaba: “Se han autorizado para la alimentación humana potenciadores de crecimiento utilizados en la cría (de animales), sin pararse a pensar e investigar cuál sería el efecto sobre los niños “. Éste reclamó nuevos estudios para conocer el papel preciso de todos los productos lácteos en la epidemia de obesidad infantil. Los investigadores creen que se han autorizado probióticos para alimentación humana sin una investigación previa de sus efectos. El problema es importante y general ya que aquellas personas que queriendo regular su peso, controlan su alimentación tomando varios yogures al día, reconocen que continúan engordando sintiéndose cada día más cansadas y frágiles.

Los problemas derivados de estas observaciones son muy relevantes y parece ser que algunas autoridades han ejercido presión a este respecto. Yo sugeriría que se requiera algo más que presión (en nuestro país la propaganda de Actimel dice “ el desayuno de las defensas”, “el consumo diario de Actimel ayuda a su

sistema inmunitario” sin justificación experimental) sobre el grupo Danone para que revise las fórmulas de sus yogures y evitar los grandes efectos negativos que desde un punto de vista económico pueden derivarse para una empresa con los grupos Actimel Europa y Activia Europa que valen, en conjunto, más de 15.000 millones de euros.

La píldora viva

Pero no es solo el suministro, como probióticos, de cepas bacterianas determinadas las que pueden ayudar a pacientes sino que hoy es posible la construcción de un nuevo microbioma utilizando bacterias modificadas con características programadas. Para su obtención se utilizan las técnicas diseñadas por la “biología de sistemas”; ésta estudia interacciones complejas en los sistemas biológicos, con una perspectiva holística en lugar del reduccionismo más tradicional y de forma cuantitativa, lo que puede conducir a diseñar “organismos nuevos” (Bu y Callaway, 2011). Esta ciencia parte de la hipótesis de que las células son realmente máquinas de Turin de modo que para que funcionen necesitan un programa, un codificador y la maquinaria que lo lea y ejecute.

La biología de sistemas elimina las limitaciones de la ingeniería genética clásica al utilizar genes sintetizados *de novo*. Con el diseño de genes artificiales se puede modificar el metabolismo de las células de tal manera que produzcan una funcionalidad artificial (Roy y Noad, 2012). La biología de sistemas permite programar las células a fin de dotarlas con las características genéticas que se deseen (Isalan, *et al.*, 2008) y para que puedan, por tanto, utilizarse como productos terapéuticos; en otras palabras, nos encontramos ante la “píldora viva”. Luis Serrano, en el Centro de Regulación Genómica de Barcelona consiguió tres millones de euros del Consejo Europeo de Investigación para un proyecto revolucionario. El proyecto consiste en diseñar una cepa bacteriana sintética que pueda ser introducida en células humanas en cultivo y permitir su adaptación con tres características:

1. Pocas copias de la bacteria por célula,
2. que la bacteria responda al entorno del huésped, y
3. que segregue al hospedador moléculas que le aporten algo útil.

Una vez conseguido esto, según Serrano, será fácil ajustar los detalles de la píldora viva a cada enfermedad concreta. Esta bacteria, de obtenerse, será un auténtico *chip biológico*, porque podrá insertarse en las personas sin modificar su genoma y también eliminarse de ellas por el tratamiento con un antibiótico adecuado.

Breve relación de investigaciones publicadas en estos años sobre esta temática por grupos españoles y que presentan a mi juicio mayor interés.

Saulnier DM, Ringel Y, Heyman MB, *et al.*, 2013. The intestinal microbiome, probiotics and prebiotics in neurogastroenterology. *Nat Immunol.* 14:101-105. University Hospital Vall d'Hebron. Barcelona

López-López A, Richter M, Peña A, *et al.*, 2013. New insights into the archaeal diversity of a hypersaline microbial mat obtained by a metagenomic approach. *Syst Appl Microbiol.* doi:pil: S0723-2020(12)00166-X. 10.1016/j.syapm.2012.11.008. Institut Mediterrani d'Estudis Avançats, Palma de Mallorca.

Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Moya A, Mira A. 2011. PLoS One 2011, A Mining virulence genes using metagenomics. *PLoS One.* 6:e24975. Centre for Public Health Research and Cavanilles Institute for Biodiversity and Evolutionary Biology, University of València.

Gonzalez-Pastor JE, Mirete S. 2011. Novel metal resistance genes from microorganisms: a functional metagenomic approach. *Methods Mol Biol.* 668, 273-285. Centro de Astrobiología (CSIC-INTA), Madrid.

Navarro-Fernandez J, Nechitaylo TY. *et al.*, 2011. A novel platelet-activating factor acetylhydrolase discovered in a metagenome from the earthworm-associated microbial community. *Environ Microbiol.* 13, 3036-3046. University of Murcia.

Ghai R, Rodriguez-Varela F, McMahon KD. *et al.*, 2011. Metagenomics of the water column in the pristine upper course of the Amazon river. *PLoS One.* 6:e23785. Universidad Miguel Hernández, San Juan de Alicante.

Torres-Cortés G, Millán V, Ramírez-Saad HC. *et al.*, 2011. Characterization of novel antibiotic resistance genes identified by functional metagenomics on soil samples. *Environ Microbiol.* 13,1101-1114. Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada.

GENES CON INTERÉS TERAPÉUTICO (terapia génica)

Los genes son las unidades físicas y funcionales de la herencia y secuencias específicas de ADN son las que codifican las proteínas. Éstas son las responsables de realizar las reacciones químicas fundamentales que hacen posible la vida y forman, además, parte de la mayoría de las estructuras celulares. Cuando la secuencia de bases de los genes se altera, las proteínas codificadas presentan estructuras anormales y son incapaces de realizar funciones necesarias dando origen a la enfermedad.

La terapia génica pretende corregir o sustituir los genes defectuosos por genes normales y que las proteínas codificadas por éstos tengan función biológica correcta y sustituyan a las responsables de la enfermedad; en otras palabras, que las proteínas terapéuticas se sinteticen directamente en el interior del organismo del enfermo.

El tratamiento con fármacos recombinantes no consistirá en la administración sustitutiva de la proteína defectiva, sino en la inserción del material genético para que sean las propias células las que fabriquen la molécula correspondiente. Con ayuda de vectores adecuados, el ADN penetrará en el interior de las células del organismo enfermo y dirigirá la transcripción y traducción de la molécula necesaria.

Los investigadores y clínicos que trabajan en terapia génica siguen varias líneas de experimentación, entre las que podemos destacar:

1. Insertar un gen normal en una localización determinada dentro del genoma de las células para reemplazar uno no funcional.
2. Cambiar un gen anormal por un gen normal a través de recombinación homóloga.
3. Reparar un gen anormal mediante una mutación inversa selectiva, que devuelva al gen su secuencia original y por tanto a su función.
4. Modificar la regulación de la expresión de un gen determinado.

El futuro de la terapia génica es extremadamente prometedor para solucionar un alto número de enfermedades, muchas de las cuales actualmente no tienen tratamiento alternativo y por tanto curación. Entre estas enfermedades se incluyen algunas que son de origen infeccioso, otras de defectos hereditarios y por último algunos tipos de cáncer. Las técnicas actuales no están lo suficientemente desarrolladas y en consecuencia no son utilizadas en la práctica clínica diaria y su utilización es aconsejable solo en el caso de enfermedades para las que actualmente no existen terapias alternativas.

Para insertar un gen exógeno en el organismo de un paciente deben utilizarse vectores y los actuales son fundamentalmente de naturaleza vírica pero también se han utilizado liposomas, electroporación, precipitación con CaPO_4 , ADN desnudo, etc.

Sabemos que en la naturaleza los virus protegen su material genético encapsulándolo frente a enzimas degradativas, pero son capaces de transferir sus genes a las células diana provocando la enfermedad. Los científicos aprovechan esta característica de los virus para manipular su genoma eliminando los genes responsables de la enfermedad e introduciendo, en su lugar, genes terapéuticos. Entre los virus que se han utilizado tradicionalmente como vectores se encuentran:

1. Retrovirus capaces de integrar su genoma, incluyendo el gen(es) terapéutico(s), en algún cromosoma de la célula diana.
2. Adenovirus que se integran en el núcleo de las células diana pero su material genético no se incorpora al de la célula hospedadora.

Los virus vectores, en ambos casos, no provocan la enfermedad ya que han sido previamente modificados y, además, deben cumplir dos características fundamentales para que puedan ser utilizados en terapia génica:

1. La seguridad del paciente debe estar totalmente garantizada.
2. El virus debe ser capaz de insertar los genes terapéuticos en las células del paciente.

El virus vector, para cumplir la primera característica, debe estar inactivado a fin de eliminar el riesgo de provocar la enfermedad y para cumplir la segunda debe ser capaz de reconocer las células diana.

El vector con el gen de interés es inyectado por vía intravenosa en el tejido u órgano elegido para que las células correspondientes lo incorporen. Alternativamente, mediante un procedimiento *ex vivo*, las células del paciente son extraídas, en el laboratorio se les introduce el vector y posteriormente las células transformadas se devuelven de nuevo al paciente. Por cualquiera de las dos técnicas, si el gen terapéutico se expresa adecuadamente, la proteína terapéutica que se sintetiza debe producir la curación del paciente.

La técnica descrita parece sencilla, si bien, son bastantes los problemas que se presentan, por lo que la terapia génica no es actualmente de uso clínico rutinario en los hospitales sino experimental. Entre los problemas pendientes de resolver para su utilización práctica y rutinaria se encuentran:

1. La necesidad de desarrollar mejores vectores.
2. La necesidad de encontrar mejores órganos o tejidos diana.
3. La necesidad de que el gen al incorporarse en las células diana se exprese debidamente regulado.

Esta última característica es capital ya que los niveles de expresión de la proteína terapéutica deben ser los adecuados a fin de evitar una producción excesiva o limitada. Un exceso de la proteína puede inducir efectos negativos en la salud del paciente y una producción limitada puede no alcanzar los niveles terapéuticos adecuados. Además, el sistema inmune del paciente debe funcionar correctamente a fin de controlar la progenie del virus vector impidiendo su liberación al medio ambiente y la posibilidad de ser transferido a otros pacientes.

Entre los problemas identificados con el uso de los retrovirus como vectores se ha detectado que, en ocasiones, la transcripción del gen terapéutico es tan

potente que activa genes adyacentes. Si la inserción del nuevo gen se produce en la proximidad de un oncogen silencioso puede provocar su activación e iniciar el desarrollo de un tumor. Esto parece haber sido la causa de lo ocurrido en París en 2004 cuando se hizo una prueba con 13 niños que sufrían deficiencia en la enzima adenosina desaminasa (niños burbuja) de los cuales 11 se curaron y 2 de ellos desarrollaron leucemia.

Hoy se utilizan adenovirus y lentivirus como nuevos vectores que a diferencia de los previamente utilizados tienen una tendencia menor a integrarse en zonas del genoma que tienen la capacidad potencial de inducir el desarrollo de tumores. Además, las secuencias reguladoras son más débiles y por tanto presentan una menor capacidad de activar genes próximos en donde el gen terapéutico ha sido insertado.

Por lo dicho podemos concluir que en el futuro las proteínas terapéuticas se sintetizarán directamente en el interior del organismo del enfermo, y que el tratamiento con fármacos recombinantes consistirá en la inserción del material genético para que sean sus propias células las que fabriquen la proteína requerida. Con ayuda de vectores adecuados, el ADN penetrará en el interior de las células del organismo y dirigirá la producción de la molécula codificada.

Terapia génica en células somáticas

Al iniciarse los trabajos en terapia génica, los científicos valoraron las razones que debían considerarse para decidir el tipo de enfermedad o enfermedades que deberían ser objetivo de un tratamiento con genes. El conocimiento de las bases moleculares de las enfermedades sugirió que el reemplazamiento de genes defectivos por normales debería ser más sencillo en el caso de las enfermedades monogénicas, es decir, aquellas en las que la enfermedad se debe exclusivamente a la presencia de un solo gen alterado. Estas enfermedades, aunque numerosas, más de 5.000 según OMS, son, a nivel individual, poco frecuentes pero afectan a millones de personas.

Como es obvio, la manipulación de enfermedades dependientes de más de un gen como así mismo las características fenotípicas dependientes de la expresión de varios genes son muchísimo más difíciles de corregir. Hoy es imposible pensar que características, como la personalidad o la inteligencia, puedan ser modificadas por manipulación genética.

Tabla 8. Ejemplos de enfermedades genéticas en las que los genes defectivos han sido identificados

Enfermedad	Producto del gen defectivo
Hemofilia A	Factor VIII
Hemofilia B	Factor IX
Talasemia	β -globina
Anemia falciforme	β -globina
Fibrosis cística	Regulador transmembranal de la Fibrosis cística
Fenilcetonuria	Fenilalanina hidroxilasa
Hiperanomenia	Ornitina transcarbamilasa
Galactosemia	Galactosa-1-fosfato uridil transferasa

El procedimiento para reemplazar un gen defectuoso debe realizarse básicamente de la siguiente manera: el alelo normal del gen defectuoso que ha de ser reemplazado es primeramente aislado a partir de las células de un donante o sintetizado químicamente. A continuación, el gen normal se introduce en células adecuadas del enfermo mediante la ayuda de un vector. Si el tratamiento va a realizarse *ex vivo* las células a las que se incorporara el gen se obtienen previamente en el laboratorio, se transforman y si lo expresa correctamente se re-introducen en el paciente. Se cree que estas células se desarrollarán mejor que las células originales del enfermo y reemplazarán a las defectuosas.

Esta técnica de terapia génica implica exclusivamente a células somáticas, ya que el procedimiento no afecta a los genes de las células germinales del individuo y es, desde un punto de vista conceptual, semejante a cualquier otro tipo de terapia que se ha utilizado hasta ahora en Medicina. La única diferencia estriba en que en vez de utilizar drogas se utilizan moléculas de ADN. Esto es importante porque algunos críticos piensan que el reemplazamiento de genes representa un cambio revolucionario en la Medicina tradicional. Desde luego, la terapia génica para corregir anomalías somáticas no se diferencia, como decía, de cualquier otro tipo de terapia.

La síntesis de la hemoglobina es desde el punto de vista genético uno de los sistemas más estudiados y las hemoglobinopatías son unas de las enfermedades monogénicas mejor conocidas. La hemoglobina es producida por células troncales pluripotenciales de la médula ósea y los genes de las células eritropoye-

ticas, en los casos de las hemoglobinopatías, serán sustituidos por genes normales obtenidos de un donante sano o por síntesis química. Si el gen normal es incorporado por las células y éstas se introducen en la médula ósea del enfermo, deben proliferar y producir una hemoglobina normal. Mediante este procedimiento una cura total o parcial de la enfermedad puede conseguirse.

En Diciembre de 2011 se informó de un trabajo realizado entre el University College de Londres y el St. Jude Children's Research Hospital de los EEUU con pacientes afectados por la hemofilia B cuyo gen alterado es el F9, que da lugar al factor de coagulación IX. Como vector se empleó un adenovirus para introducir el gen sano. El resultado fue muy esperanzador ya que los enfermos consiguieron aumentar la producción del factor IX de coagulación un 12%, suficiente para que no necesitaran las dos inyecciones semanales en que consiste el tratamiento de la enfermedad. Actualmente los investigadores están modificando las condiciones de experimentación, tratando de obtener una mayor síntesis de la proteína requerida. He de enfatizar, sin embargo, que el resultado obtenido es ya altamente satisfactorio a pesar de lo limitado de la síntesis de la proteína terapéutica.

Otro de los ensayos "importantes" en terapia génica está relacionado con el tratamiento de un caso raro de ceguera hereditaria que consiguió mejorar la visión a pacientes. La enfermedad que se abordó es la amaurosis congénita de Leber, que afecta a uno de cada 35.000 nacidos y que deja sin visión a quienes la padecen, como muy tarde, a los 40 años. El gen responsable de la patología es el *RPE65* y una mutación en este gen impide que el paciente produzca una proteína clave en el proceso de la visión. Sin ella, las células fotosensibles son incapaces de captar la luz y enviar al cerebro las señales nerviosas correspondientes.

El ensayo consistió en inyectar directamente en la retina de pacientes la copia normal del gen encapsulado en un adenovirus. Se inoculó en el ojo de peor visión y parte de los pacientes volvieron a ver con poca luz. En una segunda fase, los investigadores lo repitieron en el otro ojo. "Los pacientes ahora son capaces de ir de compras al supermercado y reconocer los rostros de la gente, algo que no podían hacer antes", señaló Jean Bennett, uno de los autores de la investigación (Testa *et al.*, 2013).

Más recientemente, en el Instituto San Raffael Telethon de Milán y bajo la dirección de Luigi Naldine se ha utilizado como vector el virus VIH inactivado, que es un tipo de lentivirus responsable del SIDA, y en el caso de tres niños con leucodistrofia metacromática causada por una mutación en el gen *ARSA*, y dos años después de la terapia génica correspondiente la progresión de la enfermedad ha sido detenida (Biffi, *et al.*, 2013). En un segundo caso, otros tres niños con síndrome de Wiskott-Adrich causado por una mutación en el gen *WAS* y utilizando el mismo vector los síntomas de la enfermedad han disminuido o parece que ha desaparecido totalmente (Aiuti *et al.*, 2013)

Los resultados descritos nos indican que los experimentos realizados en terapia génica van en la buena dirección y que sus riesgos pueden ser controlados. Sin embargo para que sea un tratamiento clínico normalizado aún deben resolverse bastantes problemas. Uno de los más acuciantes es, como ya he comentado, controlar el lugar de inserción del gen terapéutico y que se evite su inserción en zonas del genoma que puedan presentar problemas posteriormente. Una solución que se pensó que podía ser definitiva sugería que el gen se insertase en zonas no codificantes de genoma humano y basta recordar que solo el 2% del ADN contiene regiones codificantes. Con todo la Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) indica que aproximadamente el 80% del genoma sirve para ayudar a activar o desactivar los genes.

Otra de las soluciones dirigidas a aumentar los márgenes de seguridad consiste en sustituir el gen defectuoso por el correcto en la misma localización del ADN en vez de que este último se incorpore en un lugar indeterminado de la doble hélice. Actualmente se construyen enzimas de restricción artificiales generadas por la fusión del dominio dedo de zinc de unión al ADN con un dominio de hidrólisis del ADN. Dominios de dedo de cinc pueden ser diseñados para dirigirse a secuencias de ADN específicas y esto permite a nucleasas de dedos de zinc reconocer secuencias diana únicas dentro de un genoma [Transcription activator-like effectors nucleasas (TALEs) (Boch, 2011)]. Una vez el gen ha sido construido se ensambla en un plásmido con el que se transfecta la célula diana y penetrando en el núcleo tiene acceso a su genoma.

Los investigadores han ocultado frecuentemente los fracasos en terapia génica. Un ensayo de la Universidad de Harvard fue suspendido en secreto después de morir tres pacientes. En una ocasión el Instituto Nacional de la Salud de los EE UU solo había sido informado de 39 de los 691 experimentos fracasados con terapia génica en hospitales y universidades del país, pese que la ley obliga a comunicar todos los incidentes de este tipo.

Otra aproximación a la terapia génica un tanto diferente se basa en utilizar células troncales con una copia del gen activo facilitado por un donante. En el hospital Virgen del Rocío de Sevilla en 2009, un niño de 7 años que padecía β -talasemia mayor, que requería transfusiones de sangre periódicamente, fue trasplantado con células troncales del cordón umbilical de un hermano recién nacido. El Diagnóstico Genético Preimplantatorio había demostrado que éste último no solo se encontraba libre del error genético correspondiente sino que además era absolutamente compatible con su hermano, puesto que tenía idéntico perfil de histocompatibilidad, por lo que era el donante idóneo para posibilitar la curación mediante trasplante de células troncales de cordón umbilical". Portavoces del hospital indicaron en su momento que el niño enfermo había superado con éxito el trasplante, no necesitaba ningún tipo de transfusión y el 18 de Febrero de 2009 fue dado de alta.

Hay que hacer constar que este tipo de tratamiento génico fue posible con la aprobación en España de la ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida, que abrió paso a esta nueva opción terapéutica. Esta ley fue muy criticada por la jerarquía católica y dos años después, en diciembre de 2008, Ricardo Blázquez, vicepresidente de la Conferencia Episcopal, señaló que las técnicas aprobadas suponen «fabricar personas».

¿Cuál es la situación actual sobre la utilización clínica de la terapia génica?

¿Por qué el desarrollo de la terapia génica tropieza con diversas dificultades?

Los investigadores y clínicos se preguntan la razón de por qué se han obtenido resultados tan limitados y sugieren que se debe a varios factores:

1. Los vectores utilizados no son satisfactorios y deben mejorar sus características, entre ellas las de conseguir que sean capaces de interactuar específicamente con las células diana.
2. La regulación de la expresión de los genes una vez transferidos a las células objeto de la terapia presenta problemas no solucionados.
3. Desconocemos los mecanismos que permiten a las células del cáncer evadir la respuesta inmune.
4. Algunas enfermedades monogénicas implican más de un órgano o tejido, complicando los mecanismos de transferencia del gen.
5. Las pruebas clínicas se realizan generalmente con pacientes en procesos terminales, con pocas esperanzas de sobrevivir con las terapias convencionales.
6. Las empresas farmacéuticas tienen más interés en su utilización en enfermedades como el cáncer debido a que el número de pacientes con enfermedades hereditarias es relativamente modesto para la inversión a realizar.

Debemos considerar que hace bastante más de dos décadas que se iniciaron los primeros trabajos y que hasta el año 2010 no hubo terapia génica alguna aprobada ni en los EEUU ni por las autoridades de la Unión Europea.

Terapia génica del cáncer

A pesar de lo dicho anteriormente, muchos de los tratamientos de terapia génica realizados en varios países y especialmente en los EEUU se han orientado no a curar defectos genéticos heredados sino a eliminar diversos tipos de cáncer. Las primeras pruebas para curar el cáncer mediante terapia génica se iniciaron en la última década del siglo pasado y las pruebas realizadas tuvieron como objetivo asegurarse de la aplicabilidad de la técnica en el tratamiento de una amplia variedad

de tipos de cáncer. Entre éstos se encuentran el de mama, de ovario, renal, colorectal, de pulmón y melanoma maligno.

Varias han sido las estrategias utilizadas por los grupos de investigación implicados y que pueden resumirse en las siguientes:

1. Modificar las células del tumor para que aumente su respuesta inmunogénica.
2. Insertar genes supresores del tumor dentro de las propias células del cáncer.
3. Incorporar genes a las células cancerosas que produzcan toxinas que provoquen su destrucción.
4. Insertar genes suicidas en las células del cáncer.
5. Evitar la expresión de los oncogenes insertando genes antisentido.

Aunque actualmente no se ha conseguido curar cáncer alguno a través de estas técnicas, los resultados obtenidos dan esperanza de que su curación pueda conseguirse en el futuro.

Grupos españoles trabajando en terapia génica

Entre los grupos españoles debemos reseñar el coordinado por Juan A. Bueren del CIEMAT (Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas) en colaboración con el University College de Londres, el Hospital Vall d'Hebron de Barcelona y el Hospital Niño Jesús de Madrid. Dicho grupo se encuentran trabajando en la utilización de células pluripotentes inducidas (iPS) y con ellas han demostrado por primera vez que células somáticas procedentes de pacientes con anemia de Fanconi se pueden reprogramar, previa corrección de su defecto genético, para generar células iPS (Rio, *et al.*, 2012).

El proceso consiste en extraer células hematopoyéticas del paciente y corregir el gen alterado mediante un vector adecuado. Las células, una vez corregido el gen, se infunden para que produzcan los distintos linajes sanguíneos. El vector que se utiliza en estos tratamientos es un lentivirus modificado adecuadamente.

Entre los objetivos generales del proyecto descrito se encuentran:

1. Generación de células iPS corregidas genéticamente, tanto de modelos animales como de pacientes con enfermedades genéticas del sistema hematopoyético e inmune.
2. Desarrollo de condiciones optimizadas que permitan la diferenciación linfo-hematopoyética de células iPS corregidas genéticamente.
3. Desarrollo de métodos de generación y diferenciación de células iPS compatibles con su aplicación clínica.

Otro ensayo de terapia génica ha sido diseñado por Fátima Bosch, del centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica de la Universidad Autónoma de Barcelona, y está orientado al tratamiento de la mucopolisacaridosis de tipo IIIA (MPSIIIA). Ésta es una enfermedad rara, que implica al depósito lisosomal y es causada por mutaciones en el gen de la sulfamidasa. La acumulación de glicosaminoglicanos en el interior de los lisosomas se asocia a una neurodegeneración severa, así como a cambios patológicos en órganos periféricos que conducen a la muerte de las personas afectadas durante la adolescencia y de la que actualmente no hay cura.

Después de la administración sistémica de un adenovirus (AAV9) que codifica la sulfamidasa bajo el control de un promotor ubicuo, los autores han conseguido la expresión del gen terapéutico en el cerebro y en los órganos periféricos de ratones machos y hembras. Esta expresión fue acompañada por la normalización de los niveles de almacenamiento de glicosaminoglicanos en la mayoría de los órganos periféricos. La corrección de fenotipo de la enfermedad dio como resultado un aumento notable de la supervivencia de los ratones tratados. Este trabajo de investigación se realiza en colaboración con los laboratorios Esteve.

En la clínica Universitaria de Navarra se trabaja la profiria aguda intermitente, una patología poco frecuente que afecta al metabolismo.

Manuel Ramírez, del Hospital Niño Jesús de Madrid, en colaboración con Ramón Alemany, han modificado varios tipos de virus y determinado su capacidad para multiplicarse en diversas líneas de células del neuroblastoma y con ello provocar su lisis (oncolisis) (García-Castro, *et al.*, 2010). Los autores destacan los resultados obtenidos con un adenovirus que ha inducido la lisis esperada y confirman que aunque no han realizado este tipo de experimentos a nivel clínico los resultados obtenidos son esperanzadores y abren una nueva vía para su desarrollo clínico (Ramírez, *et al.*, 2010). Esta línea de investigación fue aprobada en su día por la Agencia Española del Medicamento.

Diversos autores piensan que, después de un periodo de luces y sombras, los éxitos recientes en el tratamiento de enfermedades desbastadoras como la β -talasemia o la ceguera hereditaria o diversas enfermedades de sistema inmunitario parece permiten vislumbrar una nueva era en la utilización de la terapia génica para solucionar definitivamente esas enfermedades incurables.

ARN antisentido y triplices

La enfermedad se produce en algunos casos porque las proteínas se expresan en gran cantidad o sin el control adecuado, así:

1. La sobreexpresión de citocinas en algunos sistemas patológicos agravan la enfermedad primaria.
2. La expresión de oncogenes conduce a la formación de tumores

En estos casos en los que se ha perdido la regulación de la expresión de algunos genes, ésta puede reducirse o incluso bloquearse mediante técnicas “antisentido”.

Esta línea de obtención de fármacos se basa en utilizar como dianas, no a las proteínas responsables de las enfermedades, sino a los ácidos nucleicos que las codifican.

Con las estrategias basadas en ARN antisentido y triplices se intentan diseñar drogas que se unan a sitios escogidos de los ácidos nucleicos (ARN y ADN) que dirigen la síntesis de las proteínas relacionadas con la enfermedad. Este tipo de terapia no se basa en el bloqueo de las proteínas que pudieran ser defectuosas sino que impiden su síntesis.

El tratamiento con oligonucleótidos de ARN antisentido se basa en el hecho de que si estas moléculas se unen con sus complementarias de ARN mensajero, se bloquea la maquinaria celular encargada de traducir éste último en la proteína codificada.

En el caso de triplices, el bloqueo se produce antes de la síntesis del ARN mensajero. Son oligonucleótidos que detienen la transcripción (proceso de síntesis del ARN mensajero a partir de ADN cromosómico) porque se unen a la doble hélice del ADN formando una triple hélice. Estas estrategias pudieran ser utilizadas ampliamente para inhibir la expresión de oncogenes en tumores o para combatir las infecciones virales de las que actualmente no tenemos buenas drogas.

Las estrategias actuales que utilizan cadenas de ARN antisentido y formación de triplices deben mejorarse, pero los resultados obtenidos sugieren que estos fármacos llegarán a constituir el tratamiento ordinario de algunas enfermedades de las que carecemos de otras terapias.

Es importante reseñar que el 26 de Agosto de 1998 se aprobó por el FDA el primer medicamento basado en la técnica antisentido. Este medicamento, cuyo nombre comercial es Vitravene, tiene como componente un nucleótido de 21 unidades de fosfortiolato cuya secuencia es:



Este medicamento se usa en el tratamiento de la retinitis producida por citomegalovirus en enfermos de SIDA y actúa inhibiendo la replicación del virus ya que su secuencia es complementaria a una región temprana del virus. Mediante este procedimiento se inhibe la transcripción de varios mRNA necesarios para la replicación del virus.

Identidad conceptual entre terapia génica y los procedimientos tradicionales utilizados en el tratamiento de enfermedades

El tratamiento de las anemias por transfusión de las células rojas de la sangre es una forma de terapia conocida por todos. Éste fue, desde el punto de vista histórico, el primer tipo de trasplante que se realizó con éxito, y existen pocos argumentos éticos contra su utilización. Un nuevo procedimiento de terapia experimental es el trasplante de médula ósea. En los casos en que las células productoras de hemoglobina son genéticamente defectuosas y médula ósea del tipo adecuado puede ser trasplantada al paciente, es de esperar que las células de la médula trasplantada proliferen normalmente y sintetizen la hemoglobina que el paciente era incapaz de producir.

De nuevo no se plantean problemas éticos especiales contra el trasplante de la médula ósea. Una etapa lógicamente posterior en el tratamiento de las hemoglobinopatías va a ser la que utilice genes normales de la hemoglobina aislados en vez de células enteras del donante. Esta técnica no se diferencia conceptualmente del uso de trasplantes de médula ósea. Desde este punto de vista la terapia con genes no representa más que el desarrollo natural de una técnica que se produce por incremento de nuestro conocimiento sobre los mecanismos de la enfermedad. La reacción de la sociedad ante este tipo de terapia debe ser muy limitada si se explica que la misma no supone una ruptura radical con las técnicas tradicionalmente utilizadas. Aunque el uso del ADN en este tipo de terapia no produce problemas éticos adicionales, éstos se pueden provocar si no se realizan de acuerdo a principios racionales. Se necesita una experimentación muy elaborada en animales de tal manera que cuando se realice la prueba en el hombre, la probabilidad de éxito sea muy elevada. Otro factor a considerar antes de introducir la nueva terapia es la gravedad del enfermo. Con pacientes leves uno dudaría en introducir una terapia completamente nueva en la que los efectos secundarios no son conocidos. Sin embargo, en enfermos muy graves, uno puede ser menos dubitativo, particularmente si el paciente se encuentra en las últimas etapas de la enfermedad y no existen tratamientos alternativos. Grandes científicos como Jenner y Pasteur realizaron los primeros tratamientos en enfermos con viruela y rabia sin sujetarse a las precauciones que actualmente se toman con las nuevas técnicas terapéuticas. Ambos tuvieron éxito y han salvado muchísimas vidas. Actualmente recordamos sus éxitos, pero debemos de reconocer que no era seguro que los individuos vacunados por ellos no sufrieran efectos secundarios importantes. Sin embargo, la falta de técnicas alternativas hacían tales tratamientos altamente aconsejables. La situación actual con respecto a la terapia génica en células somáticas es extraordinariamente parecida. Las reglas por las que se rige la investigación en humanos son muy estrictas y se basan en el respeto a la dignidad del hombre. Sin embargo, debemos pensar que un exceso de conservadurismo puede retrasar o incluso prevenir la introducción de tratamientos

que pueden resultar extraordinariamente eficaces. Esperemos, por tanto, que este conservadurismo no imposibilite la introducción de las nuevas técnicas que con gran imaginación se están desarrollando y cuya finalidad es la prevención o el tratamiento de las enfermedades del hombre.

“La terapia génica ofrece la posibilidad de equipar al organismo del propio paciente con la capacidad para sintetizar las drogas requeridas por él mismo. Podemos concluir lógicamente que la terapia génica ofrece el potencial de convertir en obsoletos muchos de los preparados farmacéuticos actualmente en el mercado. La tecnología de los ácidos nucleicos tendrá, sin ninguna duda, la más profunda influencia en la práctica de la medicina molecular” (Walsh, 2003).

Olimpiada genética

Con referencia a los problemas éticos que la utilización de la terapia génica puede originar me gustaría llamar la atención sobre lo que puede ocurrir entre los deportistas de alta competición.

En algunas bases de datos se incluyen los polimorfismos y sabemos que son unos doscientos genes los que influyen en características como la potencia, la resistencia o la masa muscular y que los que condicionan la velocidad o la resistencia no son los mismos. Hay grupos sociales que han recibido, a través de la evolución, los genes de la velocidad por lo que pueden ser grandes velocistas; otros, sin embargo, han heredado mayor resistencia a la fatiga y pueden correr el maratón.

El *Homo sapiens*, según diversos autores, se encuentra cerca de sus límites biológicos y biomecánicos en el deporte de alta competición. Así que para seguir mejorando récords indefinidamente solo hay dos alternativas: el dopaje químico o manipular algunos genes clave responsables en parte del rendimiento deportivo, a través de lo que podemos denominar “dopaje genético”. La proteína α -actinina-3 es responsable de que los músculos se contraigan enérgicamente y los individuos que poseen el polimorfismo R577X en las dos copias del gen que la codifica son incapaces de sintetizarla por lo que su aptitud como velocistas es limitada. En Jamaica, y específicamente en la población negra afroamericana, ocurre lo contrario y la α -actinina-3 se sintetiza en más cantidad y es precisamente donde se encuentran los campeones de esta especialidad atlética.

En condiciones limitantes de oxígeno, como ocurre cuando nos trasladamos a una ciudad muy elevada como México capital o más aún cuando nos vamos a los Andes, el organismo reacciona fabricando más eritropoyetina. Semenza y colaboradores descubrieron una proteína, que llamaron el Factor de Inducción de Hipoxia (FIH), que es responsable de la regulación de la expresión del gen de la eritropoyetina (EPO) (Manalo *et al.*, 2005). Es evidente que un FIH hiperactivo sería ideal para los

deportistas de élite, incluyendo los corredores de maratón. Si se pudiera actuar sobre el factor de inducción de la hipoxia para activar la producción de la EPO sería maravilloso para el tratamiento de ciertas enfermedades, pero peligroso para el deporte, sería un dopaje genético indetectable. Una empresa de California, los laboratorios FibroGen, tienen en fase 1 de experimentación un medicamento contra la anemia llamado PHD-I FG-2216 (inhibidor de la prolil-hidroxilasa, cuya función es suprimir el FIH) y ha probado que suministrado oralmente incrementa la síntesis endógena de EPO. Desde el punto de vista del dopaje en el deporte su toma sería indetectable ya que es exactamente igual a la que sintetiza el organismo.

Algunos especialistas suponen que es probable que ya se esté utilizando por algunos deportistas en sustitución de la EPO sintética, que es detectable en la actualidad.

Pero hay más, se supone que en un futuro próximo lo que se producirá es la transferencia directa a los deportistas de más de un gen incluyendo el de la EPO. "Las olimpiadas mejoradas genéticamente están al llegar« (Enriquez and Gullans, 2012).

Se ha descrito que el 94% de los sherpas del valle de Katmandú en Nepal, poseen el alelo I del gen *ACE* (enzima conversor de la angiotensina), alelo que no es frecuente en otras poblaciones. Los escaladores que poseen este alelo tienen más facilidad para realizar la escalada de los 8.000 metros que sus colegas con otros alelos. Éste es uno de los genes importantes para los deportes de resistencia.

Hoy se calcula, como se ha dicho más arriba, que unos 200 genes son responsables de los mecanismos biológicos básicos implicados en los distintos deportes; sabemos, además, que entre los participantes en las Olimpiadas la dotación genética es desigual y la pregunta que se desprende es la siguiente: ¿Se deberán conocer las características de determinados genes de los atletas previamente a las competiciones deportivas y celebrar éstas exclusivamente entre aquellos dotados con atributos genéticos similares?

TERAPIA GÉNICA EN CÉLULAS GERMINALES Y CIGOTOS

Los desarrollos técnicos confirman que no sólo las células somáticas pueden ser manipuladas genéticamente sino que esta manipulación es posible también en el caso de cigotos y células germinales. En 1982 el gen que codifica la hormona de crecimiento de la rata fue introducido mediante microinyección en el pronúcleo masculino de un cigoto de ratón poco después de su fecundación. Algunos de los ratones obtenidos sintetizaron posteriormente la hormona del crecimiento codificada por el gen de la especie donadora. Además, en algunos casos, el gen foráneo

se incorporó en las células germinales, detectándose en ratones de las generaciones siguientes. Actualmente, las técnicas de introducción de genes foráneos, a nivel de cigoto se han mejorado sustancialmente y pueden diseñarse mecanismos para insertar genes específicos en cromosomas determinados. Sin embargo, esto no es suficiente, pues la expresión de los genes foráneos debe ser, además, la adecuada, ya que la producción excesiva de una proteína puede provocar desequilibrios biológicos importantes. Como puede deducirse de lo anterior, y aun sabiendo que falta mucho por hacer, estos experimentos demuestran que es posible la manipulación genética de los cigotos de los mamíferos.

Las aplicaciones prácticas de estas técnicas pueden ser muy importantes en ganadería, ya que algunas características resultan de gran interés comercial como es el crecimiento rápido o la producción de gran cantidad de leche y ya han sido introducidas en animales mediante la manipulación de los cigotos correspondientes. Actualmente, y con esos fines, el suministro de la hormona del crecimiento o de la prolactina se realiza directamente a los animales y podría evitarse este suministro mediante incorporación de los genes correspondientes a huevos fertilizados.

¿Cuál es la situación en el hombre? Actualmente es difícil visualizar la aplicación de éstas técnicas en el hombre, ya que la manipulación de cigotos y embriones humanos requeriría conocimientos de los que hoy carecemos, por los que las posibilidades reales se encuentran todavía en el campo de la hipótesis. Sin embargo, los estudios realizados indican que la manipulación genética a nivel de las células germinales o del cigoto es posible y algunos autores apuntan que la manipulación genética de ovocitos antes de ser fecundados eliminarían los problemas éticos relacionados con la manipulación de embriones.

LA SOCIEDAD ANTE LA TERAPIA GÉNICA EN CÉLULAS GERMINALES

La modificación de la información genética, a nivel de células germinales o cigotos, debe verse con preocupación. Como he dicho anteriormente, la modificación del genoma humano puede ser éticamente tolerable cuando esté orientada a la eliminación de características patológicas y se realice a nivel de células somáticas. Dado que algunas enfermedades pueden diagnosticarse durante las primeras etapas del desarrollo del embrión (anemia falciforme, etc.) e incluso antes, en las células germinales de los progenitores y la introducción de modificaciones genéticas a este nivel constituye una ruptura cualitativa con los tipos de terapia utilizados hasta ahora y que afecta a las generaciones futuras. Muchos investigadores creen que aun cuando puede pensarse en los grandes beneficios que podrían derivarse de la terapia génica en estos casos, reservas muy importantes y discusiones públicas serán necesarias antes de que estas técnicas puedan ser aplicadas.

Se piensa que cada persona tiene el derecho fundamental a que su genoma sea inviolable y que este derecho debe ser protegido de manera eficaz universalmente. La Convención Europea de Derechos Humanos reconoció en su sesión del 2 de Enero de 1982 «el derecho de cada individuo a una herencia genética libre de cualquier forma de manipulación sobre su ADN». Este reconocimiento se otorgó basándose en aspectos legales, éticos y sociales y supone, en opinión de muchos, un derecho de rango superior al de la procreación.

Con todo, este criterio tan absoluto no es mantenido unánimemente por todos los científicos y la división existente en este campo fue ya indicada por el Office of Technology Assessment del Congreso de los EEUU en un estudio publicado dos años después, en 1984. Además, este criterio coincide con el del Prof. Marciano Vidal, teólogo redentorista y Catedrático de la Universidad de Madrid, que en su obra *Bioética*, publicada ya en 1998, dice: «la terapia genética es un medio mucho más humano que las alternativas que se ofrecen para curar enfermedades hereditarias: no atender al recién nacido que viene con taras hereditarias, provocar el aborto eugénico, impedir drásticamente la procreación a tarados, etc.». Podríamos pensar por ello, que la terapia génica a nivel de cigoto en casos de trastornos biológicos extremos como los que afectan a diversos órganos, pudiera ser éticamente aceptable siempre y cuando no se persigan otros fines que los de evitar o aliviar la enfermedad. Una situación semejante sería la actuación a nivel de células germinales a fin de eliminar la transmisión en determinadas familias de genes defectuosos como los de la hemofilia, la enfermedad de Lesch-Nyhan, etc. En estos casos, lo único que se persigue es el interés del hijo, que debe primar por encima de cualquier otra consideración.

Algunos científicos opinan que la acumulación de genes defectuosos puede tener efectos negativo, “disgénéticos», graves sobre el futuro de la especie y que la Medicina se ha vuelto en contra suya al haber hecho desaparecer la selección natural.

Una situación a considerar sería la referente a la acumulación de genes defectuosos debido a los tratamientos médicos y medidas de salud pública, que, según algunos autores, parece recomendar algún tipo de terapia génica. Pero creo que en estas situaciones todas las intervenciones en el patrimonio genético del hombre deberían respetar absolutamente la dignidad personal, la unicidad del individuo y «no atentar contra la unidad de la especie humana como proyecto integral» (Vidal, 1998); sería también necesario un seguimiento exhaustivo a través de comisiones independientes del cumplimiento de estos fines para evitar cualquier intervención de naturaleza eugenésica. Pero hay científicos que opinan que en un futuro más o menos próximo será posible modificar nuestro patrimonio genético de una manera aún más substancial: “La posibilidad de convertirnos en dioses ya es una realidad. La sustitución definitiva de la selección natural por la selección técnica puede ser posible durante el transcurso del tercer milenio. El proceso que

progresivamente nos aleja de la madre naturaleza –para convertirla en hija nuestra– nos conduce a la pérdida de su tutela y puede convertirnos en huérfanos o creadores, todo depende de los planteamientos y de la capacidad de los humanos de responsabilizarnos de nuestro destino” (Carbonell y Sala, 2003).

Los científicos deben elevar su voz para denunciar los problemas que puedan derivarse del uso indebido de la manipulación genética del hombre y además deben oír la opinión de la Sociedad antes de utilizar este tipo de innovaciones. A fin de ser capaces de tomar decisiones sabias e informadas en estos problemas, la sociedad debe tener conocimientos básicos sobre la Biología Humana incluyendo su Genética. Esto significa que es necesaria una educación adecuada a todos los niveles desde los más elementales hasta la Universidad. Cursos adecuados, exentos de aspectos técnicos, sobre Biología en general y Genética en particular y sus implicaciones, deben desarrollarse en las Facultades Universitarias independientemente de su orientación científica y profesional. Decisiones que no se encuentren correctamente informadas pueden impedir el desarrollo de innovaciones discutibles pero no peligrosas.

La revolución biológica basada en la manipulación del ADN se encuentra entre nosotros desde hace menos de 70 años y la sociedad difícilmente ha captado todo el impacto potencial que tiene. Cuanto más aprendamos acerca del ADN y de la Genética del hombre más problemas pueden surgir si no tenemos una idea clara de sus implicaciones.

Como dijo François Jacob: «El hombre, con la acumulación de conocimientos, ha llegado a ser el primer producto de la evolución capaz de controlarla. No solamente la de los otros seres, favoreciendo las especies que le interesan y eliminando las que le molestan, sino también la suya propia» (Jacob, 1973). Es precisamente esta capacidad de dirigir su propia evolución la que está produciendo reacciones particularmente intensas en algunos grupos sociales y la preocupación que se siente entre líderes sociales, religiosos, políticos y gobernantes. Considero que una característica del hombre es la de poseer el programa genético más abierto y flexible de la Naturaleza. Esto le independiza de las reacciones mecánicas y obligadas que se producen en los animales y que denominamos instintos; la golondrina siempre ha fabricado y fabricará su nido del mismo modo. En el caso del hombre, su programa genético le permite una gran flexibilidad y capacidad de reacción. Posee una mente cultural, conciencia de futuro y capacidad de elección. El potencial científico en manos del hombre, es enorme pudiendo planificar el futuro de la Humanidad, ya que tiene capacidad de elección. Si elige correctamente, ésta le conducirá hacia su felicidad; en caso contrario hacia su destrucción. El progreso de la «Ciencia», es decir, el aumento del conocimiento de las reglas por las que se rige la Naturaleza, por sí mismo no valora o establece la bondad del fin en que se emplee este conocimiento.

Las instituciones científicas como nuestra Real Academia, las Universidades, los centros de investigación, y en general personas cultas de las sociedades democráticas deben favorecer el uso de las nuevas tecnologías del ADN de una manera responsable y confío en que el hombre sepa elegir sabiamente su futuro para que nos conduzca a nosotros, a nuestros hijos, y a los hijos de nuestros hijos, hacia un mundo más feliz, por libre, justo y fraterno, que en el que hoy vivimos.

He dicho

BIBLIOGRAFÍA

- Agencia EFE. 213. Bill Gates y Carlos Slim unen sus fortunas para erradicar la polio. *Elespectador* .com, 25 de Abril 2013. <http://www.elespectador.com/noticias/salud/articulo-418301-bill-gates-y-carlos-slim-unen-sus-fortunas-erradicar-polio>.
- Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S. *et al.* 2013. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science* 341:1233151. doi: 10.1126/science.1233151. Epub 2013 Jul 11. PMID:23845947.
- Asgarian-Omran H, Amirzargar AA, Arjmand M. *et al.* 2013. Expression, purification and characterization of three overlapping immunodominant recombinant fragments from *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *Avicenna J Med Biotechnol.* 5, 20-28.
- Australian Medicines Handbook (AMH). 2004. ISBN 0-9578521-4-2.
- Bian G, Joshi D, Dong Y. 2013. *Wolbachia* invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to *Plasmodium* infection. *Science.* 340, 748-751. doi: 10.1126/science.1236192.
- Biffi A, Montini E, Lorioli L. *et al.* 2013. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science.* 341, 1233158. doi: 10.1126/science.1233158.
- Blatter J, 2013. «Lionel Messi es el mejor futbolista del mundo». *larepublica.pe*. Consultado el 1 de enero de 2013.
- Boch, J. 2011. «TALEs of genome targeting». *Nature Biotechnology* 29,135–136. Doi:10.1038/nbt.1767.PMID 21301438.
- Brazeau P, Vale W, Burgus R, Guillemin R. 1974. Isolation of somatostatin (a somatotropin release inhibiting factor) of ovine hypothalamic origin. *Can J Biochem.* 1067-7102.
- Brockmüller JV, Tzvetkov MV. 2008. Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *Eur J Clin Pharmacol.* 64, 133–157.
- Bu Z, Callaway DJ. 2011. «Proteins MOVE! Protein dynamics and long-range allostery in cell signaling». *Adv Protein Chem Struct Biol.* 83, 163–221. doi:10.1016/B978-0-12-381262-9.00005-7. ISBN 978-0-123-81262-9. PMID 21570668.
- Calvert N, Ashton JR, Garnett E. 2013. Mumps outbreak in private schools: public health lessons for the post-Wakefield era. *Lancet* 38,1625-1626. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60953-60958.

- Carbonell E y Sala R. 2003. Aún no somos humanos: propuesta para la humanización del tercer milenio. Ed. Quinteto.
- Cooper CL, Angel JB, Seguin I. 2008. CPG 7909 adjuvant plus hepatitis B virus vaccination in HIV-infected adults achieves long-term seroprotection for up to 5 years. *Clin Infect Dis.* 46, 1310-1314. doi: 10.1086/533467.
- D'Argenio DA, Wilson CB. 2010. A decade of vaccines: Integrating immunology and vaccinology for rational vaccine design. *Immunity* 33, 437-440
- Draper SJ, Cottingham MG, Gilbert SC. 2013. *Vaccine* 31, 4223-4230. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.05.091. Epub 2013 Jun 5. PMID: 23746455.
- Droll K, Bruce-Mensah K, Otton SV, *et al.* 1998. Comparison of three CYP2D6 probe substrates and genotype in Ghanaians, Chinese and Caucasians. *Pharmacogenetics* 8, 325-333.
- Enriquez J, Gullans S. 2012. Olympics: Genetically enhanced Olympics are coming. *Nature.* 487:297. doi: 10.1038/487297a.
- FAO-WHO (Food and Agriculture Organization – World Health Organization). 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.
- Fynan EF, Webster RG, Fuller DH. *et al.* 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 11478-11482.
- Gaedigk A, Bradford LD, Marcucci KA, Leeder JS. 2002. Unique CYP2D6 activity distribution and genotype-phenotype discordance in black Americans. *Clin Pharmacol Ther.* 72, 76-89. doi:10.1067/mcp.2002.125783. PMID 12152006.
- García-Castro J, Alemany R, Cascalló, M. *et al.* 2010. Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study. *Cancer Gene Ther.* 17, 476-483. doi: 10.1038/cgt.2010.4.
- Genentech Press Release. «University of California and Genentech settle patent infringement lawsuits». Genentech Inc. Retrieved 18 October 2012.
- Gibson GR, Probert HM, Loo JV. *et al.* 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev.* 17, 259-275. doi: 10.1079/NRR200479.
- Grice EA, Segre JA. 2011 . The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol.* 9, 244-253.
- Human Microbiome Project Consortium. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486, 207-214. doi: 10.1038/nature11234.

- Human Microbiome Project Consortium 2012. A framework for human microbiome research. *Nature*. 486, 215-221. doi: 10.1038/nature11209.
- International Agency for Research on Cancer. 2011. Agents classified by the IARC monographs, Volumes 1–100. Retrieved November 15, 2011.
- Isalan M, Lemerle C, Michalodimitrakis K, *et al.* 2008. Evolvability and hierarchy in rewired bacterial gene networks. *Nature* 452, 840-845. doi: 10.1038/nature06847.
- Itakura K, Hirose T, Crea R. 1977. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* 198, 1056-1063.
- Jackson DA, Symons RH, Berg P. 1972. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 69, 2904-2909.
- Jacob F. 1973. La lógica de lo viviente. Una historia de la herencia. Editorial Laia. Barcelona.
- Jenner E. 1801. The origin of the vaccine inoculation. Shury, London, UK.
- Kastenmüller K, Espinosa DA, Trager L, *et al.* 2013. Full-length *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein administered with long-chain poly(I-C) or the Toll-like receptor 4 agonist glucopyranosyl lipid adjuvant-stable emulsion elicits potent antibody and CD4+ T cell immunity and protection in mice. *Infect Immun*. 81,789-800. doi: 10.1128/IAI.01108-12. Epub 2012 Dec 28. PMID:23275094.
- Koff WC, Burton DR, Johnson PR, *et al.* 2013. Accelerating next-generation vaccine development for global disease prevention. *Science* 340, 1232910. doi: 10.1126/science.1232910.
- Kulkarni V, Rosati M, Valentin A. 2013. HIV-1 p24^{gag} Derived Conserved Element DNA Vaccine Increases the Breadth of Immune Response in Mice. *PLoS One*. 8, e60245. doi: 10.1371/journal.pone.0060245. Epub 2013 Mar 28.
- Laparra JM, Olivares M, Gallina O, Sanz Y. 2012. *Bifidobacterium longum* CECT7347 modulates immune responses in a gliadin-induced enteropathy animal model. *PLoS ONE* 7: e30744.
- Laparra JM, Sanz Y. 2010. Bifidobacteria inhibit the inflammatory response induced by gliadins in intestinal epithelial cells via modifications of toxic peptide generation during digestion. *J Cell Biochem*. 109, 801-807.
- Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. 1998. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 279, 1200–1205.

- Ley, R. E. Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. 2006. Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023.
- Lowy DR, Schiller JT. 2006. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Investigation* 116,1167–1173.
- Madigan M T. 2012. Brock biology of microorganisms,13th ed. San Francisco: Benjamin Cummings. ISBN 9780321649638.
- Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, *et al.* 2005. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 105, 659–669.
- McLellan RA, Oscarson M, Seidegård J. *et al.* 1997. Frequent occurrence of *CYP2D6* gene duplication in Saudi Arabians. *Pharmacogenetics* 7, 187–191. doi:10.1097/00008571-199706000-00003. PMID 9241658.
- Meyer J, McShane H. 2013. The next 10 years for tuberculosis vaccines: do we have the right plans in place? *Expert Rev Vaccines*. 12,443-451. doi: 10.1586/erv.13.19.
- Moriel DG, Bertoldi I, Spagnuolo A, *et al.* 2010. Identification of protective and broadly conserved vaccine antigens from the genome of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 107:9072-9077.
- Moutaftsi M, Peters B, Pasquetto V. *et al.* 2006. A consensus epitope prediction approach identifies the breadth of murine T(CD8+)-cell responses to vaccinia virus. *Nat Biotechnol.* 24, 817-819). 10.1038/nbt1215pmid:16767078 doi:10.1038/nbt1215_
- Moutaftsi M, Bui HH, Peters B. *et al.* 2007. Vaccinia virus-specific CD4+ T cell responses target a set of antigens largely distinct from those targeted by CD8+ T cell responses. *J Immunol.* 178, 6814-6820 . 17513729pmid:17513729.
- Nathan DM. 1993. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 328,1676–1685.
- Nayyar GML, Breman JG, Newton PN, Herrington J. 2012. Poor-quality antimalarial drugs in southeast Asia and sub-Saharan Africa. *Lancet Infectious Diseases* 12,488–496. doi:10.1016/S1473-3099(12)70064-6.
- NIH HMP Working Group. 2009. The NIH Human Microbiome Project. 2009. *Genome Res.* 19, 2317-2323.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 55, 74-108.
- Parmiani G, De Filippo A, Novellino L, Castelli C. 2007. Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. *The J Immun.* 178, 1975–1979.

- Pineiro M, Asp NG, Reid G. 2008. FAO Technical meeting on prebiotics. *J Clin Gastroenterol*.42 Suppl 3, S156-159. doi: 10.1097/MCG.0b013e31817f184e.
- Pizza M, Scarlato V, Masignani V, *et al.* 2000. Identification of vaccine candidates against serogroup *B meningococcus* by whole-genome sequencing. *Science* 287,1816-1820.
- Porter FE. 1987. Bioethics. *J Biol Response Mod.* 6, 369-374.
- Raghavendra K, Barik TK, Reddy BP. *et al.* 2011. «Malaria vector control: From past to future». *Parasitology Res.* 108, 757–779. doi:10.1007/s00436-010-2232-0. PMID 21229263.
- Ramirez M, García-Castro J, Alemany R. 2010. Oncolytic virotherapy for neuroblastoma. *Discov Med.* 10, 387-393.
- Raoult D. 2009. Probiotics and obesity: a link? *Nature Rev Microbiol.* 7, 616.
- Rappuoli, R. 2000. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol.* 3, 445-450. 10.1016/S1369-5274(00)00119.
- Ridaura VK, Faith, JJ, Rey FE, *et al.* 2013. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 341 no. 6150. September . DOI: 10.1126/science.1241214.
- Río P, Agirre X, Garate L. 2012. Down-regulated expression of hsa-miR-181c in Fanconi anemia patients: implications in TNF α regulation and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 119, 3042-3049. doi: 10.1182/blood-2011-01-331017.
- Roses AD. 2000. «Pharmacogenetics and the practice of medicine». *Nature* 405, 857–865. doi:10.1038/35015728. PMID 10866212.
- Roy P, Noad R. 2012. Use of bacterial artificial chromosomes in baculovirus research and recombinant protein expression: current trends and future perspectives. *ISRN Microbiol.* 2012:628797. doi: 10.5402/2012/628797.
- Rowland R, Pathan AA, Satti I. *et al.* 2013. Safety and immunogenicity of an FP9-vectored candidate tuberculosis vaccine (FP85A), alone and with candidate vaccine MVA85A in BCG-vaccinated healthy adults: a phase I clinical trial. *Hum Vaccin Immunother.* 9, 50-62. doi: 10.4161/hv.22464. Epub 2012 Nov 10.
- Ruzo A, Marcó S, García M. *et al.* 2012. Correction of pathological accumulation of glycosaminoglycans in central nervous system and peripheral tissues of MPSIIIA mice through systemic AAV9 gene transfer. *Hum Gene Ther.* 23,1237-1246. doi: 10.1089/hum.2012.029. Epub 2012 Oct 17.
- Seder RA, Chang LJ, Enama ME, *et al.* 2013. Protection Against Malaria by Intravenous Immunization with a Nonreplicating Sporozoite Vaccine. *Science* [Epub ahead of print].PMID: 23929949.

- Sette A, Rappuoli R. 2010. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity* 33, 530-541.
- Sherry ST, Ward MH, Kholodov M. 2001. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 29:308–311. doi:10.1093/nar/29.1.308.
- Tang DC, DeVit M, Johnston SA. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356, 152–154.
- Testa F, Maguire AM, Rossi S., *et al.* 2013. Three-year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno-associated virus in patients with Leber congenital Amaurosis type 2. *Ophthalmology.* 2013 Jun;120(6):1283-91. doi: 10.1016/j.ophtha.2012.11.048. Epub 2013 Mar 6. PMID: 23474247
- Tettelin H, Medini D, Donati C, Masignani V. 2006. Towards a universal group B *Streptococcus* vaccine using multistrain genome analysis. *Expert Rev Vaccines* 5, 687-694. Review. PMID: 17181441.
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T. *et al.* 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480–484.
- Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, *et al.* 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259, 1745–1749.
- U.S. Centers for Disease Control and Prevention. 2005. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Part 1: immunization of infants, children, and adolescents. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 54(No. RR–16), 1–31.
- Vidal M. 1998. *Bioética: Estudios de bioética racional*. Editorial Tecnos.
- Wild S, Roglic G, Green A, *et al.* 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047-1053.
- Villa-Komaroff L, Efstratiadis A, Broome S. 1978. A bacterial clone synthesizing proinsulin. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 75, 3727-3731.
- Virgin HW, Todd JA. 2011. Metagenomics and personalized medicine. *Cell* 147, 44-56. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.009.
- Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R. 2009. Redefining chronic viral infection. *Cell* 138, 30-50. doi: 10.1016/j.cell.2009.06.036.
- Wakefield AJ, Murch SH, Anthony A. 1998. Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children. *Lancet.* 351, 637-41. Retraction in: *Lancet* 2010, 375, 445.

- Walsh G. 2003. Biopharmaceutical benchmarks. *Nat Biotechnol.* 21, 865-870. Erratum in: *Nat Biotechnol.* 2003, 21, 1396.
- Walsh G. 2004. *BIOPHARMACEUTICALS. Biochemistry and biotechnology*, 2^o edition, John Wiley & Son Ltd., Chichester, England.
- Watson JD, Crick FH. 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171,737-738.
- Webster DE, Thomas MC. 2012. Post-translational modification of plant-made foreign proteins; glycosylation and beyond. *Biotechnol Adv.* 30, 410-418. Epub 2011 Aug 3.
- Wild S, Roglic G, Green A. 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047-1053.
- Woese CR, Fox GE. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74, 5088-5090.

CONTESTACIÓN DEL EXCMO. SR. D. CÉSAR NOMBELA CANO AL
DISCURSO DE INGRESO COMO ACADÉMICO DE NÚMERO DEL
EXCMO. SR. D. RAFAEL SENTANDREU RAMÓN,

LEÍDO EL 14 DE NOVIEMBRE DE 2013

EN LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA, MADRID.

Excelentísimo Señor Presidente
Excelentísimas Señoras y Señores Académicos
Autoridades
Señoras y Señores

SEMBLANZA DEL PROFESOR SENTANDREU

Me cabe el honor y la satisfacción de dar la bienvenida al Excelentísimo. Señor Don Rafael Sentandreu Ramón, como nuevo miembro de número de esta Real Corporación, contestando a su discurso de ingreso. Es un grato deber que cumpla con mucho gusto, tras haber avalado recientemente su presentación como candidato para ocupar la medalla 18, que tan dignamente desempeñara el Excelentísimo Señor Don Guillermo Tena Núñez.

Primeros trabajos

Como nada mejor para referirse a la obra de un científico que recoger alguna de sus aportaciones relevantes, comenzaré con el párrafo siguiente:

Nuestros resultados indican que el gluco-péptido portador del manano de la pared celular de la levadura contiene dos tipos de enlaces péptido-carbohidrato. Uno de ellos conecta numerosas unidades de monosacáridos o disacáridos al péptido mediante uniones glucosídicas con los grupos hidroxilo de la serina o la treonina, mientras que el otro une el manano altamente ramificado, de elevado peso molecular, al péptido, tratándose probablemente de un enlace nitrógeno-glucosídico entre N-acetilglucosamina y aspartamida [N-(β-aspartil)-p-D-(N-acetil)glucosaminido]. Es probable que las tres fracciones glucopeptídicas (fracciones A, B y C) y el manano de levadura, que se aíslan de la pared celular, constituyan tres formas de degradación de la compleja estructura glucoprotéica de la pared.

Sentandreu, R y Northcote, D.H. *Biochemical Journal* **109**, 419 (1968).

Hasta aquí la cita de uno de los primeros trabajos del nuevo académico. Como todos los trabajos seminales, es decir, fecundos por lo que son capaces de generar, el que acabo de citar constituía una de las primeras descripciones químicas de componentes de la pared celular de células microbianas eucarióticas, que abría un notable campo, un campo nuevo que, por cierto, continúa de actualidad. De hecho, a pesar de haber sido publicado en 1968, este artículo que menciono sigue siendo citado a día de hoy.

Conocí al Profesor Sentandreu durante mi período doctoral en la Universidad de Salamanca, en el Departamento de Microbiología que fundara el Profesor Julio R Villanueva. Nuestro académico se incorporaba por entonces al centro salmantino tras dos estancias de intenso trabajo investigador postdoctoral, en el Reino Unido y en Estados Unidos. De las primeras cosas que recuerdo de él, es precisamente su interés por profundizar en estudios de glicoproteínas; una motivación científica muy acertada, como el tiempo había de confirmar con creces. Hoy constatamos que estas proteínas covalentemente modificadas representan componentes esenciales de todo tipo de células, con implicaciones muy variadas en fenómenos de reconocimiento bioquímico y con consecuencias fundamentales para la biología de las mismas. Mi encuentro con nuestro académico, en las circunstancias que comento, sería el inicio de una amistad basada sobre todo en los ideales científicos y académicos compartidos. Una entrañable amistad que igualmente me vincula con la Dra. María Victoria Elorza, Toyi, su mujer y más constante colaboradora, que tanto significa también para quienes nos sentimos amigos y compañeros de ambos.

Nada mejor para entender la trayectoria vital de cualquier persona que contextualizar –orteguianamente– sus resultados en las circunstancias que le ha tocado vivir. De ahí es de donde mejor puede deducirse el mérito de sus esfuerzos merecen, en este caso los de nuestro nuevo académico, en pro de la Ciencia y la Universidad. Rafael Sentandreu se licenció en Farmacia en la Universidad de Barcelona. Pronto se habría de incorporar a un puesto en la industria farmacéutica, pero este interés inicial daría paso enseguida a su verdadera y definitiva vocación: la investigación y la docencia universitarias. Comenzó entonces a recorrer el largo y trabajoso camino que exige el consolidar con solidez una formación doctoral y postdoctoral. Fue su incorporación al grupo del Profesor Julio R Villanueva lo que le introdujo en los estudios básicos de la célula microbiana, en este caso de especies eucarióticas que habían de constituir el objetivo permanente de sus investigaciones. Profundizar en la relación estructura-función ha sido la base de su trayectoria investigadora. Es decir entender e interpretar la fenomenología biológica, a partir las aproximaciones que los datos y observaciones que la metodología experimental disponible permite obtener. Y han sido ya varias las etapas recorridas por el Dr. Sentandreu en su destacada trayectoria académica y científica.

Tras su doctorado en Madrid, en el núcleo que promoviera el Prof. Villanueva, siempre con la colaboración de la Dr. García Acha, Rafael Sentandreu llevó a cabo dos estancias postdoctorales con excelentes resultados que habían de configurar su actividad ulterior. En la Universidad de Cambridge –¡nada menos!–, de la mano del Profesor Northcote, alcanzó un segundo doctorado y se pudo centrar en las glicoproteínas de la pared celular, entre ellas los componentes complejos de la pared celular de la levadura, realizando hallazgos pioneros. A continuación, se trasladó a la Universidad de Rutgers (New Jersey, USA), precisamente al instituto de Microbiología que llevaba el nombre del premio nobel Waksman, uno de los grandes pioneros en el descubrimiento de antibióticos, que añadió los aminoglucósidos a la lista de antimicrobianos de origen natural. En el Instituto Waksman, colaborando con el Dr. Lampen, nuestro nuevo académico proyectó su experiencia en bioquímica microbiana en aspectos funcionales propios de una biología celular microbiana. Centrándose en los procesos de construcción de la pared celular de la levadura pudo mostrar la implicación de componentes intermediarios, de naturaleza de lípidos complejos, en la biosíntesis del componente de manano de las glicoproteínas de la pared celular. Fue ese otro hallazgo que lo situó en la vanguardia de estudios funcionales de la pared celular de la levadura.

Catedrático de Microbiología

Tras regresar a España, en 1972, ya como miembro de la plantilla del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Rafael Sentandreu alcanzó en no mucho tiempo la condición de catedrático de Microbiología y pudo ocupar en 1978 una cátedra en la entonces joven Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia. Se puede decir que el destino se alió para que el Dr. Sentandreu, tras años de preparación, tras una extensa experiencia en otros centros de Europa y Estados Unidos, pudiera asentarse definitivamente en su tierra valenciana, oportunidad que ciertamente agradeció y supo aprovechar. Yo recuerdo esos sus primeros años en la Universidad de Valencia, en que pudo hacer valer su autoridad científica y su sólida preparación para movilizar notables recursos y lograr el equipamiento necesario para sus investigaciones. Eran logros de los que teníamos noticia sus amigos que trabajamos en Madrid y que recibíamos con frecuencia sus visitas. Como también recuerdo el privilegio que suponía visitar Valencia con Rafael y Toyi como anfitriones.

Contextualicemos de nuevo lo que supuso el acceso del catedrático Sentandreu a su desempeño en la Universidad de Valencia. A los comienzos de la década de los ochenta, la Microbiología, como disciplina científica, iniciaba lo que Schaechter ha denominado su tercera edad de oro. Es la etapa en la que aún nos encontramos, caracterizada por un enfoque ecológico-evolutivo y unas posibilidades metodológicas notables. De hecho, la filogenia molecular revolucionaba en

esos momentos nuestra perspectiva sobre la emergencia y evolución de las primeras formas de vida en la tierra, proponiendo la separación temprana de los tres grandes troncos (bacterias, archaeas, eucariotas). Emergía, además, un nuevo concepto de microorganismo patógeno, inherente a las estirpes capaces de interactuar con el organismo animal, en función de propiedades que se podían caracterizar como factores de virulencia. Los avances en Ingeniería Genética (IG) determinaban ya la utilización de los microbios como factorías celulares, porque la nueva Biotecnología era ya una realidad para beneficio de la producción de fármacos, como se nos acaba de mostrar en el excelente discurso.

Pero, también quedaba claro, en esos momentos que ahora evocamos, que no estábamos a salvo de nuevas, y desconocidas, infecciones; la emergencia en aquel entonces del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), así lo ponía de manifiesto. Aunque también se demostraba que los instrumentos para su caracterización, la de cualquier patógeno que surgiera resultaban potentes y precisos, mucho más que lo habían sido en el pasado reciente. Así se puso de manifiesto por aquella época, con la emergencia de la *Legionella*, en 1976, o del mencionado VIH a finales de los 70. Pronto se pudieron conocer detalles de la Biología y patogenicidad de estos microbios. Además, la expansión en horizontal de la IG permitía ya empezar a hablar de secuenciación de genomas, incluido el genoma humano, meta que para ser conquistada precisaba el pasar primero por el genoma de organismos sencillos, los microbios.

Creador de escuela en Valencia

Esa era la situación de la Microbiología como disciplina, en la transición de los 70 a los 80, cuando el Profesor Sentandeu se incorpora a su cátedra de la Universidad de Valencia. Por lo que respecta a nuestro país podemos decir que la Microbiología española crecía (exponencialmente), con la configuración de departamentos nuevos en universidades, al tiempo se especializaba (grupos transversales –virus, bacterias, eucariotas–, por aplicaciones –clínica, industrial, alimentaria–, por metodologías –sistemática, molecular–, etc.). La producción científica microbiológica española se revelaba como notable en Europa (en muchas revistas europeas, sólo detrás de Reino Unido, Alemania y Francia), al tiempo que diversas empresas internacionales identificaban a España como país de notable desarrollo de los estudios microbianos.

No son ajenas estas circunstancias, las que describo para nuestro país, al hecho de que el cultivo de la Microbiología tuviera desde muchos años antes una notable pujanza en las facultades de Farmacia, ni al influjo ejercido por la escuela promovida por el Profesor Villanueva, en Madrid y en Salamanca, en épocas en que la movilidad del profesorado era una realidad. Por aquel entonces se consolidaron

la especializaciones farmacéuticas de carácter sanitario, los licenciados en Farmacia empezaron poder obtener la titulación de farmacéutico especialista en Microbiología y Parasitología, un proceso en el que el nuevo académico y quien les habla empeñamos esfuerzos e iniciativas.

Rafael Sentandreu desde Valencia pudo proseguir una extensa e intensa labor que sin duda ha contribuido notablemente a configurar el panorama de la investigación y la docencia de la Microbiología en España, al tiempo que ha logrado una notable proyección internacional. La calidad y coherencia de su trabajo científico convirtió al grupo de Sentandreu en una referencia internacional, en lo que respecta al conocimiento de aspectos fundamentales de la Biología de las levaduras, en especial de la envoltura celular externa, la pared celular, una estructura tan esencial para la morfogénesis el desarrollo y la interacción con el medio ambiente cualquier microorganismo.

Tratando de sintetizar el conjunto de los trabajos de tanto tiempo, señalamos dos aspectos en los que consultar la bibliografía de Sentandreu y colaboradores resulta obligado para abarcar el acervo de conocimiento acumulado:

- Uno es el de la biogénesis de la pared celular de los hongos, a través de estudios centrados en hongos unicelulares o dimórficos. Sus estudios sobre secreción de proteínas, así como su modificación covalente a través de complejos procesos de glicosilación, todos ellos esenciales para su incorporación y ensamblaje a una estructura que se ha de mantener íntegra a lo largo de todo su desarrollo, para asegurar la viabilidad de la célula. Todo un bloque de conocimientos que proporciona las claves para plantear la inhibición por parte de agentes capaces de bloquear la biogénesis de dicha pared y, por tanto, la posibilidad de diseñar estrategias para el desarrollo de antifúngicos.
- El otro aspecto, estrechamente relacionado con el primero, es la definición de este tipo de procesos en un hongo dimórfico, capaz por tanto de desarrollarse como organismo unicelular de forma oval, pero también de crecer en forma de hifas, características de los hongos filamentosos. La generación de la estructura de la pared celular en *Candida albicans*, la especie a la que me refiero, ha sido estudiada también bajo la óptica del carácter patógeno de esta especie. En especial la caracterización inmunológica de muchos de sus componentes tiene el interés adicional de contribuir a definir las bases de la interacción hospedador-patógeno, así como disponer de materiales, como anticuerpos monoclonales, con aplicaciones también para el diagnóstico.

Son estudios que el grupo de Sentandreu hizo posibles al utilizar las metodologías más avanzadas, en especial la caracterización de genes, incluso en la escala

genómica, abarcadora de totalidad de dotación genética de cualquier organismo, así como las estrategias proteómicas que permiten definir y caracterizar conjuntos de proteínas de los organismos, o subconjuntos de gran interés como las proteínas de la pared celular. Son investigaciones que han continuado hasta el momento generando resultados y avances en el conocimiento de fenómenos de interés para la Biología microbiana y sus aplicaciones.

Una destacada trayectoria

Una dedicación tan plena e intensa a la universidad y la investigación, como la que ha caracterizado al Profesor Sentandreu, había de materializarse en resultados propios de una auténtica creación de escuela. Sirva para glosarlos, el siguiente resumen:

Ha dirigido 42 tesis doctorales. Entre sus discípulos se encuentran 10 catedráticos, un full professor en los EEUU, 2 catedráticos más surgidos de entre los posdoctorales incorporados a su grupo de investigación y varios Profesores Titulares de Universidad. Ha servido en los consejos de redacción de varias revistas internacionales, entre ellas *Current Microbiology* (Springer-Verlag), *Cell Biology Reviews* (Springer International y Universidad del País Vasco), *Revista Iberoamericana de Micología* y *Revista Mexicana de Microbiología* (1992-).

Como miembro de la International Yeast Commission ha participado en la definición y ejecución mundial de muchas de las iniciativas de colaboración internacional en su campo de investigación. Igualmente, se ha responsabilizado de la organización de diversos congresos nacionales e internacionales.

Su extensa experiencia en la evaluación de proyectos de investigación, tanto en evaluación individual como en paneles de priorización, se ha extendido largos años; puestos a destacar, señalemos su pertenencia al jurado del Plan de Biología Molecular y sus aplicaciones de la Fundación Juan March (1981-88) y a la Comisión "Collaborative Research Programmes" de la Organización del Tratado del Atlántico Norte (OTAN), Bruselas (1988-1991), entre otras muchas actividades que llevaron a asesorar como evaluador de numerosos proyectos nacionales e internacionales.

Generaciones de farmacéuticos formados en la Facultad de Valencia han estudiado Microbiología con los profesores integrantes de su grupo. E igualmente hay que destacar sus aportaciones a la profesión como miembro de la Comisión Nacional de Microbiología y Parasitología del Consejo Nacional de Especializaciones Médicas (1980-1984), miembro de la Comisión Promotora de la Comisión Nacional de Microbiología y Parasitología de Farmacéuticos Especialistas (1984-1989), asesor de la Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios del Ministerio de Sanidad y Consumo (1989-92) y miembro de diversas comisiones de la Real Farmacopea Española.

De gran relevancia son también sus servicios científicos en el ámbito de la Comunidad Autónoma de Valencia como Vocal del Consejo de Política Científica y Tecnológica de la Generalitat Valenciana (1989-1994), Consejero de Número de la Institución Valenciana de Estudios e Investigación (1988-1993), y, en especial, Presidente Ejecutivo de la Fundación Valenciana de Investigaciones Biomédicas y Presidente de su Comité Científico. Generalitat Valenciana y Caja de Ahorros de Valencia (1991-1993) y Director de la Fundación Valenciana de Investigaciones Biomédicas, Instituto de Investigaciones Citológicas (Generalitat Valenciana y Bancaja) (1993-1995).

Esta semblanza no quedaría completa sin señalar que el Profesor Sentandreu ha publicado 27 capítulos de revisión en libros de la especialidad y más de 170 artículos en revistas internacionales. También ha desarrollado modelos de utilidad como el kit BICHRO-LATEX CANDIDA, con la empresa Fumouze Diagnostics, 26, rue des Frères Chausson, 92600 Asnières, Francia, que utiliza el anticuerpo monoclonal 3H8 desarrollado por su grupo de investigación y el convenio es administrado por la Universidad de Valencia; y la patente que corresponde a la Universitat de València de una micromatriz que contiene todo el genoma de *Candida albicans* (6039 genes) como uno de los resultados del trabajo realizado por el Consorcio Europeo NOVEL APPROACHES FOR THE CONTROL OF FUNGAL DISEASE (QLK2-CT-2000-00795) del que formó parte. La empresa que construye las micromatrices es Eurogentec S.A. Liege Science Park, 4102 Seraing, Bélgica.

Comentarios al discurso: la racionalidad biológica

Los años 50 del pasado siglo presenciaron el triunfo de la Biología experimental. La Bioquímica de enzimas había proporcionado infinidad de datos sobre cómo estas enzimas catalizan miles de reacciones químicas de las células. Pero, cabía aspirar entonces a una comprensión global, integrada, de los fenómenos biológicos en lo que tienen de valor general aplicable a todos los seres vivos. Elaboraciones teóricas, como la doble hélice de Watson y Crick (1953), o formulaciones posteriores como la de Jacob y Monod sobre el mensajero, o la propuesta de Crick de que el código genético se organizaba en tripletes, permitían avanzar explicaciones con esa vocación de interpretación global.

La lógica del avance investigador imponía verificar, comprobar, en definitiva, demostrar experimentalmente la validez de muchas de estas formulaciones. Las síntesis de ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN) en el tubo de ensayo, llevadas a cabo por primera vez por Ochoa y Kornberg respectivamente, representan algunos de esos momentos estelares en que la experimentación biológica conduce a resultados de validez universal. Desde entonces se pudo hablar de disponer de una piedra Rosseta, es decir, un conjunto de claves para in-

terpretar los, hasta entonces, enigmas biológicos y así poder explicar –racionalmente– los fenómenos que muestran cómo es la vida biológica. Se ha dicho que con el conocimiento del ADN, efectivamente, la racionalidad pudo ser parte integrante de las explicaciones sobre los seres vivos.

Esa misma racionalidad aplicada a la experimentación se fue ampliando en todas sus posibilidades. La Biología Experimental triunfó con el desarrollo de la Biología Molecular, y su posterior progreso fue imparable, al abordar la comprensión, el control y la modificación del funcionamiento de los seres vivos. El avance en el conocimiento integrado de la información (ADN, ARN) y su relación con la funcionalidad (proteínas) fue decisivo. La Biología, como “conocimiento”, devino pronto en “intervención”, que eso es la moderna Biotecnología, la posibilidad de intervenir en los seres vivos, modificando sus características de manera permanente.

La Biotecnología irrumpe en la Farmacia

De las posibilidades, pasadas, presentes y futuras, que tiene esa Biotecnología intervencionista, nos acaba de hablar el Dr. Sentandreu, bajo el prisma de su impacto en la Farmacia. Apenas tres décadas han transcurrido desde que algunas células microbianas, y también de otros organismos, empezaran a convertirse, gracias a la IG, en factorías celulares que proporcionan proteínas idénticas a las que el organismo humano produce y utiliza por su acción hormonal. A pesar del corto tiempo transcurrido –las tres décadas que menciono– ha sido tal el progreso que ya nos hemos acostumbrado a razonar que es posible disponer de una cantidad ilimitada de fármacos “biológicos” que la tecnología del ADN recombinante nos puede proporcionar. Una vez identificadas las bases de ciertas patologías, así como la acción de sustancias biológicas para atajarlas, caben pocas dudas de que se podrá seguir ampliando ese arsenal de fármacos biológicos, de calidad farmacéutica, cuya única limitación estará en hacer compatible su eficacia con una adecuada tolerancia.

A partir la disertación del académico al que hoy recibimos, podemos reflexionar sobre lo que han supuesto los desarrollos subsiguientes al de las hormonas, entre ellos los de antígenos utilizables para vacunación, o productos inmunomoduladores cuyo impacto en el manejo de diversas patologías autoinmunitarias, tan patente ya en muchos casos, está aún por calibrar en toda su extensión.

El campo de los anticuerpos monoclonales para su aplicación terapéutica se nos revela tan amplio, casi ilimitado, como diversa es la enorme cantidad de especificidades que pueden generarse en el repertorio de la respuesta inmunitaria. Son ya bastantes los anticuerpos monoclonales introducidos en Farmacia gracias a la Biotecnología, pero se puede decir que el campo apenas está en su infancia, nos esperan muchos más logros en este terreno que irán floreciendo, como ya de hecho ocurre.

Sin embargo, los desafíos a los que se puede enfrentar la Biotecnología, basada en las claves que la piedra Rosetta nos abrió, para un manejo racional de los sistemas biológicos, no sólo siguen siendo amplios, sino que se ensanchan. Si grandes han sido los logros a través de la introducción de proteínas recombinantes, también las limitaciones se mantienen en otros frentes, tras reiterados intentos. Pensemos por ejemplo en la terapia génica, una estrategia que se pudo formular también hace las mismas tres décadas, pero que sigue pendiente de soluciones prácticas que hagan posible la corrección de alteraciones genéticas en las células mediante la introducción del gen funcional, que corrija o sustituya al mutante.

He aquí un ejemplo de limitaciones con las que no se contaba al comienzo de la andadura de la Tecnología del ADN recombinante. Podemos entender que introducir un gen funcional, en una célula, supone mucho más que administrar un simple reactivo. Se trata de generar una modificación que, para ser adecuada, tiene también que producirse de forma regulada, en ese microcosmos que constituye cada célula, integrada en el macrocosmos del organismo del que forma parte.

Por ello, la disertación del Profesor Sentandreu nos introduce finalmente en los territorios que caracterizan a la Biomedicina actual. Podemos aspirar a mucho más que a entender y manejar fenómenos aislados. Se puede plantear el abarcar la complejidad biológica, integrando los datos –los que se generan en trillones de unidades de información– en una imagen coherente de los sistemas biológicos. De ahí el término Biología de Sistemas, como aspiración a convertir la información, los datos, en conocimiento aplicable, es decir en modelos que integren esa información de manera coherente. Y que nos permitan, más pronto que tarde, lograr las aplicaciones que cabe esperar de la aproximación farmacogenética y farmacogenómica, términos que ya forman parte de nuestro lenguaje pero que han de desarrollarse con intensidad y amplitud. Y, dada la especialización que comparto con el nuevo académico, no debo dejar de mencionar sus referencias al microbioma humano un campo del que semanalmente aprendemos nuevos datos que integran a la microbiota de nuestro organismo, en una auténtica visión funcional de las bases de nuestra salud. Y que nos acercan cada día más a verdaderas intervenciones basadas en estos conocimientos.

Para concluir, Señor Presidente, quisiera glosar la alusión a la ética que forma parte del discurso del Profesor Sentandreu. Capacidades, como las que se derivan del conocimiento alcanzado, ponen en manos del hombre la realización de intervenciones insospechadas hasta hace no mucho. Es tal el poder y las posibilidades suscitadas que la reflexión bioética ha de acompañar a la Humanidad durante el resto de tiempo que le queda de existencia. Sin duda, esa reflexión sobre el bien obrar ha de estar impregnada de la sabiduría que posibilite el adecuado discernimiento. Para eso están las reales academias, para cultivar el saber que se deriva del dominio del conocimiento científico. El sabio renacentista valenciano –

como el Prof. Sentandreu– Juan Luis Vives, tan estudiado por otro sabio español, Marcelino Menéndez Pelayo, que da nombre la universidad que en estos momentos tengo el honor de regir, pudo afirmar: *muchos habrían podido llegar a la sabiduría si no se hubiesen creído ya suficiente sabios*. Al recibir al Doctor Rafael Sentandreu Ramón, entre los miembros de número de esta Real Corporación, podemos felicitarnos porque su aportación, sin duda sabia, contribuirá al esfuerzo en pro de la tarea académica que tiene lugar en los muros de esta casa, y en el espacio virtual que de ella se deriva. Excelentísimo Señor Don Rafael Sentandreu, sea usted muy bienvenido.

He dicho

