

HOMENAJE A
PEDRO GARCÍA BARRENO

**PAZ Y BIEN
LA BIOMEDICINA EN ESPAÑA**

Editores:
Jesús Ávila
Joan J. Guinovart
M^a Teresa Miras

Madrid 2010

ISBN: 978-84-937389-1-4
Depósito legal: M. 52.763-2009
Impreso por:
REALIGRAF, S. A.
Pedro Tezano, 26
28039 Madrid

ÍNDICE

Relación de Participantes	7
Introducción, Jesús Ávila, Joan J. Guinovart y M.^a Teresa Miras	11
Prólogo, Margarita Salas	13

Autores

Por orden alfabético

Que la enfermedad no nos haga olvidar a los buenos amigos, Jesús Ávila	17
Del frío al dolor, Carlos Belmonte	23
Anemia de Fanconi: Avances en la Investigación de una enfermedad poco prevalente, Juan Antonio Bueren.	37
La Vacuna contra el SIDA, Mariano Esteban	49
Las neuronas tienen un caballo de Troya, Joan J. Guinovart	65
La terapia para la enfermedad de Parkinson, José López Barneo	73
Pedro García Barreno: la Medicina, la Ciencia y la Vida, Carlos López Otín	79
Pedro García Barreno un pionero de la medicina traslacional, María Teresa Miras	87
Pedro García Barreno, maestro y amigo, Francisco Moreno	111
La Biología Sintética, Luis Serrano Pubull	113
Respuesta, Pedro García Barreno	117

RELACIÓN DE PARTICIPANTES



JESÚS ÁVILA
Profesor de Investigación CSIC,
Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa»
Académico de Número de la RAC



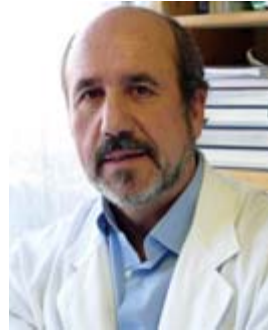
CARLOS BELMONTE
Catedrático Universidad Miguel Hernández (CSIC)
Instituto de Neurociencias de Alicante
Académico de Número de la RAC



RAFAEL BENJUMEA
Miembro de la Fundación Marcelino Botín



JUAN ANTONIO BUEREN
Investigador CIEMAT, Madrid
Académico Correspondiente RANF



MARIANO ESTEBAN RODRÍGUEZ
Profesor de Investigación CSIC
Académico de Número
de la RANF



JOAN J. GUINOVART
Catedrático Universidad de Barcelona
Institute for Research in Biomedicine
(IRB Barcelona)
Académico de Número
de la RANF



JOSÉ LÓPEZ BARNEO
Catedrático Hospital Universitario Virgen
del Rocío de Sevilla
Académico Correspondiente de la RAC



CARLOS LÓPEZ OTÍN
Catedrático Universidad de Oviedo
Académico de Número de la RAC



FRANCISCO MORENO
Director de Transferencia Tecnológica
de la Fundación Marcelino Botín



M.ª TERESA MIRAS PORTUGAL
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular
de la UCM
Académica de Número de la RANF



MARGARITA SALAS
Profesor de Investigación CSIC, Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa»
Académica de Número de la RAC y la RAE



LUIS SERRANO PUBULL

Profesor de Investigación ICREA, Centro
de Regulación Genómica de Barcelona
Académico Correspondiente de la RAC



PEDRO GARCÍA BARRENO

Catedrático Universidad
Complutense de Madrid
Académico de Número de la RAC y la RAE

INTRODUCCIÓN

Este libro es parte del homenaje que queremos hacer, en sus 66 años, a un gran médico y científico, del que estamos orgullosos porque, además, es amigo nuestro.

Cuando lo comentamos a colegas, conocidos y demás, todos estuvieron de acuerdo en lo merecido del gesto, preguntando si acaso porqué no lo habíamos hecho antes. Muchas de esas personas ofrecieron, además, sumarse al homenaje a Don Pedro. Sin embargo, como para muestra vale un botón, nos pareció mejor que un grupo, no muy numeroso participara en la confección de este libro, que sirve de botón de muestra del homenaje. El criterio seguido para elegir a los autores fue el de seleccionar personas con una vinculación de índole científica con la Fundación Botín y que fueran, además, miembros de alguna Real Academia. Es obvio que podríamos haber escogido cualquier otro criterio, pero seguimos este.

En el libro, homenajeamos a Don Pedro, contando nuestra actividad científica, en parte llevada a cabo gracias a su ayuda, pues pensamos que en el reconocimiento a un científico debe de haber Ciencia.

Por otra parte, hemos dejado en blanco unas páginas por si, en una posterior edición, Pedro quisiera contestarnos a todos, independientemente de que hayan o no contribuido a este libro.

J. ÁVILA, J. J. GUINOVART Y M.^a T. MIRAS

PRÓLOGO

MARGARITA SALAS

En mi contestación al discurso de Pedro García Barreno con motivo de su ingreso en la Real Academia Española yo decía de Pedro: «Es un hombre polifacético... un gran trabajador de conocimientos amplísimos».

En este Prólogo al libro homenaje que le dedican amigos del mundo científico, entre los que me incluyo, quiero dejar constancia, aunque sea de forma breve, del por qué de dicha afirmación.

Pedro García Barreno es madrileño y se educó en el Colegio Decroly, situado enfrente de su casa, donde un profesor, Felipe González Ruiz, influyó de un modo importante en toda su carrera. Curiosamente, no era la Medicina la vocación de Pedro. El quería ser piloto de aviación, lo que consiguió obteniendo el título de piloto C de plata de vuelo sin motor y de piloto civil. Pero el azar interviene en nuestras vidas y así lo hizo en la de Pedro. Tras un encuentro con un antiguo compañero del colegio, éste le convenció para estudiar Medicina. Apoyado por Amador Schüller, trabajó como alumno interno en el Hospital Provincial, incorporándose al Servicio de Cirugía dirigido por Pedro Gómez.

De nuevo el azar le hizo conocer a Ángel Martín Muncio, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular en la Facultad de Químicas de la Universidad Complutense y Pe-

dro, ávido de nuevos conocimientos, cursó los estudios correspondientes a esta especialidad.

Pero volvió a la Cirugía, marchándose primero a Inglaterra y después a Estados Unidos para especializarse en distintos aspectos de la Cirugía y realizar su Tesis Doctoral que presentó a su regreso a España en 1973 y mereció el Premio Extraordinario.

En Madrid se incorporó al Hospital Provincial como médico adjunto en el Servicio de Cirugía General, realizando visitas frecuentes al M. D. Anderson Cancer Center de la Universidad de Texas en Houston.

Simultáneamente, se reencontró con Municio, con quien le unió una entrañable amistad, siendo durante ocho años Profesor encargado de Fisiopatología Molecular en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

También conoció a Alberto Dou, Catedrático de Ecuaciones Diferenciales de la Facultad de Matemáticas de la Universidad Complutense, estudiando durante cinco años ecuaciones y filosofía de la ciencia. Fue Profesor invitado en dicho Departamento y Lecturer de Filosofía en el Imperial College de Londres.

En julio de 1982 se inaugura la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental en el Hospital Gregorio Marañón, dirigida por García Barreno, proyecto en el que estuvieron implicados Eladio Viñuela y Juan Antonio Manzanares, importantes artífices del Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa». Esta Unidad fue pionera en los hospitales de nuestro entorno y Pedro pudo realizar la ya acuñada medicina traslacional. Las actividades fundamentales de Pedro García Barreno en dicha Unidad fueron: el estudio de las bases fisiopatológicas y bioquímicas de la enfermedad, la asistencia mecánica circulatoria, que dio lugar a la creación de un ventrículo artificial, las técnicas de imagen médica, y la prevención de metabolopatías congénitas.

En la actualidad Pedro García Barreno es Catedrático de Fisiopatología y Propedéutica Quirúrgicas en la Facultad de

Medicina de la Universidad Complutense, y Jefe del Departamento de Medicina y Cirugía Experimental en el Hospital Gregorio Marañón, del que fue su Director médico. Además, es consejero científico de la Fundación «Marcelino Botín». Desde 1983 es académico de número de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y desde 2006 lo es de la Real Academia Española. En el periodo 1996-2003 fue Secretario General del Instituto de España, cargo que, puedo dar fe de ello, ejerció con gran eficacia y exquisita sensibilidad.

Su actividad investigadora queda reflejada en un centenar de publicaciones en revistas internacionales, y su interés en la difusión de la ciencia se plasma en los varios cientos de artículos de divulgación publicados en el suplemento cultural de ABC, así como en los libros «La ciencia en tus manos», «Cincuenta años de doble hélice», «Medicina virtual», «Claude Bernard-Introducción a la Medicina experimental», y «De póquinas y chips», entre otros.

Pero después de este recorrido breve a través de su carrera profesional, donde se demuestra el hombre polifacético que es, quisiera detenerme, para finalizar, en su humanidad y su generosidad.

Pedro García Barreno está allí donde le necesitas, dispuesto a ayudar generosamente, sin recibir ni pedir nada a cambio.

Amigo entrañable de Eladio, juntos realizaron diversos proyectos, entre los que me gustaría citar la granja de «mini-pigs». Yo puedo decir que «heredé» la fraternal amistad que le unía a Eladio.

Para mí, Pedro ha sido más que un amigo: ha sido la persona que siempre ha estado dispuesta a ayudarme y a darme su acertado consejo.

De todo corazón, muchas gracias, Pedro.

QUE LA ENFERMEDAD NO NOS HAGA OLVIDAR A LOS BUENOS AMIGOS

JESÚS ÁVILA

Aunque la imagen externa de los investigadores en Biomedicina suele ser positiva, no es difícil encontrar entre ellos personajes soberbios, egoístas y con algún otro pecado capital, o con una cierta mezquindad. Varios de estos individuos no sirven sino se sirven de la ciencia para trepar y satisfacer sus ambiciones. Es por ello destacable encontrar en la profesión al científico cabal, prudente y generoso que da la paz y disfruta haciendo el bien. El paradigma de este científico es Pedro García Barreno que siempre ha mostrado un tremendo interés y curiosidad por el trabajo realizado en España en biomedicina.

En este capítulo me gustaría dedicar al Profesor García Barreno un comentario sobre la enfermedad de Alzheimer, e incluso me voy a atrever a comentar una nueva hipótesis sobre el desarrollo de la enfermedad.

La enfermedad de Alzheimer es una demencia senil que afecta, en los países del denominado primer mundo, a alrededor del 1 al 1,5 % de la población total, como generalmente no se inicia antes de los 60 años de edad, ya que el mayor riesgo para la enfermedad es la edad. Alrededor de un 5% de la población entre 65 y 75 años la padece, y casi la mitad de la población mayor de 85 puede estar afectada.

La enfermedad tiene dos fases una en la que aparece un déficit cognitivo, con pérdida de memoria, y otra en que la capacidad intelectual del afectado se reduce de tal manera que le impide desarrollar su vida social y profesional, esta fase de desorientación, es la fase de demencia. En esta segunda fase el paciente requiere de la ayuda de cuidados y cuidadores cuyo coste medio calculado en la Unión Europea es de alrededor de 20.000€ por año y enfermo (1).

La enfermedad de Alzheimer fue descrita por Alois Alzheimer en 1906 correlacionando la demencia de una paciente con la presencia en su cerebro, tras realizar la autopsia, de una gran muerte neuronal y de dos estructuras aberrantes; las placas seniles y los ovillo neurofibrilares, que hoy conocemos tienen como componentes fundamentales al péptido beta amiloide, un fragmento de la denominada proteína precursora del amiloide; y (los ovillos) a la proteína asociada a los microtúbulos conocida como proteína tau. Esta proteína está hiperfosforilada en los ovillos neurofibrilares (2).

Lo que observó Alzheimer en la autopsia era el estado final de la enfermedad. Sin embargo, poco se conoce de cuál es el origen del proceso que conduce a dicho fin. Para conocer el origen de diferentes procesos neurodegenerativos se ha venido utilizando la genética ya que casi todos estos procesos pueden dividirse en dos tipos; los de origen familiar (genético) o los de origen esporádico. En el caso de la enfermedad de Alzheimer los casos de origen familiar son menos del 1% del total, sin embargo, el estudio de estos casos ha indicado que la aparición de la enfermedad de Alzheimer de origen familiar se debe a la mutación en uno de los siguientes genes: app, ps-1 o ps-2. El gen app codifica por la proteína APP, que cuando se fragmenta por dos proteasas (secretasas) denominadas β y γ secretasa da lugar al péptido beta amiloide, componente mayoritario de las placas seniles. Por otra parte, los genes ps-1 y ps-2 codifican a las proteínas presenilina 1 y presenilina 2, que tienen actividad γ secretasa. Las mutaciones en APP, que daban lugar a la aparición de la

enfermedad, facilitan el corte de la proteína APP favoreciendo la aparición del péptido beta amiloide, mientras que las mutaciones en ps-1 o ps-2 generalmente daban lugar a una ganancia de función de actividad γ secretasa, lo cual también favorecía la formación del péptido beta amiloide. Como en todos estos casos parecía que se favorecía la presencia de dicho péptido, se postuló que el inicio de la enfermedad se relacionaba con la presencia de dicho péptido. Sin embargo, estudiando la relación entre cantidad de péptido beta amiloide presente y tiempo de aparición de la enfermedad se observó que no existía una clara correlación, por lo que se sugería que la acción de las mutaciones en los genes app, ps-1 (los más frecuentes) o ps-2 podrían afectar a otros parámetros. Uno de estos parámetros es la activación de la proteína quinasa GSK3, que a su vez podría activarse en la enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico. Esta quinasa modifica a la proteína tau, hiperfosforilandola, lo cual explicaría la presencia de esta proteína modificada en los primeros estadios de la enfermedad en regiones como la hipocampal, en donde a tiempos tempranos, no hay patología de placas seniles. Curiosamente, en la región hipocampal se encuentra el giro dentado, uno de los pocos lugares del cerebro en donde hay neurogénesis, y esta neurogénesis del giro dentado se ha relacionado con aprendizaje y desarrollo de memoria a corto plazo. Este hecho podría explicar el deterioro cognitivo, con pérdida de memoria, que padecen en el inicio de la enfermedad, los pacientes de Alzheimer y que anteceden a la posterior fase de demencia que se relaciona con el deterioro de la corteza cerebral.

Basándose en estos antecedentes, se procedió a la obtención de un ratón transgénico que sobreexpresaba GSK3 en la región hipocampal y en la corteza. En este ratón se observó, como una primera característica, una clara degeneración del giro dentado que se correlacionaba con una clara pérdida de memoria (3, 4). La degeneración (o disminución en el número de neuronas) se debía además de una muerte neuro-

nal, a una neurogénesis aberrante que daba lugar a neuronas con una deficiente diferenciación, incapaz de sobrevivir, que al morir provocaban una activación de la microglia, que a su vez activaba la proliferación de nuevos precursores neuronales que volvían a diferenciarse mal y degeneraban, cerrándose así el ciclo, y produciéndose, finalmente, el agotamiento de los precursores neuronales y la desaparición, con el tiempo, del giro dentado. Como dicha degeneración del giro dentado ocurre en los pacientes de Alzheimer, en donde también se ha observado una neurogénesis aberrante en dicho giro dentado, la hipótesis que se propone es que un fallo en la neurogénesis del giro dentado está relacionado con la aparición de la patología relacionada con la pérdida de memoria encontrada en las primeras fases de la enfermedad de Alzheimer.

A nivel molecular se han estudiado los posibles sustratos que pueden ser modificados por GSK3 y que, una vez fosforilados por la quinasa, pudieran ser tóxicos para las neuronas o precursores neuronales. Se ha indicado que entre esos sustratos están la proteína tau, componente de los ovillos neurofibrilares, la proteína APP, precursora del péptido beta amiloide, la proteína beta catenina, implicada en neuroprotección, la proteína Bax-1, implicada en apoptosis y un pequeño catálogo de otras proteínas relacionadas con algunos aspectos de la patología de la enfermedad de Alzheimer. Quizás la fosforilación más estudiada, entre estas proteínas, ha sido la de la proteína tau en donde se ha analizado como afecta dicha fosforilación a la toxicidad de la proteína, a su agregación, o a su funcionalidad como proteína asociada a los microtúbulos o como reguladora del transporte axonal. Estos análisis han permitido la iniciación del análisis de posibles terapias no sólo para regular la actividad de la proteína GSK3, una proteína requerida para diversos procesos biológicos, sino también para prevenir la hiperfosforilación de la proteína tau. Obviamente, este tipo de terapia no es la única que se está actualmente estudiando sino que

existen estudios relacionados con la prevención de la patología asociada al péptido beta amiloide.

Por otra parte, para prevenir la enfermedad de Alzheimer es muy importante tener un buen diagnóstico precoz, pues cuando aparecen los síntomas como la pérdida de memoria, la zona hipocampal está gravemente dañada. Entre varios análisis de diagnóstico precoz, el más prevalente, actualmente, se basa en técnicas de imagen, como la resonancia magnética funcional (algo que bien conoce Pedro García Barreno), que podría indicar, dentro de una población asintomática, si el proceso de neurodegeneración ha comenzado ya.

Una vez que comienza, la degeneración ocurre primeramente en las capas superiores de la corteza entorrinal, después pasa al giro dentado, que, una vez dañado, propaga la patología al hipocampo, de donde se propaga el daño a la corteza. En este proceso de propagación la proteína tau (extracelular) podría estar implicada (5).

Una vez que la degeneración llega a la corteza puede afectar al lóbulo frontal, dando lugar a cambios de comportamiento, o al lóbulo parietal dando lugar a la pérdida de funciones ejecutivas. Todo ello produce la desorientación que conocemos como demencia y que es de difícil reparación.

Estos son unos breves trazos sobre la enfermedad de Alzheimer, que algún día me gustaría comentar con Pedro, más lentamente y, a lo mejor publicar juntos algo sobre ello, ya que es una persona muy culta, y a la que respeto tanto humanamente como científicamente y que, generosamente, ha realizado una importante labor en beneficio de su país. Te deseo Pedro, Paz y Bien.

Referencias

1. Ávila, J., Nitsch, R. M., Haass, C. & De Strooper, B. (2006) *Nat. Med.* 12: 776-777.

2. Ávila, J., Lucas, J. J., Pérez, M. & Hernández, F. (2004) *Physiol. Rev.* 84: 361-384.
3. Lucas, J. J., Hernández, F., Gómez-Ramos, P., Moran, M. A., Hen, R. & Ávila, J. (2001) *EMBO J.* 20: 27-39.
4. Engel, T., Hernández, F., Ávila, J. & Lucas, J. J. (2006) *J. Neurosci.* 26: 5083-5090.
5. Gómez-Ramos, A., Díaz-Hernández, M., Rubio, A., Miras-Portugal, M. T. & Ávila, J. (2008) *Mol. Cell Neurosci.* 37: 673-681.

DEL FRÍO AL DOLOR

CARLOS BELMONTE

Los homenajes suelen tener un sabor agridulce y el que ahora dedicamos a Pedro García Barreno con este libro, algunos de sus muchos amigos, no es una excepción. Representa, por un lado, el merecido reconocimiento a una personalidad excepcional en su doble faceta humana e intelectual, pero evoca, también, la conciencia del tiempo ya cumplido; más aún, cuando solo un día separa la fecha de nacimiento del homenajeado y la de quien escribe estas letras. Afortunadamente, la vigorosa personalidad de Pedro y su inacabable energía, auguran muchos años aún de disfrute de su creatividad, inteligencia y fino sentido del humor a quienes tengan la fortuna de acompañarle en ese futuro, todavía lleno de promesas que tiene ante sí.

Y como no hay mejor regalo para Pedro García Barreno que hablarle de ideas nuevas y provocativas en ciencia, comentaré en este capítulo algunos aspectos intrigantes de los mecanismos sensoriales de detección del frío, que pueden además tener importancia para entender el dolor evocado por los descensos moderados de temperatura en pacientes con neuropatías periféricas, particularmente las causadas por la cirugía o los tratamientos con derivados del platino que se aplican en algunos cánceres. El tema sirve, adicionalmente, para poner en evidencia la convicción que Pedro y yo com-

partimos, de que los descubrimientos aportados por la investigación básica son fundamentales para comprender los problemas de las patologías humanas.

Los ingeniosos fisiólogos de finales del siglo XIX (1) habían observado ya que en la piel humana, existían puntos en los que la única sensación evocable con estímulos físicos de diferente naturaleza era la de frío o la de calor. Esto les llevó a la acertada conclusión de que existían estructuras nerviosas periféricas, específicamente encargadas de la detección de cambios moderados de la temperatura cutánea. El advenimiento, unas décadas después, de técnicas de registro de fibras nerviosas aisladas, permitió identificar terminaciones nerviosas en la piel (receptores sensoriales) que disparaban trenes de impulsos nerviosos de manera rítmica a la temperatura cutánea basal de 34-35 °C. Un tipo de fibras termorreceptoras incrementaba su frecuencia de descarga cuando la piel se enfriaba (termorreceptores de frío) mientras que otras lo hacían al calentar aquella (termorreceptores de calor). El análisis más pormenorizado de las características de la descarga de estos impulsos nerviosos, estableció que los valores de temperatura vienen codificados por su frecuencia de disparo, tanto en lo que se refiere a los niveles de temperatura estática como a los cambios dinámicos de ésta. Los termorreceptores de frío descargan máximamente cuando la caída de temperatura cutánea alcanza los 29 °C, reduciendo su frecuencia con valores superiores o inferiores a éste, lo que confirmaba que esta población de termorreceptores es la encargada de detectar los descensos de temperatura de la piel y las mucosas dentro de niveles inocuos (2). En el año 1969, Perl y sus colaboradores (3) identificaron un nuevo tipo de receptor sensorial, sensible a estímulos mecánicos, calor e irritantes químicos en el rango lesivo, al que denominaron 'nociceptor polimodal'. Una fracción de los nociceptores polimodales era excitada también por el frío muy intenso que, como es bien sabido, evoca una sensación de dolor quemante, por lo que se atribuyó a los nociceptores

polimodales la señalización de las reducciones de temperatura que llegan a dañar los tejidos superficiales (4).

En consecuencia, los estudios funcionales llevados a cabo en los años 60 del siglo XX, condujeron a la interpretación general de que los estímulos de intensidad moderada eran detectados por diferentes tipos funcionales de receptores sensoriales, cada uno de ellos preferentemente sensible a una forma particular de energía. Éstos enviarían su información al sistema nervioso central a través de vías nerviosas, también específicas para cada tipo de receptor, evocando finalmente sensaciones conscientes, de tacto en el caso de los mecanorreceptores de bajo umbral y de frío o calor no dolorosos cuando se trata de termorreceptores de esa modalidad. Por otra parte, los estímulos de intensidad lesiva, mecánicos, químicos o térmicos, serían detectados por los nociceptores, que a su vez generarían, a través de sus conexiones centrales, sensaciones de dolor. Las interacciones entre estos diferentes 'canales sensoriales' se producen por vez primera en la médula espinal, en cuyas neuronas del asta posterior tiene lugar el procesamiento de la información que llega por cada vía independiente.

En las dos últimas décadas del siglo XX, las investigaciones experimentales sobre los mecanismos de transducción del dolor y la temperatura en los receptores sensoriales, se centraron en caracterizar y definir con mayor precisión a nivel electrofisiológico, las propiedades de las neuronas nociceptoras y termorreceptoras de los ganglios sensoriales, estudiando cuantitativamente sus propiedades de membrana y el patrón de descarga de impulsos nerviosos en sus terminaciones periféricas frente a estímulos de intensidad y duración variables. Tales estudios confirmaron las diferencias funcionales entre las neuronas termorreceptoras de bajo umbral y las nociceptoras, reforzando la interpretación de que, en el nivel más periférico, la transmisión de información al sistema nervioso central se produce por canales sensoriales funcionalmente distintos para la infor-

mación termorreceptora de frío inocuo, a cargo de los termorreceptores de frío y la de frío intenso, cercana a, o resultante de un daño tisular, mediada por nociceptores específicos, que constituyen un canal sensorial independiente, que evoca sensaciones de dolor (5).

En años recientes, el esfuerzo experimental en el campo de la transducción sensorial se ha dirigido prioritariamente a determinar, a nivel molecular, los mecanismos que confieren especificidad a las terminaciones sensoriales y que sustentan la detección preferente por éstas de los estímulos lesivos o inocuos, incluyendo la búsqueda de transductores moleculares para los cambios de temperatura moderados e intensos. El descubrimiento por Julius y colaboradores en 1997 (6) de un canal iónico activado por el irritante químico capsaicina, denominado TRPV1, que actuaba como receptor molecular en las neuronas nociceptoras periféricas para diferentes modalidades de estímulos nocivos (calor, protones, irritantes químico, mediadores de la inflamación), abrió el camino a la identificación posterior de otros canales, también pertenecientes a la súper-familia de canales iónicos TRP, que eran modulados por rangos muy distintos de temperatura así como por muy variados tipos de mediadores químicos (7).

En el caso del frío, el grupo de Julius identificó y clonó en 2002 (8), en paralelo con Patapoutian y cols. (9), otro canal catiónico inespecífico, el TRPM8, que se expresaba en una pequeña población de neuronas sensoriales primarias (presumiblemente las termorreceptoras de frío) y se activaba por el frío moderado (con un umbral de alrededor de 29 °C) y también por sustancias como el mentol, el eucaliptol o la icilina, bien conocidas por su capacidad para evocar sensaciones de frescor cuando se aplican a la piel o las mucosas en humanos. Un año más tarde, Patapoutian y cols. descubrían un canal diferente, el TRPA1, que además de ser activado por una gran variedad de sustancias irritantes volátiles, como las que contienen la mostaza, el ajo o la cebolla, respondía

al frío muy intenso, con un umbral diez grados por debajo del que presenta el canal TRPM8 (10). Esta característica, unida a la expresión preferente del canal TRPA1 en neuronas sensitivas con el fenotipo de neuronas nociceptoras, condujo a sus descubridores a postular que se trataba del canal expresado por las neuronas nociceptoras sensibles al frío dañino y responsable de la transducción de reducciones extremas de temperatura.

Y así, el concepto de especificidad sensorial periférica se ha extendido desde el nivel celular al molecular, con una generalización que considera que la modalidad sensorial de frío moderado es dependiente de la activación de una población homogénea de termorreceptores específicos de frío, que estarían equipados con canales TRPM8, mientras que la sensación de dolor provocada por el frío intenso, con intensidad cercana o dentro de los valores lesivos, sería el resultado de la activación de un tipo de terminaciones nociceptoras que estarían provistas de canales TRPA1, siendo la expresión de cada uno de estos canales, en cada caso, la condición necesaria y suficiente para dotarlas de su especificidad sensorial.

Sin embargo, la interpretación de que una sola molécula específica determina de manera decisiva el tipo funcional de receptor sensorial, tropieza con una serie de observaciones experimentales, que obligan a considerarla excesivamente simplista y que, por el contrario, sugieren una complejidad y variedad mucho mayor en los mecanismos implicados en la transducción de los cambios de temperatura periférica.

Cuando se analizan electrofisiológicamente las propiedades funcionales de las neuronas termosensibles de frío que inervan la piel y mucosas, como se hizo por vez primera en nuestro laboratorio (11), se observa que éstas, que constituyen entre el 5% y el 10% de las neuronas de los ganglios sensitivos raquídeos y del trigémino, poseen características electrofisiológicas muy particulares, tales como disparo espontáneo, alta excitabilidad, respuesta tónica a pulsos depolarizantes y alta sensibilidad al frío y al mentol, que provocan

su despolarización y eventual disparo. El BCTC, bloqueante específico del canal TRPM8, elimina o atenúa estas respuestas, lo que apoya que estén mediadas al menos en parte por el canal iónico TRPM8. Sin embargo, las neuronas termorreceptoras de frío expresan además otras conductancias iónicas muy termosensibles, como son los canales de potasio del tipo TREK y TRAAK. Éstos, a temperaturas basales se hallan abiertos y tienden a mantener el potencial de membrana pero se cierran durante el enfriamiento, lo que provoca la despolarización de la célula, por lo que sin duda contribuyen a la gran sensibilidad térmica de las terminaciones termorreceptoras de frío (12). Estas terminaciones poseen además un canal de sodio Nav1.8, capaz de seguir funcionando a temperaturas muy bajas y por tanto de generar impulsos nerviosos a temperaturas que silencian a otros tipos de receptores sensoriales, en los que a los canales de sodio responsables de su descarga son inactivados gradualmente por el frío (13). Por otra parte, las neuronas termorreceptoras de frío expresan en grado discreto y muy variable, otros canales de potasio, tipo Kv1, responsables de una corriente iónica, llamada IKD, que contrarresta el efecto despolarizante inespecífico del frío (11). Esta corriente es muy pronunciada en las neuronas sensoriales primarias no termorreceptoras, en las que actúa como un freno frente a la acción despolarizante del frío, explicando que éstas sean tan insensibles a los descensos de temperatura. Por tanto, en las neuronas termorreceptoras de frío existen, además del TRPM8, otros canales iónicos termosensibles, que pueden modular su respuesta a los descensos de temperatura y contribuir a definir su termosensibilidad.

Las diferentes neuronas termorreceptoras de frío poseen umbrales térmicos que varían en un rango muy amplio. Desde las que, partiendo de una temperatura control de 35 °C, responden con un aumento de calcio intracelular y una descarga de impulsos nerviosos a descensos de solo 1 °C (neuronas de frío de bajo umbral), hasta las que solo empiezan a disparar cuando la temperatura ha descendido por

debajo de 25 °C (neuronas de frío de alto umbral). Si se excluye la diferencia de umbral, los dos tipos de neuronas termorreceptoras de frío son funcionalmente similares: ambas poseen análogas propiedades pasivas y activas de membrana y se activan o sensibilizan por el mentol (el agonista de elección del canal TRPM8), contrastando con otros tipos de neuronas sensoriales primarias como las nociceptoras, que poseen características de membrana muy diferentes.

Estudios recientes en nuestro laboratorio (14) han mostrado que las neuronas termorreceptoras de frío de bajo umbral tienen corrientes evocadas por activación del canal TRPM8 mucho mayores que las de alto umbral, lo que sugiere que la densidad en ellas de canales TRPM8 es más alta. Por el contrario, las neuronas de frío de bajo umbral carecen o tienen una corriente IKD muy pequeña, en contraste con las neuronas termorreceptoras de frío de alto umbral, en las que la IKD es progresivamente mayor a medida que la neurona muestra un umbral más alto. El desarrollo reciente de ratones en los que se ha eliminado selectivamente el gen responsable de la expresión del canal TRPM8 evidencia que éstos conservan todavía un número apreciable de fibras termorreceptoras que responden selectivamente frío con umbrales muy variables, lo que indica que los mecanismos de transducción del frío diferentes del TRPM8, son suficientes para mantener la capacidad transductora para los descensos de temperatura de una parte de las fibras termosensibles.

Así pues, estos datos indican que, si bien existe una población específica de neuronas sensoriales primarias especialmente capacitada para detectar enfriamiento, su capacidad de transducción y su sensibilidad están determinadas por una combinación de diferentes mecanismos transductores y canales iónicos, que definen su margen de trabajo y su variable sensibilidad transductora, segregando subpoblaciones de receptores de frío, capaces de cubrir rangos de enfriamiento muy amplios, entre las que posiblemente se incluye la de los que generan a nivel central sensaciones de frío desagrada-

bles, como las causadas por enfriamientos que no provocan destrucción tisular pero son interpretadas como displacenteras y que evocan reacciones vegetativas y conductas dirigidas a evitar el frío.

A la disponibilidad de termorreceptores específicos de frío de umbral variable, hay que añadir la de los nociceptores polimodales algunos de los cuales parecen activarse por el frío intenso, incluyendo enfriamientos que producen destrucción tisular, y que evocan sensaciones de dolor quemante, sin un claro componente térmico de frío. Los nociceptores activados por los enfriamientos extremos se han localizado en las paredes de las venas superficiales (15) aunque posiblemente las deformaciones mecánicas y los mediadores endógenos de la inflamación liberados por la destrucción tisular cuando ésta tiene lugar, activan también, en mayor o menor medida, a todos los nociceptores del área afectada. No está bien definido si el efecto del frío intenso sobre los nociceptores es inespecífico y secundario a la lesión tisular o si, como comenté antes, se inicia por la activación de los nociceptores que expresan el canal TRPA1 de modo más selectivo. Esta posibilidad no puede excluirse ya que una parte de las neuronas sensoriales viscerales del vago muestran termosensibilidad al frío, que se debe a la expresión del canal TRPA1 y no de TRPM8 como en las neuronas somáticas. Se ha sugerido que esta termosensibilidad visceral, dependiente de TRPA1, media las respuestas irritativas evocadas por las bajas temperaturas en los tractos respiratorio y digestivo (16).

Es bien conocido que las sensaciones evocadas por los descensos de temperatura cutánea son muy variables y oscilan desde las de frescor placentero al frío desagradable o el dolor quemante, dependiendo su carácter, en gran medida, de la velocidad e intensidad del cambio de temperatura, la superficie afectada y la temperatura de adaptación previa. Más aún, en determinadas condiciones, es posible evocar en sujetos normales, sensaciones de dolor con enfriamientos de la piel de pocos grados y dentro de límites muy alejados de

los niveles lesivos (17). De acuerdo con los datos arriba expuestos, cabe pensar que la piel y las mucosas superficiales están inervadas por neuronas termorreceptoras específicas de frío, dotadas con una serie de propiedades funcionales características que les confieren actividad espontánea y un rango amplio de sensibilidad al enfriamiento. Cuando éste es muy moderado, se reclutan solo los termorreceptores de bajo umbral, presumiblemente conectados a nivel central con vías termorreceptoras específicas, lo que nos permite discriminar las características espacio-temporales de los pequeños cambios de temperatura a los que se atribuye un carácter afectivo neutro o placentero. Cuando el frío es más extenso e intenso, se reclutarían progresivamente termorreceptores de frío de más alto umbral, algunos de los cuales podrían estar conectados con vías nociceptivas, lo que conferiría el carácter desagradable a la sensación de enfriamiento. Finalmente, el frío muy intenso, potencial causante de lesión tisular, activaría a los nociceptores, quizá primero a la subpoblación con sensibilidad térmica al frío derivada de su expresión de TRPA1, pero presumiblemente también y de manera no específica y secundaria a la lesión, a otros nociceptores polimodales (18). El reclutamiento de esta población evocaría una sensación de dolor quemante, que ocluiría en gran medida las de frío generadas por los termorreceptores específicos, algo que ocurre también con las sensaciones táctiles que evocan los mecanorreceptores de bajo umbral durante las lesiones mecánicas. La Figura 1 resume de manera esquemática estas ideas.

La existencia de diferentes tipos funcionales de fibras nerviosas sensibles a frío, puede ayudar también a explicar las disestesias térmicas que acompañan a ciertas neuropatías periféricas, como las causadas por la diabetes, los tratamientos oncológicos con sales de platino o la sección quirúrgica o accidental de los nervios sensoriales periféricos, por citar algunos ejemplos. En muchas de estas circunstancias, el paciente experimenta la llamada ‘alodinia al frío’, es decir, una

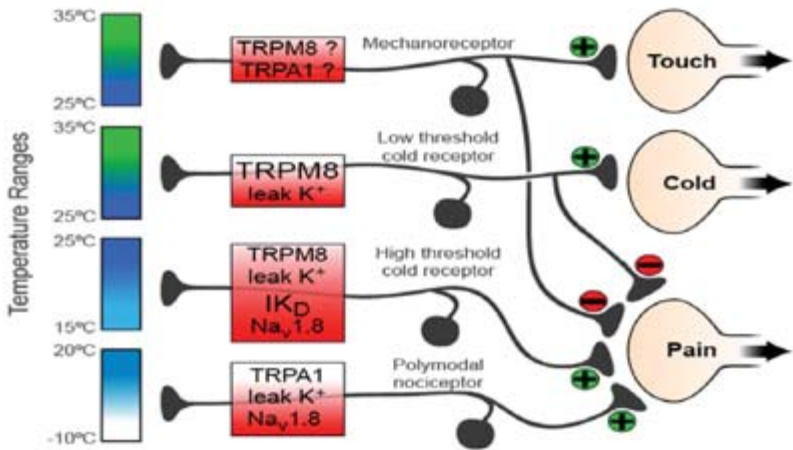


Figura 1. Esquema representativo de los mecanismos de detección de la temperatura por las neuronas termorreceptoras que inervan la piel y las mucosas. Los bloques rojos representan los tipos de canales iónicos implicados en la transducción de los estímulos de frío (barras de la izquierda) en los diversos tipos de neuronas sensoriales primarias. Los mecanorreceptores de la piel, que evocan sensaciones táctiles son débilmente excitados por el frío. Entre los termorreceptores específicos de frío, los de bajo umbral expresan muchos canales TRPM8 mientras que los de alto umbral lo hacen en menor grado pero poseen la corriente de freno IKD, mediada por canales Kv1 y posiblemente también el canal Nav1.8, que les permite seguir disparando impulsos nerviosos a temperaturas bajas. Los nociceptores polimodales expresarían TRPA1 como sensor del frío intenso. Se han representado también los efectos excitatorios (+) e inhibitorios de los diferentes tipos de receptores sobre las neuronas espinales y la sensación final que evocan (Tomado de Belmonte, Brock y Viana, 2009, ref. 22).

sensación muy desagradable que se evoca con enfriamientos discretos de la superficie corporal, como los causados por corrientes de aire o el contacto con objetos fríos, que en condiciones normales resultan afectivamente neutros o agradables. La explicación generalmente admitida es que tales disestesias son el resultado de interacciones anómalas entre las aferencias de frío y las nociceptoras en las neuronas espinales del asta posterior de la médula (19). Sin embargo, es bien conocido que la lesión de los axones sensoriales periféricos modifica de manera profunda la expresión de los canales iónicos que desde el soma neuronal, son transportados a

la periferia, provocando sobreexpresión de algunos y expresión reducida de otros. Esto afecta de modo prominente a algunos tipos de canales de sodio y potasio, que normalmente regulan la excitabilidad de las terminaciones periféricas (20). En las fibras termorreceptoras de frío lesionadas, estos trastornos en la expresión de canales darían lugar a una actividad espontánea anómala y a una alteración de su capacidad de respuesta a los estímulos naturales. Como hemos comentado repetidamente, en condiciones normales, los termorreceptores de frío de alto umbral solo se activan con descensos pronunciados de temperatura pero, tras la lesión, es presumible esperar que su umbral se halle anómalamente reducido, haciéndolos hiperexcitables. En tal caso, comenzarían a activarse ya con enfriamientos muy moderados, lo que generaría sensaciones displacenteras.

Hasta ahora no se había dispuesto de datos experimentales directos sobre el efecto de la lesión del axón sobre la actividad de los termorreceptores de frío, que pudieran corroborar esta especulación. Sin embargo, los estudios en curso en nuestro laboratorio indican que cuando tales axones de frío se dañan, efectivamente disparan de modo anómalo. Así ocurre, por ejemplo, con los que inervan la cornea del ojo del cobaya, que al ser seccionados durante una incisión quirúrgica similar a la practicada durante la cirugía fotorrefractiva en humanos, adquieren un umbral anormalmente bajo y una respuesta aumentada al enfriamiento de la cornea causado por un estímulo con aire frío. Es conocido que alrededor del 40% de los pacientes operados de cirugía fotorrefractiva, experimentan sensaciones anómalas de sequedad ocular y disestesias con las corrientes de aire (21). Es muy posible que éstas se deban, no a una disminución de la humedad corneal, secundaria a la reducción de la lacrimación refleja por lesión de los nervios aferentes, como especulan los cirujanos oculares, sino a una actividad anómala en los termorreceptores corneales de frío lesionados por la cirugía. En circunstancias normales, tales receptores incrementan moderadamente su actividad

durante el enfriamiento de la superficie ocular causado por la evaporación que resulta de mantener el ojo abierto, y contribuyen a evocar el parpadeo pero no llegan a causar una sensación consciente de sequedad. Cuando su frecuencia de disparo aumenta anormalmente, como ocurre tras la lesión, las descargas de impulsos nerviosos son interpretadas a nivel cortical como sequedad molesta de la superficie ocular, pese a que se ha demostrado que a los pocos días de la cirugía fotorrefractiva, la mayoría de las corneas han recuperado su grado de humidificación normal.

De las observaciones brevemente comentadas aquí, cabe concluir, por un lado, que resulta arriesgado aplicar un reduccionismo excesivo a la interpretación de mecanismos biológicos complejos, como los que median la detección por los receptores periféricos de los descensos moderados o acusados de la temperatura de la superficie corporal. Además, es importante tener en cuenta que, cuando éstos u otros mecanismos sensoriales periféricos se alteran como resultado de circunstancias patológicas, el cerebro pasa a recibir una información sensorial distorsionada que puede eventualmente, evocar disestesias y dolor en pacientes que padecen lesiones de las terminaciones termorreceptoras periféricas.

Referencias

1. Blix (1882) Experimentelle Beiträge zur Lösung der Frage über die spezifische Energie der Hautnerven. *Zeitschr. F. Biologie*. 21: 145.
2. Zotterman, Y. (1936) Specific action potentials from the lingual nerve of the cat. *Skand. Arch. Physiol.* 75: 105-119.
3. Bessou, P. & Perl, E. R. (1969) Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J Neurophysiol.* 32: 1025-1043.
4. Ochoa, J. & Torebjörk, E. (1989) Sensations evoked by intraneural microstimulation of C nociceptor fibres in human skin nerves. *J. Physiol.* 415: 583-599.

5. Hensel, H. (1981) Cutaneous Thermoreceptors. In: Thermoreception and Temperature Regulation, H. Hensel, ed. (London, Academic Press), pp. 33-61.
6. Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D. & Julius, D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 389: 816-824.
7. Jordt, S. E., McKemy, D. D. & Julius, D. (2003) Lessons from peppers and peppermint: the molecular logic of thermosensation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13: 487-492.
8. McKemy, D. D., Neuhauser, W. M. & Julius, D. (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*. 416: 52-58.
9. Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., Earley, T. J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S. & Patapoutian, A. (2002) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*. 108: 705-715.
10. Story, G. M., Peier, A. M., Reeve, A. J., Eid, S. R., Mosbacher, J., Hricik, T. R., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Andersson, D. A., Hwang, S. W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S. & Patapoutian, A. (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*. 112: 819-829.
11. Viana, F., de la Pena, E. & Belmonte, C. (2002) Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nat. Neurosci.* 5: 254-260.
12. Kang, D., Choe, C., Kim, D. (2005) Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK. *J. Physiol.* 564: 103-116.
13. Zimmermann, K., Leffler, A., Babes, A., Cendan, C. M., Carr, R. W., Kobayashi, J., Nau, C., Wood, J. N. & Reeh, P. W. (2007) Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature*. 447:856-859.

14. Madrid, R., de la Peña, E., Donovan-Rodríguez, T., Belmonte, C. & Viana, F. (2009) Variable threshold of cold-sensitive neurons is determined by a balance between TRPM8 and Kv1 potassium channels. *J. Neurosci.* 29: 3120-131.
15. Arndt, J. O. & Klement, W. (1991) Pain evoked by polymodal stimulation of hand veins in humans. *J. Physiol.* 440: 467-478.
16. Fajardo, O., Meseguer, V., Belmonte, C. & Viana, F. (2008) TRPA1 channels mediate cold temperature sensing in mammalian vagal sensory neurons: pharmacological and genetic evidence. *J. Neurosci.* 28: 7863-7875.
17. Morin, C. & Bushnell, M. C. (1998) Temporal and qualitative properties of cold pain and heat pain: a psychophysical study. *Pain.* 74: 67-73.
18. Perl, E. R. (1996) Cutaneous polymodal receptors: characteristics and plasticity. *Prog. Brain Res.* 113: 21-37.
19. Saade, N. E. & Jabbur, S. J. (2008) Nociceptive behavior in animal models for peripheral neuropathy: spinal and supraspinal mechanisms. *Prog. Neurobiol.* 86: 22-47.
20. Devor, M. (2006) Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *J. Pain.* 7: S3-S12.
21. Hovanesian, J. A., Shah, S. S. & Maloney, R. K. (2001) Symptoms of dry eye and recurrent erosion syndrome after refractive surgery. *J. Cataract Refract. Surg.* 27: 577-584.
22. Belmonte, C., Brock, J. A. & Viana, F. (2009) Converting cold into pain. *Exp. Brain Res.* 196: 13-30.

ANEMIA DE FANCONI: AVANCES EN LA INVESTIGACIÓN DE UNA ENFERMEDAD POCO PREVALENTE

JUAN A. BUEREN

Introducción

En el año 1927, el doctor Guido Fanconi (1892-1979) realizó la primera descripción de una enfermedad que posteriormente sería conocida como la Anemia de Fanconi (AF) (1).

Con motivo del 80 aniversario del descubrimiento de la enfermedad, y en virtud de la relevancia de la figura del Dr. Fanconi, Stephan Lobitz y Eunike Velleur publicaron en el año 2006 un trabajo de recopilación de los principales hallazgos realizados por Guido Fanconi en estos pacientes (2).

En este capítulo deseo rendir homenaje a una de las personas que con mayor entusiasmo han apoyado a nuestro equipo del Ciemat a progresar en la investigación de esta enfermedad, con el objetivo de encontrar terapias más eficaces para los pacientes con



Guido Fanconi

AF. Obviamente se trata del Dr. Pedro García-Barreno —D. Pedro—, pues sin su ayuda todo sería mucho más difícil.

Los primeros hallazgos en el descubrimiento de la enfermedad

Al poco tiempo de comenzar su formación como médico pediatra, el joven Dr. Fanconi atendió en el Hospital Kinderspital de Zurich a una familia con 5 hijos, 3 de los cuales habían desarrollado una anemia perniciosa particular, a edades de entre 5 y 7 años. Estos pacientes padecían defectos congénitos consistentes en microcefalia, estrabismo, acortamiento del dedo pulgar, hipoplasia de los testículos, hiperpigmentación de la piel y hemorragia cutánea. En los registros de seguimiento de los pacientes, Guido Fanconi observó que los defectos hematológicos no se restringían a una serie sanguínea, sino a todas ellas. En virtud de las observaciones realizadas por Fanconi sobre estos pacientes, el famoso hematólogo Otto Naegli propuso en 1931 que este síndrome debería ser conocido como «anemia de Fanconi».

Durante más de 40 años Guido Fanconi estudió la etiología de la enfermedad. Ante la variedad de síntomas observados en los pacientes, en el año 1964 propuso que la causa de la enfermedad difícilmente podría ser la afectación de un único gen, proponiendo como causa más probable de la misma una translocación cromosómica. Tal translocación nunca apareció; sin embargo, sus trabajos permitieron demostrar que las células de los pacientes con AF se caracterizaban por una marcada inestabilidad cromosómica (3, 4). En el año 1976, Arleen Auerbach demostró que la inestabilidad de estas células era particularmente manifiesta cuando se exponían a fármacos que producían entrecruzamientos en las cadenas del DNA (5).

Tratando de comprender si la causa genética de la enfermedad era la misma en todos los pacientes con AF, el Dr.

Manuel Buchwald realizó experimentos en los que fusionó células linfoblastoides procedentes de diferentes pacientes. Mientras que en algunos casos las células fusionadas tenían el mismo fenotipo que el observado en las células de cada uno de los pacientes, este investigador observó que la fusión de células procedentes de dos pacientes diferentes complementaba su fenotipo. El resultado de estos experimentos fue publicado en el año 1985, demostrando por primera vez la heterogeneidad genética de la enfermedad (6).



M. Buchwald

En la actualidad se han descubierto un total de 13 grupos de complementación en la AF. Fue en el año 1992 cuando el propio equipo de Manuel Buchwald clonó el primero de los genes de Fanconi, el gen FANCC (7). A lo largo de estos años se han ido descubriendo los otros 12 genes restantes, siendo de destacar la figura del Dr. Hans Joenje, de la Universidad Libre de Amsterdam, en el descubrimiento de los genes de Fanconi, genes FANC, pues este investigador participó en el clonaje de 9 de los 13 genes de Fanconi que actualmente conocemos.

Diferentes equipos de investigación estudiaron la prevalencia de las mutaciones de los diferentes genes FANC en los enfermos con AF. En todos los estudios realizados hasta el momento se ha observado que las mutaciones en el gen FANCA eran las de mayor prevalencia. No obstante, los estudios de subtipaje coordinados por nuestro equipo del Ciemat han mostrado que la prevalencia del grupo de complementación FA-A en España es la más elevada, en comparación a la observada en otros países (8). Esto se explica fundamentalmente por dos razones. Por un lado en España no se ha reportado la existencia de pacientes pertenecientes al grupo de complementación FA-C, también muy prevalente en otros

países. Por otra parte, aproximadamente el 30% de los pacientes AF españoles pertenece a la etnia gitana. Los pacientes de esta etnia comparten una mutación característica en el cuarto exón del gen FANCA; mutación definida como ancestral en enfermos AF de esta población. Postulamos que tal mutación se introdujo en la Península Ibérica en la Edad Media por medio de alguna familia que migró del Este Europeo, y que posteriormente se expandió en personas de la etnia gitana como consecuencia de su elevada consanguinidad (9).

La explicación de cómo mutaciones en 13 genes diferentes, sin aparente relación entre ellos, desemboca en una misma enfermedad es una cuestión que se ha ido comprendiendo con el paso de los años. Los estudios bioquímicos realizados desde el descubrimiento del primer gen FANC han permitido proponer lo que actualmente conocemos como la ruta de la anemia de Fanconi. Sin entrar en detalles, lo que esta ruta pone de manifiesto es que todas las proteínas FANC son necesarias para que finalmente se produzca una señal que facilite la reparación del DNA, tanto durante el proceso de replicación, como después de una agresión genotóxica (Figura 1). La ausencia de cualquiera de estas proteínas, independientemente de cual de ellas se trate, dificultaría la correcta reparación del DNA, promoviendo la muerte o el comienzo de la transformación neoplásica de la célula.

Hasta el año 2002, los genes FANC eran conocidos por su implicación en una enfermedad poco prevalente. En este año, sin embargo, el equipo del Dr. Alan D'Andrea descubrió que la causa de la enfermedad de un paciente adscrito al grupo de complementación FA-D1 consistía en la presencia de mutaciones bialélicas en el gen BRCA2 (10), el gen de mayor relevancia en cáncer de mama hereditario. A partir de entonces el mundo de la investigación oncológica se volcó en estudiar qué relevancia tendría la ruta de Fanconi en cáncer no sólo hereditario, sino también adquirido. Así por

Aunque los tratamientos con andrógenos o las transfusiones de eritrocitos o plaquetas constituyen terapias eficaces durante cierto tiempo, el trasplante de progenitores hematopoyéticos, principalmente a partir de donante emparentado HLA idéntico, constituye la terapia de elección en pacientes con AF. Desgraciadamente, tan sólo un 30% de los pacientes posee tal donante, por lo que su única opción es el trasplante a partir de un donante no emparentado, en los casos en los que tal donante se encuentra.

Tras los primeros hallazgos mostrando que la sangre del cordón umbilical posee un elevado contenido de progenitores hematopoyéticos, se postuló la posibilidad de utilizar este



E. Gluckman

material como producto para trasplante en pacientes que no tuvieran donante. En el año 1989, la Dra. Gluckman realizó el primer trasplante de sangre de cordón umbilical, precisamente en un paciente con anemia de Fanconi (12). A partir de entonces, el número de trasplantes realizados con unidades criopreservadas de sangre de cordón umbilical ha aumentado muy significativamente, de manera que el uso actual de esta fuente de trasplante es similar al de otras fuentes de pro-

genitores hematopoyéticos de donantes adultos.

Los buenos resultados asociados al trasplante hematopoyético a partir de hermano HLA idéntico, unido la mejora de las técnicas de fertilización in vitro posibilitó que padres con un hijo enfermo de AF pudieran recurrir a la fecundación in vitro para engendrar un hermano sano y además compatible con el hermano enfermo. En el año 2003 investigadores clínicos de la Universidad de Minesota trasplantaron por primera vez la sangre del cordón umbilical de un bebé seleccionado genéticamente en un paciente con AF (13), abriendo desde ese

momento una nueva posibilidad para la terapia de estos pacientes, así como también un importante debate ético.

La terapia génica constituye otro de los grandes retos para el tratamiento de pacientes con enfermedades genéticas, entre ellas la AF. Fue en el año 2000 cuando el equipo dirigido por el Dr. Alan Fischer y la Dra. Cavazzanna-Calvo mostraron sus primeros resultados en donde se evidenciaba que 9 de 10 pacientes con inmunodeficiencia severa combinada SCID-X1 que habían sido tratados con vectores gammaretrovirales recuperaron su inmunocompetencia, pudiendo abandonar las unidades de aislamiento (14). Los resultados del equipo francés fueron confirmados en pacientes con inmunodeficiencia ADA, primero en Milán y posteriormente en Londres (Drs. Aiuti y Thrasher, respectivamente). Más tarde, en Alemania, el Dr. Manuel Grez obtuvo también los primeros resultados positivos asociados al tratamiento genético de pacientes con granulomatosis crónica. Desgraciadamente, en Estados Unidos, dos protocolos independientes sobre pacientes con AF mostraron que tratamientos de terapia génica similares a los realizados en Europa no eran eficaces para mejorar la clínica de pacientes con AF (15, 16).

Tres años después de los primeros resultados obtenidos por el equipo de París, uno de sus pacientes con inmunodeficiencia X1 desarrolló una leucemia linfocítica (17). A este primer paciente le siguieron otros cuatro en París y uno en Londres. Estudios sobre la integración de los vectores terapéuticos en el genoma de las células leucémicas demostraron la transactivación de oncogenes en estos pacientes, con frecuencia del oncogén LMO2. Tal fenómeno se producía por efecto de la inserción del vector retroviral en la proximidad del oncogén, y por la elevada actividad del promotor/amplificador retroviral.

Trabajos pioneros de diferentes equipos de investigación, entre los que destacan los dirigidos por el Dr. Luigi Naldini en Milán, llevaron al desarrollo de vectores lentivirales con

promotores seleccionados a la carta. Estos trabajos permitieron demostrar que a diferencia de los vectores gammaretrovirales, los vectores lentivirales no tenían tropismo por regiones próximas al inicio de la transcripción de genes. En virtud de estas observaciones, estudios realizados en modelos de ratón demostraron que frente a los vectores gammaretrovirales, los vectores lentivirales eran significativamente más seguros. Todos estos trabajos permitieron concluir que, pese a lo que inicialmente se pudiera pensar, los vectores basados en el virus de la inmunodeficiencia humana se postulaban como los vectores de mayor seguridad en el campo de la terapia génica (18).

Mediante el uso de esta familia de vectores lentivirales, en nuestro laboratorio demostramos la posibilidad de curar modelos de ratón deficientes en el gen *Fancd1* (19), y también de corregir el fenotipo de linfoblastos y también de progenitores hematopoyéticos de pacientes con anemia de Fanconi (20). De ahí, que en la actualidad, en colaboración con Genethon, estemos comenzando el desarrollo de vectores lentivirales de uso clínico para la puesta en marcha de un protocolo de terapia génica en pacientes AF, subtipo A.

Ante el limitado número de células madre hematopoyéticas presentes en la médula ósea de los pacientes con AF, surgió la necesidad de investigar la posibilidad de generar progenitores hematopoyéticos a partir de fuentes alternativas a la médula ósea. Para ello, la aproximación propuesta por el investigador japonés Dr. Yamanaka en el año 2006, y basada en la transferencia de cuatro genes con capacidad de reprogramar fibroblastos de piel (21) resultaba la de mayor expectación. En colaboración con el equipo de los Drs. Raya e Izpisua-Belmonte en el Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona y el Dr. Surrallés de la Universidad Autónoma de Barcelona/Ciber de enfermedades raras, muy recientemente hemos demostrado la posibilidad de corregir el defecto genético de fibroblastos de piel de pacientes AF, y también de reprogramar estas células para generar progenitores

hematopoyéticos con fenotipo sano [Ver esquema Figura 2 y referencia (22)].

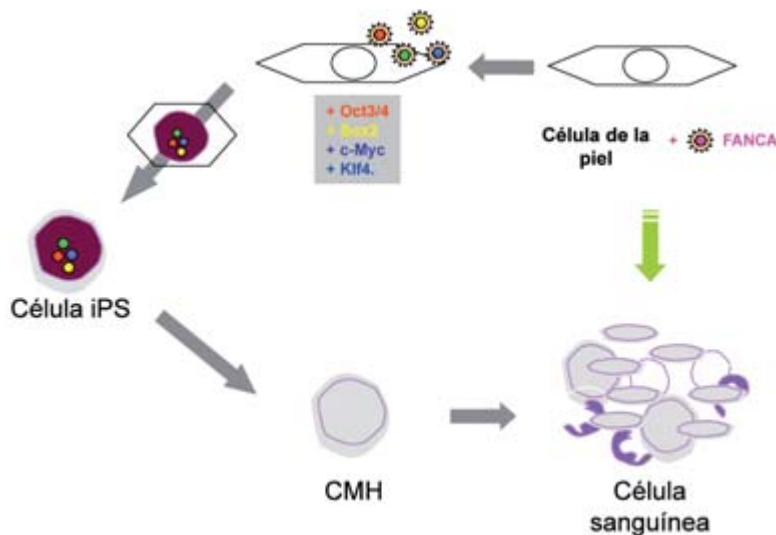


Figura 2. Esquema utilizado para la generación de células sanguíneas corregidas genéticamente, a partir de fibroblastos de la piel de pacientes con anemia de Fanconi [Referencia (22)].

Sin duda alguna, son todavía numerosos los obstáculos que faltan por vencer antes de que las células hematopoyéticas generadas por reprogramación de fibroblastos de piel puedan ser utilizadas para solventar el problema hematológico de pacientes con AF. No obstante, estos hallazgos nos permiten vislumbrar como será la terapia del futuro de pacientes con enfermedades genéticas, en particular de pacientes con AF.

Gracias a la inestimable y desinteresada ayuda del Dr. Pedro García-Barreno estamos teniendo la ocasión de participar en el gran avance que la terapia génica y celular está experimentando en estos años. Confiamos hacer buen uso de su ayuda para que nuestra experiencia en este campo permita disminuir el sufrimiento de los pacientes y familias afectadas por enfermedades genéticas, tales como la anemia de Fanconi.

Agradecimientos

Son muchas las Instituciones y personas que nos han ayudado a progresar en el campo de la terapia celular y génica como medio de encontrar nuevas terapias para enfermedades graves. Sin embargo, hoy quiero realizar un agradecimiento exclusivo a una persona que ha apoyado de manera incondicional a nuestro equipo de trabajo del Ciemat, y a mi propia persona en particular. Gracias, Don Pedro!

Referencias

1. Fanconi, G. (1927) Familiäre infantile perniziösaartige Anämie (perniciöses Blutbild und Konstitution). *Jahrbuch für Kinderheilkunde und Erziehung (Wien)*. 117: 257-280.
2. Lobitz, S. & Velleuer, E. (2006) Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades. *Nat. Rev. Cancer*. 6: 893-8.
3. Fanconi, G. (1964) Hypothesis of Chromosomal Translocation as a Genetic Interpretation of Fanconi's Familial Panmyelopathy. *Helv. Paediatr. Acta*. 19: 29-33.
4. Schroeder, T., Anschutz, F. & Knopp, A. (1964) Spontaneous Chromosome aberrations in Familial Panmyelopathy. *Human Genetic*. 1: 194-196.
5. Auerbach, A. D. & Wolman, S. R. (1976) Susceptibility of Fanconi's anaemia fibroblasts to chromosome damage by carcinogens. *Nature*. 261: 494-6.
6. Duckworth-Rysiecki, G., Cornish, K., Clarke, C. & Buchwald, M. (1985) Identification of two complementation groups in Fanconi anemia. *Somat. Cell Mol. Genet*. 11: 35-41.
7. Strathdee, C. A., Gavish, H., Shannon, W. R. & Buchwald, M. (1992) Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature*. 356: 763-7.
8. Casado, J. A., Callen, E., Jacome, A., Río, P., Castella, M., Lobitz, S., *et al.* (2007) A comprehensive strategy for

- the subtyping of Fanconi Anemia patients: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia research network. *J. Med. Genet.* 44: 241-249.
9. Callen, E., Casado, J. A., Tischkowitz, M. D., Bueren, J. A., Creus, A., Marcos, R., *et al.* (2005) A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood.* 105: 1946-9.
 10. Howlett, N. G., Taniguchi, T., Olson, S., Cox, B., Waisfisz, Q., De Die-Smulders, C., *et al.* (2002) Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science.* 297: 606-9.
 11. Taniguchi, T., Tischkowitz, M., Ameziane, N., Hodgson, S. V., Mathew, C. G., Joenje, H., *et al.* (2003) Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nat. Med.* 9: 568-74.
 12. Gluckman, E., Broxmeyer, H. A., Auerbach, A. D., Friedman, H. S., Douglas, G. W., Devergie, A., *et al.* (1989) Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N. Engl. J. Med.* 321: 1174-8.
 13. Grewal, S. S., Kahn, J. P., MacMillan, M. L., Ramsay, N. K. & Wagner, J. E. (2004) Successful hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi anemia from an unaffected HLA-genotype-identical sibling selected using preimplantation genetic diagnosis. *Blood.* 103: 1147-51.
 14. Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Nusbaum, P., Yvon, E., *et al.* (1999) Correction of SCID-X1 disease phenotype following gamma-c gene transfer by a retroviral vector into CD34+ cells in two children. *Blood.* 94: 367.
 15. Liu, J. M., Kim, S., Read, E. J., Futaki, M., Dokal, I., Carter, C. S., *et al.* (1999) Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with the Fanconi anemia group C gene (FANCC). *Hum. Gene Ther.* 10: 2337-46.
 16. Kelly, P. F., Radtke, S., Kalle, C., Balcik, B., Bohn, K., Mueller, R., *et al.* (2007) Stem cell collection and gene transfer in Fanconi anemia. *Mol. Ther.* 15: 211-9.

17. Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., *et al.* (2003) A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 348: 255-6.
18. Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Ponzoni, M., Bartholomae, C., *et al.* (2006) Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat. Biotechnol.* 24: 687-96.
19. Río, P., Meza, N. W., González-Murillo, A., Navarro, S., Álvarez, L., Surralles, J., *et al.* (2008). In vivo proliferation advantage of genetically corrected hematopoietic stem cells in a mouse model of Fanconi anemia FA-D1. *Blood*.
20. Jacome, A., Navarro, S., Río, P., Yáñez, R. M., González-Murillo, A., Lamana, L. M., Lozano, M. L., Sevilla J., Olivé, T., Díaz-Heredia, C., Badell, I., Estella, J., Madero, L., Casado, J. A., Güenechea, G., Segovia, J. C. & Bueren J. A. (2009) Lentiviral-mediated Genetic Correction of Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells from Fanconi Anemia Patients. *Molecular Therapy*. [Epub ahead of print].
21. Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126: 663-76.
22. Raya, A., Rodríguez-Piza, I., Guenechea, G., Vassena, R., Navarro, S., Barrero, M. J., *et al.* (2009) Generation of disease-free hematopoietic progenitors from Fanconi anemia-specific induced pluripotent stem cells. *Nature*. [Epub ahead of print], 31st May.

LA VACUNA CONTRA EL SIDA

MARIANO ESTEBAN RODRÍGUEZ

Vacuna española contra el VIH/SIDA: ensayos preclínicos y clínicos

Este artículo va dedicado a mi querido amigo el Excmo. Profesor Pedro García Barreno cariñosamente «Pedro», quien gracias a su tesón, entusiasmo científico y esfuerzo ha permitido que el proyecto que dirijo de desarrollo de vacunas contra distintas enfermedades como el Sida y que realizamos en mi laboratorio de POXVIRUS y VACUNAS del CNB-CSIC haya podido traspasar la barrera experimental del laboratorio a la clínica. La historia se remonta al 2004 cuando en una reunión conjunta con «Pedro» y con el muy entrañable Sr. D. Rafael Benjumea de la Fundación Marcelino Botín, me propusieron que la investigación tradicionalmente básica que realizaba en el laboratorio pudiera tener un mayor impacto social, a través de mayores recursos financieros aportados por la Fundación, con la finalidad de facilitar la protección intelectual de la investigación mediante patentes e incentivando para que la investigación biomédica pudiera llegar a fase clínica y transferirse al sector empresarial. Tradicionalmente uno de los mayores problemas a los que nos hemos enfrentado los investigadores en España ha sido la falta de incentivos para proteger nuestras invenciones mediante patentes y la escasez de recursos para poder demos-

trar mediante ensayos clínicos en fase I que un determinado producto puede tener interés comercial en salud. Fue precisamente el entusiasmo contagioso de «Pedro» lo que motivó que el proyecto que iniciamos en 2005 en mi grupo con apoyo de la Fundación Botín para el desarrollo de vacunas contra enfermedades prevalentes como el VIH/SIDA haya traspasado la barrera del laboratorio y se encuentre en 2009 en fase clínica I. Como corolario sirva de referencia que nuestro trabajo de vacunas fue objeto de un programa televisivo en Informe Semanal de TVE1 el día 17 de enero de 2009. Precisamente el título del programa fue «Vacuna de sida MVA-B made in Spain». En función del programa de TVE1 he tomado la licencia en el titular de llamar vacuna española. En este artículo describiré brevemente los antecedentes de cómo llegamos a generar vacunas frente al VIH, que es la vacuna MVA-B, los ensayos preclínicos realizados en dos modelos animales (ratones y macacos), el ensayo clínico en fase I que está en marcha en España, así como los futuros ensayos clínicos y proyectos a realizar en vacunas VIH.

Antecedentes: proyecto EuroVac

El proyecto de vacuna VIH se inicia en mi laboratorio, entonces en la Facultad de Medicina de la Universidad del Estado en Nueva York (SUNY), poco años después del descubrimiento del VIH como agente causal del SIDA por el que los investigadores franceses Luc Montagnier y Françoise Barré-Sinoussi obtuvieron el Premio Nóbel de Fisiología y Medicina en octubre de 2008 (1). Desarrollamos virus atenuados de vaccinia expresando los antígenos Env y Gag-Pol del VIH subtipo B como candidatos vacunales (2) y establecimos, junto con colaboradores de Nueva York, procedimientos de inmunización combinada de vectores heterólogos (prime/boost) que inducían respuestas celulares T CD8+ específicas con altos niveles de protección frente a un modelo de patógeno como malaria

murina (3). Estos procedimientos de inmunización combinada de vectores heterólogos con poxvirus recombinantes como «booster» están siendo utilizados ampliamente por la comunidad científica en vacunación frente a múltiples patógenos (4, 5). Los trabajos de vacunas frente a VIH los continuamos a mi regreso a España para dirigir el nuevo Centro Nacional de Biotecnología (1992-2003). Fue en 1999 cuando la UE nos concede el cluster «European Vaccine Effort against HIV/AIDS» QLK2-CT-1999-01321 como parte de un consorcio de laboratorios europeos, cuyo objetivo era desarrollar vacunas experimentales contra VIH basadas en los vectores de poxvirus (MVA y NYVAC) expresando los antígenos Env/Gag-Pol-Nef del VIH para los subtipos B y C, en replicones del virus Semliki Forest y en vectores de DNA expresando los mismos antígenos y en la proteína purificada de Env (gp140). Con estos vectores se propone llevar a cabo ensayos preclínicos en macacos y clínicos en voluntarios sanos. Los vectores de poxvirus basados en NYVAC los desarrolla la empresa Sanofi-Pasteur, los vectores basados en MVA los desarrollamos en el CNB-CSIC, los vectores de DNA los produce la Universidad de Regensburg en Alemania, los vectores de Semliki Forest los genera el Instituto Karolinska de Suecia y la proteína Env la produce el National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) del Reino Unido. Después de un largo recorrido, con financiación europea para los proyectos EuroVac I, EuroVac II y EuroVac III, finaliza en 2007 el proyecto EuroVac con la demostración de que la inmunización con los vectores de DNA y de poxvirus (MVA y NYVAC) es un procedimiento eficaz para desarrollar en el organismo de animales (ratones y monos) respuestas inmunes específicas frente a los antígenos del VIH (6-8). Para poder continuar, en ausencia de financiación europea, con el estudio de estos vectores en ensayos clínicos creamos en 2006 y en Lausanne la Fundación EuroVacc. En humanos y con voluntarios sanos se llevaron a cabo por la Fundación EuroVacc dos ensayos clínicos en fase I (EVO1 y EVO2), demostrando que en procedimientos de

prime/boost, es decir una primera inoculación por ruta intramuscular (i.m.) del vector DNA que expresa Env/Gag-Pol-Nef seguido de una segunda inoculación (i.m.) con NYVAC expresando los cuatro antígenos del VIH se producía una respuesta inmune específica en más del 90% de los voluntarios, siendo esta respuesta multifuncional, con predominio en la activación de linfocitos T CD4+ y mayoritariamente dirigida frente a Env (9). Estos resultados supusieron un repunte en el horizonte de vacunas VIH ya que con anterioridad los ensayos clínicos con distintos candidatos vacunales no habían producido los resultados esperados de inmunogenicidad amplia frente a los antígenos del VIH, excepto para vectores de adenovirus. Sin embargo, en un ensayo en fase II con 3000 voluntarios que se inmunizaron con vectores de adenovirus expresando antígenos del VIH (proyecto STEP), que había demostrado previamente un buen comportamiento inmunológico frente a los antígenos del VIH, hubo que abortar el ensayo clínico al observar que los individuos vacunados y con títulos altos de anticuerpos frente al virus respiratorio adenovirus, fueron más susceptibles a la infección por VIH que los individuos control que no habían recibido la vacuna (10, 11). La dificultad en el desarrollo de vacunas frente a VIH ha sido discutida en varias revisiones (12-14). Teniendo en cuenta que el VIH ha provocado desde su aparición en 1981 más de 22 millones de defunciones, que otros 40 millones de personas están infectadas, que la pandemia se sigue extendiendo con virulencia especialmente en África y sureste asiático, y que el virus desarrolla resistencia frente a la terapia antirretroviral, es absolutamente necesario, como lo indica la OMS (www.who.int/vaccines), el desarrollar una vacuna preventiva frente a dicha pandemia.

La vacuna MVA-B

Así como el vector NYVAC, derivado de la cepa del virus vaccinia Copenhagen por delección selectiva de 18 genes vira-

les (15), fue utilizado por la empresa Sanofi-Pasteur para la generación de virus recombinantes que expresaban los antígenos Env/Gag-Pol-Nef (referidos como NYVAC-B/C), nuestro grupo desarrolló otros vectores basados en la cepa del virus vaccinia modificado de Ankara (MVA) que había perdido después de de 500 pases seriados en células embrionarias de pollo unos 30.000 nucleótidos del genoma viral. Esta pérdida de secuencias virales hacía que el vector MVA careciera de una serie de genes virales que en el virus parental codifican para proteínas que inhiben respuestas inmunes (5, 16, 17). Además, este vector tiene limitada su capacidad para replicar en la mayoría de las células de mamífero y en organismos, aunque se puede producir a escala industrial en células embrionarias de pollo. La seguridad del vector MVA se ha demostrado en ensayos preclínicos y clínicos con vectores que expresan distintos antígenos (5, 18). Recientemente hemos demostrado que el vector MVA activa en células dendríticas la transcripción de genes que codifican para proteínas con funciones inmunomoduladoras y que este fenómeno se produce por activación de distintas rutas de señalización como TLR2-TLR6, MDA-5 y el inflamasoma NALP3 (20). En el laboratorio del CNB-CSIC y tras mucho esfuerzo conseguimos generar los vectores MVA-B y MVA-C (referidos como MVA-B/C) que expresaban en un mismo locus, los cuatro antígenos Env/Gag-Pol-Nef del VIH para los subtipos B y C (ambos subtipos representan cerca del 80% de todas las infecciones por VIH en el mundo) (6, 8). Este vector demostró buena capacidad para expresar los cuatro antígenos del VIH en células humanas y una alta estabilidad. La proteína gp120 se liberaba como monómero de la célula mientras que Gag-Pol-Nef se expresaba intracelularmente como proteína de fusión de unos 160 kDa (6).

Debido al interés que los vectores MVA-B y MVA-C podrían tener como vacunas frente al VIH se propuso a la Fundación Botín la posibilidad de su patentabilidad. La patente fue procesada y después de un largo recorrido ha sido

otorgada en España el título de patente de invención (P2005501841) y sigue su curso para la titularidad internacional. Debo de admitir que sin el apoyo de la Fundación Botín y el mensaje de «Pedro» de proteger las invenciones, nunca hubiéramos procesado la patente con titularidad CSIC.

Ensayos preclínicos

Con los vectores MVA-B/C y NYVAC-B/C llevamos a cabo los primeros ensayos preclínicos de inmunización en modelo murino demostrando que dichos vectores inducen respuestas inmunes específicas frente a los cuatro antígenos del VIH, y que la magnitud de dichas respuestas era potenciada cuando en la primera inmunización se utilizaba como inmunógeno vectores de DNA o replicones del virus Semliki Forest expresando los mismos antígenos, seguido de una dosis recuerdo con los vectores atenuados de poxvirus (6). Estas respuestas se observaban también en modelo transgénico murino de presentación de antígenos en el contexto humano MHC de clase I (6). Además de establecer que la combinación DNA/pox era muy inmunogénica observamos que la combinación de los vectores NYVAC/MVA, es decir una primera inmunización con el vector NYVAC-B seguido al cabo de tres semanas por una segunda inoculación con el vector MVA-B, pero no al revés, producía una mayor amplitud en la respuesta inmune frente a los distintos antígenos del VIH (6, 8). Ello se debe a que el vector NYVAC tiene mas limitada su capacidad para expresar proteínas virales a tiempos tardíos en la infección (21), por lo que no sintetiza proteínas virales que inducen anticuerpos neutralizantes, lo que confiere una ventaja selectiva cuando se administra posteriormente el vector MVA-B a los ratones (6, 8).

Los resultados obtenidos en modelo murino fueron seguidos de ensayos preclínicos en modelo de macaco (7). Como el macaco no se infecta por VIH y sí por un virus híbrido (referido como SHIV) que expresa la envuelta del

VIH y los antígenos del virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV), desarrollamos en mi laboratorio dos recombinantes de MVA y NYVAC que expresaban la proteína Env del VIH (89.6p) y Gag-Pol-Nef del SIVmac239. Estos recombinantes fueron crecidos y purificados de células CEF y enviados al Centro de Primates de Holanda para ensayos de inmunogenicidad y de protección. Mediante ensayo con tres grupos de macacos (7 animales por grupo para los inmunizados con DNA/MVA; otros 7 para DNA/NYVAC y seis animales para el grupo control pero inmunizados con los vectores vacíos) pudimos demostrar que la inmunización combinada de DNA/MVA y DNA/NYVAC inducía respuestas inmunes bien diferenciadas con predominio de respuesta tipo CD4+ para DNA/NYVAC y del tipo CD8+ para DNA/MVA. Significativamente cuando a los animales se les inoculaba una dosis letal del virus híbrido SHIV89.6p al cabo de 32 semanas después de la primera inmunización, los dos grupos de animales inmunizados con los vectores DNA/MVA y DNA/NYVAC inducían protección en todos los animales mientras que los animales inmunizados con los vectores vacíos fallecían por la infección (7). Estos resultados demostraban que los vectores MVA y NYVAC eran buenos candidatos vacunales frente al VIH.

La siguiente aproximación fue demostrar si se podían administrar de forma segura los vectores MVA y NYVAC por inhalación. Uno de los problemas de administración de vacunas por inyección es la dificultad para su administración en países pobres, mientras que la ruta respiratoria es de fácil manejo. Por ello decidimos llevar a cabo experimentos en macacos a los que se les administró MVA o NYVAC mediante inhalación. Los resultados obtenidos indican que dicha ruta es segura, el virus no atraviesa la vía cráneo-encefálica, no se distribuye a otros tejidos, su expresión es transitoria, pero suficiente para activar respuestas inmunes específicas frente a antígenos del VIH o de otros patógenos (19). Estos resultados abren la posibilidad de administrar los vectores de

poxvirus MVA y NYVAC por vía respiratoria lo que facilitará su aplicación como vacunas a nivel mundial.

Ensayos clínicos

Una vez demostrado que los vectores NYVAC y MVA eran buenos inmunógenos y que en combinación con DNA expresando los mismos antígenos se potenciaba la respuesta inmune frente a los antígenos del VIH, el siguiente paso fue la realización de ensayos clínicos en fase I. Cada uno de los vectores a utilizar en los ensayos clínicos tuvo que ser producido en condiciones GMP, lo que supuso elevados costes. El vector DNA-C fue producido por la empresa Cobra en el Reino Unido, el vector NYVAC-C fue producido por Sanofi-Pasteur mientras que el vector MVA-B lo produjo la empresa alemana IDT. Además, con cada uno de los productos GMP hubo que llevar a cabo por empresas análisis de toxicidad y biodistribución en modelos animales. Una vez que los productos GMP habían pasado los controles de seguridad, se procedió a su ensayo clínico. Se han llevado a cabo por EuroVacc dos ensayos clínicos, referidos como EVOI y EVOII, en Lausanne y Londres. En el primero (EVOI) se examinó en 20 voluntarios sanos la seguridad y capacidad inmunogénica del vector NYVAC-C, después de su administración por ruta intramuscular a las 0 y 4 semanas. En el EVOII se utilizaron 40 voluntarios sanos, comparando la seguridad e inmunogenicidad de los vectores DNA-C y NYVAC-C. Un grupo de voluntarios recibió dos dosis de NYVAC-C (0 y 4 semanas), mientras que el otro grupo recibió primero dos dosis de DNA-C (0 y 4 semanas) seguido de dos dosis de NYVAC-C (20 y 24 semanas). Se examinaron parámetros de seguridad e inmunológicos, estableciendo que mientras que la administración de dos dosis del vector NYVAC-C inducía respuestas inmunes específicas en el 33% de los voluntarios, sin embargo cuando se combinaba con DNA el porcentaje se

incrementaba al 90%. Significativamente esta respuesta era duradera en el tiempo, mayoritariamente de células T CD4+ y con inmunodominancia del antígeno Env (9).

Uno de los problemas en el ensayo clínico con DNA y NYVAC es que la dosis a administrar de DNA es muy alta (4 mg por inoculación) y que el vector NYVAC administrado sólo, había dado repuestas positivas en un reducido número de voluntarios. Debido a las diferencias que existen en señalización entre los dos vectores MVA y NYVAC, con MVA dirigiendo una mayor inducción de genes que codifican para citoquinas proinflamatorias (22), activando la ruta de genes dependiente e independiente de interferón-beta (23), lo que en su conjunto beneficia la respuesta inmune, el siguiente paso fue llevar a cabo un ensayo clínico en España con MVA-B. Este ensayo se inicia en 2009 con 30 voluntarios sanos, distribuidos en dos grupos de 15 personas por hospital. Los hospitales participantes son el Gregorio Marañón de Madrid y el Clinic en Barcelona. Se inicia en marzo-abril de 2009 el programa de inmunización, con 24 voluntarios que reciben por ruta intramuscular la vacuna MVA-B y otros 6 voluntarios reciben un placebo. La vacuna se administra a los tiempos 0, 4 y 16 semanas. Se llevará a cabo un seguimiento de los voluntarios inmunizados y se determinará a lo largo de un año la naturaleza de las respuestas inmunes inducidas en los individuos vacunados. La relevancia del ensayo en fase I de vacuna VIH con MVA-B es que es el primero que se lleva a cabo con un vector desarrollado y patentado en España y que permite el establecimiento de una plataforma clínica para futuros ensayos con candidatos vacunales frente al VIH.

Futuros ensayos clínicos en España

España es el país con mayor número de casos de infecciones por VIH de la Unión Europea y dispone de una cohorte de individuos seropositivos muy bien controlada, así

como de un excelente banco de datos. Además, con la creación de la Red de Sida española, de la que formamos parte, se podrá ampliar el número de ensayos clínicos y desarrollar nuevos vectores vacunales frente al VIH. Este objetivo de ampliación de ensayos clínicos y nuevos vectores está en marcha y ya se ha solicitado por la Red financiación en las convocatorias de proyectos FIS y FIPSE. Asumiendo que los resultados clínicos con el vector MVA-B en voluntarios sanos indiquen respuestas inmunes específicas en un número significativo de voluntarios, el siguiente paso es extender el ensayo clínico a una combinación de vectores. Ya hemos mencionado que la combinación de vectores NYVAC/MVA induce respuestas inmunes más potentes y amplias que cuando se administra un único vector. Por ello, hemos propuesto que el siguiente ensayo clínico profiláctico tenga dos ramas, una con voluntarios sanos a los que se les administra una dosis de NYVAC-B seguido de dos dosis de MVA-B y otra en la que se administra primero MVA-B seguido de dos dosis de NYVAC-B. Se medirían en el tiempo y a partir de sangre periférica (PBMCs) una serie de parámetros inmunológicos (ELISPOT, ICS, ELISA, citoquinas/quimiocinas) indicadores de activación de respuestas inmunes VIH específicas. Se considera como parámetros relevantes el que la respuesta inmune frente al VIH sea positiva en la mayoría de los vacunados, que se produzca activación de células T CD4+ y T CD8+, que la respuesta sea polifuncional afectando a un buen número de citoquinas y quimiocinas y que la respuesta sea duradera. Aunque es predecible que se produzcan anticuerpos frente a Env, sin embargo estos protocolos de inmunización van más dirigidos a activar una respuesta celular T específica.

Otro de los ensayos clínicos en consideración es terapéutico, dirigido a establecer si la administración de MVA-B en individuos seropositivos para el VIH puede incrementar sus defensas y controlar la infección. Por ello, hemos propuesto un ensayo terapéutico en individuos con terapia antirretroviral pero con niveles de células T CD4+ por encima de los

200/ml y tasas virales bajas. Estos individuos recibirían tres dosis de MVA-B como en el ensayo profiláctico actualmente en marcha. Se establecerá si en los pacientes la vacunación produce algún beneficio en el control de la infección y naturaleza de la respuesta inmune.

Consideraciones sobre vacunas VIH

A nivel mundial, ¿en qué situación nos encontramos con vacunas VIH? Después del fracaso del ensayo STEP con adenovirus se está invirtiendo un gran esfuerzo en entender el por qué no funcionó la vacuna. Para evitar el problema de anticuerpos frente a adenovirus en la mayoría de la población se están llevando a cabo experimentos con adenovirus de chimpancés (hay una gran diversidad de serotipos) debido a que los humanos no hemos estado expuestos a estos virus. El objetivo es utilizar adenovirus de chimpancés que expresen distintos antígenos del VIH y demostrar en modelo de macaco que la inmunización con estos vectores, solos o en combinación con otros vectores como DNA y poxvirus, pueden inducir protección frente a un desafío con SIV altamente patógeno y origen heterólogo.

Aunque los ensayos clínicos en fase III realizados con anterioridad fueron negativos, el único ensayo clínico en fase III actual es el llevado a cabo en Tailandia en zonas de riesgo de contraer la infección por VIH. Dicho ensayo ha sido realizado con 16.000 voluntarios que fueron inmunizados con la combinación del vector ALVAC (un poxvirus de canario) que expresa varios antígenos del VIH, subtipos B/E, seguido de dosis recuerdo con proteína purificada gp120. Los datos del ensayo se conocerán en septiembre de 2009. Es interesante resaltar que el ensayo ha pasado todos los controles lo que es un buen indicador de que la vacuna no ha producido efectos negativos. ¿Qué es lo que esperamos de este ensayo la comunidad científica? Lo que sí es deseable es que después de todos los frac-

sos en vacunas VIH anteriores, se vislumbra la luz en el túnel, con indicación de algún grado de protección en los vacunados. Incluso si los indicadores fueran de un 30-40% de protección, se consideraría como significativo pues el mensaje sería que es posible desarrollar una vacuna, introduciendo nuevos vectores/inmunógenos/adyuvantes en los protocolos de inmunización. Sin embargo sería un jarro de agua fría y una vez más una frustración si no se observara protección alguna. Hay que resaltar que ninguno de los dos vectores del ensayo de Tailandia había producido por separado protección alguna en anteriores ensayos clínicos y que la combinación de los dos vectores se llevó a término con la comunidad científica enfrentada. Veremos lo que pasa con el ensayo fase III en septiembre. Ojalá y por el bien de la humanidad el ensayo de sus frutos. Eso esperamos y deseamos.

Aunque el ensayo fase III sea un fracaso hemos de seguir adelante con los nuevos vectores que han sido desarrollados y otros están en proceso. Esto conlleva a que tenemos que ser más exigentes en los ensayos preclínicos, por lo que la demanda para realizar ensayos de inmunogenicidad y protección en monos está aumentando. Aquellos protocolos que cumplan este requisito podrán pasar a fase clínica. Debemos de seguir en el empeño de desarrollar una vacuna frente al VIH pues la pandemia no cesa y unos 3 millones de personas fallecen anualmente por culpa de esta enfermedad. Gracias al esfuerzo de la comunidad científica internacional, al empuje de instituciones como el NIH, la Unión Europea, la Fundación Bill y Melinda Gates y otras organizaciones, la lucha contra el SIDA continúa. El mundo desarrollado y las empresas no pueden mantenerse al margen de esta pandemia que nos afecta a todos.

Agradecimientos

Debo de resaltar que la persona que ha ejercido un efecto «boomerang» para que el proyecto de vacuna VIH tenga

el impacto que ha producido en España es mi querido amigo «Pedro». Con tu deseo y el de la Fundación Botín de facilitar al máximo la actividad científica de cada uno de nosotros, habéis logrado que se hayan producido avances importantes en el desarrollo de la vacuna MVA-B en España, con perspectivas de realizar futuros nuevos ensayos clínicos. Ni que decir tiene que ello también se debe al celo con el que «Pedro» ha cuidado mi salud en el Hospital Gregorio Marañón. Por todo ello, gracias «Pedro». Gracias también a la Fundación Botín por la generosidad de su personal de apoyo en el seguimiento del proyecto.

Quiero agradecer al personal de mi laboratorio por todo su buen hacer científico, especialmente a Carmen E. Gómez, verdadero artífice de constancia en la generación y caracterización de los vectores NYVAC y MVA para ensayos preclínicos y clínicos, a José Luis Nájera por los estudios de inmunogenicidad en ratones y actualmente por su perseverancia en la optimización de los vectores NYVAC y MVA. Muy especialmente quiero agradecer la labor ingente llevada a cabo por Victoria Jiménez en la preparación de células embrionarias de pollo, crecimiento y purificación de los virus recombinantes MVA y NYVAC y hacer fácil lo difícil. Lógicamente el proyecto y el trabajo en poxvirus y vacunas del laboratorio no podrían haberse realizado sin la financiación obtenida por la Fundación Botín, así como del Plan Nacional, FIPSE, Fundación Bill y Melinda Gates y de la Unión Europea.

Referencias

1. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., *et al.* (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220(4599): 868-71.
2. Rodríguez, D., Rodríguez, J. R., Rodríguez, J. F., Trauber, D. & Esteban, M. (1989) Highly attenuated vaccinia

- virus mutants for the generation of safe recombinant viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86(4): 1287-91.
3. Li, S., Rodrigues, M., Rodríguez, D., Rodríguez, J. R., Esteban, M., Palese, P., *et al.* (1993) Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90(11): 5214-8.
 4. Zavala, F., Rodrigues, M., Rodríguez, D., Rodríguez, J. R., Nussenzweig, R. S. & Esteban, M. (2001) A striking property of recombinant poxviruses: efficient inducers of in vivo expansion of primed CD8(+) T cells. *Virology.* 280(2): 155-9.
 5. Gómez, C. E., Nájera, J. L., Krupa, M. & Esteban, M. (2008) The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr. Gene Ther.* 8(2): 97-120.
 6. Gómez, C. E., Nájera, J. L., Jiménez, V., Bieler, K., Wild, J., Kostic, L., *et al.* (2007) Generation and immunogenicity of novel HIV/AIDS vaccine candidates targeting HIV-1 Env/Gag-Pol-Nef antigens of clade C. *Vaccine.* 25(11): 1969-92.
 7. Mooij, P., Balla-Jhaghoorsingh, S. S., Koopman, G., Beenhakker, N., van Haaften, P., Baak, I., *et al.* (2008) Differential CD4+ versus CD8+ T-cell responses elicited by different poxvirus-based human immunodeficiency virus type 1 vaccine candidates provide comparable efficacies in primates. *J. Virol.* 82(6): 2975-88.
 8. Gómez, C. E., Nájera, J. L., Jiménez, E. P., Jiménez, V., Wagner, R., Graf, M., *et al.* (2007) Head-to-head comparison on the immunogenicity of two HIV/AIDS vaccine candidates based on the attenuated poxvirus strains MVA and NYVAC co-expressing in a single locus the HIV-1BX08 gp120 and HIV-1(IIIB) Gag-Pol-Nef proteins of clade B. *Vaccine.* 25(15): 2863-85.

9. Harari, A., Bart, P. A., Stohr, W., Tapia, G., García, M., Medjitna-Rais, E., *et al.* (2008) An HIV-1 clade C DNA prime, NYVAC boost vaccine regimen induces reliable, polyfunctional, and long-lasting T cell responses. *J. Exp. Med.* 205(1): 63-77.
10. Sekaly, R. P. (2008) The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? *J. Exp. Med.* 05(1): 7-12.
11. Buchbinder, S. P., Mehrotra, D. V., Duerr, A., Fitzgerald, D. W., Mogg, R., Li, D., *et al.* (2008) Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet.* 372(9653): 1881-93.
12. Barouch, D. H. (2008) Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature.* 455(7213): 613-9.
13. Fauci, A. S., Johnston, M. I., Dieffenbach, C. W., Burton, D. R., Hammer, S. M., Hoxie, J. A., *et al.* (2008) HIV vaccine research: the way forward. *Science.* 321(5888): 530-2.
14. Johnston, M. I. & Fauci, A. S. (2008) An HIV vaccine—challenges and prospects. *N. Engl. J. Med.* 359(9): 888-90.
15. Tartaglia, J., Perkus, M. E., Taylor, J., Norton, E. K., Audonnet, J. C., Cox, W. I., *et al.* (1992) NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology.* 188(1): 217-32.
16. Blanchard, T. J., Alcamí, A., Andrea, P. & Smith, G. L. (1998) Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 5): 1159-67.
17. Antoine, G., Scheiflinger, F., Dorner, F. & Falkner, F. G. (1998) The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology.* 244(2): 365-96.
18. Gómez, C. E., Nájera, J. L., Domingo-Gil, E., Ochoa-Callejero, L., González-Aseguinolaza, G. & Esteban, M.

- (2007) Virus distribution of the attenuated MVA and NYVAC poxvirus strains in mice. *J. Gen. Virol.* 88(Pt 9): 2473-8.
19. Corbett, M., Bogers, W. M., Heeney, J. L., Gerber, S., Genin, C., Didierlaurent, A., *et al.* (2008) Aerosol immunization with NYVAC and MVA vectored vaccines is safe, simple, and immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105(6): 2046-51.
 20. Delaloye, J., Roger, T., Steiner-Tardivel, Q. G., Le Roy, D., Knaup Reymond, M., Akira, S., *et al.* (2009) Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome. *PLoS Pathog.* 5(6): e1000480.
 21. Nájera, J. L., Gómez, C. E., Domingo-Gil, E., Gherardi, M. M. & Esteban, M. (2006) Cellular and biochemical differences between two attenuated poxvirus vaccine candidates (MVA and NYVAC) and role of the C7L gene. *J. Virol.* 80(12): 6033-47.
 22. Guerra, S., Nájera, J. L., González, J. M., López-Fernández, L. A., Climent, N., Gatell, J. M., *et al.* (2007) Distinct gene expression profiling after infection of immature human monocyte-derived dendritic cells by the attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC. *J. Virol.* 81(16): 8707-21.
 23. Guerra, S., López-Fernández, L. A., Conde, R., Pascual-Montano, A., Harshman, K. & Esteban, M. (2004) Microarray analysis reveals characteristic changes of host cell gene expression in response to attenuated modified vaccinia virus Ankara infection of human HeLa cells. *J. Virol.* 78(11): 5820-34.

LAS NEURONAS TIENEN UN CABALLO DE TROYA

JOAN J. GUINOVART

Paz y Bien es algo más que un saludo, son palabras que intentan recoger el camino de San Francisco de Asís, quien predicaba que la gratitud por lo recibido siempre ha de llevarnos a la responsabilidad de ofrecerlo. Pedro García Barreno ha hecho honor al espíritu de Francisco y nos ha ofrecido a una serie de laboratorios españoles la posibilidad de dar un enorme salto adelante en nuestro trabajo. Al frente del programa de Biomedicina de la Fundación Marcelino Botín, ha puesto las bases de una nueva «orden» de científicos (OCM). Su objetivo es potenciar a los investigadores para que logren descubrimientos, pero también asegurar que éstos produzcan beneficios que reviertan en la sociedad. Como novicio en esta nueva orden, quiero expresar con este artículo mi admiración por Pedro. Pax et Bonum, frater.

La biología del cerebro es un tema de estudio relativamente nuevo en mi grupo del Instituto de Investigación Biomédica (IRB Barcelona). Ocurre a menudo en la ciencia que se empieza a trabajar en un problema básico en un tipo de célula o tejido y luego se observa que lo que se está estudiando es importante para algún otro sistema que no se había contemplado inicialmente.

El foco de mi laboratorio se centra principalmente en el estudio del mecanismo por el que las células almacenan glu-

cosa en forma de glucógeno. La insulina ordena a las células de todo el cuerpo que eliminen la glucosa del torrente sanguíneo. Una vez en su interior, las moléculas de glucosa se entrelazan dando lugar a largas cadenas de polisacáridos gracias a la intervención de una proteína denominada glucógeno sintasa.

La glucógeno sintasa es la única enzima capaz de formar cadenas de glucógeno en los mamíferos. La mayoría de estudios sobre esta molécula se han centrado en el papel que desempeña en las células hepáticas y en las fibras musculares, pues son las que presentan un metabolismo del glucógeno más activo en los humanos. En mi laboratorio hemos dedicado mucho esfuerzo a comprender los mecanismos de regulación de esta enzima, particularmente en el hígado, y a resolver su estructura tridimensional. Sin embargo, mi asistencia a un seminario de Santiago Rodríguez de Córdoba sobre la enfermedad de Lafora fue la clave para que me interesara en el estudio de la glucógeno sintasa en las neuronas, responsables de la transmisión de las señales nerviosas y que constituyen la «nobleza» de las células del cerebro.

La enfermedad de Lafora es una rara epilepsia neurodegenerativa provocada por la acumulación en las neuronas de un tipo de polímeros de glucosa que tienen características similares a las del glucógeno. Esta enfermedad se debe a mutaciones en cualquiera de los genes que codifican para las proteínas denominadas laforina y malina. En este trastorno, las neuronas y también las células del corazón, de los músculos y del hígado se ven colapsadas por cuerpos de inclusión, ricos en glucosa. Se trata de una enfermedad devastadora, pues los primeros síntomas se presentan hacia los 10 años de edad en forma de epilepsia y contracciones musculares incontroladas, progresando rápidamente hacia la neurodegeneración. Los pacientes no suelen alcanzar la edad adulta.

Las acumulaciones de polímeros de glucosa en las neuronas son las que distinguen a la enfermedad de otras formas de epilepsia y se conocen como cuerpos de Lafora, en honor

a su descubridor. Gonzalo Rodríguez Lafora, un discípulo de Santiago Ramón y Cajal, los observó por primera vez mientras realizaba las autopsias de pacientes jóvenes que habían padecido epilepsia y que habían fallecido antes de cumplir los 19 años.

Con la esperanza de conocer mejor el mecanismo de formación de estos cuerpos de Lafora, se decidió estudiar el metabolismo del glucógeno en las neuronas. En principio, estas células no serían el lugar más interesante para investigarlo. Según los libros de texto, las neuronas necesitan grandes cantidades de glucosa para obtener energía, sin embargo no la acumulan, al contrario de lo que ocurre en la inmensa mayoría de las otras células del organismo. En el cerebro, el glucógeno se almacena en otro tipo de células denominadas astrocitos. Cuando las neuronas necesitan energía, recurren a estas células para que se la proporcionen. Los astrocitos convierten la glucosa en lactato, una fuente de energía que las neuronas pueden absorber y utilizar.

El primer descubrimiento, realizado por mi estudiante de doctorado David Vílchez, fue que las neuronas expresan MGS (glucógeno sintasa muscular), una forma de la glucógeno sintasa que normalmente se encuentra en las células musculares. Este hallazgo fue muy sorprendente porque la función de la MGS es sintetizar glucógeno a partir de glucosa. La pregunta clave era ¿para qué lo tendrían las neuronas si no acumulan glucógeno? Pronto observamos que la enzima se encuentra en dichas células en un estado durmiente. Sin embargo, los experimentos de David demostraron que si se fuerza la activación de la MGS, las neuronas empiezan a sintetizar glucógeno de inmediato. En esta situación, las células se enfrentan a una grave carencia: les falta una segunda enzima, denominada glucógeno fosforilasa cuya función es degradar la compleja molécula de glucógeno para que la célula pueda liberar y utilizar su energía. Las neuronas no producen la proteína, y como resultado no son capaces de eliminar el glucógeno. De esta manera se forman densas

partículas que las células no pueden disolver y eventualmente las neuronas se colapsan. Esta acumulación de glucógeno pone en marcha un programa que hace que las neuronas se auto-destruyan, la denominada apoptosis.

Este hallazgo constituye un cambio de perspectiva significativo. Los científicos no habían pensando en el glucógeno como algo que pudiera ser dañino para el cerebro. Pero mirando retrospectivamente y examinando la literatura desde esta nueva perspectiva, muchas observaciones que habían pasado desapercibidas empiezan a tener sentido. En varias enfermedades neurodegenerativas, se han descrito acumulaciones de moléculas compuestas de cadenas de glucosa en las células. Sin embargo, el glucógeno nunca se había asociado a la enfermedad o destrucción de las neuronas.

El hecho de que las neuronas contengan glucógeno sin-tasa genera otras muchas preguntas. ¿Para qué mantienen una enzima que si se activa puede causar la muerte celular? La MGS constituye, de esta manera, una especie de caballo de Troya. Sin embargo, también está presente en neuronas sanas, pero no las daña. En consecuencia, la célula debe tener una manera de mantenerla bajo control, evitando que se active. ¿Cómo lo consigue?

La contestación a estas preguntas exigió la aplicación de varios métodos distintos. Se averiguó que las neuronas sanas logran que la MGS se mantenga inactiva y confinada en el núcleo. De esta manera, cuando las neuronas captan glucosa, no la pueden convertir en glucógeno como sucede en la mayoría de los otros tipos de células.

El estudio demostró que las neuronas disponen de varios métodos para mantener a la MGS a raya. La enzima se puede inactivar por fosforilación, un mecanismo que consiste en acoplar a la proteína grupos de fosfato. Pues bien, en las neuronas, la enzima se encuentra bien provisto de fosfato, lo que le impide ejercer su función. Incluso si se fuerza a las neuronas a fabricar más MGS, la anulan inmediatamente mediante la incorporación de los fosfatos.

Sin embargo, las células pueden reavivar proteínas que han sido desactivadas simplemente retirando los fosfatos de nuevo. Esto se consigue mediante una enzima denominada fosfatasa, que se acopla a la MGS y elimina los fosfatos de la proteína. Para ello precisa un adaptador, otra proteína denominada PTG (Protein Targeting to Glycogen – proteína dirigida a glucógeno), que se une tanto a la MGS como a la fosfatasa, facilitando así la interacción entre ellas.

Pero las neuronas sólo producen pequeñas cantidades de PTG. Veinte veces menos que la cantidad que se encuentra en las células que acumulan glucógeno. Sin este conector la fosfatasa no puede acoplarse a la MGS, por lo que ésta última queda atrapada en la posición «apagada».

Lo que acabamos de describir es la situación normal en las neuronas sanas. ¿Qué sucede entonces en la enfermedad de Lafora? La PTG proporcionó una vía para crear neuronas enfermas que se pudieran utilizar para ensayar lo que sucede en la enfermedad de Lafora. David utilizó un método que obligaba a las células a producir mayor cantidad de PTG, forzando así la activación de la MGS. Esto hizo que las células acumularan glucógeno, lo que provocó su auto-destrucción. Tras esta averiguación, se empezaron a buscar otros componentes del sistema que pudieran rescatar a las células e interrumpir el proceso de muerte.

Un buen punto de partida sería examinar los efectos de la laforina y la malina, las proteínas cuyos genes son defectuosos en los pacientes que padecen la enfermedad de Lafora. Para ello, se crearon dos grupos de células con altos niveles de PTG. A uno se le obligó a fabricar cantidades adicionales de laforina (la versión sana) y a otro a expresar cantidades adicionales de malina. En ambos grupos las neuronas continuaron sintetizando y acumulando glucógeno. Pero en un tercer experimento, se prepararon células que sobreproducían las tres moléculas al mismo tiempo (PTG, malina y laforina). El resultado en este caso sí fue el bloqueo completo de la síntesis de glucógeno. Es decir, habíamos

demostrado que juntas, malina y laforina, son capaces de bloquear la síntesis de glucógeno inducida por PTG.

Estas células presentaban otra característica particularmente interesante: casi la totalidad de MGS y PTG había desaparecido. Esto significa que las células estaban destruyendo tanto la enzima capaz de producir glucógeno (MGS) como la PTG, que era capaz de inducir su activación. Aunque las neuronas estaban fabricando estas proteínas, desaparecían rápidamente. La laforina y la malina, de alguna forma, le estaban indicando a la célula que destruyera las moléculas de MGS y de PTG. Probablemente estaban consiguiendo su propósito activando una máquina molecular denominada proteasoma.

Todas las células animales necesitan deshacerse de proteínas dañadas y uno de los métodos que utilizan es el proteasoma, un complejo con forma de barril constituido por cerca de 30 moléculas. A las proteínas a destruir se les acopla una molécula denominada ubiquitina. Eso hace que la máquina trituradora las reconozca. El barril las atrae y en su interior se fragmentan las proteínas, cuyas subunidades pueden reciclarse. Con el fin de demostrar que esto era precisamente lo que estaba sucediendo, se trataron las células que sobreproducían laforina, malina y PTG con moléculas que bloquean la actividad del proteasoma, observando que, en esas condiciones, la MGS y la PTG ya no eran destruidas.

No sólo la laforina y la malina tienen que estar presentes sino que las dos proteínas también tienen que unirse. Se examinaron los cambios en las proteínas (mutaciones) que existen en los pacientes que padecen la enfermedad de Lafora. Algunos de los defectos en la malina se localizan en la parte de la molécula que le permite unirse a la laforina. Si se repiten los experimentos anteriores con una malina que no puede unirse a laforina no se consigue bloquear la síntesis del glucógeno. Esto explica el porqué los pacientes que tienen alteraciones en la malina o en la laforina muestran los mismos síntomas y sufren la misma evolución de la enferme-

dad. Es la pareja entre estas dos proteínas la que ejerce su misión de salvaguarda. Si falla una de las dos, da igual cual sea, no puede formarse el complejo activo.

Todo esto apunta hacia un proceso inesperado en las neuronas. Contienen partes principales de la maquinaria necesaria para captar glucosa y sintetizar glucógeno, pero no lo utilizan. Una posible explicación es que en circunstancias normales les falta una parte crucial —el conector adaptador PTG. Sin este adaptador, la MGS no se activa. ¿Y por qué las células no tienen PTG? Quizás lo pueden producir, pero la laforina y la malina le dicen a la célula que lo destruya.

Nuestros experimentos asocian los síntomas de la enfermedad —un malfuncionamiento del cerebro, porque las neuronas han muerto debido a la acumulación indeseada de glucógeno— con las mutaciones en malina y laforina halladas en los pacientes. Esto es lo que sucede probablemente, pero las cosas pueden ser más complicadas. Es posible que la laforina y la malina marquen también a otras proteínas para ser destruidas. Quizás algunas de ellas pueden contribuir a causar daño en las neuronas con los consecuentes efectos catastróficos que esto tiene para los pacientes.

Esta historia plantea nuevas preguntas: ¿por qué las neuronas fabrican una enzima, la MGS, que puede destruirlas? ¿Qué ventaja les reporta conservarla para llegar al extremo de haber elaborado sofisticados mecanismos para mantenerla inactiva y silenciada? Muchas proteínas tienen múltiples funciones, y esto también puede ser aplicable a la MGS. Lo que ahora se investiga es si la MGS realiza otras funciones adicionales en las neuronas que son imprescindibles.

Otra posible explicación para la presencia de MGS puede estar relacionada con la eficiencia. Puede que a las células les resulte más fácil fabricar la maquinaria primero y luego añadirle unos cuantos componentes que la controlen, en vez de no construirla de entrada. Esto puede permitir al organismo incorporar la máquina de síntesis de glucógeno a todo

tipo de células y luego designar unos cuantos casos en los que no deba funcionar.

En este mismo sentido, la «solución» laforina-malina probablemente no es exclusiva de las neuronas. Ambas proteínas se encuentran en otros tipos de células. Allí, también pueden entrar en acción para ralentizar la síntesis de glucógeno en tejidos concretos o en situaciones específicas en las que se requiera dejar de producirlo. Por consiguiente, este mecanismo de control sea probablemente una solución genérica para el control de la síntesis del glucógeno.

Esta historia tiene un último corolario. El estudio de una enfermedad rara nos ha aportado el descubrimiento de un nuevo mecanismo de regulación de la síntesis del glucógeno que nadie había podido intuir. Y viceversa, el conocimiento de los mecanismos celulares del almacenamiento de glucosa han arrojado luz sobre una enfermedad, la de Lafora, que a priori nadie sospechaba que estuviera relacionada con el metabolismo de la glucosa.

Y un consejo: hay que asistir a los seminarios de tus amigos, aunque sólo sea porque si no luego ellos no vendrán a los tuyos.

Esta investigación se ha beneficiado del apoyo de la FMB. Sin la ayuda de la misma, no habríamos podido llevar a cabo los costosos experimentos que eran necesarios ni ahora nos podríamos plantear la posibilidad de explorar si la acumulación de glucógeno pueda ser la causa de otras enfermedades neurodegenerativas. Gracias, pues, a la Fundación Marcelino Botín y a Pedro García Barreno, medianero de dicha gracia.

El estudio sobre el mecanismo del glucógeno en las neuronas se publicó en *Nature Neuroscience* en 2007 con el título «Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy». [Vilchez, D., Ros, S., Cifuentes, D., Pujadas, Ll., Vallès, J., García-Fojeda, B., Criado-García, O., Fernández-Sánchez, E., Medraño-Fernández, I., Domínguez, J., García-Rocha, M., Soriano, E., Rodríguez de Córdoba, S., Guinovart, J. J. *Nature Neuroscience* (doi 10.1038/nn1998) (2007)].

LA TERAPIA PARA LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

JOSÉ LÓPEZ BARNEO

El desarrollo científico ha sido el responsable del incremento de la duración y calidad de vida del hombre ocurrido durante los últimos siglos. La crisis económico-financiera actual ha puesto una vez más de manifiesto que son los países con una ciencia y técnica propias, basadas en estructuras académicas sólidas e independientes, los que mejor aguantan las dificultades y mantienen una posición de liderazgo internacional. Si alguien tiene todo esto claro, lo practica y lo enseña es Pedro García Barreno. Su magisterio es especialmente valioso pues lo ejerce con respeto y reconocimiento al trabajo de los demás, con generosidad, y alejado de la demagogia y lugares comunes típicos de los tiempos que vivimos. Pedro García Barreno tiene un discurso intelectual exigente, agudo y crítico, aunque prudente, abierto a la comprensión, e impregnado de humanismo.

En este capítulo voy a tratar de la terapia celular en las enfermedades neurodegenerativas y, especialmente, en la enfermedad de Parkinson (EP). Describiré brevemente la situación actual del campo y cuáles parecen ser las perspectivas en el futuro cercano. Sea este texto un pequeño homenaje a Pedro García Barreno, Catedrático de Fisiopatología y Pro-pedéutica Quirúrgicas, que como investigador ha dedicado

gran esfuerzo a la transferencia de los conocimientos científico-técnicos a la práctica médica.

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la destrucción de neuronas en diferentes zonas del sistema nervioso, dando lugar a síntomas (cognitivos, motores, etc.) que varían según la zona afectada y la extensión del proceso. Las causas de las enfermedades neurodegenerativas se desconocen y los tratamientos, cuando existen, son simplemente sintomáticos y por tanto no atacan a la causa de la enfermedad. Dentro de los «nuevos» abordajes terapéuticos existen dos aproximaciones muy atractivas que son la restitución celular y la neuroprotección.

El objetivo de la restitución celular consiste en el implante de células en la zona de la lesión para sustituir a las que se han destruido y realicen su misma función. Este tipo de terapia es, en principio, sólo aplicable en patologías neurodegenerativas, como la EP, en las que la muerte celular se circunscribe (al menos en algunas fases del proceso) a zonas localizadas y accesibles quirúrgicamente. Los síntomas motores más invalidantes de la EP se deben a la muerte de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas nigroestriatales, y por esa razón desde hace tiempo se ha ensayado el implante de células productoras de dopamina en el estriado. Las células más utilizadas han sido procedentes de mesencéfalo de feto y los resultados obtenidos en varias decenas de estudios abiertos han sido variables (en algún caso con mejoría clínica muy espectacular). Sin embargo, estudios doble ciego, con control del efecto placebo, han mostrado no solo que esta técnica es clínicamente poco eficaz, sino la presencia en algunos pacientes trasplantados de complicaciones motoras, en la forma de movimientos anormales denominados disquinesias. La restitución celular, basada en la generación de una «sustancia negra» ectópica en el estriado, y las técnicas similares (como sería, por ejemplo, la diferenciación de neuronas dopaminérgicas a partir de células madre embrionarias) está actualmente desacreditada en el campo de la terapia antipar-

kinsoniana. Además, varios grupos han descrito recientemente la presencia de cuerpos de Lewy (depósitos anormales de proteínas que aparecen en las neuronas lesionadas por la EP) en las neuronas trasplantadas en pacientes que al fallecer años más tarde se les realizó la autopsia. Estos datos se han interpretado como indicadores de que las células trasplantadas se afectan por el proceso neurodegenerativo causante de la enfermedad.

En los últimos años el énfasis de la terapia celular anti-parkinsoniana ha evolucionado desde la restitución celular a la neuroprotección. Ello se refiere al intento de depositar en el estriado células que liberen factores neuroprotectores (especialmente factores neurotróficos) que reviertan, o al menos frenen, la enfermedad. Se está trabajando muy activamente en la búsqueda de moléculas pequeñas (fármacos clásicos) que atraviesen la barrera hematoencefálica y actúen sobre las neuronas activando programas genéticos y/o rutas metabólicas neuroprotectoras. Sin embargo, lo que ha tenido mayor desarrollo hasta la fecha ha sido el uso de factores neurotróficos; moléculas que se producen en los tejidos dianas (a los que proyectan los axones de las neuronas) y contribuyen al establecimiento y mantenimiento de los circuitos nerviosos. Aunque los datos experimentales de valor no son muy abundantes, se piensa que en el sistema nervioso adulto los factores neurotróficos son necesarios para el mantenimiento de la integridad y el fenotipo neuronal. Postulamos que en el proceso neurodegenerativo de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, la pérdida del fenotipo es un signo temprano de daño neuronal y que el estudio de los cambios iniciales que ocurren en las neuronas afectadas podría conducir al desarrollo de terapias más eficaces que las disponibles actualmente. Aunque existen numerosos trabajos preclínicos que describen los efectos de varios factores neurotróficos en modelos de enfermedades neurodegenerativas (NGF, IGF1 y otros en la enfermedad de Alzheimer, BDNF en la enfermedad de Huntington, etc.), los ensayos clínicos

más avanzados se refieren al uso de GDNF (factor neurotrófico derivado de la glía) en relación con la EP. Los estudios preclínicos realizados con GDNF administrado intraestriatalmente en animales parkinsonianos (mediante transfección con vectores virales o por inyección de células que producen GDNF recombinante) tuvieron resultados muy positivos. Igualmente, exitosos fueron los primeros ensayos abiertos en humanos con la administración de GDNF mediante cánulas implantadas en el estriado. Desafortunadamente, la euforia inicial fue seguida de resultados clínicos decepcionantes ya que los pacientes intervenidos con la administración directa de GDNF no mostraron mejoría clínica franca en fases posteriores y presentaron complicaciones derivadas de la generación de anticuerpos neutralizantes anti-GDNF que reaccionan con proteínas propias. Las razones por la que la administración local del GDNF no tiene efectos clínicos se desconoce, aunque podría explicarse, al menos en parte, por la producción de los anticuerpos mencionados y por la difusión limitada del GDNF en el parénquima cerebral.

La situación de indefinición de la terapia antiparkinsoniana basada en la liberación de GDNF en el estriado, condujo a nuestro grupo a generar el ratón KO («knockout») condicional de GDNF, donde el gen que codifica el factor trófico se puede anular en la vida adulta. Este experimento nos pareció particularmente importante ya que durante casi una década habíamos ensayado, tanto en modelos animales como en pacientes, una terapia antiparkinsoniana basada en el trasplante intraestriatal de células del cuerpo carotídeo, cuyo mecanismo de acción biológico se debe fundamentalmente a la liberación de GDNF (y posiblemente otros factores neurotróficos). El estudio del ratón KO condicional de GDNF ha mostrado que este factor neurotrófico es absolutamente necesario para la viabilidad de determinados grupos neuronales catecolaminérgicos, especialmente los localizados en el *locus coeruleus*, la sustancia negra y el área tegmental ventral. De hecho, la disminución en la produc-

ción de GDNF produce un patrón de muerte neuronal progresiva muy similar al que se observa en la EP. El ratón KO condicional de GDNF presenta también un síndrome clínico aquinético similar al que aparece en los enfermos de Parkinson.

Los datos experimentales parecen indicar que la apuesta por la terapia neuroprotectora en la EP no está perdida y que posiblemente lo más crítico sea encontrar el vehículo y la forma más adecuada de suministrar el GDNF (o el cóctel adecuado de factores neurotróficos) en el cerebro. Nuestro grupo, y otros, ha realizado una extensa investigación sobre el efecto beneficioso de las células glómicas del cuerpo carotídeo, productoras de dopamina y GDNF, en el tratamiento del parkinsonismo experimental con resultados muy satisfactorios en los modelos animales. Sin embargo, los dos estudios pilotos que hemos realizados con esta técnica en humanos han mostrado menos eficacia, posiblemente debido a que la cantidad de células trasplantadas fue muy escasa. Recientemente hemos descrito que el cuerpo carotídeo adulto es un nicho neurogénico, donde se producen nuevas neuronas (células glómicas) a partir de progenitores derivados de la cresta neural. En roedores, los progenitores del cuerpo carotídeo muestran una gran capacidad de proliferación y diferenciación. Parece, por tanto, que, de poder llevarse a cabo, la expansión *in vitro* del cuerpo carotídeo humano proporcionaría un punto de partida muy prometedor para el desarrollo de una nueva terapia neuroprotectora de aplicabilidad en la EP y otras patologías neurodegenerativas.

La terapia celular antiparkinsoniana está en una fase crítica y con nuestro trabajo pretendemos contribuir de algún modo a su desarrollo y a que la investigación biomédica realizada en España sea independiente y de primera calidad. Como resultado deseáramos no solo la traslación del conocimiento científico del laboratorio a la clínica humana, sino estimular la innovación tecnológica y, de este modo, contri-

buir al verdadero cambio en el sistema económico que desde hace décadas preconizamos. Con ello contribuiríamos a dar cumplimiento al sueño de muchos españoles del presente y del pasado a los que Pedro García Barreno representa de forma ejemplar.

PEDRO GARCÍA BARRENO: LA MEDICINA, LA CIENCIA Y LA VIDA

CARLOS LÓPEZ OTÍN

Una tarde de primavera de hace casi tres décadas, salí del laboratorio del Hospital Ramón y Cajal donde trabajaba y crucé Madrid para asistir a la primera clase de un curso de doctorado que se iniciaba en la Universidad Complutense. Aquel curso trataba sobre la Fisiopatología del colágeno y como nunca fue fácil atravesar la capital, yo llegué tarde. No esperaba gran cosa de aquellas lecciones porque, entonces como ahora, los cursos de doctorado no acaban de encontrar su lugar en el mundo. Me senté en la última fila y me dispuse, no a escuchar, sino a darle vueltas a los extraños resultados de unos experimentos que no lograba desalojar de la cabeza: Mientras pensaba en imposibles puentes disulfuro, una voz grave iba ocupando la sala. Aquella fue la primera vez que supe de Pedro García Barreno. Era médico, pero no lo parecía. No quiero decir que Pedro careciera de alguna característica fenotípica común a los que practican la disciplina galénica. Lo que me llamó la atención aquella tarde era la precisión de su lenguaje molecular. El Dr. García Barreno hablaba de genes y proteínas con la misma soltura que los extraordinarios profesores de Bioquímica y Biología Molecular que durante los dos años anteriores nos habían explicado estas materias en esas mismas aulas. Hasta enton-

ces, ignoraba que la Medicina pudiera ser molecular. En aquella clase, y para mi sorpresa, Pedro me introdujo a ese mundo fascinante que trata de aproximarse al estudio de la enfermedad humana a través del análisis de las estructuras, funciones y transformaciones de un conjunto de macromoléculas de interés biológico. En días sucesivos, en los que ya no llegué tarde a clase, entendí que la Medicina estaba dando sus primeros pasos hacia esa Ciencia individualizada, predictiva y regenerativa que promete el futuro, pero cuyos fundamentos ya nos había anunciado Pedro García Barreno en aquellas sesiones complutenses.

Mirando hacia atrás, es emocionante constatar que el estudio de la lógica molecular de la enfermedad humana ha avanzado con pasos de gigante. En poco tiempo se han podido definir los mecanismos moleculares subyacentes al desarrollo de muchas patologías, se han identificado marcadores genéticos y bioquímicos que permiten predecir las causas de las enfermedades y anticipar las respuestas a los posibles tratamientos, y finalmente, se han desarrollado nuevas aproximaciones terapéuticas que ofrecen respuestas clínicas a preguntas en cuyo entorno sólo habitaban la ignorancia y la resignación. Estos nuevos medicamentos basados en proteínas recombinantes, anticuerpos humanizados, oligonucleótidos antisentido, ARNs interferentes, virus modificados o células reprogramadas, son un reto para la imaginación y también para los artesanos del diccionario (como el propio Pedro García Barreno), al abordar conceptos que pertenecen a una nueva terra incognita, paralela a la que antaño sólo era accesible a los conquistadores del horizonte y que hoy exploran los aventureros de la Ciencia fundamental, esa subespecie humana en claro peligro de extinción. Aunque parezca sorprendente para algunos, son precisamente estos exploradores del conocimiento básico los que también nos han mostrado que, pese a tantos y tan incuestionables avances, el intento de aproximación a la lógica molecular de la enfermedad humana mediante el análisis del minúsculo

mundo de los genes y las proteínas, presenta todavía barreras colosales. Así, para entender la enfermedad humana es requisito imprescindible entender la forma en la que la información genética se regula en el espacio y en el tiempo para conseguir que miles de reacciones bioquímicas se desarrollen de manera ordenada haciendo posible cada instante de vida en cada organismo. Sólo comprendiendo estos complejos mecanismos de regulación podremos encontrar las claves de lo que acontece cuando la enfermedad altera el equilibrio bioquímico y destruye la armonía molecular con la que cada célula trata de contribuir a esa obra de arte única e irrepetible que es el cuerpo humano.

El conocimiento acumulado en el campo de la regulación biológica ha demostrado la diversidad y complejidad de los mecanismos que controlan la expresión de la enorme cantidad de información que portan todos los seres vivos. Sin embargo, más allá de esta complejidad que a veces parece inabordable, los estudios iniciados por Jacob y Monod, y extendidos por múltiples autores en años posteriores apuntaron a la existencia de un nivel esencial de decisión: la regulación de la transcripción. El intrincado problema de la regulación biológica quedaba así planteado en términos mucho más accesibles: transcribirse o no transcribirse, ésta es la cuestión principal que deben afrontar los genes de un organismo en cada instante y en cada lugar. Sin embargo, a medida que hemos ido progresando en la búsqueda de respuestas a esta pregunta, ha quedado patente que este mecanismo de control transcripcional no es suficiente para explicar la regulación de la expresión génica. Así, el nuevo nivel de regulación post-transcripcional orquestado por las numerosas tribus de microARNs recientemente descubiertas en el lado oscuro del genoma, amenaza con socavar la primacía del todopoderoso control transcripcional. Además, tampoco basta con regular la producción de proteínas a través de la expresión de sus genes, dado que también hay que inactivarlas o destruirlas cuando sus funciones ya no son necesarias. Por otra parte, muchas proteínas se sintetizan como moléculas

las precursoras inactivas que deben activarse en el lugar y momento adecuados. Por ello, todos los organismos han desarrollado numerosas estrategias para intentar regular la actividad de sus proteínas, una vez que son sintetizadas. Entre dichas estrategias, en los últimos años ha emergido con notable impulso el estudio de una forma de regulación que influye decisivamente en la vida y muerte de todas las células: la regulación por proteólisis.

Dada la legendaria estabilidad del enlace peptídico que une los aminoácidos constituyentes de las proteínas, la proteólisis no es un fenómeno que ocurra espontáneamente en condiciones fisiológicas, sino que debe catalizarse por un grupo de enzimas llamadas proteasas. Inicialmente, las proteasas se asociaron exclusivamente a reacciones inespecíficas del catabolismo proteico y su estudio quedó circunscrito a este ámbito durante varias décadas. Sin embargo, el transcurso del tiempo y la experimentación biológica han determinado que nuestra visión del universo proteolítico se haya expandido hasta alcanzar límites que resultarían insospechados para sus primeros exploradores. En efecto, hoy sabemos que las proteasas, a través de cortes selectivos en sus correspondientes sustratos, ejecutan reacciones irreversibles que influyen decisivamente en múltiples procesos biológicos como la progresión del ciclo celular, el desarrollo embrionario, la migración celular, el remodelado tisular, la angiogénesis, la apoptosis, la fertilización, la formación de los huesos, la coagulación sanguínea, el funcionamiento del sistema inmunológico o el establecimiento de rutas neuronales. Considerando esta multiplicidad de funciones, no resulta extraño que diversos cambios en la estructura o expresión de los enzimas proteolíticos se encuentren asociados al desarrollo de numerosos procesos patológicos incluyendo el cáncer, la artritis, la osteoporosis, las alteraciones cardiovasculares o las enfermedades neurodegenerativas. Además, muchos microorganismos, como el virus del SIDA, utilizan proteasas como factores de virulencia, por lo que de una u otra forma, estos enzimas

se han convertido en dianas de intervención terapéutica y por tanto de estudio preferente para el desarrollo de nuevos fármacos. Por ello, en los últimos años ha habido un interés creciente hacia la identificación y caracterización de los múltiples componentes de los sistemas proteolíticos que operan en los distintos seres vivos, desde las bacterias hasta el hombre.

Es precisamente en este contexto en el que se enmarca el trabajo de nuestro grupo de investigación en la Universidad de Oviedo, donde durante los últimos 17 años hemos tratado de progresar en el análisis de la implicación de las proteasas en diversos procesos patológicos, y especialmente en el cáncer. Los estudios realizados en este sentido nos han conducido a la identificación y caracterización estructural y funcional de más de 60 nuevas proteasas humanas, aisladas en su mayor parte como consecuencia de su sobreexpresión en distintos tipos de tumores, o debido a su participación en procesos de remodelación tisular que guardan un cierto paralelismo con los procesos tumorales. Tras la identificación de estas nuevas proteínas humanas, nuestro trabajo ha estado centrado en una amplia caracterización bioquímica y funcional de las mismas, que pueda servir como base para definir sus posibles implicaciones en la progresión del cáncer o en otras enfermedades. Asimismo, hemos realizado estudios dirigidos a analizar los mecanismos que regulan su expresión en condiciones normales y patológicas. El estudio de estos mecanismos reguladores ha proporcionado nuevas claves acerca de la etiopatogenia de las enfermedades neoplásicas, y de otros procesos como la artritis en los que también se sobre expresan estas enzimas. Por otra parte, debemos resaltar que aunque la relevancia patológica de las nuevas proteasas humanas identificadas en nuestro laboratorio deriva en gran medida de las alteraciones en sus patrones espacio-temporales de expresión durante el desarrollo del cáncer y otras patologías, deficiencias en alguno de estos nuevos genes causan distintas enfermedades hereditarias humanas,

incluyendo graves anomalías óseas y hematológicas, o devastadores síndromes de envejecimiento acelerado.

Más recientemente, nuestro grupo ha iniciado nuevas aproximaciones al estudio de las proteasas basadas en la generación de modelos animales que implican sobre expresión o eliminación de proteasas. Estas estrategias pueden conducir a una mejor comprensión de la participación de estas enzimas en el desarrollo del cáncer y proporcionar nuevas ideas acerca de sus funciones fisiológicas. Como ejemplo, nuestro trabajo de generación y análisis de animales deficientes en la metaloproteasa FACE-1/Zmpste24, ha conducido al hallazgo de su papel central en la formación de la envuelta nuclear. El trabajo con estos ratones ha adquirido una dimensión adicional tras el hallazgo de que mutaciones en el gen de esta metaloproteasa o en el de su sustrato lamina A, causan diversos síndromes de envejecimiento acelerado en humanos. Curiosamente, en estudios muy recientes con los ratones Face1^{-/-}, hemos observado que el extraordinario envejecimiento acelerado que muestran estos animales se asocia a la hiperactivación crónica de rutas de supresión tumoral, avalando así la idea de la pleiotropía antagónica entre el envejecimiento y el cáncer. Asimismo, hemos descrito la existencia de profundas alteraciones en la morfología y regulación de las células madre de estos ratones progeroides, sustanciando la hipótesis de que el envejecimiento puede estar causado en parte por disfunciones en dichas células madre. Por último, nuestro grupo ha demostrado que el dramático fenotipo de envejecimiento prematuro de estos ratones puede rescatarse mediante estrategias de manipulación genética o tratamientos farmacológicos dirigidos a disminuir los niveles de prelamina A acumulada en sus células. Estos hallazgos han abierto por primera vez la posibilidad de introducir tratamientos para los devastadores síndromes de envejecimiento prematuro en humanos, los cuales están ya en ensayos clínicos en pacientes de todo el mundo que padecen estas enfermedades.

Todos estos trabajos, son un claro ejemplo de la necesidad de mantener la actividad enzimática de las proteasas en sus justos niveles. Un exceso de las mismas puede favorecer procesos de destrucción tisular como los que acompañan al cáncer, y una deficiencia proteolítica puede conducir al desarrollo de otras patologías que también comprometen la vida de los pacientes. Estas ideas han sido la base de nuestra propuesta de una aproximación global al estudio de las proteasas a través de la introducción de nuevos conceptos como los de Degradómica o Degradoma, y del desarrollo de nuevas metodologías que doten de contenido experimental a estos conceptos globales. Asimismo, la necesidad del empleo de inhibidores específicos frente a las proteasas tumorales ha quedado de manifiesto tras nuestro hallazgo de que algunas proteasas como la colagenasa-2, desempeñan una función protectora frente a la progresión tumoral y no esa función promotora del cáncer tradicionalmente adscrita a las mismas. Por último, nuestra experiencia en el análisis genómico de proteasas y sus inhibidores nos ha permitido colaborar en los Proyectos Genoma de unos cuantos pasajeros distinguidos del Arca de Noé, como la rata, el ratón, el chimpancé, el orangután y el ornitorrinco, y cuyo estudio nos está ayudando a aproximarnos con modestia pero con perseverante insistencia a la búsqueda de respuestas a una pregunta esencial: ¿qué nos hace humanos?

Sirvan estas líneas experimentales en torno a la observación de la enfermedad humana bajo un minimalista prisma proteolítico como símbolo de nuestra contribución desde la periferia asturiana a esa Medicina molecular, cuyos fundamentos intuí en aquella lejana clase complutense surgida de la cosmovisión científica de Pedro García Barreno. Ahora, justo cuando Pedro ha llegado a una nueva edad palindrómica, o tal como aprendí de la cortesía académica, cuando está más cerca de los 60 que de los 50, es el momento de recordar con admiración y cariño su figura, la figura de un hombre de pensamiento pero también de sentimiento, que ha

dialogado con los enfermos en los hospitales, con la Naturaleza en los laboratorios, y con sus colegas en las Academias. En todos estos terrenos tan aparentemente dispares pero al mismo tiempo tan similares, Pedro García Barreno ha escrito páginas brillantes en los libros de la Medicina, de la Ciencia y de la Vida. Por eso, pero también por su infinita generosidad con todos y para todo, adornada además con una universal y proverbial bonhomía, Pedro se ha instalado para siempre en nuestros corazones como el representante más genuino de esa otra subespecie humana en peligro de extinción: la de los hombres de Paz, la de los hombres de Bien.

PEDRO GARCÍA BARRENO, UN PIONERO DE LA MEDICINA TRASLACIONAL

M.^a TERESA MIRAS PORTUGAL

La llegada de Pedro

Don Pedro García Barreno nació en Madrid el 23 de octubre de 1943. El otoño es la estación más hermosa de esta ciudad, pero no era aquella la mejor época para nacer, a la etapa de posguerra, opaca y de estricta supervivencia española, se sumaba la inmensa desolación de la culta y supuestamente racional Europa.

En ese mismo mes y año las tropas aliadas entran en Nápoles y la zona liberada de Italia declara la guerra a Alemania. Al mes siguiente los rusos reconquistan las planicies de Ucrania incluido Kiev, y los británicos, en respuesta a las destrucciones previas, comienzan el bombardeo masivo de Berlín y continúan con el de otras muchas ciudades que hasta el momento brillaban por haber sido la cuna de grandes filósofos, músicos, matemáticos y científicos.

Antes de que finalice 1943 se reúnen, en Teherán, Roosevelt, Churchill y Stalin, lo que nos podría servir de profunda reflexión: En primer lugar, los que supuestamente ganan deciden el futuro, pero lo que entendemos por ganar no es fácil de definir y el futuro tiene una duración poco precisa. En segundo lugar, una reunión similar de jefes de gobierno

en esa ciudad seria hoy día impensable. La idea occidental de racionalidad cultural y de progreso ha perdido valor en muchas zonas del mundo y la teocracia más extrema las ha hecho menos permeables.

Toda esta introducción es absolutamente innecesaria, pero a veces es bueno conocer el escenario a donde llegamos como depositados por algún tornado irascible y burlón. Casi todos los recién llegados son moldeados por el entorno y no se cuestionan el seno cultural que los acoge, solo algunos escapan a la rutinaria sumisión y son capaces de observar la panorámica con una cierta lejanía. Ese fue el escenario donde la mente racional, analítica y aguda de Pedro realiza sus observaciones, desmenuza el contexto, lo filtra por el razonamiento estricto y hace frente a las sinrazones gracias a su gran bagaje cultural, humanista y científico.

Conociendo a Pedro

Conocí a Pedro García Barreno a través de un amigo común, el profesor Ángel Martín Municio, hombre de gran inteligencia y singularidad, a la sazón director del departamento de Bioquímica de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense. Era el final de los años 80 del pasado siglo y con motivo de la lectura de una tesis doctoral.

Pedro había sido uno de los jóvenes clínicos seducido por los cursos de biología molecular que impartía el Profesor Municio y que sirvieron para crear una autentica escuela de renovación y elevación científica en la ansiosa población universitaria. Esa idea de la ciencia como necesidad y motor nunca le abandonaría.

Unos años mas tarde en 1993, recuerdo con absoluta nitidez que lo volví a encontrar, vestía un elegante traje gris, con camisa blanca y corbata con fondo rojo suave y estampada con hojas trilobuladas en color amarillo pajizo. Fue en el curso de verano del Escorial organizado por el profesor

Municio, del cual fui secretaria, titulado: «*Cell Signal Transduction, Second Messengers, and Protein Phosphorylation in Health and Disease*». Los conferenciantes nacionales y extranjeros fueron todo un lujo, no en vano el profesor Municio me confesó que Pedro había dado nombres y puesto en contacto con muchos de ellos. Edmond Fisher, premio Nobel de fisiología y medicina, nos deleitó con la importancia de las tiroquinas fosfatasa en el ciclo celular. Yasutomi Nishizuka habló de la hidrólisis de los fosfolípidos y la activación de la nueva, por aquel entonces, proteína quinasa C (PKC). Nicolás Bazán presentó la apasionante historia del *Platelet activating factor*, PAF, y su efecto en la activación de genes cerebrales. Michel Moskowitz nos concedió la primicia de los subtipos de receptores de serotonina que eran poderosas dianas anti-migrañosas. No quiero olvidar tampoco a Pierre Braquet y a L. A. Horrocks, y entre los nacionales a Jesús Ávila, Lisardo Boscá, Guillermo Giménez-Gallego, Cecilio Giménez, María Antonia Lizarbe, Federico Mayor y yo misma entre otros.

El libro con el contenido del curso fue publicado por Plenum Press y pudimos reproducir el bellissimo cartel dibujado por Rafael Alberti para anunciar los cursos de aquel año (16). El cartel contenía toda una filosofía de la vida y la ciencia: un Escorial esquemático con una especie de raíces de anclaje hacia la tierra y un gran número de pájaros revolándolo. Todo un símbolo de la necesidad de aunar la realidad experimental y la imaginación en el mundo de la creación científica. Fue ahí donde conocí realmente a Pedro y comprendí la razón por la que el Profesor Municio le tenía tanta simpatía y aprecio. Pedro, además de inteligencia, tenía muy buen talante, excelente humor, trabajaba duro y sobre todo tenía la clarividencia de anticiparse a lo que vendría.

Esa visión lúcida y precisa sobre la personalidad de Pedro García Barreno la dejó escrita don Ángel en la respuesta a su discurso de entrada en la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales: *La vida se portó con él clementemente; le ha dado sensibilidad, talento, generosidad, entre-*

ga sin cuenta y sin razón y una afición desordenada al trabajo; le ha negado, en cambio, ambición, mezquindad y cualquier aptitud para la intriga. Discrepo de la descripción solamente en «la carencia de ambición», Pedro es quizás una de las personas más ambiciosas que he conocido, pero no para sí, no para su beneficio. Pedro es ambicioso para su entorno, para que los que le rodean puedan hacer las cosas bien hechas, para optimizar y movilizar los recursos al alcance de los científicos y la ciencia de calidad, para la adecuada dotación y equipamiento de los hospitales y la necesidad de una investigación hospitalaria de alto nivel. Pedro es un soñador, entre realista y romántico, extraordinariamente ambicioso para su País.

La formación de Pedro

Pedro podía haber estudiado cualquier disciplina, pero los soñadores activos quieren solucionar los problemas de la humanidad y por eso comienza obteniendo su título de Licenciado en Medicina y Cirugía en la Universidad Complutense de Madrid en 1966, y Doctor en Medicina por la misma universidad en 1973. Universidad de la que sería y es Catedrático de Fisiopatología Quirúrgica.

Pedro complementa su formación con la asistencia a los seminarios de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias, estancias en diversas universidades de Estados Unidos para graduados extranjeros en Medicina. Su intuición le indica la necesidad de adquirir conocimientos de nuevas disciplinas, como la informática, que tan necesaria sería en la adaptación de los equipos de diagnóstico por imagen al ámbito hospitalario, desarrollando al mismo tiempo su afición por lo exacto, el cálculo matemático y los planteamientos lógicos. Como nunca deja de sorprendernos, la obtención del título «Executive Master in Business Administration» podría parecer un capricho, pero fue una de las piezas fundamentales en su

análisis de la dimensión de la ciencia como un proyecto viable en el futuro.

Sus primeros intentos de aunar clínica y laboratorio estuvieron encaminados a profundizar en los parámetros para evaluar la situación de los pacientes en el shock endotóxico, labor que se convierte en eje de su investigación en 1974 mediante colaboración entre el Hospital Gregorio Marañón y el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la facultad de Ciencias de la Universidad Complutense (4). Pedro recorre todas las etapas, desde el puro análisis de los datos de parámetros en pacientes, hasta que es consciente de la necesidad de disponer de modelos animales, que él denomina modelos experimentales de estudio, donde realiza importantes contribuciones sobre la acción de la endotoxina de *E. coli* a nivel de funcionamiento mitocondrial en 1980 y 1981 (5).

Desde su lugar privilegiado en el hospital como Director del Servicio de Medicina y Cirugía Experimental, asiste a la tragedia del denominado «síndrome tóxico» que a comienzos de la década de 1980 hace su aparición dando lugar a especulaciones sin fundamento. En una serie de sólidos trabajos desde 1983, postulan y demuestran, que los efectos son debidos a los efectos de las anilidas del ácido oleico sobre la lipogénesis y la peroxidación de lípidos (6). Pedro fue nombrado Presidente de la Comisión Unificada del Plan Nacional del Síndrome Tóxico y realizó una amplia labor de control de los trabajos hasta descubrir el origen de los aceites tóxicos. Coincide esta masiva intoxicación, con los primeros casos del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, SIDA, y añadió un elemento más de tensión, a la Presidencia de Adolfo Suárez y la transición española.

Los oncogenes y concretamente el efecto del oncogén *ras* sobre diversas cascadas de señalización fue otro de los temas que se abordaron en su laboratorio de medicina experimental publicando un excelente artículo en la revista *Science* en 1987 (7). La flexibilidad de las membranas y la impor-

tancia del surfactante pulmonar en las enfermedades pulmonares son también de esta época de 1989-90.

Al comienzo de los años 1990 la obsesión clínica de Pedro García Barreno da un vuelco y se encauza a potenciar el diseño de prototipos para paliar la falta de funcionamiento cardíaco, lo que denominaríamos «corazón artificial». De este modo podrían prolongarse los tiempos de espera para la cirugía de trasplante cardíaco, son los años 1992, 1994, 1996 en los que publica una serie de importantes trabajos en la revista *Artificial Organs* (8, 9). Ciertamente que la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental cumplía sus objetivos con creces.

No deja de admirar que animado por ese afán de introducir las técnicas más novedosas en los hospitales, conjugue la simulación de cirugía sobre tomografía computarizada e imágenes de resonancia magnética, es el año 1997 (10). Le sigue en 1998 un trabajo compilatorio sobre la integración de imágenes multimodales y otros muchos analizando cada una de las técnicas de imagen y su preocupación por normalizar los análisis y efectuar unos cálculos precisos de las densidades observadas con los diferentes procedimientos.

Ese gusto perfeccionista por la precisión y el cálculo le lleva, junto con su grupo del hospital, a proponer un nuevo algoritmo para minimizar los efectos de la segmentación de las imágenes procedentes de la resonancia magnética, realizando una serie de interesantes publicaciones en importantes revistas, como *Neuroimage* 2003, 2005, *Magnetic Resonance Imaging* 2004, *Human Brain Mapping* en 2004 etc. (11-14).

Me gustaría finalizar este esbozo de su labor clínica-investigadora con un pequeño fragmento de una de sus recientes publicaciones titulada: *Design of Experimental Models in Surgical Investigation* (15):

Research in Medicine is essentially based on three knowledge resources: diseased people (natural and primary), cadaveric bodies (Pathology primary resource) and experimental animals, whom

constitutes physiopathologic knowledge resource. Experimental advances reached in the last century have determined the change of the concept «experimental animal» to a wider term: «experimental model».

Pedro deja aquí constancia de la necesidad de aunar todo el conocimiento y los datos obtenidos por diferentes procedimientos para poder tener una visión completa de la situación patológica del paciente, siendo el tercer elemento «el modelo experimental» una pieza clave en la comprensión de la patología.

Pedro y las Academias del Instituto de España. La Real Academia de Ciencias

Pedro lee su discurso de entrada como Académico de Número en la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales en diciembre de 1984 (1). El título: «*Lo exacto, lo físico, lo natural y la medicina*», es una declaración de principios, su mente necesitaba el componente de lo exacto y lo experimental en una profesión con bordes poco precisos, a medio camino entre el diagnóstico y el sacerdocio. Su trayectoria racionalizada a través del trabajo de laboratorio y la aplicación de los grandes avances tecnológicos está recogida someramente en el apartado anterior. He querido en este apartado dejar constancia con sus propias palabras, extraídas del discurso de ingreso, de su visión del mundo de la medicina.

«La medicina es una teoría práctica de la realidad humana...

La medicina es una actividad cuya esencia se localiza en el denominado encuentro clínico y demanda que el conocimiento científico se particularice en la realidad vivida de una persona determinada, con el propósito de promover la salud o curar la enfermedad, lo que consigue mediante la manipulación directa del organismo dentro de una matriz de decisión que implica valores...

Se comenta frecuentemente que la medicina clínica no es experimental ni teórica, lo que la aleja del contexto científico. No es cierto;

la medicina clínica elabora hipótesis a partir de la «Clínica», realiza comprobaciones y recoge datos más precisos mediante la tecnología ofrecida por la Bioquímica, etc., pero, por último, verifica sus planteamientos en el laboratorio que ofrecen la clínica y el quirófano, a la vez que los objetiva en el animal de experimentación».

El discurso finaliza la parte dedicada a lo exacto y la medicina con el pleno convencimiento de que existe una investigación básica en ciencias de la computación cuya aplicación en las ciencias medicas es necesaria y que constituiría por sí misma un área de desarrollo de las ciencias médicas.

En lo físico y la medicina, Pedro es un convencido de la importancia de la física y los modelos teóricos que aporta. Uno de los ejemplos en el que hace hincapié es el del cerebro, fijando su atención en la propia arquitectura cerebral y su disposición, que daría idea del rango de las órdenes en su funcionamiento. Es de destacar el aporte que los descubrimientos físicos suponen en el desarrollo de la medicina, y cito texto una de sus frases: «...*La repercusión del conocimiento físico en la medicina, significa una aportación continuada en el desarrollo de la misma. Si hace tiempo leyes físicas simples soportaron el desarrollo del fonendoscopio, que supuso la primera revolución de la práctica médica, la repercusión del proceso de imagen, la revolución icónica, ha hecho de la imagen médica un nuevo paradigma*».

Lo exacto y lo físico son para Pedro García Barreno los dos grandes sistemas mediante los cuales se intenta comprender la naturaleza. El conocimiento natural de la medicina necesita dos paradigmas: la evolución biológica y la biología molecular, proporcionando la herramienta diagnóstica y también el alcance de una terapia racional.

Su visión de las enfermedades neuropsiquiátricas y de que las neurociencias son uno de los ejemplos paradigmáticos de integración del conocimiento y potencialidad futura, postulado en 1984, se han cumplido y han estado y siguen estando de plena actualidad. La ciencia médica como toda

ciencia experimental necesita de ideas, a veces aparentemente sin conexión lógica, o contrapuestas al buen sentido, como en los buenos tiempos del empirismo más antiguo.

La búsqueda de las razones que expliquen los hechos es lo que necesita de la técnica perfecta desarrollada por la física y los cálculos más precisos que aporte la matemática. Al final, cualquier hallazgo de nivel, aunque proceda de la intuición, hermosa palabra, necesitará actualmente de las más sofisticadas técnicas que habrán requerido en su desarrollo de lo físico y lo exacto. Cuando Newton consiguió calcular las orbitas de los planetas y modelizarlas, algunos pensaron que el cálculo para explicar la vida estaba próximo, muy pronto se dieron cuenta, entre ellos Leibnitz, que es tal la complejidad de la vida que si ello fuera factible, exigirá algunos milenios de dedicación al problema.

La actividad de Pedro García Barreno en la Academia ha sido sin descanso y entre los cometidos tuvo el de representante en el Instituto de España, ocupando el cargo de Secretario General del mismo entre los años 1996 y 2004. En esa época recuerdo su ayuda y apoyo, junto con el de María Cascales, para que impartiera un curso de Neurociencias. El curso impartido a finales de 2003 se titulaba: *Enfermedades neurales y neurodegenerativas: Nuevos avances moleculares y farmacológicos*. El curso batió record de asistencia, con magníficos alumnos y tuvo como colofón algo inesperado, tuve que presentar el manuscrito completo del libro en una semana para que contabilizara en los gastos del año en curso (41). Esa semana era la Navidad de 2003. ¡Me acordé de Pedro!

Pedro trabajó sin desmayo desde el Instituto de España para dar nivel y contenido a una institución que, puesto que existe, debe de sacarse de ella la máxima rentabilidad científica y cultural.

*La Real Academia Española (de la Lengua)
...que tanto gusto había*

*en quejarse, un filósofo decía,
que, a trueco de quejarse,
habían las desdichas de buscarse.*

(La vida es sueño.

Don Pedro Calderón de la Barca.)

No podría finalizar sin citar su incorporación a la Real Academia Española, la de la Lengua. No podía ser de otro modo, la ciencia en general y la médica en particular tienen un lenguaje que requiere precisión para ser eficaz; es además el que está sometido a más cambios y por lo tanto a la necesidad de adaptar palabras o crearlas en base al contenido al que se quiere dar una nueva entidad. Pedro ya tenía experiencia como editor de la revista *Arbor* del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de que las cosas solo existen si se las nombra y la palabra es en sí misma creación y arte, el gran poder de los humanos.

El discurso de entrada fue leído el 29 de octubre de 2006, contestado por Margarita Salas. El título contenía una nueva y hermosa palabra: *De Calderón y cibercirugía* (3).

Leyendo su discurso me sorprendió que Ruyces de Fontecha en 1606 publicara un libro de cultismos para comprender en castellano los términos procedentes del latín, griego o arábigos y que en los siglos de aislamiento posteriores no tuviera continuidad, coincidiendo con la consolidación de la ciencia en Europa.

El acceso al interior corporal mediante imágenes incruentas es un tema que siempre ha entusiasmado a Pedro. Desde el diagnóstico radiológico y la importancia en su desarrollo del gran número de fracturas óseas de la gran guerra del 1914-18, el desarrollo de medios de contraste, para darle más amplia utilidad, la angiografía de contraste, los tomógrafos y la reconstrucción tomográfica, siendo el primer equipo de esta naturaleza instalado para uso clínico en 1975. Todas las técnicas han necesitado de nuevas palabras a las cuales ya no prestamos atención de tanto repetirlas. La revolución icónica

de la medicina lo ha sido también de los términos para entenderla.

El discurso de Pedro contiene deliciosos y documentados detalles del desarrollo de la cirugía incruenta o cibercirugía. El acceso a los vasos sanguíneos mediante técnicas menos invasivas, las primeras angioplastias y el origen de la palabra *stent*, epónimo de un dentista inglés que lo ideó. Aunque reconozco que sería difícil pensar cómo sería el vocablo castellano: «muelle de mantenimiento de luz de vaso sanguíneo». Seguro que Pedro tiene alguna palabra pensada.

La cibercirugía es una palabra que resulta futurista, cálida y con decisión, intuimos en su significado la esperanza de menos dolor y mejor recuperación frente a los episodios que antes eran cruentos. Cibercirugía, será una palabra de las más utilizadas en el futuro y a cuyo cobijo acudiremos antes o después los humanos, ya que al comenzar el «peregrinar reparatorio» es difícil parar y como reza la famosa frase de Don Pedro Calderón de la Barca: *De males a bienes dicen que se pasa fácilmente; pero de males a males, digo yo que es más frecuente.*

¡Que la cibercirugía nos alcance y nos proteja!

Pedro y la organización de la Ciencia

¿Para qué querría Don Pedro García Barreno un máster en organización de empresas?, dicho en inglés un: «Executive Master in Business Administration».

Creo que Pedro es un organizador nato y que plantea la ciencia como los elementos que encajan y se ensamblan para dar estructuras funcionales y armoniosas, siguiendo los ejemplos de tenseguridad, como postula en su discurso de entrada en la Academia de Doctores de España (2). ¿Es posible hacer esos encajes? ¿Cómo deben de ser los elementos, o grupos ensamblantes? ¿Se les puede poner juntos y ver cuál es la dinámica de interacción? Hace algunos años visitando una

exposición de los tapices de Goya me fijé en los niños cogiendo fruta. En este tapiz se puede observar claramente como un niño aúpa a otro sobre sus hombros para que alcance la deseada manzana roja. Pensé que muchas reacciones necesitan el impulso de una reacción acoplada y la ciencia como obra colectiva de una sociedad del conocimiento necesita los impulsos, los catalizadores y un ambiente que garantice la continuidad. La ciencia debería de ser una estructura colectiva auto-ensamblante, regida por las leyes de la tensegridad, capaz de crecer como un fractal y auto-replicante. Esa era sin duda la idea de Pedro como punto de partida en su afán de aunar esfuerzos y un objetivo común, la estructura creada debería de estar compensada y poseer esa belleza intrínseca de las cosas bien hechas. Queda todavía un cuestionamiento ¿Será posible crear riqueza? ¿Será posible pensar en la utilidad inmediata sin condicionar la idea original?

Pedro y los neurotransmisores: Receptores de nucleótidos P2X y P2Y

Ha sido una constante en el trabajo de investigación de Pedro García Barreno querer comprender el funcionamiento del cerebro mediante las técnicas de imagen. Sus discursos de entrada en las ya reseñadas Academias dejan constancia de este hecho. Comprender el comportamiento humano y la valoración de uno mismo en el entorno social; cómo se consigue el mimetismo con los congéneres para igualarse a la tribu ancestral; cómo se pueden disociar las experiencias aportadas por el entorno y crear un mundo propio anárquico o grandilocuente que nos cierre más y más, como ocurre en las enfermedades neuropsiquiátricas. Cómo si el gran ganglio cefálico llamado cerebro decidiera ir por su cuenta haciendo imposible el acceso al mundo real. Los que trabajamos en neurotransmisores, sabemos que las puertas de nuestro comportamiento como humanos están bajo el control de receptores, transportadores, acumuladores, enzimas

de síntesis y de degradación de unas pequeñas moléculas de muy diversa naturaleza, que han sido y son dianas farmacológicas de gran relevancia en los trastornos del comportamiento, y otras muchas disfunciones neurológicas.

Baste citar algunos ejemplos, como es el campo de los neurotransmisores aminérgicos: catecolaminas, serotonina e histamina, en el cual se han desarrollado múltiples fármacos que van desde el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, a la depresión, la migraña, la agresividad, la hiperactividad, pasando a otros efectos periféricos, como el mareo, la hipertensión, la hemostasia y un largo etc. Más reciente y compleja es la farmacología del neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico, GABA, que ha permitido tratar la epilepsia, el insomnio, la ansiedad, nuevos anestésicos y un largo etc... No pretendo pasar revista a todos los neurotransmisores y enumerar las dianas terapéuticas que entran en su ámbito, solamente deseo que quede constancia de que existen otros transmisores nerviosos menos conocidos para los cuales se supone un gran potencial terapéutico y necesitan de un gran esfuerzo de investigación, ya que todo está por hacer.

Los nucleótidos, de los cuales el ATP es el más conocido, pero igualmente el ADP, UTP, UDP y otros muchos, incluidos los diadenosina polifosfato, descubiertos por nuestro grupo en vesículas neuronales de secreción, actúan como mensajeros extracelulares y en el sistema nervioso son neurotransmisores de pleno derecho (17-43). La existencia de un elevado número de receptores clasificados en dos grandes familias, la de los P2X ionotrópicos, con siete subunidades susceptibles de combinarse formando trímeros y la de los P2Y que son metabotrópicos y con 8 miembros en la actualidad, su amplia distribución, la presencia de múltiples variantes de procesamiento, junto con la carencia de utensilios farmacológicos, agonistas o antagonistas específicos, convierten el estudio de estos receptores en una carrera de obstáculos.

Las posibilidades de los receptores P2 en terapéutica aparecieron de golpe en el año 2000, cuando se clonó el receptor P2Y₁₂, cuyo agonista fundamental es el ADP y se relacionó con una enfermedad hereditaria en la cual la capacidad de agregación plaquetaria estaba disminuida al tener una variante inactiva del receptor. Se descubrió al mismo tiempo que este era el receptor diana de un fármaco huérfano hasta entonces, el clopidogrel, comercialmente conocido como plavix, que era el fármaco más utilizado para prevenir la repetición del ictus cerebral y en las etapas de post-infarto de miocardio, ya que impedía la formación de trombos. Como en una lección de farmacología clásica, el clopidogrel necesitaba ser primero metabolizado en el hígado para ser activo, siendo por lo tanto un pro-fármaco.

Otros muchos receptores P2 se han sumado como potenciales dianas terapéuticas, pero la farmacología se resiste, la química orgánica de los compuestos mimetizando los derivados nucleotídicos tiene el problema de los grupos fosfato, todo va muy bien *in vitro* pero la llegada al medio interno es una batalla no ganada.

En nuestro grupo y gracias a la ayuda de la Fundación Marcelino Botín hemos puesto de manifiesto que el último receptor clonado, el P2Y₁₃, cuya presencia es muy abundante en cerebro, es capaz de inhibir el enzima glucógeno sintasa quinasa-3, GSK-3, clave en procesos degenerativos y considerada una de las dianas en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, gracias a los trabajos pioneros de Jesús Ávila. La activación del receptor lleva la expresión de genes que conducen a la diferenciación y neuroprotección (46).

En el área de los receptores ionotrópicos de nucleótidos, hace muchos años habíamos propuesto la existencia de receptores ionotrópicos presinápticos tanto para ATP, como los diadenosina polifosfatos. Estos receptores son plenamente funcionales, hacen entrar calcio e inducen la exocitosis de los neurotransmisores almacenados (44, 47). Están además regulados mediante interacciones con otros receptores situados en

la propia terminal presináptica, como los metabotrópicos de glutamato, GABA_B y Adenosina A₁ y A₂, y los ionotrópicos de glutamato tipo NMDA y acetilcolina tipo nicotínico (42, 43, 45, 47). Según cuál sea el tipo de receptor P2X pueden además asociarse a toda una serie de cascadas que, regulan la señalización intracelular. Para estos receptores, sobre todo los P2X₁ y P2X₃ fuimos capaces de sintetizar inhibidores con constantes de inhibición en el rango nM, los diinosina polifosfato (25, 30). Éramos tan ingenuos que ni siquiera sospechamos del valor que aquel descubrimiento hubiera tenido con la correspondiente patente, corría el año de 1997. ¡Ahora sí que somos conscientes de lo que hemos tirado!

Gracias de nuevo a la Fundación Botín le dimos ambición a los receptores ionotrópicos presinápticos para nucleótidos y pudimos establecer colaboraciones con excelentes grupos, así hemos podido demostrar que el receptor P2X₇ se encuentra en el cono de crecimiento en las etapas iniciales de formación y guía del axón (49). En un enroque inesperado, la activación del receptor P2X₇ por el agonista fisiológico, el ATP, mantiene bloqueado el crecimiento y ramificación del axón, mientras que su bloqueo mediante antagonistas o con RNA de interferencia induce un desmedido crecimiento axonal con ramificaciones que se pueden calificar de exuberantes. Esto lleva a una cuestión tan sencilla como evidente: ¿Cómo sale de las células el ATP necesario para mantener el equilibrio estático de las estructuras de conexión en las delicadas terminales sinápticas y cómo es su control para parar el crecimiento en un lugar definido?, se necesitará tiempo para conocer el sistema completo. El receptor P2X₇, en nuestra opinión, se ha convertido en una «nariz» neuronal sensora de destino y llegada a buen puerto. Dará mucho que hablar y las regulaciones de su expresión e interacciones con otros receptores presinápticos están ahora en su inicio.

Este descubrimiento de pura ciencia básica tiene unas connotaciones que lo hacen apetecible en aplicaciones para paliar anomalías que requieran de nuevas conexiones axóni-

cas en lugares alejados, o de ramificaciones axónicas que alcancen otras dianas. En las enfermedades neurodegenerativas con alteraciones de conexiones sinápticas, uno de cuyos ejemplos es la enfermedad de Huntington, utilizando el modelo de ratón KO condicional preparado por José Javier Lucas, hemos visto como el incremento de la actividad del receptor P2X7 en la zona presináptica de las terminales del córtex motor que contactan con el estriado, es capaz de inducir una entrada más sostenida de calcio y la muerte de las neuronas que expresan huntingtina mutada (51).

Lo anteriormente citado es solo un pequeño ejemplo de la potencialidad de la señalización mediada por nucleótidos, a cuyo desarrollo asistiremos en el futuro y será una de las áreas más fértiles de la fisiopatología y la farmacología.

El poder trabajar sin angustia por la escasez de medios, nos ha hecho más ambiciosos y sin temor a enfrentarnos con problemas más complejos, pidiendo ayuda a los grupos que pueden aportar las herramientas tecnológicas de las que carecemos (48, 52). En definitiva somos más osados y también más abiertos, comunicamos y obtenemos en retorno otras ideas. ¿Será eso la tensegridad cooperativa de la ciencia? ¿Es ese el camino indispensable para la ciencia de calidad en nuestro País? Yo no tengo duda de que lo es.

Nota final

Hace tiempo leí que *«nada que no pueda ser imaginado por el ser humano existirá»*. En ciencia, en los aspectos novedosos, es esencialmente así, aunque esto no indica si lo imaginado es personal y singular, o ronda a un colectivo y surge en un momento específico, en terreno abonado para la idea. En las obras sociales colectivas, y la ciencia lo es, se requieren planes para preparar el terreno y es ahí donde entra en juego el tesón y la personalidad de Pedro García Barreno, convenciendo y movilizand o voluntades. Muchos le debemos mu-

cho, y a mí en particular me gustaría no defraudar su idea de la tensegridad en el ámbito humano de la ciencia.

No quiero finalizar estas líneas sin citar a Nela, su esposa, a su hija Marta, a sus hijos Alberto y Ricardo, sin olvidarme de sus nietecitos Iván, Nadia y Maya, ellos son la constante en el norte de su vida.

Gracias Pedro por tu generosa y noble ambición.

Referencias

1. García Barreno, P. (1984) Lo exacto, lo físico, lo natural, y la medicina. Discurso de entrada en la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.
2. García Barreno, P. (2005) Tensegridad: arquitectura, arte, biología. Discurso de entrada en la Real Academia de Doctores de España.
3. García Barreno, P. (2006) De Calderón y cibercirugía. Discurso de entrada en la Real Academia Española.
4. García-Barreno, P. & Balibrea, J. L. (1978) Metabolic response in shock. *Surg. Gynecol. Obstet.* 146: 182-9.
5. Conde, G., García-Barreno, P. & Suárez, A. (1980) Arachidonate release from rat liver mitochondria in endotoxin shock. *FEBS Letters.* 112: 89-91.
6. Suárez, A., Vilorio, M. D., García-Barreno, P. & Municio, A. M. (1985) Toxic oil syndrome, Spain: effect of oleoyl-anilide on the release of polyunsaturated fatty acids and lipid peroxidation in rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 126: 551-558.
7. Lacal, J. C., de la Peña, P., Moscat, J., García-Barreno, P., Anderson, P. S. & Aaronson, S. A. (1987) Rapid stimulation of diacylglycerol production in *Xenopus* oocytes by microinjection of H-ras p21. *Science.* 238: 533-536.
8. García-Barreno, P. *et al.* (1992) Improvement of the hydrodynamic response of a ventricular assist device: a false auricle solution. *Artif. Organs.* 16: 301-305.

9. García-Barreno, P. *et al.* (1994) Development and clinical assay of the BCM ventricular assist device. *Artif. Organs*. 18: 484-489.
10. García-Barreno, P. *et al.* (1997) Simulated surgery on computed tomography and magnetic resonance images: an aid for intraoperative radiotherapy. *Comput. Aided Surg.* 2: 333-339.
11. Guisáosla, C., Desco, M., Millan, O., Villanueva, F. J. & García-Barreno, P. (2002) Biological dosimetry of magnetic resonance imaging. *J. Magn. Reson. Imaging*. 15: 584-590.
12. García-Barreno, P. *et al.* (2003) Influence of the normalization template on the outcome of statistical parametric mapping of PET scans. *Neuroimage*. 19: 601-612.
13. García-Barreno, P. *et al.* (2004) Method for bias field correction of brain T1-weighted magnetic resonance images minimizing segmentation error. *Hum. Brain Mapp.* 22: 133-144.
14. García-Barreno, P. *et al.* (2007) ¹H MR spectroscopy in the assessment of gliomatosis cerebri. *AJR Am. J. Roentgenol.* 188: 710-714.
15. García-Barreno, P. *et al.* (2008) Design of experimental models in surgical investigation. *Actas Urol. Esp.* 32: 27-40.
16. Municio, M. & Miras-Portugal, M. T. (Eds.) (1994) Cell signal transduction, second messengers and protein phosphorylation in health and disease. (Plenum Press).
17. Castro, E., Tome, A. R., Miras-Portugal, M. T. & Rosario, L. (1994) Single cell Fura-2-microfluorometry reveals different purinoceptor subtypes coupled to Ca² influx and intracellular Ca²⁺ release in bovine adrenal chromaffin and endothelial cells. *Pflugers Arch. European Journal of Physiology*. 426: 524-533.
18. Klishin, A., Lozovaya, N., Pintor, J., Miras-Portugal, M. T. & Krishtal, O. (1994) Possible functional role of diadenosine polyphosphates: Negative Feedback for excitation in hippocampus. *Neuroscience*. 58: 235-236.

19. Pintor, J., Porras, A., Mora, F. & Miras-Portugal, M. T. (1995) Dopamine receptor blockade inhibits the amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates - Ap4A and Ap5A from neostriatum of the conscious rat. *J. Neurochem.* 64: 670-676.
20. Pintor, J. & Miras-Portugal, M. T. (1995) P2₇purinergic receptors for diadenosine polyphosphates in the nervous system. *Invitation review to General Pharmacology.* 26: 229-235.
21. Castro, E., Mateo, J., Tomé, A. R., Barbosa, M., Miras-Portugal, M. T. & Rosario, L. M. (1995) Cell-Specific purinergic receptors coupled to Ca²⁺ entry and Ca²⁺ release from internal stores in Adrenal Chromaffin cells: Differential Sensitivity to UTP and Suramin. *J. Biol. Chem.* 270: 5098-5106.
22. Pintor, J. & Miras-Portugal, M. T. (1995) A novel receptor for diadenosine polyphosphates coupled to calcium increase in rat midbrain synaptosomes. *British Journal of Pharmacology.* 115: 895-902.
23. Gualix, J., Abal, M., Pintor, J., García-Carmona, F. & Miras-Portugal, M. T. (1996) Nucleotide vesicular transporter of bovine chromaffin granules. Evidence for mnemonic regulation. *J. Biol. Chem.* 271: 1957-1965.
24. Pintor, J., King, B. F., Miras-Portugal, M. T. & Burnstock, G. (1996) Selectivity and activity of adenine dinucleotides at recombinant P2X₂ and P2Y₁ purinoceptors. *British Journal of Pharmacology.* 119: 1006-1012.
25. Pintor, J., Gualix, J. & Miras-Portugal, M. T. (1997) Diadenosine polyphosphates, a group of dinucleotides with antagonistic effects on diadenosine polyphosphate receptor. *Molecular Pharmacology.* 51: 277-284.
26. Pintor, J., Gualix, J. & Miras-Portugal, M. T. (1997) Dinucleotide receptor modulation by protein kinases (Protein Kinases A and C) and Protein Phosphatases in rat brain synaptic terminals. *J. Neurochem.* 68: 2552-2557.

27. Gualix, J., Fideu, M. D., Pintor, J., Rotllán, P., García-Carmona, F. & Miras-Portugal, M. T. (1997) Characterization of Diadenosine Polyphosphates Transport to chromaffin granules from adrenal medulla. *FASEB Journal*. 11: 981-990.
28. Pintor, J., Puche, J. A., Gualix, J., Hoyle, C. H. V. & Miras-Portugal, M. T. (1997) Diadenosine polyphosphates evoke Ca^{2+} transients in guinea-pig brain via receptors distinct from those for ATP. *Journal of Physiology (London)*. 504: 327-335.
29. Mateo, J., Martinez de Lecea, M., Miras-Portugal, M. T. & Castro, E. (1998) Ca^{2+} signals mediated by P2X-type purinoceptors in cultured cerebellar Purkinje cells. *Journal of Neuroscience*. 18: 1704-1712.
30. King, B. F., Liu, M., Pintor, J., Gualix, J., Miras-Portugal, M. T. & Burnstock, G. (1999) Diinosine pentaphosphate (Ip5I): A potent competitive antagonist at recombinant rP2X1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 128: 981-988.
31. Pintor, J., Díaz-Hernández, M., Gualix, J., Gómez-Villafuertes, R., Hernando, F. & Miras-Portugal, M. T. (2000) Diadenosine Polyphosphate Receptors: from rat and Guinea-pig Brain to Human Nervous system. Invited review. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics*. 87: 103-115.
32. Pintor, J. & Miras-Portugal, M. T. (2000) Receptors for diadenosine polyphosphates P2D, P2YApnA and P4, and dinucleotide receptors: are there too many? *Trends in Pharmacological Sciences*. 21: 135.
33. Pereira, M. F., Díaz-Hernández, M., Pintor, J., Miras-Portugal, M. T., Cunha, R. A. & Ribeiro, J. A. (2000) Diadenosine polyphosphates facilitate the evoked release of acetylcholine from rat hippocampal nerve terminals. *Brain Research*. 879: 50-54.
34. Pintor, J., Miras-Portugal, M. T. & Fredholm, B. B. (2000) Research on purines and their receptors comes of age. *Trends in Pharmacological Sciences*. 21 December.

35. Gómez-Villafuertes, R., Gualix, J. & Miras-Portugal, M. T. (2001) Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors able to induce GABA secretion. *J. Neurochem.* 77: 84-93.
36. Giraldez, L., Díaz-Hernández, M., Gómez-Villafuertes, R., Pintor, J., Castro, E. & Miras-Portugal, M. T. (2001) ATP and diadenosine polyphosphate receptors in rat basal ganglia aminergic terminals. *J. Neurosci. Res.* 64: 174-182.
37. Díaz-Hernández, M., Pintor, J., Castro, E. & Miras-Portugal, M. T. (2001) Independent receptors for diadenosine pentaphosphate and ATP in rat midbrain single synaptic terminals. *European Journal of Neurosciences.* 14: 918-926.
38. Díaz-Hernández, M., Pintor, J., Castro, E. & Miras-Portugal, M. T. (2002) Colocalisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic terminals. *Neuropharmacology.* 42: 20-33.
39. Díaz-Hernández, M., Pereira, F., Pintor, J., Cunha, R., Ribeiro, R. A. & Miras-Portugal, M. T. (2002) Modulation of the rat hippocampal dinucleotide receptor by adenosine receptor activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 301: 441-450.
40. Gómez-Villafuertes, R., Pintor, J., Gualix, J. & Miras-Portugal, M. T. (2003) GABAB receptor-mediated presynaptic potentiation of ATP ionotropic receptors in rat midbrain synaptosomes. *Neuropharmacology.* 44: 311-323.
41. Gualix, J., Gómez-Villafuertes, R., Díaz-Hernández, M. & Miras-Portugal, M. T. (2003) Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain. *J. Neurochem.* 87: 160-171.
42. Miras-Portugal, M. T. (2004) Enfermedades neurales y neurodegenerativas: Nuevos avances moleculares y farmacológicos. Monografía del Instituto de España (ISBN: 84-85559-59-2).
43. Gómez-Villafuertes R., Pintor, J., Gualix, J. & Miras-Portugal, M. T. (2004) GABA modulates presynaptic sig-

- nalling mediated by dinucleotides on rat synaptic terminals. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 308: 1148-1157.
44. Díaz-Hernández, M., Sánchez-Nogueiro, J., Pintor, J. & Miras-Portugal, M. T. (2004) Interaction between dinucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 311: 1-14.
 45. León, D., Hervás, C. & Miras-Portugal, M. T. (2006) Activation of P2Y1 and P2X7 induce CaMKII phosphorylation in cerebellar granule neurons. *European Journal of Neuroscience*. 23: 2999-3013.
 46. Delicado, E. G., Miras-Portugal, M. T., Carrasquero, L. M. G., León, D., Pérez-Sen, R. & Gualix, J. (2006) Dinucleoside polyphosphates and their interaction with other nucleotide signaling pathways. (Invited review). *Pflugers Arch- Eur. J. Physiol.* 452, 653-572.
 47. Ortega de la O, F., Pérez-Sen, R. & Miras-Portugal, M. T. (2008) Gi-coupled P2Y-ADP receptor mediates GSK-3 phosphorylation and β -catenin nuclear translocation in granule neurons. *Journal of Neurochemistry*. 104: 62-73.
 48. Marín-García, P., Sánchez-Nogueiro, J., Gómez-Villafuertes, R., León, D. & Miras-Portugal, M. T. (2008) Synaptic terminals from mice midbrain exhibit functional P2X7 receptor. *Neuroscience*. 151: 361-373.
 49. Gómez-Ramos, A., Díaz-Hernández, M., Rubio, A., Miras-Portugal, M. T. & Ávila, J. (2008) Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells. *Molecular and Cellular Neurosciences*. 3: 673-681.
 50. Díaz-Hernández, M., Del Puerto, A., Díaz-Hernández, J. I., Díez-Zaera, M., Lucas, J. J., Garrido, J. J. & Miras-Portugal, M. T. (2008) Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *J. Cell Sci.* 121: 3717-28.

51. Ortega, F., Pérez-Sen, R., Delicado, E. G. & Miras-Portugal, M. T. (2009) P2X7 nucleotide receptor is coupled to GSK-3 inhibition and neuroprotection in cerebellar granule neurons. *Neurotoxicity Research*. 15: 193-204.
52. Díaz-Hernández, M., Díez-Zaera, M., Sánchez-Nogueiro, J., Canals, J. M., Alberch, J., Miras-Portugal, M. T. & Lucas, J. J. (2009) Altered P2X7 receptor level and function in Huntington's disease: therapeutic efficacy of antagonist administration to mouse models. *FASEB Journal*. 23: 1893-1906.
53. Gómez-Ramos, A., Díaz-Hernández, M., Rubio, A., Díaz-Hernández, J. I., Miras-Portugal, M. T. & Ávila, J. (2009) Characteristics and consequences of the muscarinic receptors activation by tau protein. *European Neuropsychopharmacology*. (en prensa, Epub 6 mayo 2009).

PEDRO GARCÍA BARRENO, MAESTRO Y AMIGO

FRANCISCO MORENO

Excmos. Sres. Académicos, distinguido público asistente, queridos amigos, maestro.

Antes de nada quiero recordar en este momento al humanista Francisco Ayala que, como todos sabemos, desgraciadamente hoy nos ha dejado a los 103 años de edad.

Quiero manifestar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que con un tremendo esfuerzo personal han hecho realidad este momento. De la misma forma, agradezco a la RANF que haya prestado tan desinteresadamente su hogar para este evento.

En este punto, poco más puedo añadir sobre lo que ya se ha dicho, salvo intencionadamente recalcar la tremenda generosidad y humildad de D. Pedro, que lo distinguen y engrandecen en todos los momentos de la vida, y agradecer, por qué no de todo corazón, a mi maestro sus enseñanzas, de las que trataré dejar constancia. No obstante, en este momento tan especial perdonadme por no tener palabras para ello, no se..., no quiero alargarme más de la cuenta, por lo que, aun a sabiendas de lo poco que le gustan este tipo de recursos a D. Pedro y siempre sin ánimo de adornarme y con toda humildad, permitidme utilizar dos citas de San Francis-

co de Asís que me ayuden a resumir lo aprendido y el esfuerzo llevado a cabo por el maestro para conseguirlo:

La primera dice:

«Comienza haciendo lo que es necesario, después lo que es posible y de repente estarás haciendo lo imposible».

D. Pedro, gracias por enseñarme a distinguir lo importante de lo que no lo es, gracias por enseñarme, siempre con el ejemplo, lo que significa el esfuerzo, la constancia, el compromiso, el respeto, la tolerancia, la obediencia, la lealtad y, sobre todo, la ilusión.

Con respecto a la segunda cita, querido D. Pedro, no se alarme por las explicaciones, ya que ésta no requiere de ninguna, por ella misma refleja lo enseñado y aprendido.

«Ten paciencia con todas las cosas, pero sobre todo contigo mismo».

D. Pedro, maestro (...) muchas gracias.

PAZ y BIEN

LA BIOLOGÍA SINTÉTICA

LUIS SERRANO PUBULL

Todavía recuerdo cuando Blanka mi secretaria me informó de que un médico quería hablar conmigo. Al principio pensé que era un médico que estaba haciendo algún experimento con ratones y quería discutir conmigo de alguna idea abstrusa y un poco difusa. Mi secretaria me lo volvió a recordar y finalmente concertamos una cita. Recuerdo como entro alguien muy bien trajeado de pelo blanco que se introdujo como el Dr. Pedro García Barreno y me contó que venía por parte de la Fundación Botín a concederme una ayuda para la investigación por una cuantía significativa. Después de reponerme de tamaño sorpresa, recuerdo una conversación muy agradable donde hablamos de emprendedores, de la creación de empresas, del fomento del talento. Estuvimos charlando casi una hora y la verdad es que independientemente de la ayuda agradecí esa conversación y reconocí a alguien con un interés enorme en promover el desarrollo de la ciencia en España de forma desinteresada.

En este capítulo voy a comentar sobre la Biología sintética y las posibilidades que ofrece, así como sus potenciales peligros.

La Biología es una ciencia en continua evolución donde la última disciplina se ha quedado obsoleta antes de madu-

rar. No hace más de 6 años que una nueva disciplina empezó a pisar fuerte en todas las revistas y no hace más de 4 años que centros dedicados a ella han aparecido como hongos en todos los países. Me refiero a la Biología de Sistemas. Apenas nos hemos empezado a acostumbrar a ver modelos matemáticos mezclados con experimentos de Biología Molecular, que un nuevo nombre ha aparecido que quiere relevar a la Biología de Sistemas en el candelero de la Biología. Me refiero a la Biología sintética. Todavía hay grandes discusiones acerca de que es la Biología de sistemas y ya tenemos que definir que es la Biología Sintética y como se diferencia de la anterior. Una definición de la Biología sintética aprobada por la comisión europea la define como «Ingeniería de la Biología: La síntesis de sistemas biológicos complejos que tengan nuevas propiedades que no se encuentren en la naturaleza en el contexto del organismo modificado, o del proceso biológico». Dicho de otra manera la Biología sintética permite el diseño de sistemas biológicos de forma racional. La principal diferencia entre la Biología sintética y la Biología de sistemas, es que mientras esta última intenta entender sistemas biológicos de forma cuantitativa y predictiva, la primera se centra en el diseño e ingeniería racional.

La biología sintética empezó de forma oficial hace unos 7 años cuando varios grupos diseñaron y analizaron pequeños circuitos génicos que tenían propiedades de circuitos electrónicos (filtros de ruido, circuitos bi-estables, osciladores). A partir de estos trabajos pioneros hemos visto una explosión en el diseño de circuitos en bacterias y eucariotas, aunque en la mayoría de los casos sin aplicación directa práctica. Al mismo tiempo hemos visto una revolución en la síntesis de DNA, de tal forma que ahora es posible pedir que sintetizen y clonen el gen de interés de un grupo y hasta llegar a sintetizar el genoma de un virus. Finalmente el MIT ha creado el: «Registry of Standard Biological Parts» (<http://parts.mit.edu>) que en teoría permite ensamblar circuitos complejos pidiendo las partes correspondientes. Los trabajos

realizados de diseño de circuitos génicos, o el rediseño completo del genoma del bacteriófago T7 han permitido avances importantes en la comprensión del funcionamiento de sistemas biológicos complejos como una bacteria, como el estudio del origen del ruido en la transcripción o en la traducción.

Un caso especial práctico que ha tenido un gran impacto en el campo es la producción de precursores de la droga artemisina (producida de forma natural en plantas) en *E. coli* y levadura, a través del clonaje y la ingeniería de los genes necesarios. Otro ejemplo interesante ha sido el diseño de *E. coli* para invadir células tumorales que se encuentran en condiciones anaerobias e inaccesibles al tratamiento con quimioterapia. Hay también avances recientes en la modificación de microorganismos para producir biofuel o hidrógeno, en bioremediación etc. Aunque hay avances en todos los frentes todavía no se ha llegado al mercado y necesitamos ejemplos de más proyectos con éxito que animen a la sociedad y a los inversores a apoyar esta nueva disciplina emergente.

Aunque todavía estamos lejos de que la biología sintética sea capaz de diseñar organismos a la carta de la misma manera que un ingeniero diseña un Nuevo avión o un ordenador, hay que pensar que este futuro no es tan lejano. De la misma manera que la ingeniería ha mejorado nuestra calidad de vida pero también ha creado la bomba atómica, la biología sintética puede utilizarse también con propósitos no amigables para la humanidad. Es decir la biología sintética puede reportar enormes beneficios en muchos ámbitos pero existe un riesgo de su mala utilización. Los riesgos pueden ser de tipo accidental, como podría ser la liberación en la naturaleza de organismos rediseñados. El otro aspecto más preocupante es el posible uso por agentes terroristas para diseñar nuevas ramas biológicas. Finalmente existe la posibilidad en un futuro de rediseñar el genoma humano para perfeccionarlo, esto conllevaría una serie de problemas éti-

cos de diversa naturaleza, el primero de ellos la división de la humanidad entre los que podrían pagarlo y los que no. Todos estos temas son importantes y se han creado numerosos comités que están pensando en regulaciones, foros de discusión etc... para intentar anticiparse a lo que está por llegar. Como siempre la sociedad va por detrás de los avances y es importante hacer una labor pedagógica para ilustrar los beneficios y los riesgos.

En fin espero con estas pocas líneas haber presentado un panorama de las luces y las sombras de esta nueva disciplina, que creo que a alguien con la curiosidad y el talento de Pedro le puedan interesar.

Un abrazo enorme, Pedro.

Luis.

RESPUESTA

A quién corresponda

PEDRO GARCÍA BARRENO

Imaginen la vida sin vacuna contra la polio y sin marcapasos cardíacos. O sin computadoras digitales. O sin sistemas de salubridad comunitarios. O sin predicciones meteorológicas. O sin terapias avanzadas contra el cáncer. O sin sistemas rápidos de transporte. O sin cosechas resistentes a las enfermedades o a la sequía. O sin unidades de cuidados intensivos.

Hemos heredado esos y miles de otros avances tecnológicos que han hecho de las sociedades occidentales industrializadas las más avanzadas de la historia. Logros que se han traducido en una economía más competitiva, han creado millones de puestos de trabajo y han aupado nuestro estándar de vida. Han mejorado incuestionablemente nuestra salud y prolongado la expectativa de vida. En cierto sentido, definen el estatus social Occidental.

Pero esos avances no han sido fruto de la casualidad. Son productos de un compromiso a largo plazo, fruto de un esfuerzo de las políticas nacionales encaminado a fomentar la innovación, el descubrimiento y el desarrollo de nuevas tecnologías. Durante muchos años, las administraciones públicas, trabajando en los organismos democráticos, han alenta-

do y financiado los programas de investigación en las instituciones públicas —Universidades y Organismos públicos de investigación— como una inversión vital para el futuro de los países. La industria ha jugado un papel igualmente crítico, encauzando ese conocimiento y esas nuevas tecnologías hacia el mercado, y, a través de él, a la sociedad.

Esta complicidad —los activos educativos y científicos institucionales, el apoyo financiero de los gobiernos y el desarrollo de productos por la empresa— ha sido un factor decisivo para mantener el prestigio y el liderazgo tecnológico de las naciones a lo largo de gran parte del siglo XX.

De igual modo, la continua atención a la investigación científica institucional ha servido para formar y capacitar a ingenieros, científicos y técnicos que han hecho posible, gracias a esa preparación, dar rienda suelta a sus potencialidades para conseguir aquellos avances excepcionales. Ello en un equilibrio entre una innovación provocadora y una cierta prudencia en la toma de riesgos.

Desafortunadamente, la fortaleza científica y tecnológica de las naciones Occidentales está seriamente amenazada. Cuando los gobiernos se plantean recortes o dudan del papel de la ciencia y la tecnología, se producen tensiones que ponen en grave riesgo la investigación científica institucional.

La investigación en la Universidad y en los Organismos públicos de investigación es un blanco fácil, porque mucha gente no es consciente del papel crítico que representa. Pueden pasar años de intensa investigación científica antes que las tecnologías emergentes puedan acceder al mercado. Pero la historia ha demostrado que la investigación científica de calidad, con objetivos ambiciosos, financiada con capital público, es la base para mantener el sistema de ciencia y tecnología y crear el ambiente de confianza empresarial, necesarios para la innovación tecnológica.

Hoy, los datos apuntan que la economía y el bienestar de los ciudadanos se hallan sobre arenas movedizas. Y los dos

factores, claves para la convivencia social, dependen de tres productos básicos de nuestras instituciones: buena ciencia, nuevas tecnologías y científicos e ingenieros bien formados.

El liderazgo científico y tecnológico, por su naturaleza, es efímero. Las grandes civilizaciones —Egipto, China, Grecia o Roma— tuvieron en sus manos, temporalmente, el estado del arte de su tiempo. Cada una de ellas dejó escapar su ventaja, y cuando aquellas civilizaciones perdieron sus respectivos liderazgos tecnológicos, también claudicaron en lo político.

Por todo ello, es esencial que los gobiernos mantengan su papel como financiadores de esa investigación científica de calidad en sus instituciones. Si se quiere mantener el estatus conseguido por las naciones industrializadas es necesario mantener aquella complicidad que lo hizo posible. Apenas consumida la primera década del nuevo siglo debe reconocerse que ha llegado el «momento de la verdad»: ¿se quiere mantener el espíritu innovador que catapultó a las naciones democráticas, el siglo pasado, hacia el bienestar social que disfrutamos, o la inoperancia, una vez más, ganará la partida? Cuando los representantes de los ciudadanos toman decisiones sobre cuestiones de ciencia y tecnología en las instituciones legislativas de la Nación o Autonómicas, están decidiendo el futuro: fortalecerlo o hipotecarlo está en su actitud.

La importancia creciente del papel de la ciencia en la solución de los problemas complejos que nos desbordan y la dificultad de los temas sociales y éticos que de ello deriva, exigen, a todos, una mayor inmersión en la cultura científica. Los políticos deben conocer los rudimentos de la evidencia de la ciencia y la tecnología, y la sociedad, en su conjunto, debe estar suficientemente informada para comprender lo que ello significa para el día a día de sus vidas y, también, para poder participar en el debate de las consecuencias del desarrollo científico. Ello requiere que la enseñanza de la ciencia comience en la escuela, y exige, también, que quienes dictan las

leyes de los hombres trabajen, codo a codo, con quienes comprenden las leyes de la naturaleza.

(Adaptación libre del escrito «A Moment of Truth for America», publicado en el *Washington Post*, el 2 de mayo de 1995 y dirigido al Congreso de la Nación [USA]; de *Science and the quiet art*, de David Weatherall, y de *Making the link between science and politics*, de Thomas H. Kean).

A QUIENES ELABORARON ESTE HOMENAJE

PEDRO GARCÍA BARRENO

¡¡Qué ocurrencia!!

Feliz, sonrojado..., pero debéis ser conscientes: no es oro todo lo que reluce.

«Hay en el corazón humano un crédito ilimitado para el elogio póstumo». Pero sólo los espíritus bondadosos lo ejercen con antelación. Lo hacen por amistad que, en este caso, es amabilidad descomedida por aquellos acostumbrados a mirar, difidentes, los acontecimientos de su entorno más próximo: los avatares a los que está sometida esa cosa que llamamos ciencia. Una palabra tan nuestra, tan sensible a los imprevistos y, sobre todo, tan golpeada por la parca temporalidad de cualquier intento para dotarla de sosiego. A vosotros va dirigido este homenaje. A vosotras mi respeto y mi gratitud.

No puedo olvidar de remachar mi agradecimiento y afecto a todos los que desde la amistad y el aprecio me empujaron hasta este acto. Hago mías cuantas frases de agradecimiento ha imaginado el mérito modesto al verse aupado a honores inimaginables.

Accedí a «biomedicina» —aunque entonces tal mote no existía—, a través del diario Madrid, de grato recuerdo y torpe final; un anuncio en él insertado hacía referencia al Primer Curso de Biología Molecular que, bajo la dirección

de Ángel Martín Municio, recién ganada su Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Complutense, se celebraría durante su primer Curso Académico. Inauguró las sesiones el Rector Magnífico de la Universidad, siendo el plantel de profesores algo hasta entonces desconocido en la otrora Universidad Central y, por extensión, en el resto de nuestro país. Por aquellos cursos pasaron: C. Milstein, J-P. Changeux o D. Chapman. A la vuelta de un nuevo periplo y, esta vez, con Ángel cada vez más cercano, accedí a los que fueron, son, maestros y amigos; ello a través del Curso «Temas Actuales de Biología en Medicina»: Alberto Dou, Antonio García Bellido, Francisco García Olmedo, José García Santesmases, David Vázquez y Eladio Viñuela, entre otros. Un Curso de Biología ¡celebrado en un Hospital y con billete agotado tarde tras tarde! ¿Se imaginan algo así, hoy?

Conseguimos una fraternidad transcultural, transinstitucional —Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Complutense, Centro de Biología Molecular del CSIC, Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General de Madrid...— y con un compromiso que Eladio tomó prestado de Goethe: «Pensar no es suficiente, hay que aplicar; intentar no basta, hay que hacer». Margarita Salas —*prima inter pares*— ha relatado los detalles con bonhomía. Un afán integrador con espíritu decido de ampliar sus bordes, siempre borrosos y, por ello, porosos. La búsqueda de los mejores; conocerlos, merecerlos, conseguir su confianza. Colaborar con ellos; con aquellos pocos quienes merecen la pena. ¿Tan solo una ilusión? No, aquí estáis.

Hoy tenéis que perdonármelo todo. Soy imprudente y temerario, y empiezo a desvariar. Sed piadosos y dejadme seguir.

Cuando ya esté tranquilo —sólo entonces— habré aprendido a ver muy de otro modo la luna y su vespertina aparición. Porque la tendré de colaboradora y no de tentadora, Y, por otra parte, también al sol tendré de colaborador. Pero las estrellas son demasiadas. La imposibilidad de enumeración, en el caso de las estrellas me turbaría. Así, para esa

fecha, habré escogido sólo unas pocas más de las que aquí están; y sólo me acordaré de ellas; y exclusivamente os miraré a vosotros, sin hacer caso de las demás. Sin hacer caso de los guiños y de las sonrisas de tanta estrella como hay. Cuando ya esté tranquilo.

Pero hoy es un tramo especial del recorrido. Resulta natural echar cuentas: cuanto ha entrado, cuanto ha salido y cuanto queda. Se trata de una necesidad que puede resultar placentera, y el hecho de pasar por ella representa, asimismo, una señal. Significa que todavía podrán suceder algunas cosas, caer ramas y brotar otras nuevas, aunque nuestras raíces hayan consolidado. ¿Cuánto debo y a cuántos? Mucho y a muchos.

Por ello, debo dar nombres. Dice Jenofonte, que entre los dones que los hombres tratan de arrebatarse a los dioses con su trabajo, uno de los más valiosos es el del nombre, si es de buena ley. Unos pocos nombres, como las estrellas, escogidos y sujetos al alma por garfios de acero. Los generosos voceros del encomio: Margarita, Jesús Ávila, Joan J. Guinovart, María Teresa Miras. Los escribientes que, con aquellos, donaron su tiempo: Carlos Belmonte, Juan A. Bueren, Mariano Esteban, José López Barneo, Carlos López Otín, Luis Serrano Pubull.

Por lo que este acto representa: Enrique Martínez Berro, Esperanza Botella y Federico Ysart, que bosquejaron un nuevo camino; y los más próximos y entrañables: Rafael Benjumea y Francisco Moreno —los acabáis de escuchar; ¿qué decir?—, quienes asentaron la ruta. Asentar: poner o colocar algo de modo que permanezca firme. Y también, quién hizo posible el lance: Emilio Botín. Todos ellos en el contexto de la Fundación Marcelino Botín.

Una aventura inolvidable que nadie nos podrá arrebatarse. Y voluntad para continuarla no ha de faltar.

Tenéis que permitirme otros dos nombres: Juan Manuel Reol presidió esta Casa que nos acoge; y Blanca, mi madre, cumple, hoy, cien años.

Margarita y María Teresa ya han remachado «mis» nombres: Nela, Alberto, Ricardo, Marta, Iván, Nadia y Maya.

Mas, no olvidéis, mañana, el camino depende, hoy, de todos nosotros. ¡¡Debemos convencer!!

«Mucho vine caminando.

Andando y soñando fui, y aun sigo;

Pero mi sueño apenas tiene sitio.

Ayer se fue. Mañana está por llegar.

¿Volver?

Vuelva el que tenga,

Tras largos años, tras un largo viaje,

Cansancio del camino.

Más, ¿tú?, ¿volver? Regresar no piensas,

Sino seguir libre adelante.

Sigue, sigue adelante y no regreses,

Fiel hasta el fin del camino.

No eches de menos un destino más fácil,

Tus pies sobre la tierra antes no hollada,

Tus ojos frente a lo antes nunca visto.

Andar es sembrar camino.»

Paz y Bien



REAL ACADEMIA DE CIENCIAS



REAL ACADEMIA ESPAÑOLA



REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA



REAL ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA