

PRESIDÈNCIA DE LA GENERALITAT VALENCIANA

BASES MOLECULARES DEL FUTURO DE LA SALUD





EDITA: © PRESIDÈNCIA DE LA GENERALITAT
 FUNDACIÓ PREMIOS REY JAIME I

ISBN: 978-84-482-5338-7

DEP. LEGAL: V-4228-2009

IMPRIME: GRÁFICAS ANTOLÍN MARTÍNEZ S.L.
 TEL. 96 391 89 84 - WWW.GRAFAMAR.COM



PREMIOS
REY JAIME I



Prólogo del Hble. Sr. Manuel Cervera Taulet

Director: D. Santiago Grisolía

Coordinadora: Elena Bendala-Tufanisco

ÍNDICE

DECLARACIÓN DE LA GRANDA	7
INTRODUCCIÓN DEL CONSELLER DE SANIDAD	9
DESDE LA ENZIMOLOGÍA Y LOS CICLOS METABÓLICOS A LA BIOLOGÍA MOLECULAR	
Dr. Santiago Grisolia	13
MEJORA GENÉTICA DE ESPECIES VEGETALES	
Dr. Luis Navarro.....	31
BIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS	
Dr. Daniel Ramón	47
DISEÑO Y APLICACIONES DE HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA REPARACIÓN DE GENES	
Dr. Guillermo Montoya.....	61
BIOSÍNTESIS COMBINATORIA: UNA NUEVA ESTRATEGIA PARA LA GENERACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN MICROORGANISMOS	
Dr. José Antonio Salas.....	69
HEPATITIS VÍRICA INFANTIL	
Dra. Mercedes Ruiz Moreno	79
HEMANGIOBLASTOS EN TEJIDO ADIPOSO ADULTO	
Dra. M ^º Dolores Miñana	97
FACTORES NEUROTRÓFICOS PARA LA SUPERVIVENCIA NEURONAL	
Dr. José López Barneo.....	107
IMPACTO DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA MEDICINA FORENSE	
Dr. Ángel Carracedo	125

DECLARACIÓN DE LA GRANDA 2009

En el cincuenta aniversario de la concesión del Premio Nobel de Fisiología a los Dres. Ochoa y Kornberg por el descubrimiento de la síntesis de los ácidos nucleicos, los participantes en el Curso de La Granda "Bases Moleculares del Futuro de la Salud" desean manifestar:

1. El conocimiento de la secuencia del genoma tanto humano como de otros seres vivos, ha supuesto un hito histórico que no debe considerarse un objetivo en sí mismo, sino la obtención de una herramienta poderosa para el desarrollo de líneas de investigación que han mejorado ya notablemente la calidad de vida y pueden continuar haciéndolo.
2. Desde la antigüedad, los humanos han manipulado, aun desconociéndolo, el genoma de otros seres vivos, con el objeto de mejorar la alimentación, Sólo muy recientemente, gracias a la biotecnología de los organismos modificados genéticamente, conocemos los genes que modificamos y estudiamos exhaustivamente sus consecuencias, lo que ha permitido unas garantías hasta ahora no posibles.
3. Parece fundamental mantener los genomas de especies silvestres en todos los reinos, puesto que desconocemos todavía muchas de sus cualidades potenciales.
4. Las nuevas técnicas derivadas del conocimiento obtenido por la Biología Molecular permiten estudiar nuevas formas de tratamiento de enfermedades tanto oncológicas, como víricas o degenerativas, por lo que servirán para paliar los problemas que ocasiona el envejecimiento.
5. Estas nuevas investigaciones se verán muy beneficiadas por un abordaje interdisciplinario amplio e internacional, como el que permitió la secuenciación del genoma.
6. Es además necesario que la inversión en estas investigaciones no se vea limitada por prejuicios o intereses comerciales, sino que se mantengan los fondos públicos y privados. En el caso español, la creación de empresas de capital-riesgo que apoyen estas tecnologías tiene además un interés económico fundamental para el mantenimiento de nuestra competitividad.
7. Algunas de las tecnologías desarrolladas han mostrado ya a la sociedad su utilidad pública, como la asignación de paternidades, la identificación de cadáveres, y el análisis de vestigios biológicos de interés criminal por técnicas de ADN; o el aumento de producción de alimentos con un elevado control sanitario -gracias, entre otros, a los organismos modificados genéticamente-.
8. Las ventajas potenciales de las tecnologías con aplicaciones en oncología, vacunación o tratamiento de diversas patologías por ingeniería genética, generación de nuevos fármacos en microorganismos, o prevención y tratamiento de procesos degenerativos, así como las posibilidades todavía potenciales de la medicina regenerativa apoyan la necesidad de una investigación de calidad a fin de buscar un futuro más saludable.

LA GRANDA, 20 de agosto de 2009.

Firmantes por orden alfabético: *Ángel Carracedo, Santiago Grisolia, José López Barneo, Teodoro López-Cuesta, M^a Dolores Miñana, Guillermo Montoya, Luis Navarro, Daniel Ramón, Mercedes Ruiz Moreno, José Antonio Salas Fernández, Juan Velarde Fuertes.*

PRÓLOGO

“BIODIVERSIDAD, BASES MOLECULARES DEL FUTURO DE LA SALUD”

Manuel Cervera Taulet
Conseller de Sanitat

El futuro de la medicina, hoy ligado a disciplinas de la ciencia como la genética o la biología molecular, empezó a fraguarse hace ahora cinco décadas con el descubrimiento de la estructura de la doble hélice del ADN por parte de los doctores James Watson y Francis Crick.

A partir del impulso inicial que supuso dicho modelo, científicos de la época como Ochoa, Kornberg, Jacob, Monod, Nirenberg o Matthaei ayudaron a ampliar el horizonte de la investigación genético-molecular y de la biomedicina. Esos científicos fueron pioneros en el descubrimiento de una nueva frontera de la ciencia. Una frontera que en aquella época se dejaba vislumbrar de una manera tenue y que hoy, apenas cincuenta años después, se ha convertido en una realidad dinámica y en plena expansión.

El sorprendente avance que ha registrado la biología molecular, la genética o la bioinformática en este arranque del siglo XXI y cuyo resultado más tangible ha sido la decodificación del genoma humano, permite augurar la creación de herramientas terapéuticas y diagnósticas mucho más eficaces que las actuales; pues esas herramientas estarán adaptadas al perfil genético de cada individuo.

El reciente anuncio de que en muy poco tiempo seremos capaces de obtener un mapa génico individualizado, permite aventurar un rápido desarrollo de la medicina predictiva y con ello de nuestra capacidad para detectar a tiempo aquellas patologías que somos susceptibles de padecer.

Estos avances influirán también en otras vertientes, de enorme impacto social, como pueden ser la nutrición o la productividad agrícola o ganadera. Pues una vez seamos capaces de definir la función de cada uno de los genes que hay codificados en el ADN de cualquier ser vivo, podremos hacer frente a muchas enfermedades y mejorar notablemente nuestra calidad de vida.

Estamos viviendo, por tanto, el arranque de una nueva era. La era de la genómica funcional. Una era que se va a convertir en el nuevo paradigma de la ciencia.

No obstante, resulta paradójico pensar que estos avances, que aparentemente entrañan un beneficio tangible para el ser humano, generan al mismo tiempo multitud de dudas sobre influencia a largo plazo. Esas dudas vienen derivadas del temor a que la manipulación genética pueda llegar a afectar a nuestra biodiversidad y con ello la sostenibilidad del planeta.

Hoy el mundo se está globalizando y esto favorece la transferencia genética horizontal. Ya se han detectado agentes patógenos que tras mutar y recombinarse han logrado atravesar con éxito los límites de las especies. Esto ha derivado, por ejemplo, en la dispersión de la resistencia a los antibióticos. Pues bien, este efecto inesperado ha coincidido, en gran medida, con el desarrollo de la ingeniería genética.

La comunidad científica ha sido la primera en reaccionar y lo ha hecho advirtiéndonos que todos los seres que habitan este planeta son parte de un gran sistema interdependiente. Un maravilloso sistema cuyos componentes físicos, químicos y biológicos son capaces de autorregularse para mantener con ello un perfecto equilibrio.

De esta certeza es de la que deriva la sensación de que todos aquellos que habitamos la Tierra tenemos la enorme responsabilidad de defender eficientemente ese rico patrimonio en biodiversidad que hemos heredado.

La pérdida de la diversidad genética, de especies y de ecosistemas es uno de los mayores peligros que acechan al futuro de la humanidad. Cada año desaparecen miles de especies y con ellas perdemos un enorme potencial en fuentes de medicamentos, de nuevas culturas agrícolas o de nuevos productos industriales.

Con la pérdida de la diversidad biológica, aumenta la uniformidad, la dependencia de una escasa variedad de plantas y sobre todo crece la vulnerabilidad ante las plagas y sobre todo las enfermedades.

Desde esta perspectiva, iniciativas como la promovida por el Alto Consejo Consultivo en I+D+i de la Generalitat al programar el curso sobre “Bases moleculares del futuro de la salud”; encierran un enorme valor simbólico, pues además de darnos a conocer la dimensión exacta del problema, nos invitan a analizar y debatir de una manera abierta y constructiva los límites que debe tener la ciencia, así como evaluar las estrategias que se están poniendo en práctica para hacer frente al mismo.

La Declaración de la Granda de 2009, surgida en el marco de dicho encuentro, es un primer fruto en este sentido. En mi opinión sus ocho propuestas, avaladas por la enorme calidad y dimensión científica de sus promotores, nos van a ayudar a definir con mayor precisión ese largo y arduo camino que vamos a tener que recorrer en defensa de nuestra biodiversidad y, por tanto, del futuro de nuestro planeta.

DESDE LA ENZIMOLOGÍA Y LOS CICLOS METABÓLICOS A LA BIOLOGÍA MOLECULAR

Santiago Grisolía

Catedrático Emérito “Sam Roberts” de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Kansas.

Vicepresidente Ejecutivo del Alto Consejo Consultivo en I+D+i de la Presidencia de la Generalitat Valenciana.

Sin duda alguna, la bioquímica empieza, como demuestran historias bíblicas tales como el descubrimiento de la fermentación alcohólica por Noe, en tiempos muy remotos, aunque fuera de forma empírica. El pensamiento racional, el método científico, tendrá que aguardar a la llegada de René Descartes en el siglo XVI.

Pero es el siglo XVIII, el de la ilustración, y, sobre todo, el del despegue de la tecnología con inventos como la máquina de vapor, o la consecución de acero fundido, la que permite a hombres como Lavoisier establecer las bases de la Química tal como la conocemos. Las leyes de Newton empiezan a conocerse mundialmente y a aceptarse. Y al desarrollo de la Física, se unen el de la geología, las matemáticas y la biología, con figuras como Linneo o Lamarck, o, Jenner y su vacuna de la viruela, o el descubrimiento de la fotosíntesis por Ingenhousz, Priestley, Saussier y Senebier.

Todos ellos contribuyeron con sus pensamientos y trabajo al florecimiento en la Francia de la Revolución Francesa de figuras esenciales para el desarrollo de la medicina: Claude Bernard, quien desarrolló la fisiología como una ciencia, y Louis Pasteur, quien tanto contribuyó a la química orgánica y al desarrollo de la microbiología. Su pasión por los microbios le llevó, a pesar de sus brillantes estudios, a cometer una de los errores científicos más memorables cuando aseveró que para que ocurriera la fermentación de los azúcares eran necesarios organismos vivos.

Poco después de la muerte de Pasteur, los hermanos Büchner falsean esta afirmación al preservar unos extractos de levadura con azúcar, con la esperanza de mantenerlos sin que se estropearan. La solución fermentó, y Eduard y Hans Büchner aislaron una sustancia a la que denominaron “zimasa alcohólica”. Una muestra más de que en ciencia hay que ser, como en todo, muy precavido con lo que se asegura.

De todas formas, fue Wöhler, en 1828, quien debió producir una verdadera revolución en el pensamiento científico cuando sintetizó la urea en el laboratorio, es decir, ¡la transformación de una sustancia inorgánica en orgánica!. Naturalmente, Wöhler fue uno de los defensores de la naturaleza estrictamente química de las reacciones enzimáticas, en detrimento de la importancia de los seres vivos en que éstas ocurrieran y se le acusa de ser el responsable del fin de las teorías vitalistas.

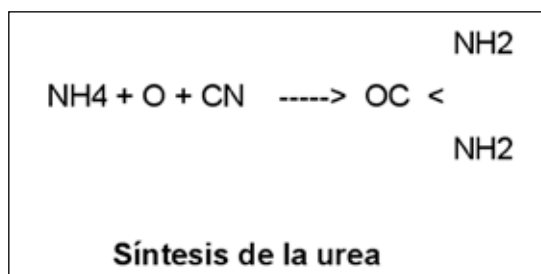


Figura 1. Reacción química para sintetizar la urea descrita por el Dr. Friedrich Wöhler

Conviene recordar el origen de la bioquímica como asignatura universitaria, porque sólo desde un conocimiento de la historia se pueden aventurar predicciones.

A principios de siglo XX todavía había personas como el Premio Nobel de Química de 1915, el alemán Richard Willstätter que no creían que los enzimas fuesen proteínas, a pesar de su extraordinaria labor de caracterización de la clorofila. Willstätter, como comentaba Birgit Vennesland, había escogido para su purificación, la peroxidasa, de la que descubrió que tenía un efecto oxidante y que demostraba actividad en cantidades en que no se podía reconocer proteína con los métodos entonces utilizados en su época. El prestigioso científico alemán mantuvo sus creencias a pesar de que en 1926, James Batcheller Sumner cristalizó la ureasa, a partir de extractos obtenidos de *Cannavalia enzyformis*, las judías o frijoles (1), y muchos otros enzimas fueron rápidamente estudiados, aislados y cristalizados (2).

Curiosamente, una de las primeras Cátedras de Bioquímica del mundo se creó en España y la ocupó el Prof. José Rodríguez Carracido, en la Facultad de Farmacia de Madrid, el año 1898. Poco después, las pocas cátedras que habían de bioquímica estaban en las también escasas facultades de farmacia, que no creo pasasen de 6 en toda España. Al principio no había departamento de bioquímica en las facultades de medicina, por lo que D. Severo Ochoa decía frecuentemente que hubiera sido mucho mejor haber empezado con una formación química, ya que en las facultades de medicina lo que se enseñaba era fisiología general.

La primera cátedra de bioquímica en los Estados Unidos se constituyó en la Universidad de Yale por Russell Chittenden, también a finales del siglo XIX, y en 1906 Chittenden se convirtió en el primer presidente de la Sociedad de Bioquímica Americana. Los departamentos de bioquímica se establecieron paulatinamente en todo el mundo, así, por ejemplo, en un inicio, el departamento donde yo trabajé con D. Severo era el Departamento de Química en la Facultad de Medicina de Nueva York, que enseñaba bioquímica a los estudiantes de Medicina. Después, en Chicago, cuando yo llegué en el 46, ya había Cátedra de bioquímica; mientras que en Wisconsin, en la misma época, aún se llamaba química fisiológica.

La bioquímica moderna cuenta con 3 figuras claves:

1. Otto Warburg (1883-1970), que se consideraba el descendiente científico de Lavoisier, y entre cuyos hallazgos más relevantes hay que recordar el descubrimiento de que las células utilizan oxígeno y el diseño de un artilugio manométrico, el "aparato de Warburg-Barcroft", instrumento de gran importancia. (3);

2. Otto Meyerhof (1884-1951), Premio Nobel de Medicina en 1922 por su descubrimiento del consumo de oxígeno para la degradación del ácido láctico en el músculo, procedente de la combustión de glucosa. Meyerhof, quien formó a un gran número de alumnos en Alemania, incluyendo a Severo Ochoa, se vio obligado a abandonar Alemania por su condición de judío e inmigrar a Estados Unidos, donde fue profesor de la Universidad de Pensilvania. (4); y
3. Elmer V. McCollum (1879-1967), que descubrió no sólo las vitaminas A y D sino que también estableció un nuevo método crucial para estudios de nutrición. (5) Hasta que McCollum llegó a la Universidad de Madison, en Wisconsin, los científicos utilizaban animales de granja como vacas, cerdos, etc... De hecho, sus primeros experimentos al llegar a Madison, se enmarcaron en el estudio de la nutrición de los novillos que la Universidad llevaba a cabo con cuatro manadas. Las tres primeras se alimentaban exclusivamente con un tipo de pienso: trigo, maíz, o cebada, mientras la cuarta ingirió una mezcla de los tres cereales observándose que crecía más y mejor. McCollum decidió que dedicaría su tiempo a investigar en qué eran deficientes las dietas restringidas a un solo cereal. Naturalmente, comprendió que la reproductibilidad de los experimentos requería de animales más pequeños que los novillos y con una vida más corta, por ello decidió utilizar ratas en experimentación, lo que le produjo grandes problemas, porque su decano decía que la rata era el enemigo del granjero y como ellos trabajaban en una de las universidades Land-grant, creadas con el propósito de potenciar el desarrollo agrónomo y ganadero, tendrían problemas. El desarrollo de la bioquímica en los Estados Unidos ocurrió con fuerza, debido a estas Land-grant fruto de las donaciones de terrenos para la construcción de estas Escuelas de Agricultura por el Presidente Lincoln. McCollum compró una docena de ratas albinas de su bolsillo e introdujo este animal en experimentación. Como no existían entonces jaulas apropiadas en que estudiarlas, McCollum tuvo que pedir la ayuda de un carpintero. Pero no crean que la inversión de McCollum se debía a la ausencia de fondos de las Escuelas de Agricultura: concretamente la Universidad de Wisconsin obtuvo años más tarde un gran capital por la patente del método de irradiación de la leche para enriquecerla en provitamina D.

Pero Warburg, Meyerhof y McCollum no fueron figuras aisladas. La ciencia que durante el siglo XVIII floreciera en Francia, había cedido la primacía a Alemania, especialmente en Química, durante los siglos XIX y comienzos del XX. La tragedia de la guerra civil española y la segunda guerra mundial, llevarían a muchos científicos europeos, especialmente judíos, a los Estados Unidos, donde, junto a las eminentes figuras de aquel país, constituirían en los años cuarenta y principios de los cincuenta del siglo XX la masa crítica necesaria para crear lo que se ha dado en llamar "La Gran Ciencia".

Personajes como el fisiólogo húngaro Albert Szent-Györgyi (1893-1986), llegaron desde Europa huyendo de la opresión y la guerra, y se encontraron el ambiente perfecto para desarrollar sus estudios. Szent-Györgyi estaba interesado en la química de la respiración celular. En 1927 identificó la vitamina C, a la que llamó ácido ascórbico por su capacidad de prevenir el escorbuto. Estos hallazgos le llevaron a conseguir el Premio Nobel de Medicina en 1937; el mismo año en que se dio el Premio Nobel de Química a Haworth y Karrer por sus trabajos sobre las estructuras de diversas vitaminas. Pero Szent-Györgyi seguía interesado en los procesos metabólicos intracelulares. Llegó así al entendimiento de la oxidación de los carbohidratos, al estudiar la catálisis del ácido fumárico.

Este estudio le introdujo en los ciclos metabólicos, empezando por el ciclo del ácido cítrico descubierto por Hans Krebs (6) que completara años más tarde Severo Ochoa con el aislamiento de la enzima condensante.

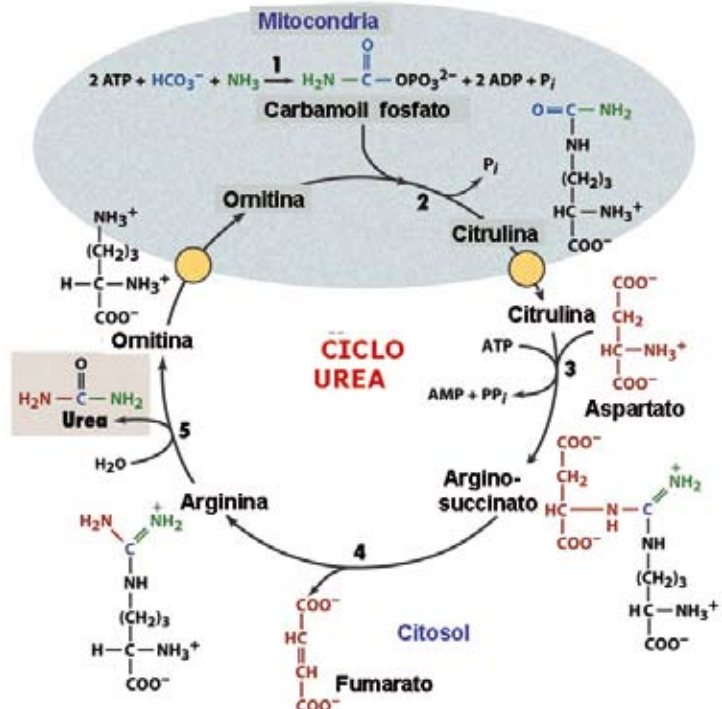


Figura 2. Ciclo de la urea

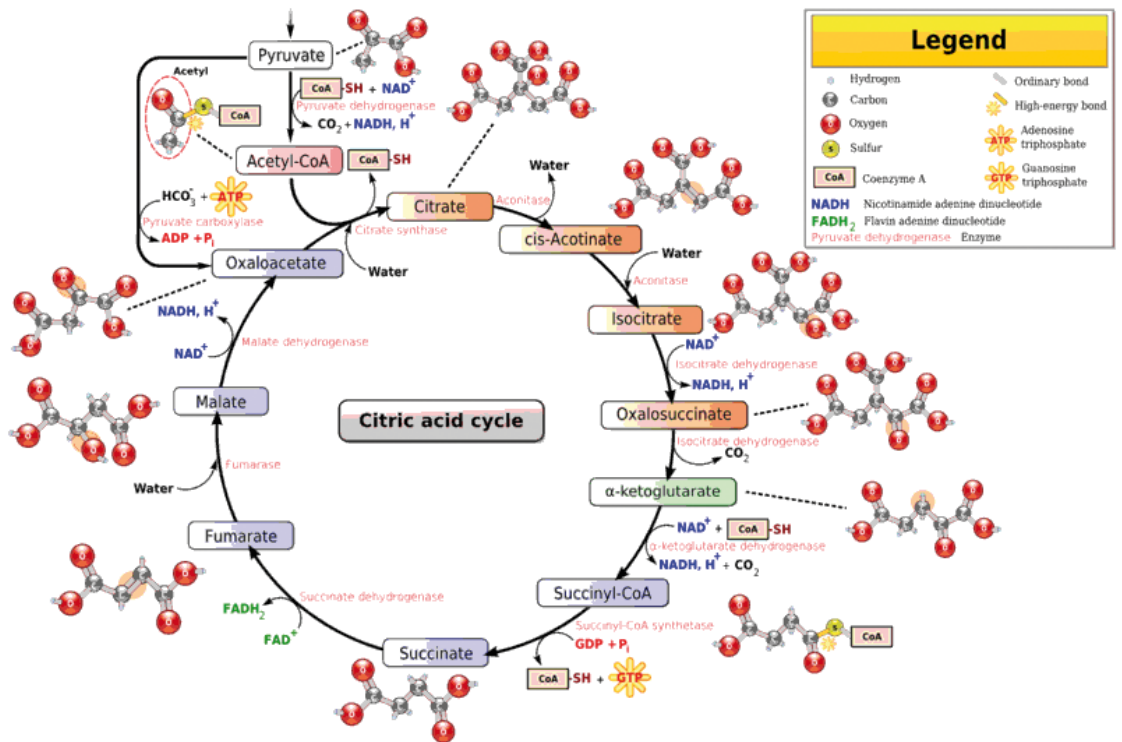


Figura 3. Representación del ciclo de Krebs

Es importante señalar que en la primera mitad del siglo xx no existían ayudas económicas a la investigación científica, ni siquiera las grandes subvenciones de los Institutos Nacionales de la Salud, que empezaron hacia principios de los años 50 y, por tanto, el número de personas y los grupos de investigación en bioquímica eran muy pequeños. Generalmente cada investigador se encargaba por sí mismo de todo, desde limpiar el material del laboratorio, hasta de diseñar el experimento en su conjunto. Los investigadores debían ser personas con una gran habilidad manual, limpias y muy cuidadosas, dado el uso corriente de técnicas altamente sofisticadas como la ya mencionada de manometría de Otto Warburg, muy utilizadas para mantener tejidos respirando a fin de estudiar su nivel de captación de oxígeno o la eliminación de CO₂; las técnicas de tinción tisulares o las de purificación de proteínas y su cristalización. Por entonces, se requería frecuentemente de cada científico la síntesis o aislamiento de muchos de los reactivos que necesitaban, puesto que la mayoría de ellos no se podían obtener comercialmente. Esto tenía ventajas e inconvenientes. Una de las ventajas es que así aprendías, a la fuerza, química en el banco de ensayo y también conocías con absoluta certeza el grado de pureza de tus compuestos, lo que no sucede ahora. Por eso, no puedo evitar el contar una anécdota deliciosa y es que cuando Dan Broida, que había ganado bastante dinero vendiendo sacarina durante la Segunda Guerra Mundial, fue en el 49-50 a ver al joven Arthur Kornberg, que acababa de ser nombrado Jefe del Departamento de Microbiología en la famosa Universidad de Washington, en San Luis, le preguntó qué le parecía la idea de hacer una compañía dedicada a la producción de productos bioquímicos. Arthur le dijo que era la tontería más grande que había oído, puesto que él, en un día de trabajo y con un conejo, era capaz de obtener suficiente ATP para todo el año. Broida no le hizo caso y así se formó la compañía química Sigma que pasó de producir únicamente sacarina a ser la empresa que, como los bioquímicos y biólogos moleculares saben, abastece de reactivos a la mayor parte de laboratorios de todo el mundo, hasta el punto de que, si cerrase, los investigadores lo pasarían muy mal y muchos deberían abandonar sus líneas de trabajo. Años más tarde, el muy inteligente Arthur Kornberg ya advertía a sus estudiantes y colaboradores de los peligros de los llamados kits comerciales, para cuando no funciona algo, y también él fue una persona muy importante en la creación de la compañía DNX.

Otros avances técnicos para el desarrollo de la bioquímica fueron los homogenados celulares, que permitieron reemplazar a los cortes de tejido; la utilización de isótopos radiactivos, particularmente el Carbono 14; y el empleo de métodos cromatográficos para la identificación y purificación de muchas sustancias.

Quizá la introducción de la penicilina en el tratamiento de las infecciones en los años treinta y, especialmente, su empleo durante la segunda guerra mundial, supusiera un salto radical en la percepción de la ciencia por la sociedad.

Fleming, Chain y Florey consiguieron en 1945 el Premio Nobel de Medicina por el descubrimiento de la penicilina. Pero, sobre todo, la sociedad entendió que la ciencia tenía un objetivo y que podía ser útil para el conjunto de la humanidad, no sólo para el entretenimiento de unas clases "ociosas". Quizá eso explique la creación de las ayudas estatales a la investigación.

Curiosamente este rápido desarrollo de la bioquímica, a finales de los 40 y 50, condujo pocos años después al inicio del desarrollo de la biología molecular.

En este desarrollo es fundamental el estudio de la estructura tridimensional de las moléculas, y, aún hoy, un laboratorio brilla en este campo con luz propia: el laboratorio de Cavendish, en la Universidad de Cambridge. Pero la historia del material genético comienza mucho antes.

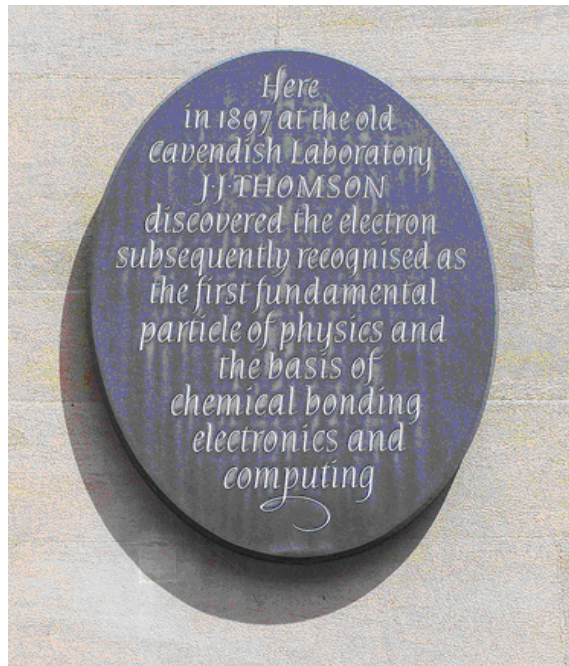


Figura 4. Placa conmemorativa colocada en la entrada del Laboratorio de Cavendish en la Universidad de Cambridge

Obviaré los estudios de genética realizados por Mendel, por su profunda divulgación social, e incluso mencionaré sólo de pasada los trabajos de Augustin Sageret, quien, según afirma el Dr. Enrique Cerdá, fue quien propuso en 1826 que la información genética se almacenaba en unidades independientes.

Supongo que los expertos en genética podrán citar un largo listado de excelentes investigadores, pero, para los bioquímicos, es indiscutible la importancia del trabajo de Oswald Avery, investigador del Instituto Rockefeller, que demostró a lo largo de varios trabajos publicados entre 1944 y 1946 (7, 8, 9 y 10) que el “principio transformante” es el ácido desoxiribonucleico, el ADN. El descubrimiento de Avery y sus colaboradores, que detalla la figura 5, fue crucial: en 1944, Oswald Avery, Colin McLeod y Maclyn McCarty, fraccionaron el extracto celular de neumococos “S” muertos y agregaron cada uno de estos componentes a cultivos de neumococos “R”. Ellos observaron, que el fenómeno de transformación sólo se presentaba cuando a los neumococos “R” le agregaban la fracción de ADN de los neumococos “S”; esto los llevó a concluir que el principio transformador descubierto por Griffith era el ADN y por lo tanto, **el ADN es el material que contiene la información que se hereda**. La identificación del ADN como portador de la información genética lo convirtió en el centro de las investigaciones de la segunda mitad del siglo XX, indispensable para entender a los seres vivos, y fundamento de muchas aplicaciones prácticas que se desarrollarán a lo largo del siglo XXI.

Pero volviendo a la bioquímica, la biología molecular, y las estructuras tridimensionales de las moléculas, es necesario mencionar al bioquímico exiliado Erwin Chargaff, descubridor de la estructura primaria del ADN, es decir, que estableció que éste era una larga cadena en que se alternaban cuatro bases nucleótidas distintas, y que éstas se hallaban en proporciones idénticas dos a dos, los llamados pares de bases. También demostró que la proporción de las bases purínicas coincide con la de bases pirimidínicas, aunque puede tener diferentes valores según la especie estudiada (esto contrastaba con la idea de P.H. Lavin, quien fue profesor de mi primer maestro, D. José García-Blanco, de que los ácidos nucleicos eran

una repetición monótona de un tetranucleótido). También confirmó que el ADN no cambia con la nutrición ni el envejecimiento (11 y 12). De la misma forma que está bien establecida la influencia de los trabajos de Avery en las investigaciones de Chargaff, parece claro que los comentarios que éste hizo a Watson y Crick durante una comida en mayo del 52, ayudaron a los científicos a fijar la estructura.

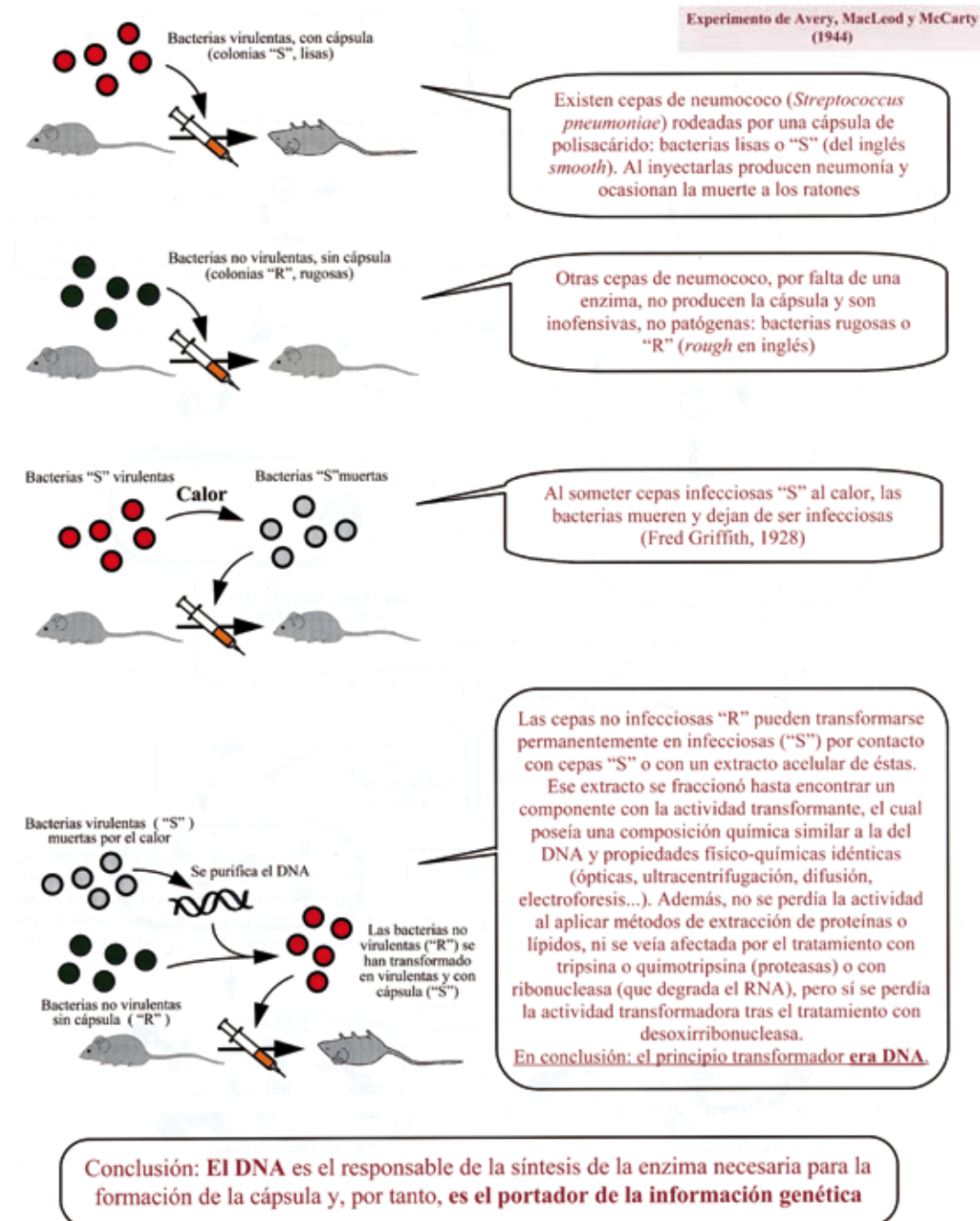


Figura 5. Esquema de las deducciones del experimento en que se determinaba la importancia del ADN como almacén de la herencia genética

Al igual que lo hicieron las fotografías realizadas por la cristalógrafa británica Rosalind Franklin del ADN hidratado, que Watson consiguió para que Crick las estudiara de forma poco ortodoxa, según confesó él mismo. Franklin escribió en sus notas de laboratorio que los grupos fosfato se encontraban en el exterior de la molécula y que le parecía que debían formarlos dos cadenas. En realidad, la idea de la hélice Alfa ya había sido expuesta por Linnus Pauling en las proteínas. (13)

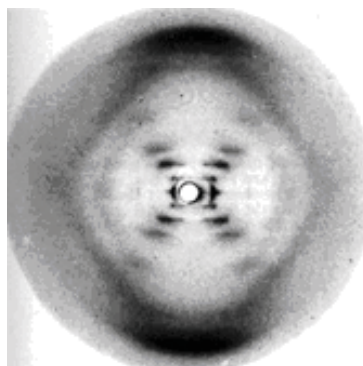


Figura 6. Fotografía de difracción de rayos X tomada en 1952 por Rosalind Franklin en que se muestra la forma B del ADN. Ésta es la primera imagen que indujo a pensar que se trataba de una estructura helicoidal

En el laboratorio de John Randall, donde trabajaba Rosalind Franklin, había otro brillante cristalógrafo: Maurice Wilkins, quien proporcionó las fotografías de sus experimentos a Watson y Crick. Los dos últimos publicaron en 1953 el artículo que más impacto ha tenido en el siglo XX. (14) Por cierto, el modelo del ADN, que según Dalí puede rivalizar con la Mona Lisa, fue en realidad dibujado por Odile Crick, la mujer de Francis, y se publicó como tal en el cortísimo trabajo inicial de Watson y Crick aparecido en *Nature* en 1953.

En 1962 Crick, Watson y Wilkins recibieron el Premio Nobel por la estructura de la doble hélice, que rápidamente se introdujo en la cultura popular y el arte. Franklin había muerto para entonces.

El Prof. Severo Ochoa, con su interés y conocimientos bioquímicos, descubrió la síntesis de un ácido nucleico en el tubo de ensayo. (15) Ochoa siempre estuvo interesado en la fosforilación oxidativa, incluso durante la segunda Guerra Mundial, cuando trabajó en el laboratorio de los Cori en Sant Louis, que estudiaban el metabolismo de los azúcares y el efecto de las hormonas en el mismo.

Ochoa trabajó en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos de Krebs, donde aisló la enzima responsable de la oxidación del ácido pirúvico, completando el ciclo que Krebs descubriera en 1932. En 1954 Ochoa descubrió la polinucleótido fosforilasa, capaz de sintetizar ARN *in Vitro* (16). Apenas un año después, publicaba en *JBC* el método para aislar del *E. coli* la hoy denominada ARN-polimerasa. (17)

Uno de sus discípulos, Arthur Kornberg, demostró que también el ADN se sintetiza por una polimerasa (18). Kornberg contaba que los experimentos iniciales los realizó su esposa Silvia. Por el descubrimiento de las polimerasas en la síntesis de los ácidos nucleicos, Ochoa y Kornberg recibieron el Premio Nobel de Fisiología en 1959.

El laboratorio de Marshall Nirenberg comenzó a utilizar la polinucleótido fosforilasa para producir polinucleótidos sintéticos, la relación de su secuencia con la unión de diversos aminoácidos, condujo a descifrar el código genético (19), en que Severo Ochoa desempeñó una parte importante.

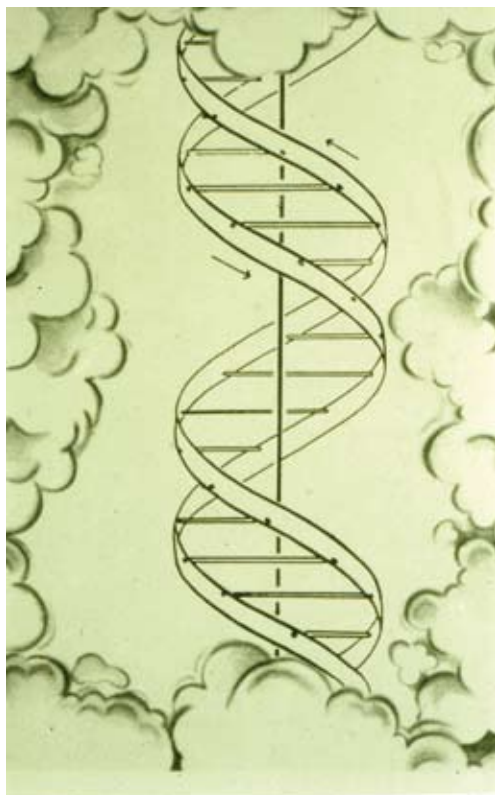


Figura 7. Dibujo de la doble hélice aparecido en el número de *Nature* de 1953

Severo Ochoa continuó con los mecanismos de reproducción de los virus ARN por una parte, y con los mecanismos de síntesis de proteínas por otra, donde descubrió los factores que inician la traducción de la proteína.

Desde los años 50-60, cuando se descubren la mayor parte de los ciclos metabólicos, la bioquímica ha avanzado no sólo metodológicamente.

Posiblemente, fui uno de los primeros en detectar la imbricación cada vez más profunda entre la bioquímica y la biología molecular; así, que cuando llegué en 1962 a Jefe de Departamento de bioquímica en la Universidad de Kansas, propuse que el nombre del Departamento fuera de bioquímica y biología molecular, aún a costa de las críticas de grandes bioquímicos tales como E. Racker que llamaba a los biólogos moleculares "bioquímicos sin carne".

Sin embargo, como mi viejo amigo Edmond Fischer, he mantenido una pasión por la enzimología estudiando los mecanismos de regulación de las enzimas, la forma en que se activan e inhiben y la importancia de algo que descubrí trabajando en el primer paso del ciclo de la urea: la actividad enzimática de algunas proteínas, que actúan de reguladoras, depende de la unión reversible de moléculas que las activan porque, al unirse cambian su conformación, es decir, los grupos que tienen expuestos para reaccionar (20). Monod lo denominó el alosterismo proteico.

Naturalmente, como bioquímico cada vez más interesado en los avances de la medicina molecular y, por mi participación en las primeras y profundas reuniones del Genoma Humano realizadas en España

desde el año 1988, he tenido la suerte de conocer a muchos líderes de esta área. Y, como todos, he visto el desarrollo convulso de la ciencia desde los maestros. Edward Tatum y George Beadle, ambos Premios Nobel de Fisiología en 1958 junto a Lederberg por sus descubrimientos del control genético de los ciclos metabólicos, postularon el dogma de la biología molecular: un gen, una proteína. Francis Crick añadió que sólo el ADN puede reproducirse y transmitir información a la descendencia. Ambas ideas permitieron un rápido avance de la ciencia, pero sus discípulos las han demostrado falsas.

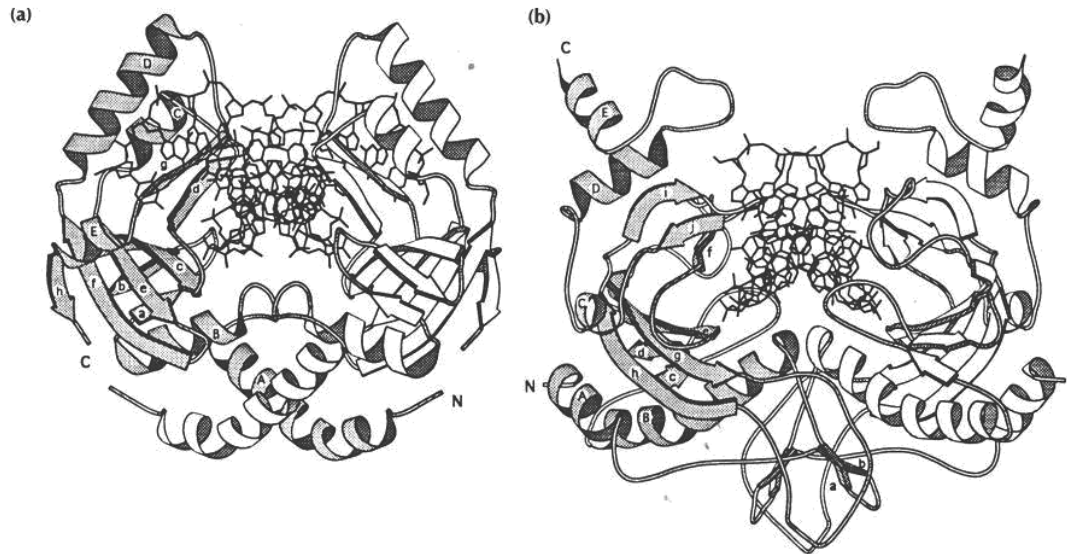


Figura 8. Estructuras tridimensionales de dos enzimas de restricción representadas como líneas curvas. a) es PvuII DNA, con un fragmento de ADN en su sitio catalítico representado por medio de las líneas rectas. b) es EcoRV DNA, también con un fragmento de ADN en su sitio catalítico

Los microbiólogos Arber, Nathans y Smith descubrieron la existencia de las enzimas de restricción. Ellas han sido la herramienta que ha permitido el estudio de los genes y su comparación (21 y 22). Uno de los asistentes a las charlas de Nathans, Richard Roberts, se sintió tentado por esas enzimas y descubrió el ensamblado alternativo de los genes: los genes están compuestos de diferentes porciones y, cuando se transcriben a ARN, pueden dar lugar, según qué fragmentos se transcriban y empalmen, a diferentes proteínas (23 y 24). Fred Sanger y Walter Gilbert habían descubierto métodos para secuenciar el ADN (25) que han permitido un más rápido avance de la biología molecular.

De nuevo el estudio de las enfermedades infecciosas dio un vuelco a los dogmas establecidos, cuando Prusiner describió el agente causante de patologías neurodegenerativas infecciosas en cerebros de mamíferos: unas proteínas capaces de infectar las neuronas y replicarse en su interior en ausencia de ácidos nucleicos, los priones. (26)

Y, Mellow y Fire encuentran que, en gusanos y plantas, el ARN mensajero puede transformarse e interferir la expresión de las proteínas (27). Es el comienzo de una nueva línea de investigación plagada de Premios Nobel: el ARN de interferencia. (28)

En medicina, desde los años setenta parece esperarse una revolución, que, en casos como el de la terapia génica, de la que esperábamos mucho, todavía se ha avanzado muy poco – no obstante, personal-

mente, creo que con el tiempo se avanzará –. También el prometedor descubrimiento de que los individuos adultos de diferentes especies, incluidos los humanos, disponemos, además de en nuestras gónadas en la mayor parte de los tejidos de células totipotentes, las llamadas células madre, que en el imaginario popular han sustituido a los mágicos ungüentos de los vendedores ambulantes como panacea universal. James Thomson, el primero que aisló las células madre embrionarias humanas (29) en la Universidad de Wisconsin, mostraba su preocupación ante tan altas expectativas al afirmar: “espero que no se diga en poco tiempo lo mismo que se dijo de la terapia génica”.

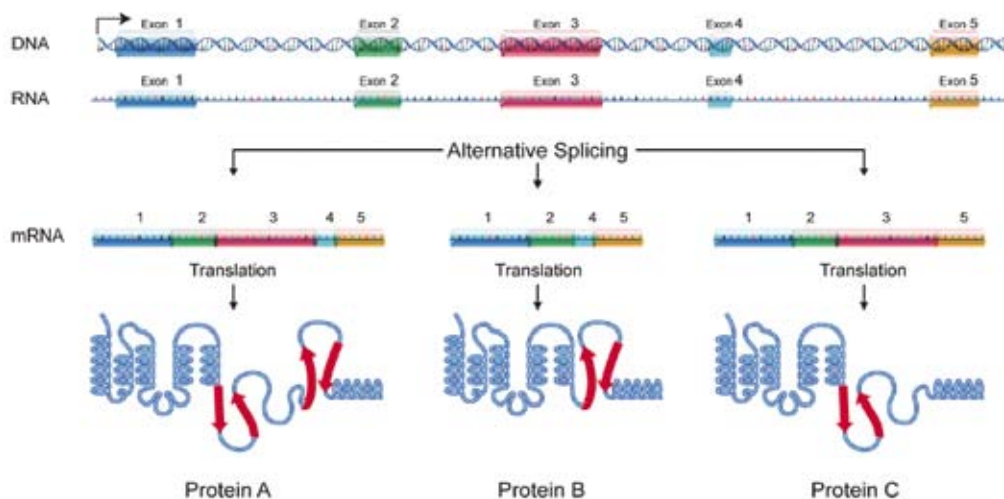


Figura 9. Ensamblado alternativo: en un gen siempre se descartan los intrones y se respeta el orden en que se transcriben los exones al ARN mensajero, pero no todos los exones son copiados, y esto genera diferentes proteínas de la transcripción de un gen

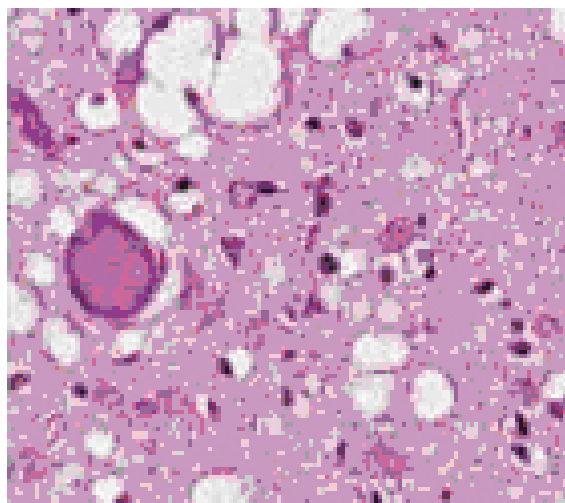


Figura 10. Corte de cerebral de un enfermo de Creutzfeldt-Jakob. Los espacios blancos son las características lesiones espongi-formes que origina el prión

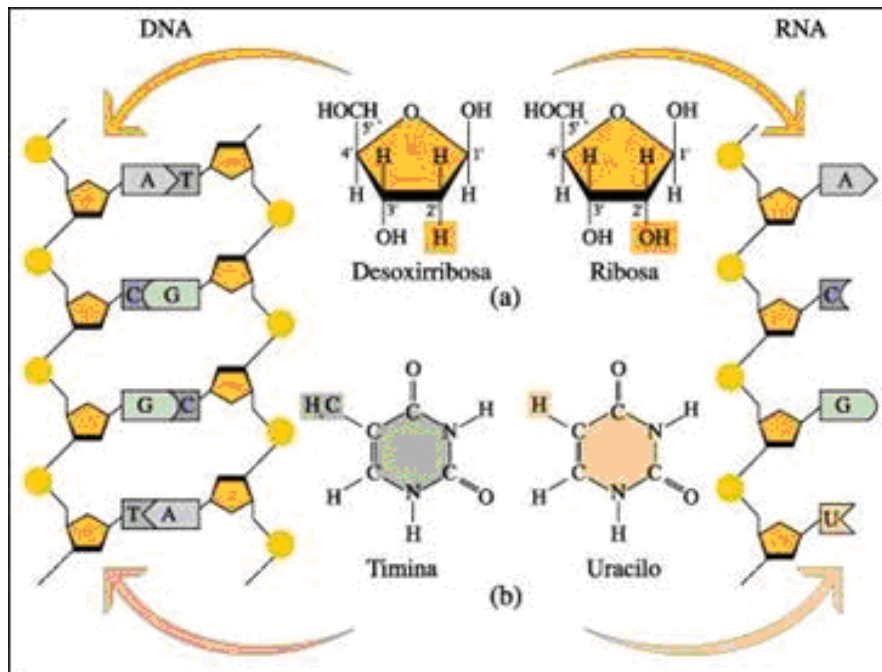


Figura 11. Pequeños fragmentos de ARN interfieren en la traducción del ADN en ARN mensajero



Figura 12. Craig Venter a bordo del Sorcerer II

El Presidente Obama ha dado luz verde al uso de fondos federales para el estudio y uso de células madre. Para los interesados en medicina regenerativa, recomiendo el monográfico de Mayo del 2008 de NATURE: "Regenerative Medicine". Las posibilidades terapéuticas de estas dos técnicas conjuntas son delirantes.

En el momento en que los científicos seamos capaces de controlar la diferenciación celular para reestructurar tejidos dañados y de incorporar en las células los genes de los que son deficitarias, estaremos en condiciones de realizar "curaciones bíblicas". Y lo mismo ocurre con las posibilidades diagnósticas.

La segunda reunión sobre el Genoma Humano, celebrada en Valencia en 1990, se centró en la ética, dando lugar a la II Declaración de Valencia; fue patrocinada por la entonces recién creada Fundación BBV, que se ocupaba de la ciencia de una forma ejemplar, y contó con la presencia de Craig Venter, al que invité a participar como miembro de su Patronato, como recuerda él mismo en su libro "*Life Decoded. My Genome: My Life*". Por entonces Venter ya empezaba a destacar por sus estudios del genoma vírico. En Bilbao, en 1993, durante la tercera reunión del Genoma Humano, Venter conoció a Hamilton Smith, Premio Nobel por el descubrimiento de los enzimas de restricción, la herramienta que ha permitido dividir la larga molécula de ADN en fragmentos adecuados para su análisis. Durante una cena, Venter convenció al doctor Smith de las posibilidades comerciales de los descubrimientos del Genoma Humano, a las que nadie habíamos hecho mucho caso. Ya había problemas sobre su proyecto de generar patentes antes de que lograra la primera secuencia completa del genoma humano. Por todo ello, no es de extrañar que Craig Venter nos hablara en dicha reunión en Bilbao, sobre "La rentabilidad de patentar los descubrimientos genéticos". Venter fue tan convincente que Hamilton Smith dejó su Cátedra en la Universidad Johns Hopkins y se fue a trabajar con él al Instituto de Ciencias Genómicas que Venter había creado en el 92 y, desde entonces, siguen trabajando juntos. Así, apenas cinco años después de la reunión de Bilbao, se creó Celera con el objeto de realizar el primer mapa completo del genoma humano.

La fama de Craig Venter se debe a su desarrollo de tecnologías importantísimas para secuenciar rápidamente el genoma, como la llamada identificación de secuencias diana. Muy simpático y claramente "inconformista", no se lleva bien con otros científicos, incluyendo al también iconoclasta James Watson, quien dijo que lo que Venter hacía con dicha técnica "lo podía hacer un mono". Venter no lo ha olvidado. Su creatividad, diligencia y originalidad en la secuenciación, le llevaron a publicar en el año 2003 en la revista Science la primera secuencia del genoma humano (30).

Las nuevas tecnologías, como el High throughput DNA sequencing, han abaratado mucho los costes y permiten realizar las secuencias con una increíble rapidez (31 y 32). La consecución de la tecnología necesaria para obtener la secuencia del Genoma de cada individuo por unos mil dólares, permitirá un gran avance a la medicina en áreas como las "enfermedades raras", o la medicina predictiva o personalizada.

Una de las nuevas propuestas de Craig Venter es el trasplante genómico (33): el genoma de una bacteria es sustituido por el de otra, con lo que una especie se transforma en otra especie bacteriana resultando en nuevas células que tienen el genotipo y el fenotipo dictado por el genoma introducido. Lo más importante a distinguir en este aspecto de trasplantes es que el genoma del receptor es enteramente reemplazado por el genoma del donante y no hay recombinación entre los cromosomas de uno y de otro.

En mi opinión, los dos aspectos más importantes del reciente trabajo de Venter – que empezó como bioquímico y sigue siendo básicamente un bioquímico –, incluso por encima de la secuenciación del genoma humano, son a) la identificación de más de 60.000 nuevos genes y b) la síntesis de un genoma en el laboratorio.

En efecto, con los años, Craig Venter se ha dedicado a recorrer los mares en su yate Sorcerer II, analizando genomas de bacterias con el objetivo de conseguir nuevos recursos, especialmente energéticos

(34). Con sus proyectos de metagenómica utilizando su famosa tecnología de la escopeta – *shotgun* – ha obtenido datos de más de seis millones de proteínas y, sobre todo, el gran interés es la posible obtención de bacterias capaces de producir energía, especialmente a partir de la inducción de la síntesis de hidrógeno, derivado de la fijación de Anhídrido Carbónico y la luz solar.

Craig Venter estudiará el Mediterráneo desde finales del 2009, tal como acordamos durante su visita a Valencia del pasado mes de mayo.

Venter acaba de anunciar, como ya he mencionado, la síntesis del genoma de un ser vivo, el de la bacteria *Mycoplasma laboratorium*; (35) el primer paso para crear vida en el laboratorio, lo que provocará no sólo importantes avances científicos sino también grandes discusiones éticas y filosóficas.

Como he tenido la fortuna de identificar y cristalizar varios enzimas, puedo decirles que, según los datos de la biología evolutiva, las enzimas han evolucionado únicamente para acelerar reacciones biológicas bajo un escaso número de condiciones que son compatibles con la vida. Dos artículos diferentes de un mismo grupo, por Röhtlisberger et al. (36) y en *Science* por Jiang et al. (37), muestran cómo estas limitaciones se pueden vencer. Dichos artículos describen un método para diseñar enzimas que catalicen reacciones no – naturales, demostrando su utilización en dos reacciones químicas distintas.

Las enzimas trabajan disminuyendo la energía de activación de las reacciones, específicamente mediante el confinamiento de los sustratos en sitios de unión que disminuyen la energía de activación.

Asimismo, protegen a las sustancias reaccionantes de tal forma que se previene cualquier reacción secundaria. La idea que sirve de base para diseñar una enzima es simple – modelar el *estado de transición* para una reacción, estabilizarla rodeándola cuidadosamente con grupos químicos, insertar el centro activo resultante dentro de una proteína existente, alterando la secuencia de aminoácidos de la proteína para alojar los cambios. Sin embargo, en la práctica, se trata de un proceso complicado. Para un principiante, construir un modelo lo suficientemente exacto requiere un conocimiento detallado de los mecanismos de reacción, conocimiento del que no siempre se dispone. Además, la modelización de los estados de transición requiere de complejos cálculos mecánico-cuánticos que con frecuencia exceden de nuestras capacidades de computación.

El diseño de enzimas está todavía lejos de la tasa de mejora de reacción de las enzimas naturales, que se fija en torno a las 10,000 millones de veces mayor que aquellas enzimas artificiales descritas. Además, las reacciones que se han escogido son, todavía, relativamente objetivos fáciles.

Sabemos bastante de las proteínas que se encuentran en cantidades medibles y aislables pero muy poco de las proteínas que existen en cantidades muy pequeñas, ni tampoco de sus muchas interrelaciones. Además, después de los importantes avances en el tercio medio del siglo pasado, existe un olvido casi absoluto de vitaminas y cofactores que sin duda existen en muchos tejidos. Como descubridor, por casualidad, de uno de estos cofactores importantes, el acetilglutámico, pienso que debe haber muchos más todavía desconocidos.

Otro campo en el que el descubrimiento de nuevas proteínas está siendo decisivo, es el del envejecimiento. La aparición de conceptos como el de “degradoma” (38) como conjunto de proteasas que mantienen la actividad celular correcta, o la importancia de las proteínas de membrana y las proteínas carabina del núcleo celular en el envejecimiento, junto a la afamada telomerasa, pueden suponer un primer paso en el entendimiento de por qué envejecemos y, espero que en breve plazo, en el desarrollo de mecanismos de prevención. Me complace recordar que existen grupos españoles de muy reconocido prestigio internacional en estos temas, como los liderados por María Blasco y Carlos López Otín, ambos Premio Rey Jaime I.

Carlos López Otín, interesado en las funciones de las metaloproteasas, ha encontrado numerosas relaciones entre diversas proteínas y el envejecimiento celular. Y, últimamente, algunos mecanismos por los que el envejecimiento parece dificultar que las células adquieran capacidad de proliferación indefinida. En cierta medida, López Otín está descubriendo las vías de regulación genética de la actividad proteica, el equivalente a las vías metabólicas con las que Krebs revolucionó la bioquímica. (39)

Y de nuevo Cambridge y sus magníficos laboratorios de estructura tridimensional de moléculas pueden revolucionar la ciencia: Aaron Klug, formado en el mismo laboratorio Cavendish en que se descubrió la estructura de la doble hélice, está analizando las funciones de las proteínas carabinas de la cromatina con estructuras en dedos de zinc. Sus últimos experimentos le han llevado a bloquear la expresión de algunos genes de células eucariotas con nucleasas con estructuras en dedos de zinc modificadas en el laboratorio (40).

Desde hace aproximadamente unos 4 años, hay un gran interés en la biología sintética y la producción de nuevos productos químicos y energéticos, por medio de la utilización de bacterias modificadas por ingeniería genética. En un artículo de *Nature* (41), Paul Berg recordaba los comienzos de la ingeniería genética, cuando los líderes de aquella época en esta área se reunieron en Asilomar y se abordaron los posibles riesgos tanto medioambientales como de salud. Entonces, afortunadamente, se vio que no existían los problemas que en un principio se temían.

Drew Endy, responsable del Grupo de Biología Sintética del *Massachusetts Institute of Technology*, ha puesto de manifiesto que su grupo está trabajando con fragmentos de ADN, intentando diseñar y construir nuevos sistemas *in vivo* conocido como proyecto alfa. (40 y 41) Afortunadamente, los jóvenes españoles están desarrollando un importante trabajo en este campo, como el grupo multidisciplinar de la Universidad Politécnica de Valencia, la Universidad de Valencia y el proyecto ingenio Mathematica i-Math, que ha participado cuatro veces en las competiciones anuales iGEM desarrolladas en el MIT.

Por todo este avance, quizá, se hace necesario otro Asilomar, porque no podemos renunciar al conocimiento, siempre que se desarrolle desde el respeto a la vida y a la humanidad.

Referencias

1. Sumner, J.B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *J. Biol. Chem.* 1926, 69, 435-441.
2. Northrop, J. H. *Crystalline Enzymes* (1939; rev. ed. 1948).
3. Shafrit, E. Otto Heinrich Warburg-pioneer in enzymatic biochemistry and physiology of respiration (1883-1970). *Isr J Med Sci.* 1993 Dec;29(12):823.
4. Raju, T N (1998), "The Nobel chronicles. 1922: Archibald Vivian Hill (1886-1977), Otto Fritz Meyerhof (1884-1951).", *Lancet* 352 (9137): 1396, 1998.
5. Day, H. G. (1974) *Biographical Memoir of Elmer Verner McCollum*, Vol. 45, pp.263 –335, National Academy of Sciences, Washington, D. C.
6. A. Krebs H A. The tricarboxylic acid cycle. *Harvey Lect.* 1948-1949;Series 44:165-99.
6. B. Krebs H A., Eggleston L.V. The oxidation of piruvate in pigeon breast muscle. *Biochemical J.* 1940 Mar;34(3):442-59.
7. Avery OT, MacLeod C, McCarty M "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus Type III" *J. Exper. Med.* 79:137-158, 1944.

8. McCarty M, Avery OT "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. II. Effect of deoxyribonuclease on the biological activity of the transforming substance", *J. Exper. Med.* 83:89-96, 1946.
9. McCarty M, Avery OT "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. III. An improved method for the isolation of the transforming substance and its application to *Pneumococcus* Types II, III, and IV", *J. Exper. Med.* 83:97-104, 1946.
10. McCarty M, Taylor HE, Avery OT "Biochemical studies of environmental factors essential in transformation of pneumococcal types", *Cold Spring Harbor Symposia* 11: 177-183, 1946.
11. Chargaff, E. "Structure and function of nucleic acids as cell constituents" *Fed Proc.* 1951 Sep;10(3):654-9.
12. Chargaff E. "Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. 1950." *Experientia.* 1994 Apr 15;50(4):368-76
13. Pauling L, Corey RB, Branson HR "The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain" *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 37, 205-211, 1951.
14. Watson JD, Crick FHC "Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acids", *Nature* 171:737-738, 1953.
15. Grunberg-Manago M, Ortiz PJ, Ochoa S. "Enzymatic Synthesis of nucleic acidlike polynucleotides" *Science.* 1955 Nov 11;122(3176):907-10.
16. Rose IA, Grunberg-Manago M, Korey SR, Ochoa S. "Enzymatic Phosphorylation of Acetate" *J Biol Chem.* 1954 Dec;211(2):737-56.
17. Brummond D.O., Staehelin M., Ochoa S. "Enzymatic Synthesis of polynucleotides. II Distribution of polynucleotide Phosphorylase" *J Biol Chem.* 1957 Apr;225(2):835-49.
18. Bessman MJ, Kornberg A, Lehman IR, Simms ES. "Enzymic Synthesis of deoxyribonucleic acid" *Biochim Biophys Acta.* 1956 Jul;21(1):197-8.
19. Martin RG, Matthaei JH, Jones OW, Nirenberg MW. "Ribonucleotide composition of the genetic code" *Biochem Biophys Res Commun.* 1962 Jan 24;6:410-4.
20. Grisolia S, Wallace R, Mendelson J. "Correlation between in vivo and in vitro metabolic measurements. Maximum capacity for urea synthesis" *Physiol Chem Phys.* 1975;7(3):219-23.
21. Arber W, Linn S. "DNA modification and restriction" *Annu Rev Biochem.* 1969; 38:467-500.
22. Smith HO, Nathans D. "Letter: A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes." *J Mol Biol.* 1973 Dec 15; 81(3):419-23.
23. Gelinis RE, Roberts RJ. "One predominant 5'-undecanucleotide in adenovirus 2 late messenger RNAs." *Cell.* 1977 Jul;11(3):533-44.
24. Chow LT, Gelinis RE, Broker TR, Roberts RJ. "An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA." *Cell.* 1977 Sep;12(1):1-8.
25. Maxam AM, Gilbert W. "A new method for sequencing DNA" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Feb;74(2):560-4.
26. Prusiner SB "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie." *Science.* 1982 Apr 9;216(4542):136-44.

27. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.
28. Sharp PA. RNA interference -- 2001. *Genes Dev* 2001;15:485-490.
29. Thomson JA, Odorico JS. "Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines." *Trends Biotechnol*. 2000 Feb;18(2):53-7.
30. Scherer SW, Cheung J, MacDonald JR, Osborne LR, Nakabayashi K, Herbrick JA, Carson AR, Parker-Katiraei L, Skaug J, Khaja R, Zhang J, Hudek AK, Li M, Haddad M, Duggan GE, Fernandez BA, Kanematsu E, Gentles S, Christopoulos CC, Choufani S, Kwasnicka D, Zheng XH, Lai Z, Nusskern D, Zhang Q, Gu Z, Lu F, Zeesman S, Nowaczyk MJ, Teshima I, Chitayat D, Shuman C, Weksberg R, Zackai EH, Grebe TA, Cox SR, Kirkpatrick SJ, Rahman N, Friedman JM, Heng HH, Pelicci PG, Lo-Coco F, Belloni E, Shaffer LG, Pober B, Morton CC, Gusella JF, Bruns GA, Korf BR, Quade BJ, Ligon AH, Ferguson H, Higgins AW, Leach NT, Herrick SR, Lemyre E, Farra CG, Kim HG, Summers AM, Gripp KW, Roberts W, Szatmari P, Winsor EJ, Grzeschik KH, Teebi A, Minassian BA, Kere J, Armengol L, Pujana MA, Estivill X, Wilson MD, Koop BF, Tosi S, Moore GE, Boright AP, Zlotorynski E, Kerem B, Kroisel PM, Petek E, Oscier DG, Mould SJ, Döhner H, Döhner K, Rommens JM, Vincent JB, Venter JC, Li PW, Mural RJ, Adams MD, Tsui LC. Human chromosome 7: DNA sequence and biology. *Science*. 2003 May 2;300(5620):767-72. Epub 2003 Apr 10.
31. Grujic D, Strezoska Z, Crkvenjakov R. High throughput PCR procedure for up to 6-kb lengths of DNA. *Biotechniques*. 1994 Aug;17(2):291-2, 294.
32. Hyten DL, Song Q, Choi IY, Yoon MS, Specht JE, Matukumalli LK, Nelson RL, Shoemaker RC, Young ND, Cregan PB. High-throughput genotyping with the GoldenGate assay in the complex genome of soybean. *Theor Appl Genet*. 2008 May;116(7):945-52.
33. Lartigue C, Glass JI, Alperovich N, Pieper R, Parmar PP, Hutchison CA 3rd, Smith HO, Venter JC. Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science*. 2007 Aug 3;317(5838):632-8. Epub 2007 Jun 28.
34. Yooseph S, Sutton G, Rusch DB, Halpern AL, Williamson SJ, Remington K, Eisen JA, Heidelberg KB, Manning G, Li W, Jaroszewski L, Cieplak P, Miller CS, Li H, Mashiyama ST, Joachimiak MP, van Belle C, Chandonia JM, Soergel DA, Zhai Y, Natarajan K, Lee S, Raphael BJ, Bafna V, Friedman R, Brenner SE, Godzik A, Eisenberg D, Dixon JE, Taylor SS, Strausberg RL, Frazier M, Venter JC. The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: expanding the universe of protein families. *PLoS Biol*. 2007 Mar;5(3):e16.
35. Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, Denisova EA, Baden-Tillson H, Zaveri J, Stockwell TB, Brownley A, Thomas DW, Algire MA, Merryman C, Young L, Noskov VN, Glass JI, Venter JC, Hutchison CA 3rd, Smith HO. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*. 2008 Feb 29;319(5867):1215-20. Epub 2008 Jan 24.
36. Röthlisberger D, Khersonsky O, Wollacott AM, Jiang L, DeChancie J, Betker J, Gallaher JL, Althoff EA, Zanghellini A, Dym O, Albeck S, Houk KN, Tawfik DS, Baker D. Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature*. 2008 May 8;453(7192):190-5. Epub 2008 Mar 19.
37. Jiang L, Althoff EA, Clemente FR, Doyle L, Röthlisberger D, Zanghellini A, Gallaher JL, Betker JL, Tanaka F, Barbas CF 3rd, Hilvert D, Houk KN, Stoddard BL, Baker D. De novo computational design of retro-aldol enzymes. *Science*. 2008 Mar 7;319(5868):1387-91.

38. Ordoñez G.R, Puente X.S, Quesada V, López-Otín C. "Proteolytic Systems: constructing degradomas". *Methods Mol Biol.* 2009;539:33-47.
39. Fanjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S, López-Otín C. "Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional análisis in Mouse models". *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jul 22.
40. Santiago Y, Chan E, Liu PQ, Orlando S, Zhang L, Urnov FD, Holmes MC, Guschin D, Waite A, Miller JC, Rebar EJ, Gregory PD, Klug A, Collingwood TN. Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Apr 15;105(15):5809-14. Epub 2008 Mar 21.
41. Berg P. Meetings that changed the world: Asilomar 1975: DNA modification secured. *Nature.* 2008 Sep 18;455(7211):290-1.
42. Canton B, Labno A, Endy D. Refinement and standardization of synthetic biological parts and devices. *Nat Biotechnol.* 2008 Jul;26(7):787-93.
43. Yu RC, Resnekov O, Abola AP, Andrews SS, Benjamin KR, Bruck J, Burbulis IE, Colman-Lerner A, Endy D, Gordon A, Holl M, Lok L, Pesce CG, Serra E, Smith RD, Thomson TM, Tsong AE, Brent R. The Alpha Project: a model system for systems biology research. *IET Syst Biol.* 2008 Sep;2(5):222-33. Review.

MEJORA GENÉTICA DE ESPECIES VEGETALES

Luis Navarro

*Centro de Protección Vegetal y Biotecnología
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)
Miembro de la Academia de Agricultura de Francia
Premio Rey Jaime I de Nuevas Tecnologías*

Una parte importante de la sociedad y de los medios de comunicación están convencidos de que la mejora genética o transformación genética de las plantas cultivadas es un proceso reciente que se realiza mediante la utilización de la biotecnología, particularmente mediante técnicas de ingeniería genética. Sin embargo, esta idea está totalmente alejada de la realidad ya que este proceso se ha producido de forma ininterrumpida desde el inicio de la agricultura hace unos 10.000 años. Lo que es cierto es que durante este periodo la mejora ha tenido distintas fases y los actores encargados de la misma han ido cambiando. Los primeros “mejoradores” fueron los recolectores-cazadores que realizaron la domesticación de especies silvestres e iniciaron la agricultura. Posteriormente los agricultores sometieron a las plantas a un proceso de selección empírica durante varios milenios creando las variedades locales. Los descubrimientos sobre la hibridación, la herencia y la genética hacen que los científicos tomen el relevo en la mejora de las plantas, tímidamente durante el siglo XIX y de forma generalizada durante el siglo XX creando las variedades de alto rendimiento más resistentes a plagas y enfermedades. Los desarrollos biotecnológicos de la segunda mitad del siglo XX incorporaron una nueva pléyade de científicos en diversas disciplinas al proceso de mejora genética de las plantas cultivadas con nuevas estrategias que abren horizontes insospechados en el desarrollo de la agricultura, especialmente con la irrupción de las plantas transgénicas. La domesticación de las especies y su mejora a través de las distintas fases constituyen un proceso evolutivo totalmente artificial desde sus orígenes que nunca hubiese sucedido de forma espontánea en la naturaleza (García Olmedo, 1998).

La domesticación de las plantas cultivadas

La especie humana pasó unos dos millones de años alimentándose de la recolección de plantas silvestres y de la caza, hasta que hace tan solo unos 10.000 años inició la domesticación de distintas es-

pecies vegetales y con ella la agricultura, que probablemente es la revolución tecnológica más importante de la historia de la humanidad. No se conocen las causas de este cambio tan radical del sistema de vida. De los datos arqueológicos y del estudio de tribus primitivas que han permanecido aisladas hasta tiempos recientes se deduce que los recolectores-cazadores tenían una dieta muy variada y se alimentaban de centenares de plantas, aunque probablemente unas pocas de ellas constituían el sustento principal en cada una de las distintas zonas geográficas habitadas. Debían tener un conocimiento detallado sobre la botánica de las planas de su habitat. Además debieron desarrollar procedimientos basados en el fuego y la maceración para eliminar o disminuir la toxicidad de muchas de ellas, lo que les permitía aumentar el alimento disponible. Los datos existentes parecen indicar que el tiempo que necesitaban para buscarse el sustento no debía ser superior a unas cuatro horas diarias, lo que no representa un gran esfuerzo. La población de cada zona probablemente estaba controlada por la cantidad de alimentos disponibles, por lo que en circunstancias normales la escasez de alimentos no debió ser un desencadenante para el inicio de la agricultura, que además se realizó de forma independiente en distintas zonas del planeta. Se puede especular que grandes cambios climáticos redujeron la cantidad de alimentos disponibles, lo que indujo a nuestros antepasados a realizar algo tan trascendente como recolectar semillas de plantas silvestres de las que se alimentaban habitualmente, sembrarlas en un campo preparado, cuidarlas y protegerlas y recoger la cosecha para alimentarse guardando una parte de la semilla para repetir el ciclo.

El simple hecho de sembrar semillas de una especie silvestre supone cambios muy importantes en su ambiente natural. Las semillas se siembran a más profundidad en un suelo más mullido, lo que le da más protección y facilita la germinación. La planta probablemente tiene más agua disponible y no tiene la competencia de otras plantas que se eliminan. La simple adaptación a las condiciones de cultivo causa modificaciones genéticas y consecuentemente cambios en la información hereditaria.

En el proceso de domesticación el hombre indujo modificaciones genéticas de gran importancia que cambiaron totalmente el comportamiento y características de las plantas en distintos aspectos. Por ejemplo, en las especies silvestres hay una gran variabilidad en la época de maduración con la finalidad de que existan semillas maduras en un periodo prolongado de tiempo que faciliten la supervivencia de la especie ante condiciones adversas. Cuando se cultivan estas especies se produce la misma variabilidad, pero la recolección se realiza en una época determinada en la que hay plantas cuyas semillas no han madurado y no se recolectan y otras que han madurado con anterioridad y cuyas semillas se han diseminado. Esto implica que de la población inicial solo se recolectan las plantas que maduran en la época de recolección. Una parte de la semilla recolectada se dedica a alimentación y otra se siembra para la cosecha del año siguiente. Este ciclo se repite en años sucesivos ejerciendo una fuerte presión de selección sobre la población primitiva hasta que se consiguen poblaciones cada vez más homogéneas que maduran de forma sincrónica.

Algo parecido se repitió con la dehiscencia de los frutos de las espigas. En las especies silvestres los frutos se desprenden y se dispersan en el momento de la maduración para favorecer la supervivencia de las mismas, lo que es un desastre para la agricultura, ya que en el momento de la recolección los granos estarían dispersos en el suelo en vez de en las espigas. Durante la domesticación se seleccionaron de forma generalizada poblaciones con frutos indehiscentes, que favorecen la agricultura pero dificultan la supervivencia natural de las especies.

Los caracteres que se modificaron de forma general durante la domesticación, denominada selección automática, fueron la maduración sincrónica, la formación de frutos o infrutescencias indehiscentes, la pérdida del periodo de latencia de las semillas, el aumento del tamaño de las inflorescencias, el aumen-

to (trigo, cebada) o la disminución (maíz, girasol) del número de inflorescencias, el aumento del tamaño de las semillas (Cubero, 2003).

Un aspecto muy interesante es el estudio del lugar de domesticación de las plantas cultivadas. Este tema no se aborda hasta la mitad del siglo XIX. Darwin fue el precursor de estos estudios y en su obra "El origen de las especies" describe la selección artificial en plantas y animales realizada por agricultores y ganaderos y posteriormente especuló con el posible origen a partir de especies silvestres. El botánico Alfonso De Candolle, contemporáneo de Darwin, escribió por primera vez un tratado sobre el tema titulado "El origen de las plantas cultivadas", publicado en 1882. En sus estudios utilizó datos botánicos, arqueológicos, históricos y etnográficos para determinar las zonas de origen de las plantas cultivadas. El ruso Nikolai Vavilov realizó extensísimos estudios sobre el origen de las plantas cultivadas basándose en criterios fitogeográficos y al servicio de la mejora vegetal, creando el concepto de Centros de Origen de cada especie cultivada y proponiendo siete centros de origen de las especies cultivadas: China, Sudeste asiático, Sudoeste asiático (creciente fértil), el Mediterráneo, Etiopía, Mejico y los Andes (Vavilov, 1926). Estos estudios pioneros se han completado posteriormente con utilización de técnicas genéticas, de biología molecular y genómicas, que son herramientas muy poderosas para explicar la domesticación y la evolución de las plantas cultivadas (Burger et al., 2008). La mayoría de los Centros de Origen no son tan localizados y concretos como se creía y se ha creado el concepto de Centros de Origen Difusos, ya que hay evidencias de que la domesticación de algunas especies se realizó de forma simultánea e independiente en distintas zonas próximas. Actualmente se considera que el número de especies domesticadas en cada zona responde esencialmente a las necesidades y la actividad humana, más que a la riqueza de especies de potencial interés agrícola.

Los numerosos estudios recientes sobre diversos aspectos de la domesticación están dando resultados muy interesantes (Burger et al., 2008). Una de las preguntas sin respuesta concreta es el periodo que cada especie necesitó para su domesticación. Tradicionalmente se había considerado que el proceso había sido extraordinariamente lento durante milenios, pero diversos estudios sugieren que en algunas especies, como el maíz, el proceso se llevó a cabo en apenas unos pocos centenares de años. También se están identificando genes relacionados con la domesticación y curiosamente se están encontrando genes equivalentes en distintas especies que han tenido un papel fundamental en la misma (Paterson et al., 1995).

Como ejemplo se puede citar el caso del maíz. Gracias a la integración de diversas metodologías, desde la arqueología y la paleontología a la biología molecular, es la especie de la que mejor se conoce el proceso de domesticación (Matsuoka et al., 2002; Piperno et al., 2009). Tuvo lugar hace 9.000 años a partir de la especie silvestre teosinte en el valle del río Balsas en México (Figura 1).

Desde que se inició la domesticación se produjo una continua evolución artificial de las especies cultivadas para adaptarlas a las necesidades de la agricultura, que generalmente fue en dirección distinta de la evolución natural que favorece su supervivencia en condiciones naturales. Las modificaciones genéticas que se realizaron en esta época fueron muy superiores a las producidas en los milenios posteriores cuando se seleccionaron numerosas variedades a partir de las poblaciones iniciales. La pérdida de diversidad genética también fue muy superior en el proceso de domesticación.

Selección de variedades locales

La agricultura se estableció como actividad permanente después de la domesticación y apareció la figura del agricultor, que es clave en la evolución de las especies cultivadas. La agricultura se fue extendiendo paulatinamente y de forma lenta en nuevos territorios fundamentalmente como consecuencia de

la presión demográfica, difundiendo simultáneamente las especies domesticadas. Las grandes conquistas aceleraron la expansión de las especies a nuevos territorios, ya que los pueblos llevaban consigo su más valiosa tecnología, que era el conocimiento del cultivo de las plantas para producir alimentos. La difusión de las especies se aceleró enormemente con los grandes viajes de exploración, fundamentalmente a partir del siglo XV, ya que sistemáticamente se transportaban semillas y plantas entre zonas muy alejadas. De esta forma las especies salieron de sus centros de origen para implantarse en todos los territorios que tenían condiciones adecuadas para su cultivo.

En este periodo de varios milenios los agricultores sembraban semillas de las distintas especies y de la cosecha obtenida reservaban una parte de las semillas para cultivo del año siguiente, que además pasaban de generación en generación. Durante el cultivo se produce una variación continua como consecuencia de la recombinación de genomas por cruzamientos sexuales espontáneos y por mutación de genes. En consecuencia en cualquier campo aparecerían individuos distintos que el agricultor seleccionaba para cultivar el año siguiente en base a sus propios criterios que debían estar relacionados con los gustos de la población y por la adaptación a los distintos ambientes. Al cabo de los años los caracteres se fijan formando plantaciones de plantas bastante homogéneas, es decir, se han creado las variedades locales. Este tipo de mejora o selección artificial continua realizada por millones de agricultores en el mundo, llamada selección masal, dio lugar a las innumerables variedades locales de las distintas especies (Figura 1). Aunque el fenotipo de estas variedades sea bastante diverso, en realidad la variabilidad genética de las variedades locales es muy inferior a la de las especies silvestres originales, ya que se originan a partir de poblaciones mucho más homogéneas.

En la actualidad la selección de sus propias semillas por los agricultores se produce fundamentalmente en la agricultura de subsistencia. No obstante, los agricultores siguen hoy seleccionando nuevas variedades en algunos cultivos altamente tecnificados. Por ejemplo, en los cítricos, que son el principal cultivo frutal del mundo, la mayor parte de las variedades cultivadas se han producido por mutaciones espontáneas en campo, que son detectadas e incluso protegidas o patentadas por los agricultores y luego propagadas por injerto masivamente en modernos viveros. En la figura 2 se muestran como ejemplo diversas variedades de mandarino clementino producidas por mutación espontánea en campo y seleccionadas por los agricultores en función del tamaño y época de maduración. También cabe destacar que las variedades más apreciadas son aquellas cuyos frutos no producen semillas, que se cultivan de forma generalizada. Se da la paradoja que se han seleccionado variedades por métodos considerados "naturales" que no tienen ninguna posibilidad de sobrevivir en la naturaleza por que no disponen de un sistema de reproducción. La agricultura las mantiene mediante métodos de clonación masiva por injerto. Este ejemplo nos indica una vez más que la evolución de las especies cultivadas se ha realizado de forma totalmente artificial por la intervención del hombre muchas veces contra natura.

Las variedades de alto rendimiento

La mejora genética de las especies vegetales toma un nuevo rumbo con los descubrimientos científicos iniciados a finales del siglo XVII que se materializan en el siglo XX con la obtención generalizada de variedades de alto rendimiento en la mayoría de las especies cultivadas a gran escala. La hipótesis de la reproducción sexual de las plantas no se plantea hasta finales del siglo XVII y los primeros cruzamientos para probar esta teoría se realizan en 1717 entre distintas variedades de clavel. Kölreuter (1733-1806) realizó una gran cantidad de cruzamientos entre variedades de distintas especies para confirmar la sexualidad de las plantas. Las primeras hibridaciones dirigidas a la obtención de nuevas variedades se realizaron a finales del siglo XVIII y principios del XIX. En 1858 Mendel hizo públicos sus descubrimientos sobre la

herencia de caracteres en las plantas. Posteriormente se identifican los cromosomas como sedes de la información genética. A finales del siglo XIX la mejora de plantas mediante cruzamientos controlados es utilizada en diversos países, e incluso se realizaron los dos primeros Congresos Internacionales Mejora.

Un hecho de gran trascendencia en la mejora genética de plantas fue la creación de empresas de producción de semillas. La primera fue Vilmorin en Francia, que se estableció en 1727. La implantación de las empresas de semillas fue muy rápida, ya que facilitaban al agricultor semillas de calidad y además este no tenía que preocuparse de recolectar y conservar sus propias semillas. Inicialmente las empresas producían semillas de variedades existentes, pero rápidamente iniciaron programas de selección y mejora y de hecho crearon la profesión de "mejorador genético".

A principios del siglo XX se "redescubrieron" las leyes de herencia de Mendel, que además se integraron con las teorías de evolución de Darwin. Se descubrió la mutagénesis artificial, que permitía mutar genes y la poliploidía que permitía crear nuevas especies. En otras palabras, se podía imitar a la naturaleza creando de forma dirigida variabilidad por recombinación de genomas y mutación de genes. Todo ello supuso un gran avance de la genética que se aplica de forma generalizada para la mejora de variedades y que tiene su punto álgido en la llamada revolución verde con la obtención de variedades de alto rendimiento (Figura 1).

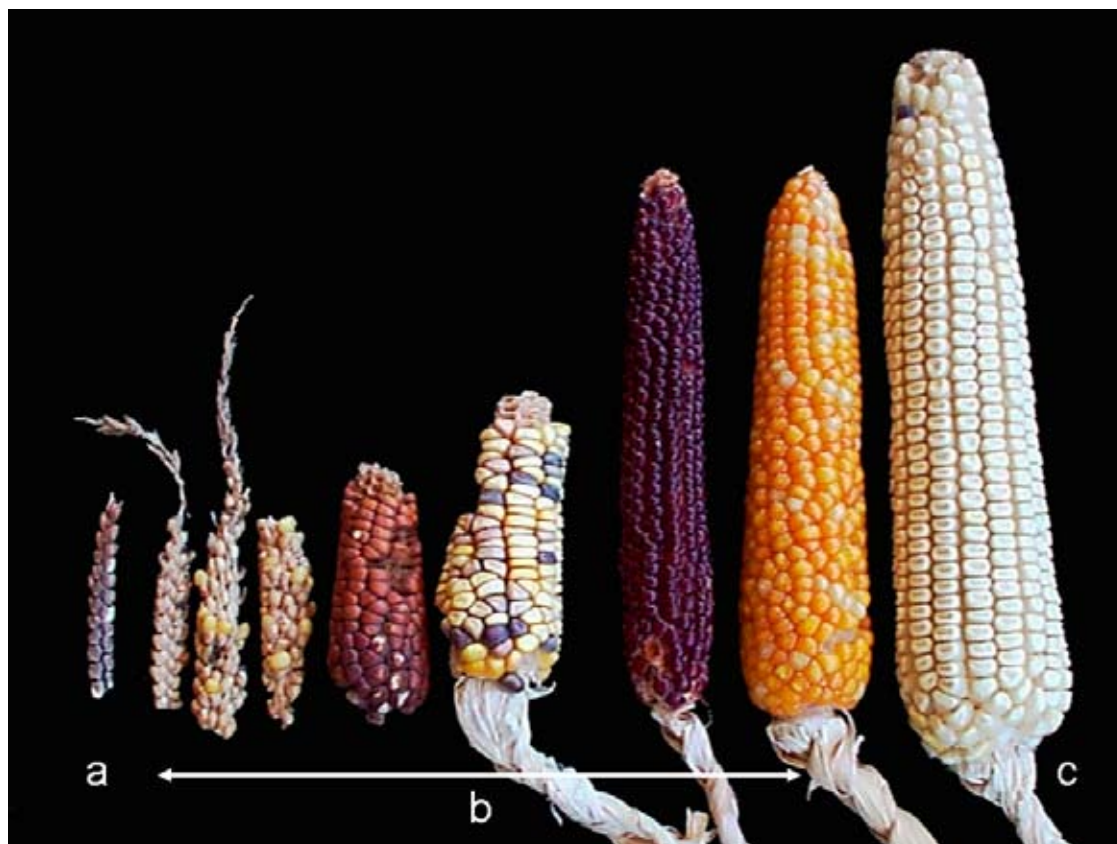


Figura 1. Evolución de las variedades de maíz. a) Teosinte o maíz silvestre original; b) variedades locales; c) variedades actuales de alto rendimiento



Figura 2. Variedades de mandarino clementino producidas por mutación espontánea en campo y seleccionadas por agricultores

Desde las pesimistas predicciones de Malthus (1978) de crecimiento lineal de la producción de alimentos y exponencial de la población, se estimaba que la producción de alimentos limitaría de forma drástica el crecimiento de la población mundial y que habría grandes hambrunas a partir de la mitad del siglo XX. El crecimiento de la demanda de alimentos se cubrió hasta esta época con incrementos de la superficie cultivada y mejoras en las técnicas agrícolas. La necesidad de incrementar los rendimientos agrícolas se abordó a nivel internacional con la creación de grandes programas de mejora en los centros auspiciados por el Grupo Consultivo Internacional para la Investigación Agrícola (CGIAR) para obtener variedades más productivas de los principales cultivos que contribuyen a la alimentación.

En el Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y el Trigo (CIMMYT) en Méjico se inició en 1943 un programa de mejora de estas dos especies dirigido por Norman Borlaug con el objetivo de obtener variedades más productivas, más resistentes a plagas y enfermedades y con buen comportamiento agronómico en ambientes diversos. Con la misma aproximación, en 1958 se inició en el Centro Internacional de Investigación del Arroz (IRRI) en Los Baños, Filipinas un programa de mejora de esta especie.

En estos programas se obtuvieron variedades de alto rendimiento en las tres especies que se adaptan muy bien a condiciones de suelo y clima diferentes. Las variedades de trigo son además más resistentes a plagas y enfermedades. Las nuevas variedades de arroz son de ciclo corto y floración independiente de la duración del día, lo que permite dos cosechas al año, son resistentes a plagas y enfermedades y tienen buenas propiedades culinarias.

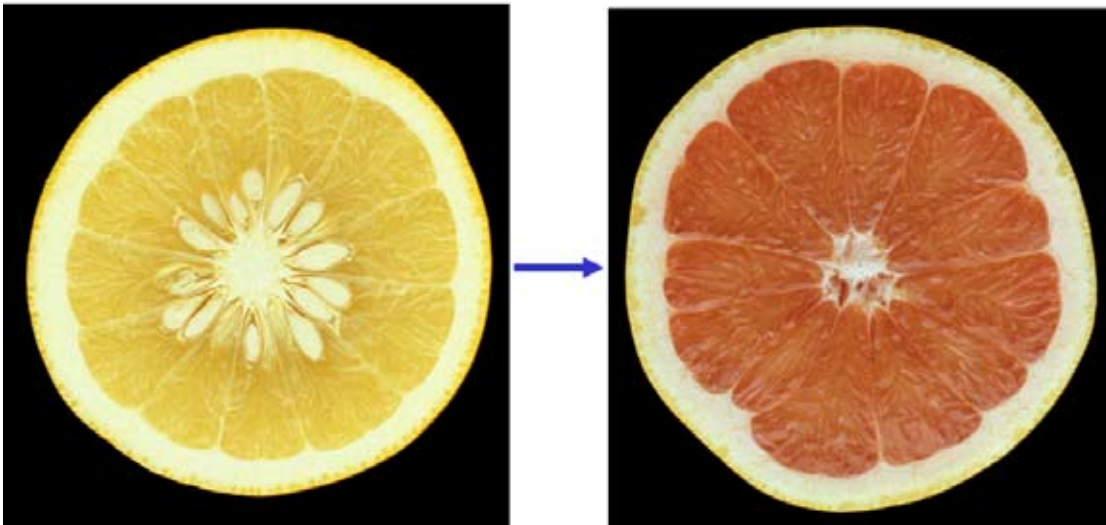


Figura 3. Ejemplo del uso de la irradiación para la inducción de mutaciones. La irradiación de semillas del pomelo Hudson de pulpa amarilla dio lugar al pomelo Star Ruby, sin semillas y de pulpa roja, que se cultiva ampliamente en distintos países

Las nuevas variedades empezaron a cultivarse en 1959, inicialmente a pequeña escala y con una implantación global en unos diez años. Entre 1965 y 1969 la superficie sembrada con las nuevas variedades de trigo y arroz pasó de menos de 100 hectáreas a más de 15 millones.

La utilización de las nuevas variedades produjo aumentos espectaculares de las cosechas. Por ejemplo, la producción de trigo en la India pasó de 11,3 millones de toneladas en 1967, a 33 millones en 1971 y 73 millones en la actualidad. El rendimiento de arroz en China pasó de 2 a 4,7 toneladas por hectárea. Entre 1940 y 1980 la producción de maíz en EE.UU. pasó de 64 millones de toneladas con 36 millones de hectáreas cultivadas a 185 millones de toneladas con 29 millones de hectáreas. A nivel global la productividad de la tierra era 2,4 veces superior en 2005 que en 1961. Se estima que alrededor del 70% del incremento de la productividad se debe a la utilización de variedades mejoradas de alto rendimiento y más tolerantes a plagas y enfermedades.

Un hecho de especial relevancia es que Norman Borlaug, recientemente fallecido, recibió el Premio Nobel de la paz en 1970 por la obtención de los trigos de alto rendimiento por su enorme contribución al bienestar de la humanidad.

La mejora genética ha impedido que se cumplan las pesimistas previsiones malthusianas. Actualmente la producción de alimentos es suficiente para alimentar a toda la humanidad. No obstante la distribución de alimentos es irregular por causas fundamentalmente políticas y 1.000 millones de personas tienen escasez de alimentos y están subnutridas y 200 de ellos padecen hambre. Una de las paradojas de nuestra humanidad es que probablemente el número de personas con problemas de obesidad está alcanzando al número de seres humanos que pasan hambre. En EE.UU. los problemas de obesidad ocasionan el 9% de los gastos sanitarios y algunas fuentes estiman que en España superan el 6%.

Actualmente la agricultura moderna está basada en la utilización generalizada de variedades obtenidas por mejora genética, que se distribuyen a los agricultores por empresas de semillas y viveros. Además de forma paulatina se está produciendo la protección o patente de las nuevas variedades, particularmente en la hortofruticultura intensiva.

Banco de germoplasma de cítricos del IVIA



Figura 4. Ejemplo de genotipos del banco de germoplasma de cítricos del IVIA donde se conservan variedades actuales, variedades locales y variedades de especies silvestres

Una de las consecuencias de esta situación es que las variedades locales están desapareciendo rápidamente, con lo que se produce una nueva disminución de la biodiversidad, lo que hace que los bancos de germoplasma adquieran mayor importancia como reservorio de la biodiversidad de las especies cultivadas y de sus parientes silvestres (Figura 4).

Las variedades biotecnológicas

La biotecnología de plantas surge a partir de la hipótesis revolucionaria en su tiempo de Haberlandt que en 1902 consideró que las células vegetales eran totipotentes, es decir que cultivadas en los medios adecuados serían capaces de regenerar plantas enteras. Esta hipótesis se ha cumplido con creces y en la actualidad es posible el aislamiento y cultivo *in vitro* de células vegetales de muchas especies para regenerar plantas enteras y en la mayoría de las especies es posible regenerar plantas a partir de diversos órganos cultivados *in vitro*. Además, las plantas pueden clonarse *in vitro* con relativa facilidad para regenerar en poco tiempo miles de ejemplares idénticos a partir de células o tejidos iniciales. Estos logros han permitido el desarrollo de varias técnicas basadas en el cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro* que son muy importantes para la mejora genética de plantas. La conjunción de estas técnicas con la biología molecular ha permitido también el desarrollo de la ingeniería genética en plantas. Las técnicas

biotecnológicas en plantas están ampliamente revisadas en distintas publicaciones, entre las que puede citarse la serie de 64 monografías sobre la biotecnología en agricultura y silvicultura publicadas entre 1988 y 2009 (Widholm et al., 1988-2009). A continuación se hace una breve discusión sobre las principales de estas técnicas.

Obtención de plantas libres de virus

Los virus producen importantes pérdidas en la agricultura, ya que disminuyen la producción y la calidad de la fruta y causan decaimientos, pérdida de vigor y vida comercial corta de las plantas e incluso en casos graves la muerte de las mismas. En consecuencia, pueden potencialmente convertirse en los factores limitantes más importantes de la producción. El problema es especialmente grave en los frutales, ya que si la propagación en los viveros se realiza con material infectado, todos los árboles de las plantaciones resultantes estarán también infectados y las pérdidas que, en cultivos como los cítricos pueden suponer el 15-25% de la producción, se acumulan durante toda la vida comercial de los árboles, que puede ser de 15 a 25 años. El control de estas enfermedades sólo puede hacerse con medidas preventivas, en las que es imprescindible usar plantas sanas en las nuevas plantaciones.

En muchas ocasiones no es posible encontrar árboles sanos de una determinada variedad, por lo que es necesario recurrir a la utilización de técnicas que permitan la obtención de plantas sanas a partir de plantas enfermas. Los virus no se distribuyen en las plantas infectadas de forma homogénea en todos sus tejidos y es bien conocido que los ápices caulinares (meristemo apical más 1-3 primordios foliares con tamaño comprendido entre 0,1 y 0,3 mm) están normalmente libres de patógenos aunque el resto de las células de la planta estén infectados. Se desconocen las causas por las que los ápices caulinares permanecen libres de patógenos, pero están relacionadas con el hecho de en los ápices caulinares no hay diferenciaciones vasculares que los conecten con el resto de la planta, por lo que los patógenos no los pueden infectar a través del sistema conductor y además hay cada vez más resultados que indican que en estos tejidos los mecanismos de silenciamiento de virus son muy activos e impiden su replicación.

La regeneración de plantas enteras a partir de ápices caulinares mediante cultivo o microinjerto *in vitro* permite la obtención de plantas sanas a partir de plantas infectadas. Como ejemplo cabe citar el caso de los cítricos, que están afectados por diversos patógenos que causan pérdidas muy importantes. La técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* (Navarro y Juárez, 2007) se usa de forma rutinaria en los principales países citrícolas para obtener plantas sanas. Consiste en aislar ápices caulinares de la variedad infectada e injertarlos sobre un portainjertos obtenido por germinación de semillas *in vitro* para regenerar plantas sanas por crecimiento del ápice injertado (Figura 5). En España, que es el cuarto productor del mundo y el primero en exportación de fruta fresca, esta técnica se ha aplicado en gran escala y ha permitido obtener plantas sanas de todas las variedades comerciales de interés y su propagación en viveros comerciales para plantar en los últimos 30 años unos 130 millones de árboles libres de virus que representan más del 95% de la citricultura. Este programa ha producido beneficios multimillonarios en nuestra citricultura y además no se ha limitado a las variedades comerciales, sino que se ha ampliado a variedades locales y especies silvestres para establecer un banco de germoplasma de plantas sanas que conserva una amplia representación de la diversidad de los cítricos (Figura 4).

Cultivo de embriones

El cultivo de embriones es la técnica de cultivo *in vitro* más antigua. Los primeros ensayos se iniciaron dos años después de las hipótesis de Haberland. Actualmente es posible regenerar con facilidad

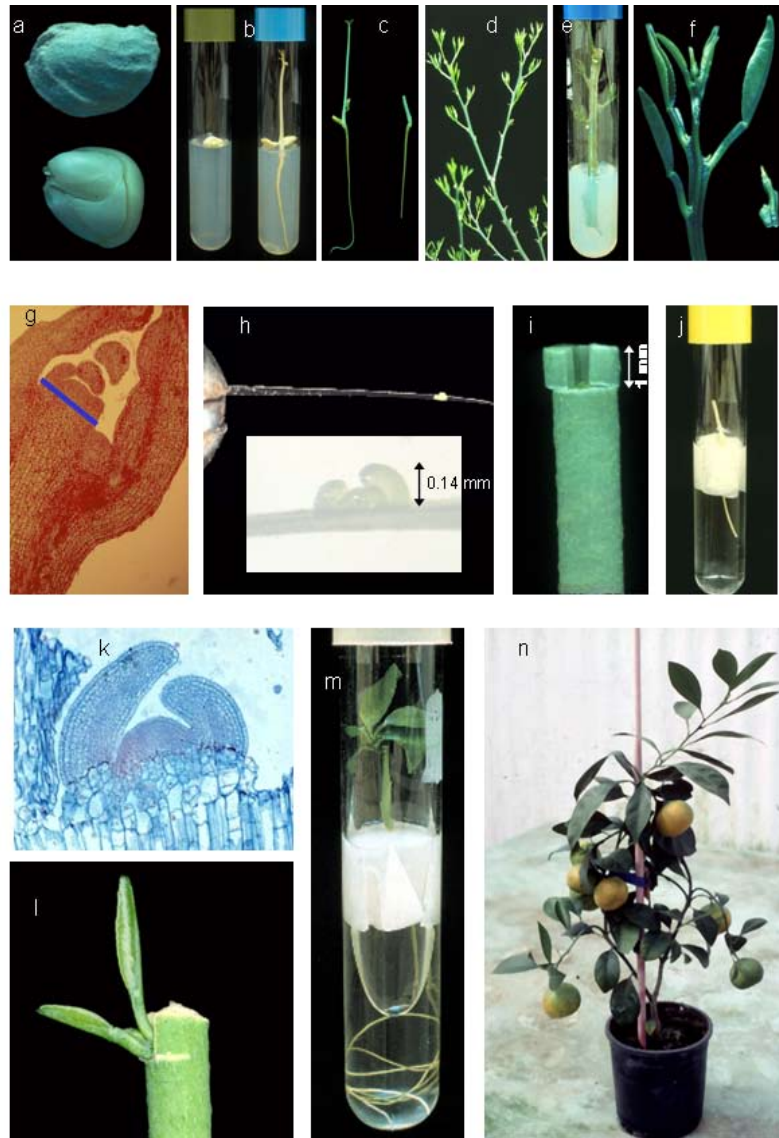


Figura 5. Técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro*. a) semillas del portainjertos intactas (arriba) y sin tegumentos (abajo); b) semilla recién sembrada (izquierda) y plántula resultante al cabo de dos semanas (derecha); c) plántula de dos semanas de edad (izquierda) y portainjertos preparado para el injerto (derecha), con el epicotilo decapitado, los cotiledones y el ápice de la raíz eliminados y una incisión tipo T-invertida realizada en la parte superior del epicotilo decapitado; d) brotes producidos por una planta infectada defoliada y cultivada en una cámara de cultivo a 32°C durante dos semanas; e) brotes producidos por una varetta de una variedad infectada cultivada *in vitro* a 32°C durante dos semanas; f) brote vegetativo intacto (derecha) y preparado para la desinfección (derecha); g) sección histológica de un brote vegetativo de naranjo dulce en la que se indica la zona de corte para el aislamiento del ápice, h) ápice de naranjo dulce sobre el microbisturí usado para el aislamiento; i) detalle de un injerto recién hecho mostrando el ápice en el interior de la incisión del portainjertos; j) injerto recién hecho en un tubo de ensayo; k) sección histológica de un ápice de naranjo dulce 5 días después del injerto; l) naranjo dulce sobre el portainjertos 3 semanas después del microinjerto; m) naranjo dulce sobre el portainjertos 6 semanas después del microinjerto; n) mandarino libre de patógenos a los 2 años de la realización del microinjerto.

plantas a partir de embriones maduros de la mayoría de las especies, aunque es mucho más difícil la regeneración a partir de embriones inmaduros. La principal aplicación es la obtención de híbridos a partir de cruces interespecíficos que presentan incompatibilidad endospermo-embrión que impide el desarrollo de este último. Varias especies cultivadas se originaron por cruzamientos espontáneos entre distintas especies que generalmente son incompatibles y por tanto no se forman embriones y semillas viables después de la polinización y fertilización. Ocasionalmente entre millones de cruzamientos se puede producir una semilla que se desarrolle y de lugar a un híbrido que puede originar una nueva especie. Los cruzamientos entre especies próximas pero incompatibles se pueden abordar en programas de mejora mediante el rescate y cultivo *in vitro* de los embriones producidos para regenerar plantas híbridas. En algunos casos el objetivo es la creación de nuevas especies y en otros incorporar caracteres deseables de especies silvestres en especies comerciales. Este último caso es muy frecuente en programas de mejora de plantas hortícolas que pretenden la introducción de resistencia a patógenos. Cuando esta resistencia no se encuentra en la especie cultivada se recurre a especies silvestres próximas. El primer paso es la consecución de un cruce interespecífico, que normalmente es muy difícil por problemas de incompatibilidad. En algunos tipos de incompatibilidad se produce un embrión que en condiciones normales aborta, pero que es posible rescatar y cultivar *in vitro* antes del aborto para producir híbridos. Estos híbridos se usan como puentes genéticos y a partir de sucesivos retrocruzamientos se fijan en la especie cultivada los caracteres deseables de las especies silvestres. Es interesante destacar aquí, que en este tipo de procesos de mejora se aumenta la diversidad genética de la especie cultivada por la incorporación de genes de la especie silvestre.

Otra aplicación del cultivo de embriones es la obtención de híbridos triploides, que tienen muy baja fertilidad y como consecuencia producen frutos sin semillas que son muy apreciados por los consumidores. En la mayoría de los cruces interploides para obtener triploides se producen embriones, pero las semillas no se desarrollan debido a problemas derivados de las anormales relaciones de ploidía entre el embrión y el endospermo. En estos casos es posible cultivar los embriones *in vitro* para regenerar plantas triploides. En cítricos estamos aplicando de forma rutinaria esta técnica en un amplio programa de mejora para obtener mandarinos sin semillas, que ha permitido la protección y el inicio de la propagación comercial de nuevas variedades (Figura 6).

Obtención de plantas haploides

Las plantas haploides tienen grandes aplicaciones en mejora clásica, ya que por simple duplicación cromosómica permiten obtener de forma directa líneas puras homocigóticas, que facilitan y acortan en varios años los periodos necesarios para la obtención de variedades. Las líneas homocigóticas son también muy importantes en los programas de mejora por irradiación, ya que permiten identificar fácilmente los mutantes, particularmente los que portan genes recesivos de interés. En los últimos años, el desarrollo de la genómica estructural ha creado nuevas aplicaciones de las plantas haploides. La utilización de líneas totalmente homocigotas o líneas monoploides presenta una mayor ventaja para la realización de proyectos de secuenciación ya que facilita enormemente el ensamblaje, así como para el análisis del número de copias de genes candidatos.

La consecución de líneas puras por métodos convencionales se realiza por autofecundaciones sucesivas de varias generaciones (8-12) hasta fijar los caracteres deseados. Esto requiere muchos esfuerzos y además sólo se obtienen líneas casi puras.

La obtención de haploides se puede realizar de forma mucho más sencilla en un considerable número de especies mediante técnicas de cultivo *in vitro*. La mayoría de los haploides se obtienen por

cultivo de anteras o granos de polen,. También se pueden obtener plantas haploides mediante partenogénesis inducida por diversos sistemas y posterior cultivo *in vitro* de óvulos. En ambos casos las plantas se obtienen por una embriogénesis directa o mediante una fase intermedia de formación de callo y posterior regeneración indirecta. Como ejemplo de estas aplicaciones se puede citar que en el proyecto del Consorcio Internacional de Genómica de Cítricos se ha elegido una planta haploide de mandarina obtenida en nuestro laboratorio por el procedimiento de partenogénesis inducida por polen irradiado y cultivo de óvulos (Aleza et al., 2009) para la secuenciación de la especie que ya se ha iniciado en diversos laboratorios.

Hibridación somática

La hibridación somática o fusión de protoplastos es una herramienta biotecnológica que ha sido ampliamente empleada en la mejora genética de vegetales. La técnica se basa en el aislamiento y posterior unión de dos células no sexuales (somáticas) privadas de pared celular (protoplastos), para formar una única célula híbrida, denominada heterocarionte o híbrido somático, a partir de la cual se puede regenerar una planta entera empleando técnicas de cultivo *in vitro*. La fusión entre las células somáticas se induce

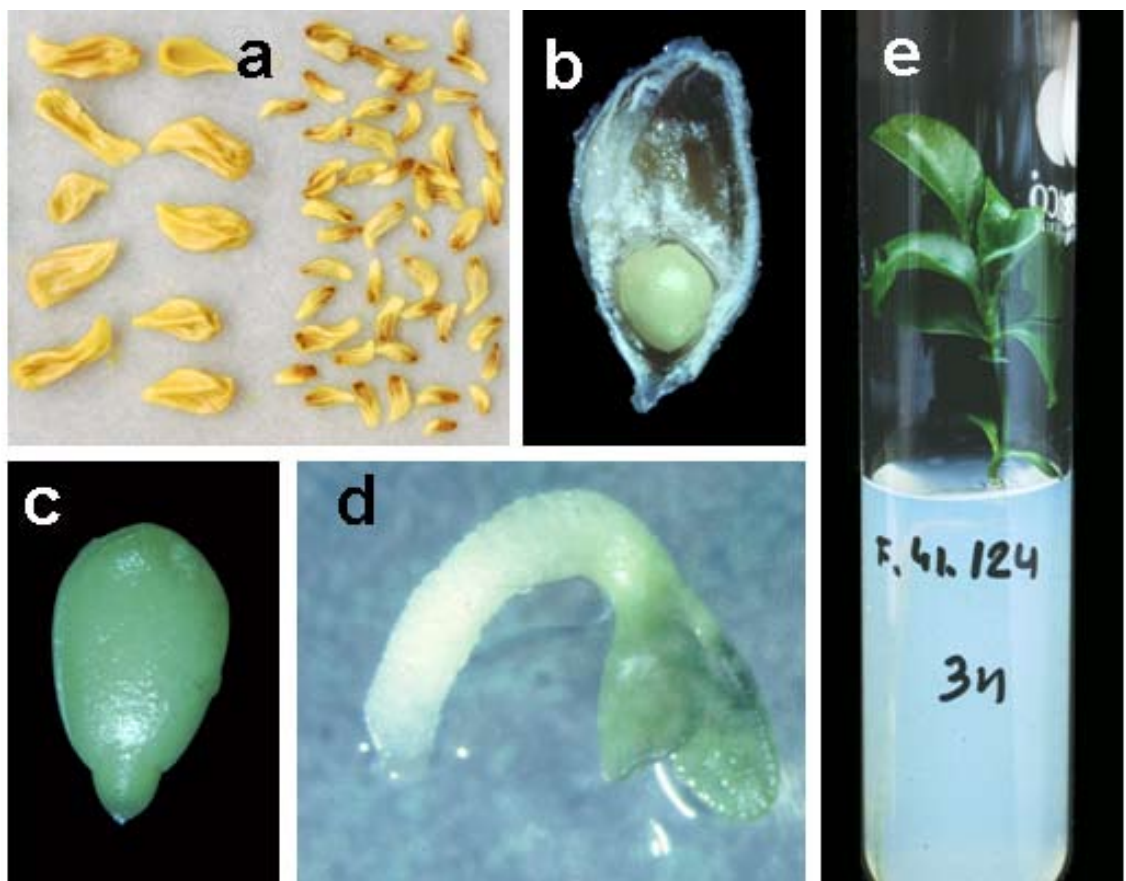


Figura 6. Rescate de embriones *in vitro* para la obtención de híbridos triploides de cítricos. a) semillas poco desarrolladas o abortadas en la que están los embriones triploides; b) semilla con los cotiledones degenerados con un embrión de 1 mm aproximadamente en su interior; c) embrión extraído de la semilla; d) embrión germinando *in vitro*; e) plántula triploide procedente del embrión.

mediante la adición al medio de cultivo de polímeros de alto peso molecular para producir la agregación y una solución rica en iones calcio a pH elevado para inducir la fusión. También hay métodos alternativos que inducen la fusión celular mediante la aplicación de campos eléctricos de corriente continua y alterna.

En la hibridación sexual los gametos (o células sexuales) se originan tras un proceso de meiosis que reduce a la mitad el número de cromosomas y además induce recombinación entre los cromosomas homólogos. La unión de los dos gametos (con número "x" de cromosomas) da origen a un nuevo individuo que presentará un número de cromosomas igual al de sus parentales (2x, diploide). La diferencia principal entre la hibridación sexual y la hibridación somática es que en esta última se suman los genomas de dos células somáticas, que no han sufrido la recombinación y reducción previa. Esto significa que si los parentales de partida son diploides, la planta híbrida obtenida tras la fusión de protoplastos será tetraploide. Los híbridos así obtenidos contienen el genoma nuclear de ambos parentales y pueden expresar los caracteres de ambos parentales, formando los denominados híbridos somáticos simétricos.

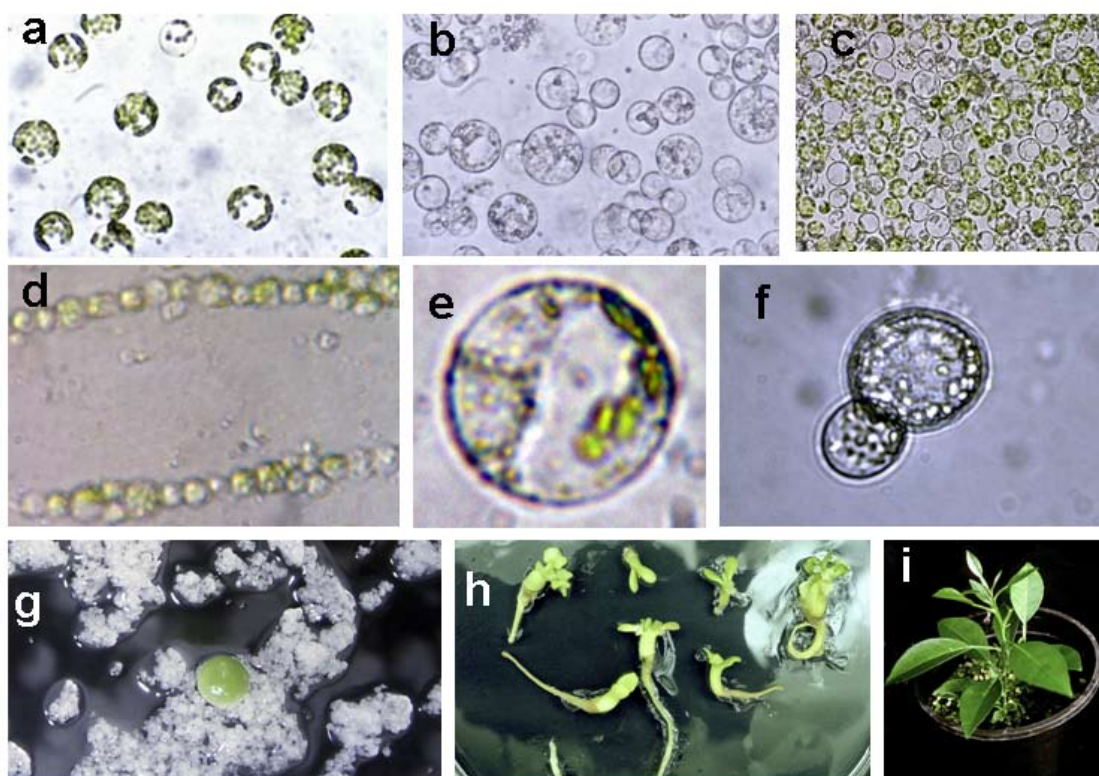


Figura 7. Hibridación somática en cítricos. a) protoplastos aislados de mesófilo hoja; b) protoplastos aislados de callo; c) protoplastos de ambos tipos aglutinados por acción del polietilenglicol; d) protoplastos de ambos tipos alineados por acción de la corriente eléctrica alterna; e) heterocarionte formado tras la fusión de protoplastos; f) primera división del heterocarionte; g) formación de embriones somáticos en el callo híbrido; h) germinación de embriones somáticos; i) híbrido somático.

También se pueden obtener híbridos somáticos asimétricos que poseen toda la información genética de uno de los dos parentales y solamente una parte del otro. Entre este tipo destacan los que presentan el núcleo de uno de los dos parentales y el citoplasma del otro (o el resultante de la reorganización de los

dos citoplasmas parentales). A este tipo de híbridos se le denomina híbridos somáticos citoplasmáticos o cíbridos y tienen un gran interés en la mejora genética ya que permiten modificar solamente los caracteres que están controlados por el genoma citoplasmático o que dependen de la interacción núcleo-citoplasma, sin modificar los caracteres regulados exclusivamente por el genoma nuclear. Este tipo de aproximación no es posible en la hibridación sexual, ya que el genoma citoplasmático se hereda solo por vía materna.

Mediante fusión de protoplastos se pueden obtener híbridos entre especies sexualmente incompatibles, lo que permite aprovechar la variabilidad extraespecífica para la mejora de las especies, que no podrían usarse mediante métodos convencionales.

Transformación genética

Los alimentos transgénicos se tratan con detalle en otro capítulo de este libro (Ramón, 2009), por lo que aquí solo se hacen unos comentarios generales. La transformación genética de plantas ofrece enormes posibilidades, ya que permite introducir caracteres únicos en genotipos de élite sin alterar su fondo genético. Está basada en las características de la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*. Es una bacteria común que infecta a las plantas en lugares donde hay heridas produciéndoles agallas. En la naturaleza, *Agrobacterium* transfiere un segmento de su ADN a las células vegetales y lo integra en su genoma. En el ADN transferido se encuentran varios genes que, una vez integrados en los cromosomas, la célula vegetal reconoce como suyos. De esta forma las células vegetales han sido transformadas. Entre ellos se encuentran genes implicados en la síntesis de hormonas, como auxinas y citoquininas. La producción de estas hormonas a gran escala por las células vegetales transformadas hace que se dividan y proliferen sin control y se formen las agallas típicas de la enfermedad causada por la bacteria. Utilizando técnicas de ingeniería genética, se pueden retirar esos genes “nocivos” del genoma de *Agrobacterium*, es decir desarmar a *Agrobacterium*, y sustituirlos por otros genes de interés que queramos introducir en las plantas que hemos clonado de otros organismos.

Otra posibilidad de transformar las plantas es el “bombardeo” de tejidos de la planta con micropartículas de oro recubiertas con preparaciones de los genes que queremos introducir mediante la llamada pistola de genes, lo que permite la integración al azar de genes en los cromosomas de la planta. Tanto los tejidos tratados con *Agrobacterium* como los bombardeados con micropartículas se cultivan *in vitro* para regenerar plantas a partir de las células transformadas.

Esta tecnología supone un salto espectacular en la mejora genética. La variabilidad a utilizar para la mejora ya no está restringida a la especie a mejorar o a las especies próximas, sino que los genes de interés se pueden clonar de cualquier planta e incluso de otros organismos. Quizás debido a este hecho la técnica tiene importantes detractores, a pesar de que los alimentos transgénicos son los más seguros (Ramón, 2009). No obstante, el cultivo de plantas transgénicas está aumentando de forma continua y en el año 2008 se cultivaron unas 125 millones de hectáreas, fundamentalmente soja, maíz, algodón y colza, con resistencia a herbicidas e insectos. Se están empezando a cultivar otras plantas transgénicas como alfalfa, clavel, calabaza, papaya, tomate, álamo, remolacha, petunia y pimiento. Hay que destacar que la transformación genética es un complemento, aunque de gran importancia, a la mejora convencional. Mediante transformación se modifican aspectos puntuales de genotipos de élite obtenidos por mejora convencional. Por ejemplo, cualquier de las variedades de maíz de la figura 1 podría transformarse para introducir resistencia a herbicidas e insectos, pero lógicamente se han utilizado las variedades de alto rendimiento para este objetivo. Además, cuando disponemos de una planta transgénica con un gen determinado, se

utiliza como parental en programas de hibridación convencionales, ya que el gen introducido se comporta y hereda como un gen de la propia planta.

Perspectivas futuras

Según estimaciones de FAO la población mundial pasará de los 6.750 millones actuales a 9.200 millones en el año 2050. Además, la dieta está cambiando rápidamente en países como China para ingerir más alimentos de origen animal. Hay que tener en cuenta que para producir una caloría de pollo se necesitan 3 calorías de cereales, para una de cerdo 4-5 de cereales y para una de vacuno 7 de cereales. Esto implica que la demanda de alimentos agrícolas también va a aumentar para alimentar a la población existente. Debido a estos factores FAO estima que hay que duplicar la producción de alimentos para el año 2050.

Hay factores adicionales que causan preocupación. Actualmente las plagas, enfermedades y malas hierbas causan pérdidas del 40% de la producción. Además, debido a la intensificación de los intercambios agrícolas se prevé una mayor distribución de plagas y enfermedades transfronterizas, que de alguna forma tenderán a la globalización causando daños adicionales en áreas donde ahora no están presentes. El cambio climático producirá pérdidas de cosecha muy importantes debido a sequías, inundaciones y temperaturas extremas y también modificará el hábitat natural de muchas plagas.

Por otra parte se está produciendo un importante aumento de usos no alimentarios de los cultivos, como biocombustibles, biofactorías, obtención de sustitutos plásticos, etc, que pueden producir un importante incremento del precio de los alimentos, lo que puede tener efectos catastróficos para las poblaciones más desfavorecidas, como ya ha sucedido recientemente con la crisis de los precios de los alimentos, que aún no se ha solucionado totalmente.

Un problema fundamental es la situación de África. Aunque los problemas políticos tienen un papel importante en las situaciones de hambruna de importantes partes de la población, también es cierto que la revolución verde no estuvo en ningún momento dirigida a África, ya que las variedades de alto rendimiento de trigo, maíz y arroz no pueden cultivarse en las zonas áridas de la mayor parte del continente.

El incremento necesario de la producción de alimentos podría realizarse aumentando la superficie destinada a la agricultura. Actualmente se cultivan 1.400 millones de hectáreas en el mundo y la única superficie adicional disponible apta para la agricultura son los bosques tropicales, fundamentalmente en África y Sudamérica. Los incrementos de producción de alimentos deben basarse fundamentalmente en aumentos de rendimiento y la agricultura debe ser sostenible y conservar los recursos disponibles para generaciones futuras. Bajo ningún concepto se puede continuar aumentando la superficie de cultivo a costa de espacios naturales, ya que esto provocaría daños medioambientales incalculables. Los alimentos producidos deben ser cada vez más seguros y contribuir a la salud del consumidor.

La mejora genética de las especies cultivadas usando todas las tecnologías disponibles es la única solución al problema de producción de alimentos. Esto incluye la transformación genética, sin cuya contribución se producirían problemas medioambientales importantes. El objetivo general de la mejora genética debe ser el desarrollo de variedades de alto rendimiento, resistentes a plagas y enfermedades, que se adapten bien a cambios climáticos bruscos y que produzcan adecuadamente en suelos marginales y con escasez de agua.

Bibliografía

- Aleza P, Juárez J, Hernández M, Pina JA, Ollitrault P, Navarro L. 2009. Recovery and characterization of a *Citrus clementina* Hort. ex Tan. 'Clemenules' haploid plant selected to establish the reference whole Citrus genome sequence. *BMC Plant Biology* 2009, 9:110.
- Burger JC, Chapman MA, Burke JM 2008. Molecular insights into the the evolution of crop plants. *American Journal Botany* 95: 113-122.
- Cubero JI 2003. Introducción a la mejora genética vegetal. Ediciones Mundiprensa, Madrid, 567 pp.
- García Olmedo F, La tercera revolución verde. Plantas con luz propia. Editorial Debate, Madrid, 209 pp.
- Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, Sanchez GJ, Buckler E, Doebley J, 2002 A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *PNAS* 2002 99:6080-6084.
- Navarro L, Juárez J. 2007. Shoot-tip grafting in vitro: impact in the citrus industry and research applications, pp.353-364. In: I. Khan (ed.), *Citrus Genetics, Breeding, and Biotechnology*. CAB International Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK.
- Paterson AH, Lin Y-R, Li Z, Schertz KF, Doebley JF, Pinson SRM, Liu SC, Stansel JW, Irvine JI, 1995. Convergent Domestication of Cereal Crops by Independent Mutations at Corresponding Genetic Loci. *Science* 269:1714-1718.
- Piperno DR, Ranere AJ, Holst I, Iriarte J, Dickau R, 2009. Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium B.P. maize from the Central Balsas River Valley, Mexico, *PNAS* 2009 106:5019-5024.
- Ramón D, 2009. *Biología de alimentos*. Este volumen.
- Vavilov NI, 1926. *Studies on the origin of cultivated plants*. Institut Botanique Appliqué et d'Amelioration des Plantes. State Press, Leningrad, USSR.
- Widholm JM, Nagata T, Lörz H, (Eds). 1988-2009. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Springer, London. Serie exhaustiva de 64 monografías sobre aplicaciones de la biotecnología en plantas.

BIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Daniel Ramón^{1,2}

¹Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas

²Departamento de I+D, Biópolis S.L.

El empleo de la biotecnología en la historia de la alimentación humana

Decía Bill Gates, el dueño de Microsoft, que nada mejor para caldear el ambiente de una cena que sacar a relucir el tema de la biotecnología en la alimentación. No le faltaba razón, sobre todo si la cena se producía en un hogar o restaurante europeo, ya que tras la crisis de las vacas locas, una gran parte de la ciudadanía europea vive todo lo referente a su alimentación bajo la tiranía de lo que algunos llaman el factor hipocondríaco. En esencia, este consiste en que los europeos pensamos que comemos muy mal y que para comer mejor debemos añadir todo tipo de suplementos o ingredientes funcionales a nuestras dietas. Nada más lejos de la realidad, aunque lo cierto es que esta atmósfera de angustia crece año tras año bendiciendo productos con mucho marketing y poca ciencia y satanizando alimentos con mucha ciencia y poco marketing. Este último es el caso de los alimentos obtenidos mediante técnicas biotecnológicas, los denominados alimentos modificados genéticamente o alimentos transgénicos, un tipo de nuevo alimento cuya comercialización levanta muchas críticas en algunos países de la UE.

Podemos definir un alimento transgénico como aquel en cuyo diseño se utilizan las técnicas de la ingeniería genética. Desde el punto de vista conceptual no es nada nuevo, porque la especie humana ha aplicado de forma empírica la genética en la alimentación desde el comienzo de la agricultura y la ganadería. Para ello ha usado, sin saberlo, técnicas genéticas como la mutación al azar (variabilidad natural) y el cruce sexual (hibridación). Así hemos mejorado casi la totalidad de las variedades vegetales comestibles o razas animales que comemos. Podemos afirmar que, con la excepción de unos pocos animales que aún se cazan o pescan en libertad, el resto de plantas comestibles o animales de granja han sido objeto de estas mejoras genéticas. Baste recordar algunos ejemplos. Las coles y los brócolis no existían hace tan sólo 5000 años. Son mutantes homeóticos, es decir, mutantes en genes cuyos productos génicos controlan patrones de desarrollo. Con respecto a la hibridación, recordemos que las variedades de trigo con cuya harina se

producen el pan y las pastas alimenticias se obtuvieron por trabajos de mejora genética que incluyeron diversas mutaciones y cruzamientos sexuales. Son un verdadero “puzzle” genético en cuyos genomas, en lugar de haber dos copias de cada cromosoma, lo normal en las especies ancestrales que nuestros antepasados cultivaban, hay cuatro o seis. Un último ejemplo son las gallinas ponedoras de huevos. En la década de los cincuenta ponían 70 huevos por año. Mediante selección genética por cruce sexual se llegó a 110 huevos por año a principios de la década de los ochenta. En la actualidad la cifra de puesta supera los 300 huevos por año, y todo gracias a la genética.

Todos los casos mencionados en el párrafo anterior son ejemplos de mejora genética clásica. Al repasar la historia de la biotecnología agroalimentaria es evidente que tuvieron que transcurrir casi 12000 años para que del empirismo pasáramos al conocimiento. Hasta principios del siglo XX no se formuló la teoría de la herencia y se acuñó el término gen. Hace poco más de cincuenta años que sabemos que todos los genes están hechos de ADN y apenas treinta que comenzamos a utilizar una nueva técnica, la ingeniería genética, que nos permite trabajar con genes aislados en el laboratorio. Esos genes, una vez separados del conjunto del genoma en el que estaban, se pueden modificar en el tubo de ensayo y reintroducir en el organismo del que originalmente fueron extraídos o en uno distinto al que llamamos transgénico por portar un gen de otro organismo. Así se generan los alimentos transgénicos. Antes nos servíamos de la mutación y la hibridación en procesos de azar y combinación; ahora, a este bagaje podemos añadir la ingeniería genética y acciones dirigidas específicamente a la mejora de las propiedades físico-químicas, organolépticas o nutricionales de los alimentos.

De todo lo dicho anteriormente se deduce que la única diferencia entre un alimento transgénico y otro convencional es que en el diseño de los primeros se ha usado ingeniería genética y en los segundos procesos genéticos convencionales. Esta mera diferencia técnica tiene varias consecuencias importantes que merece la pena destacar. La primera hace referencia al aumento de la direccionalidad que la ingeniería genética supone. Ya no es preciso mutar ni hibridar genes al azar, sino que se selecciona uno determinado, se identifica molecularmente y se inserta en un genoma concreto. La segunda es consecuencia de la normativa jurídica, ya que al ser considerados nuevos alimentos, los alimentos transgénicos deben ser evaluados tanto sanitaria como ambientalmente, cosa que no sucede con los alimentos convencionales. En estas evaluaciones supone una valiosa ayuda el conocimiento molecular exhaustivo del evento genético realizado que viene suministrada por la direccionalidad de la ingeniería genética. En tercer lugar debemos mencionar que los resultados con ingeniería genética se obtienen mucho antes. La cuarta y última consecuencia hace referencia al salto de barrera de especie. Recordemos que la mutación o el cruce sexual presentan limitaciones técnicas, por ejemplo, es imposible cruzar sexualmente un salmón y una naranja o mutar una naranja hasta obtener un salmón, pero es técnicamente posible expresar el gen de un salmón en el genoma de una naranja o viceversa. Esta posibilidad implica repercusiones éticas para algunos grupos de consumidores. Por ejemplo, un hipotético vegetal transgénico que porte un gen de un animal podría ser un problema para un vegetariano de dieta estricta, como para cualquier musulmán lo sería un alimento transgénico que contuviera un gen proveniente del genoma del cerdo.

¿Cuál es la fuerza de la agroalimentación transgénica?

El primer alimento transgénico se comercializó en Estados Unidos en el año 1994. Era un tomate transgénico que tardaba más tiempo en pudrirse. A fecha de hoy en todo el mundo se comercializan centenares de alimentos transgénicos. Casi todos ellos son alimentos transgénicos vegetales, por lo que una buena forma de medir hasta que punto se impone esta tecnología es cuantificar la superficie destinada en

el planeta al cultivo de plantas transgénicas. Este ejercicio lo viene haciendo desde el año 1996 la organización internacional sin ánimo de lucro *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications* (abreviadamente ISAAA, <http://www.isaaa.org/>). Los últimos datos publicados por esta organización indican que en el año 2008 se cultivaron en todo el planeta más de 125 millones de hectáreas de cultivos transgénicos, esencialmente en Estados Unidos, Argentina y Canadá, pero también en África del Sur, Brasil, China o Paraguay, hasta sumar un total de 25 países. Por supuesto son muchos más los países en los que se comercializan y consumen. Los cultivos transgénicos que se han plantado en el año 2008 han sido soja (53% del total), maíz (30%), algodón (12%), colza (menos del 5%) y alfalfa, calabaza, clavel, papaya, pimiento, remolacha y tomate con superficies mínimas.

En el año 2008 usaron cultivos transgénicos 13.300.000 agricultores, aunque hay que destacar que el 90% de ellos vivían en países en vías de desarrollo. De hecho, el incremento interanual de superficie cultivada con transgénicos en este año fue de un 6% en países ricos y de un 22% en países pobres. Todo el continente americano apuesta por la transgenia. Estados Unidos cultivó en el 2008 la mayor extensión de transgénicos del planeta con 62,5 millones de hectáreas. Argentina (21 millones), Brasil (15,8 millones), Canadá (7,6 millones), Paraguay (2,7 millones), Uruguay (0,7 millones) Bolivia (0,6 millones) y Colombia, Chile, Honduras y México (cada uno de ellos con una cifra inferior a 0,1 millones de hectáreas) completan el panorama americano. El continente asiático es otra zona de crecimiento transgénico. India plantó el año pasado 7,6 millones de hectáreas, China 3,8 millones y Filipinas 0,4 millones. En África ha comenzado la plantación de transgénicos más recientemente. Sudáfrica lleva varios años cultivando transgénicos, de forma que en el año 2008 ha sembrado 1,8 millones de hectáreas de este cultivo. Ese mismo año Egipto y Burkina Faso han comenzado a cultivar transgénicos. Se espera aumentar la lista de países africanos cultivando transgénicos en los próximos años ya que en los últimos meses hasta nueve países africanos distintos han aprobado legislaciones para el cultivo de este tipo de productos. En el año 2008, Australia también ha comenzado el cultivo de transgénicos con 0,2 millones de hectáreas. Finalmente hay que destacar que en Europa siete países cultivaron en este año transgénicos. Fueron España (0,1 millones de hectáreas) y Alemania, Eslovaquia, Polonia, Portugal, República Checa y Rumania (cada uno de ellos con menos de 0,1 millones de hectáreas).

La primera generación de transgénicos: plantas resistentes a herbicidas y plagas

Los primeros alimentos transgénicos que han irrumpido en el mercado son vegetales transgénicos comestibles que resisten el tratamiento con herbicidas o el ataque de distintas plagas. Se les conoce con el nombre de primera generación de transgénicos y son la mayoría de los que ahora se comercializan. La razón es doble: por un lado suelen ser características monogénicas (dependen de un único gen) y, por lo tanto, su generación es relativamente sencilla; por otro, se trata de desarrollos con indudable interés comercial para los agricultores, lo que asegura su venta. Se han generado plantas transgénicas comestibles con resistencia a viroides, virus, bacterias, hongos o insectos.

Para percibir la importancia socio-económica de estos desarrollos hay que recordar que el control de las plagas de insectos mediante el uso de productos químicos cuesta más de 9000 millones de euros al año en todo el mundo. A pesar de ello se sigue perdiendo entre el 20 y el 30% de las cosechas mundiales por culpa de los insectos. Por ello se han desarrollado diversas estrategias encaminadas a construir plantas transgénicas resistentes al ataque de estos animales. La más conocida de todas es la expresión de la proteína insecticida Bt de la bacteria *Bacillus thuringiensis* en distintas plantas, entre ellas el algodón o el maíz, produciendo resistencia

al ataque por este gusano. Son los llamados cultivos transgénicos Bt. Su productividad en campo es superior a la de los cultivos convencionales si hay incidencia de la plaga. En el caso del maíz Bt dichos incrementos varían entre el 6 y el 16% y en el caso del algodón pueden ser superiores al 60%. Además, mediante el uso de estos cultivos se reduce drásticamente el uso de insecticidas. Por ejemplo, en India mediante el empleo del algodón Bt se ha reducido el consumo de insecticidas un 70%.

Por otro lado, las malas hierbas afectan la productividad de las cosechas al competir con las plantas cultivadas por la luz solar y los nutrientes. Pueden llegar a reducir hasta un 85% la productividad en campo. Para paliar este problema se utilizan herbicidas. Se trata de unas moléculas pertenecientes a distintas familias químicas capaces de eliminar las malas hierbas. Si bien su uso ha sido imprescindible para aumentar productividades, también es cierto que muchos de ellos han sido tremendamente agresivos con el medio ambiente. Los herbicidas suelen inhibir rutas metabólicas concretas. El problema es que lo hacen tanto a las malas hierbas como a los cultivos, lo que obliga a tratar los campos cuando los cultivos aun no están presentes. Desde el año 1986 que se detectó el primer caso de resistencia a herbicidas han aparecido multitud de malas hierbas resistentes. Se conocen la existencia de varios mecanismos de resistencia (entrada dentro de la célula vegetal, detoxificación, pérdida de la afinidad por el sitio de acción) que han permitido diseñar estrategias biotecnológicas para construir plantas capaces de resistir su acción.

Donde más se ha investigado es en el caso del glifosato. Se trata de un herbicida cuya base química es la N-fosfometilglicina que inhibe la acción de un enzima clave en la síntesis de aminoácidos aromáticos. Hay dos estrategias para construir plantas transgénicas resistentes a este herbicida. La primera consiste en aumentar la dosis génica del gen diana desequilibrando la relación cantidad de herbicida/cantidad de dianas. La segunda es buscar alelos mutantes del gen que codifica la diana en los que el sitio activo ha variado y no se produce la inhibición. Ejemplos de ello son los alelos mutantes del gen *aroA* de *Salmonella typhimurium* y el alelo resistente de *Petunia hybrida*. Con este último se ha construido la soja resistente a herbicida cuya comercialización está autorizada en la Unión Europea (UE). El empleo de este cultivo transgénico va unido a la técnica agrícola conocida como siembra directa que consiste en espolvorear la semilla sin roturar el campo y tratarlo inmediatamente con el herbicida. Los resultados de aplicar este paquete tecnológico son espectaculares. Por ejemplo, en Argentina se han alcanzado rendimientos de más de 6 toneladas de haba/Ha con una reducción importante del consumo energético y la erosión, unida a un aumento de la biodiversidad. En la campaña 1994-95, la última sin soja transgénica, los agricultores argentinos gastaban 78 dólares/Ha en herbicidas. Hoy gastan 37 dólares/Ha y se ha producido una bajada global del 90% en el consumo de estos plaguicidas.

Merece la pena resaltar que ninguno de estos dos cultivos se utiliza directamente en alimentación humana. Se usan sobre todo como base para la preparación de piensos animales y también como materia prima en la obtención de almidones o jarabes de glucosa de maíz y de lecitinas o fitoesteroles de soja. Estos productos se utilizan como ingredientes en la formulación de miles de alimentos.

La segunda generación de transgénicos

Tras la aparición de todas estas variedades resistentes a herbicidas y plagas han surgido otros desarrollos transgénicos que afectan a propiedades físico-químicas, organolépticas o nutricionales. Se han llevado a cabo en vegetales comestibles y también en animales de granja y en microorganismos responsables de la producción de alimentos y bebidas fermentadas. Entrañan mayor complejidad tecnológica y constituyen la llamada segunda generación de alimentos transgénicos.

Por ejemplo, el proceso de podredumbre de muchos vegetales comestibles se produce porque el fruto sintetiza poligalacturonasa. Esta enzima degrada la pared celular vegetal y es la señal que dispara la putrefacción del fruto. Se han conseguido tomates transgénicos que tienen disminuida la expresión del gen que codifica dicha enzima, consiguiendo una reducción de hasta un 80% de la actividad y un retraso considerable en la podredumbre del fruto. Un segundo caso mucho más interesante es el de la maduración de frutos climatéricos. En ellos el proceso de maduración comienza con la emisión por parte del fruto de la hormona vegetal etileno que dispara una serie de rutas metabólicas que conducen a la síntesis de pigmentos y compuestos volátiles que dan el aspecto, consistencia y flavor del fruto maduro. Se han ideado varias estrategias biotecnológicas para inhibir esta ruta en tomate y otros frutos climatéricos como el melón. Con todos estos productos transgénicos se puede pensar en una maduración controlada.

También se han construido levaduras vínicas transgénicas que aumentan o disminuyen la acidez de los vinos al realizar la fermentación láctica o la alcohólica, respectivamente. Además se han diseñado levaduras vínicas transgénicas que expresan genes que codifican celulasas y hemicelulasas o un gen fúngico que codifica una pectato liasa. Con las primeras se logran vinos con un mayor aroma afrutado y con las segundas mejoras en procesos de filtración.

Pero sin duda, donde más atractivo resultará el empleo de la ingeniería genética será en su uso para paliar problemas de déficit nutricional presentes en muchos alimentos. Por ejemplo, el arroz es deficitario en lisina, pero se ha logrado construir una variedad transgénica que contiene el gen que codifica una proteína de reserva de la semilla de la judía rica en este aminoácido. Con ello en la planta transgénica el contenido global de lisina pasa del 3,4% al 6%. Este cereal también es deficitario en el precursor de la vitamina A, el β -caroteno, porque en la semilla del arroz faltan tres enzimas de la ruta de síntesis de esta vitamina. Por ingeniería genética se han introducido en una variedad transgénica de arroz denominado "arroz dorado" los genes que codifican todos estos enzimas, completando así dicha ruta metabólica. Esta variedad transgénica se ha incorporado a los programas de mejora genética tradicional del *Internacional Rice Research Institute* de Filipinas para transferir esta característica a las variedades autóctonas de uso en China, India, Africa y América Latina. Su uso masivo, previsto para el año 2014, permitirá eliminar el problema crónico de avitaminosis en países pobres donde la base de la dieta es el arroz. Según datos de OMS, este problema nutricional produce la muerte de 2 millones de niños cada año y condena a la ceguera a 250000 niños en el mismo período de tiempo. Para finalizar con el arroz, el problema clásico de la deficiencia en hierro de este cereal se ha intentado solventar mediante la obtención de variedades transgénicas que expresan los genes que codifican proteínas que acomplejan y almacenan hierro como la ferritina de judía. Ensayos con ratas anémicas han demostrado que es posible la recuperación de la anemia por falta de hierro tras 28 días de dieta con este arroz transgénico.

También se dispone de algunos alimentos transgénicos que, al expresar genes que codifican determinados antígenos, inmunizan contra enfermedades. Se les denomina vacunas orales y ya hay ejemplos de ellas que inmunizan contra el virus Norwalk, el coronavirus transmisible responsable de la gastroenteritis o el cólera. En la misma línea se han generado bacterias lácticas que expresan algunos epítotos alérgicos y producen derivados lácteos que vacunan al comerlos.

En el caso de los animales de granja se ha prestado especial atención a la expresión específica de proteínas de alto valor añadido en la leche de hembras transgénicas de mamífero. La glándula mamaria es el mejor fermentador que existe en la naturaleza. Una vaca en producción puede dar lugar a 10000 litros de leche con una concentración de proteína de 35 g/l. Estos datos llevaron hace tiempo a formular la posibilidad de producir proteínas de alto valor añadido en la leche de animales de granja. Utilizando los

promotores de los genes que codifican la caseína, la lactoglobulina o la proteína ácida de la leche se han logrado expresar cantidades importantes de distintas proteínas de alto valor añadido en la leche de varios animales transgénicos de granja. Destacan los casos de la antitripsina 1 humana (tratamiento de la fibrosis quística), la interleuquina-2 humana (generación de respuesta inmune) y la calcitonina (osteoporosis).

Estos resultados son un paradigma que permite pensar en cambios en la composición nutricional de la leche. De hecho, el gen de la β -lactoglobulina de oveja se ha expresado en ratón dando lugar a una leche con 23 mg/ml de esta proteína, similar en su composición a la de oveja. También se ha conseguido la expresión del gen de la lactoalbumina humana en vaca, dando lugar a una leche con 2.4 g/l de esta proteína. Pensando en fenilcetonúricos, hay en marcha proyectos encaminados a producir vacas que expresen el gen de la lactoalbumina humana en una versión mutada donde se han sustituido los codones que codifican a fenilalanina para que den lugar a otros aminoácidos. Recientemente se ha conseguido la expresión de una β -galactosidasa en ubre de ratones. Con esta construcción se consiguen leches que pueden tener de un 50-85% menos de lactosa sin cambios de grasa y proteína.

Algunos de los alimentos transgénicos de la segunda generación comienzan a obtener ahora el permiso de comercialización. Los próximos años traerán a los supermercados muchos de los logros mencionados en el apartado anterior. ¿Qué nos deparará el futuro? Muy probablemente, la oferta de lo que podríamos llamar "alimentos transgénicos funcionales". Por ejemplo, recientemente han aparecido dos artículos científicos que describen la creación de un arroz transgénico con más contenido de nicotinamina y de otro con mayor concentración de ácido γ -aminobutírico, de forma que ambos incrementan el efecto antihipertensivo. La creación de esta nueva generación de alimentos hoy puede parecer ciencia-ficción pero quizás los próximos años nos deparen la llegada de alimentos transgénicos que acaben con la enfermedad celíaca o prevengan determinadas alergias alimentarias o infecciones intestinales agudas. En muchos laboratorios se está comenzando a trabajar en estos problemas. Unas semanas antes de redactar este capítulo apareció un artículo que describía el trabajo de unos investigadores japoneses demostrando la seguridad alimentaria en macacos de la ingesta de un arroz transgénico que contiene un gen humano relacionado con la prevención de la alergia al polen de cedro, un problema sanitario que afecta al 20% de la población japonesa. Así será muy probablemente la tercera generación de alimentos transgénicos.

Transgénicos y salud del consumidor

Existe un debate en torno a la comercialización de los alimentos transgénicos. Es un debate ideológico, excesivamente politizado y carente de datos técnicos. Para entenderlo hay que partir de tres premisas. La primera es aceptar que en alimentación no hay riesgo cero. La segunda entender que hay muchos alimentos transgénicos y es imposible generalizar su seguridad o su riesgo. La tercera es que el posible riesgo puede ser sanitario, ambiental o económico y que cada uno de ellos debe ser analizado por expertos en la materia correspondiente.

Los alimentos obtenidos por técnicas clásicas de biotecnología no precisan de una evaluación sanitaria. Por el contrario, los alimentos transgénicos la requieren obligatoriamente antes de su comercialización. Organismos internacionales como FAO u OMS han establecido durante los últimos años sus propios grupos de trabajo sobre la seguridad para el consumidor de los nuevos alimentos transgénicos, concediéndole prioridad a la elaboración de principios científicos para su evaluación. Para ello se basan en llevar a cabo una evaluación de riesgos sanitarios atendiendo a tres criterios: el contenido nutricional, la posible presencia de alérgenos y el nivel de toxicidad (Tabla 1).

En cuanto a la composición nutricional, la conclusión de estos grupos es el desarrollo del concepto denominado "equivalencia sustancial". Es utilizado por la normativa europea sobre la comercialización de alimentos transgénicos que otorga dicha categoría a aquellos alimentos transgénicos cuya composición nutricional y características organolépticas son iguales a aquel del que proviene, con la única excepción del nuevo carácter introducido por ingeniería genética.

Al evaluar la alergenicidad se sigue el enfoque acordado por FAO y OMS y el grupo *Codex ad hoc Intergovernmental Task Force on Foods Derived from Biotechnology*. Ello implica para cada alimento transgénico el análisis de homología y similitud estructural entre la proteína transgénica y alérgenos conocidos y también la posible identificación de epítomos que por su secuencia en aminoácidos puedan interactuar con la inmunoglobulina E, epítomos de células T o motivos estructurales significativos. También para algunos casos incluye el estudio de la digestibilidad de la proteína transgénica en sistemas simulados de fluidos gástricos e intestinales y estudios de exposición ocupacional. Todos estos trabajos cobran especial relevancia si el organismo donador del gen tiene un pasado de alergenicidad.

Tabla 1. Cuestiones de seguridad alimentaria a analizar antes de otorgar el permiso de comercialización a un alimento transgénico

Disponibilidad de las suficientes especificaciones sobre el origen y composición del alimento transgénico que aseguren su identificación

Análisis de los efectos que puedan producir los procesos a los que pueda ser sometido el alimento transgénico

Información sobre los usos y características de los transgénicos utilizados

Análisis de la ingesta esperada del alimento transgénico

Análisis de los efectos de la modificación genética sobre las propiedades del organismo receptor o huésped (efectos intencionados y no intencionados)

Estudio de la estabilidad genética de la modificación introducida

Especificaciones de la expresión del material genético modificado

Estudio de las posibilidades de transferencia del nuevo material genético; en su caso, análisis de las modificaciones de la supervivencia del transgénico durante su paso por el intestino y posibilidades de colonizar el intestino humano

Evaluación del impacto de la introducción del transgénico sobre las pautas y hábitos de consumo

Análisis nutricional: composición e impacto previsible en la dieta de la población

Información microbiológica

Toxicología, establecida caso a caso según las características identificadas

Estudio del potencial alérgico y efectos en poblaciones sensibles

Cualquier información sobre los efectos de la exposición total o parcial de poblaciones humanas al alimento transgénico

En cuanto a los estudios toxicológicos, si hay equivalencia sustancial se focalizan en la proteína transgénica. Se requiere información sobre su carcinogenicidad, genotoxicidad, metabolismo, toxicidad crónica y subcrónica y toxicocinética. Si no hay equivalencia sustancial o existen indicaciones de ocurrencia potencial de efectos no intencionados se debe estudiar todo el alimento. En estos casos se aconseja un estudio de toxicidad de 90 días en roedores con las dosis máximas que no produzcan desequilibrios nutricionales.

En todos los alimentos transgénicos comercializados hasta la fecha se han llevado a cabo todos estos controles. La conclusión de todos estos estudios, como manifiesta la OMS (<http://www.who.int/fsf/GMfood/>), es que no existe un solo dato científico que indique que dichos alimentos, por el hecho de ser transgénicos representen un riesgo para la salud del consumidor superior al que implica la ingestión del alimento convencional correspondiente. Por todo ello, podemos concluir que los alimentos transgénicos son los más evaluados en toda la historia de la alimentación. Aunque con los comercializados hasta la fecha no hay datos científicos que detecten riesgos inaceptables para la salud del consumidor, algunos grupos que se oponen a lo transgénico hablan de riesgos sanitarios. Se hace referencia a aumentos de casos de alergia, peligro de aparición de resistencias a antibióticos, generación de cánceres o retardos en el desarrollo inmunitario.

Con respecto al primer problema, la generación de alergias, hay que destacar que sólo en un caso de todos los evaluados hasta la fecha se ha detectado un problema de alergenicidad. Este problema se detectó en una colza transgénica durante la evaluación del producto previa a la concesión del permiso de comercialización y, aunque este último se ofertó a la compañía productora siempre y cuando se etiquetara el alimento transgénico, dicha compañía decidió no comercializarlo. En cuanto al uso de genes que codifican resistencia a antibióticos como marcadores de selección en plantas, animales o microorganismos transgénicos, hace unos años se abrió la polémica sobre la posible transferencia de dichos genes desde el alimento transgénico a bacterias de la microbiota intestinal y la posible aparición de nuevas cepas bacterianas resistentes a antibióticos. No hay pruebas ni datos experimentales que apoyen esta hipótesis, lo que llevó en su día a la OMS a afirmar que la presencia de genes de resistencia a antibióticos *per se* en un alimento no constituye un riesgo para la salud del consumidor. Finalmente, hay que destacar que no existen experimentos que indiquen que exista un peligro sanitario relacionado con procesos tumorales o problemas en el desarrollo inmunitario. Todo lo que los grupos opositores a los transgénicos indican en este sentido son meras suposiciones sin soporte experimental.

Transgénicos y medio ambiente

La evaluación ambiental de los alimentos transgénicos, y en particular de las plantas comestibles transgénicas, no es sencilla. El problema fundamental radica en la falta de conocimiento y metodologías para analizar riesgos medioambientales, tanto de las plantas transgénicas como de las convencionales. Algo que la gente no suele conocer es que es preciso evaluar centenares de plantas transgénicas en el invernadero antes de tomar algunas de ellas con las que comenzar los trabajos de campo. También desconoce que estas liberaciones controladas al campo son obligatorias, incluso antes de solicitar el permiso de comercialización. A este proceso se le denomina liberación controlada al ambiente. Desde el año 1986 se han llevado a cabo decenas de miles de liberaciones controladas al ambiente de plantas transgénicas. Se han producido en más de cincuenta países, sobre más de cien variedades vegetales en las que se habían introducido más de diez modificaciones genéticas distintas. Los cultivos transgénicos más usuales han sido por este orden maíz, tomate, soja, colza, patata y algodón, y las modificaciones más evaluadas tolerancia a herbicidas, resistencia a insectos, calidad de producto y resistencia a virus.

Asumiendo la falta anteriormente reseñada de herramientas para medir el impacto ambiental, los expertos detectan tres riesgos ambientales por el uso de las plantas transgénicas. Un primer tipo de riesgo es la posible transferencia de los genes exógenos desde la variedad transgénica a variedades silvestres. Esta transferencia se dará, como ocurre con las plantas convencionales, siempre que exista compatibilidad sexual y presión selectiva. Por ejemplo, en Europa la transferencia de genes de maíz transgénico es improbable ya que no hay variedades silvestres compatibles, pero la de soja es probable porque sí las hay. Ahora bien, conviene recordar que lo mismo ocurrirá con cualquier variedad vegetal resistente a una plaga que haya sido generada por cruce sexual o mutagénesis. Otro posible riesgo medioambiental es la pérdida de biodiversidad agrícola asociada al cultivo de plantas transgénicas, lo que no es nuevo puesto que los agricultores utilizan preferentemente aquellos cultivos que mejor funcionan. Por ello es necesario mantener con fondos públicos bancos de germoplasma y colecciones de cultivo. Un último riesgo medioambiental es el referente a los efectos dañinos que ciertas plantas transgénicas resistentes a insectos pueden tener sobre poblaciones de otros insectos distintos de aquellos contra los que protegen, lo mismo que ocurre con los insecticidas orgánicos o químicos. Es una posibilidad que en el caso de los transgénicos, a diferencia de las variedades convencionales, antes de conceder el permiso de comercialización se obliga a analizar.

En resumen, no se percibe la aparición de nuevos posible riesgos ambientales por el uso de las variedades transgénicas. Son los mismos de la agricultura convencional, aunque en este caso se intentan determinar *a priori* mediante la realización de liberaciones controladas al medio. Por ello la cuestión clave es conocer si el empleo de transgénicos acelerará la aparición de estos riesgos. Parece claro que no, siempre que se mantengan y mejoren las normas de evaluación que empleamos actualmente con las plantas transgénicas.

Los transgénicos y el riesgo económico

¿A quién benefician y a quién perjudican los transgénicos? La respuesta a esta pregunta difiere en función de la parte del planeta donde la planteemos. Es evidente que en estos momentos la UE es el área menos proclive a los alimentos transgénicos. Pero también es cierto que fuera de nuestro entorno la comercialización de estos productos gana cada día más mercados.

Analicemos en primer lugar los países en vías de desarrollo. A menudo se ha aducido por parte de los defensores de estos productos que con los transgénicos se acabará con el problema del hambre en el mundo. Nada más lejos de la realidad. Este problema podría ser resuelto hoy en día mediante la distribución adecuada de los alimentos que se producen en cantidad suficiente para que nadie pase hambre. Por desgracia, el reparto de excedentes alimentarios es un problema político y no técnico, y sólo se solventará con medidas políticas y sociales adecuadas. Sin ellas los transgénicos no pueden detener el hambre. Pero si dichas medidas se produjeran, los cultivos transgénicos serían el complemento adecuado para combatir el hambre en sociedades mal alimentadas. Aun así los alimentos transgénicos pueden jugar un gran papel en países en desarrollo para mejorar problemas de productividad o déficit nutricional. Por eso cada día un mayor número de estos países apuestan por ellos.

El primero de ellos es la República Popular China. En la década de los ochenta enviaron muchos científicos a distintos países a formarse en biología molecular vegetal. A su vuelta les dieron fondos e instalaciones y en muy pocos años han creado grupos potentes en la producción de cultivos transgénicos que trabajaban fundamentalmente en el arroz. En la actualidad el gobierno chino financia a través del Programa Nacional de Biotecnología proyectos con más de 130 variedades transgénicas y 100 genes

concretos. China dispone de tecnología propia patentada para la generación de variedades transgénicas de arroz. Además el gobierno chino ha hecho una apuesta muy firme por la tecnología Bt, sobre todo en el caso del algodón. A todo ello hay que sumar el esfuerzo en genómica. Es evidente que los científicos chinos disponen desde hace algunos años de información genómica privilegiada sobre el arroz y el pollo. En esencia, China se ha convertido en un auténtico gigante de la transgenia. Por ello la respuesta de otros países vecinos en el sudeste asiático no se ha hecho esperar. Por ejemplo, India ya cultiva 7,6 millones de hectáreas de algodón transgénico. En la actualidad el gobierno hindú financia 48 proyectos de plantas transgénicas financiadas con fondos públicos que afectan a 15 cultivos distintos. Se han generado plantas transgénicas de relevancia como variedades de arroz transgénicas resistentes a sequía y salinidad, arroz con provitamina A libre de marcadores de resistencia, patatas y arroz con mayor contenido proteico o patatas transgénicas Bt.

En Latinoamérica la situación es similar. En Argentina, en la última campaña con soja convencional cultivar una hectárea de soja costaba 182 dólares. Actualmente cuesta 117 dólares, a pesar de tener que pagar más por la semilla transgénica y por la adquisición del herbicida. Estas cifras explican que el 98% de la soja cultivada hoy en Argentina sea transgénica. En el primer semestre del 2002, en plena debacle económica por el corralito, el 60% de los ingresos que entraron en Argentina llegaron por exportación de soja transgénica. Por eso los consumidores argentinos aprecian la biotecnología. Hay programas públicos de investigación e incluso una compañía de capital argentino con científicos argentinos que ha generado una vaca transgénica llamada Pampa II que en su leche produce hormona del crecimiento humano. Esta única vaca es capaz de suministrar la cantidad necesaria de este fármaco para atender a todos los enfermos latinoamericanos de enanismo hipofisario.

En Brasil, otro país del Mercosur, no estaba autorizada la plantación de soja transgénica, pero existía tráfico ilegal de soja transgénica desde agricultores argentinos a brasileños. En su campaña electoral el Presidente Lula defendió el rechazo a los transgénicos. Tras llegar al poder comprobó que el 40% de la soja plantada en Brasil era ilegalmente transgénica. No tuvo más remedio que conceder en el año 2003 una medida precautoria para comercializar de forma transitoria la soja transgénica ilegalmente producida. En el 2005 se ha aprobado la comercialización de soja transgénica y su producción se ha disparado hasta alcanzar los 15 millones de hectáreas en el año 2008. También en Paraguay y Uruguay, tras años de oposición, se ha autorizado el cultivo de soja transgénica.

Pero sin duda en estos momentos el continente africano es la gran parcela de batalla por la transgenia. Hay gobiernos que han hecho manifestaciones públicas a favor de la transgenia. Este es el caso de Kenia y Uganda. Otros como Zambia han llegado a rechazar ayuda humanitaria en forma de maíz transgénico aduciendo informes de organizaciones ecologistas sobre el potencial cancerígeno de dicho producto. Es necesario recordar que estas afirmaciones carecían de algún dato científico que las avalaran y que la propia Vicepresidenta de OMS viajó a Zambia para despejar dichos temores. África se percibe en estos momentos como el continente que declinará la balanza. Tras la apuesta americana (Argentina y EE.UU.) y la asiática (China e India), si África acepta los transgénicos la UE quedaría sola. Quizás este hecho explique que recientemente las multinacionales Dow AgroScience, DuPont, Monsanto y Syngenta han confirmado que cederán gratuitamente a la *African Agricultural Technology Foundation* la licencia de sus patentes para proyectos de uso en países africanos y que, por el contrario, el gobierno alemán haya prometido ayuda monetaria a algunos países africanos si desarrollan normativas jurídicas restrictivas en torno a la comercialización de estos alimentos.

Frente a todo esto, ¿qué ocurre en la UE? Desde mediados de la década de los noventa los dirigentes europeos decidieron poner los cultivos y alimentos transgénicos en cuarentena. La presión de los grupos ecologistas y los partidos verdes en contra de lo transgénico llegó a crear una atmósfera asfixiante contraria a estos desarrollos. Frente al riesgo de “hacer” y admitir estos nuevos desarrollos nuestros políticos decidieron optar por la opción del “no hacer”. Esta opción también tiene riesgos. La primera planta transgénica se construyó en el año 1984 en la UE. Los científicos europeos fueron pioneros en biotecnología agroalimentaria. A lo largo de estos veinte años las cosas han cambiado radicalmente. El resultado desde la investigación ha sido desastroso. El VI Programa Marco de la UE tuvo un recorte importante de fondos para investigación en estas temáticas y una cantidad importante de científicos europeos decidieron dejar sus laboratorios y emigrar a países como Australia o EE.UU. donde su experiencia es reconocida y financiada. Esta pérdida de cerebros en biotecnología agroalimentaria ha ido unida a la decisión de varias compañías multinacionales del sector que mantenían instalaciones de investigación en la UE de desmantelarlas. De forma paralela una cantidad importante de pequeñas y medianas empresas europeas en biotecnología han tenido que cerrar sus puertas. A nadie se le escapa la pérdida de competitividad que implica esta situación. Como consecuencia, recientemente la posición de la UE ha variado y se denota que la inmensa mayoría de ministros europeos de agricultura o economía defienden los cultivos transgénicos. En cualquier caso para todos ellos es claro que son una alternativa de futuro y que la UE está a punto de perder el tren de la oportunidad tecnológica que estos desarrollos suponen.

Podríamos concluir este apartado considerando que desde el año 1996 a 2007 se calcula que el cultivo de transgénicos ha suministrado a los agricultores que los usan unas ganancias económicas de aproximadamente 4,2X10⁸ millones de dólares. De esa cifra el 44% se debió a aumentos de productividad y el 56% a reducción de los costes de producción. Conseguir esos mismos aumentos de productividad con cultivos no transgénicos hubiese requerido un aumento de 43 millones de hectáreas adicionales en el planeta con el consiguiente impacto ambiental. El resumen de todo lo expuesto es claro: la agricultura transgénica es un buen ejemplo de agricultura sostenible al que difícilmente puede renunciar la humanidad.

Percepción pública de los transgénicos

La aplicación de la biotecnología de los alimentos es cuestionada por una serie de organizaciones, sobre todo grupos ecologistas y, en menor medida, sindicatos y grupos religiosos. Las críticas son amplias y en general contraponen lo natural y lo ecológico a lo transgénico. Es indudable el respeto que dichas críticas merecen pero es necesario analizarlas desde la realidad de la ciencia. En este complicado panorama hay que añadir un hecho obvio. El consumidor recibe información sobre estas temáticas a través de los medios de comunicación y las organizaciones que se oponen. La opinión de los medios de comunicación está en más ocasiones de las deseadas forzada por el sensacionalismo, lo que aun complica más la situación a la vez que introduce mayor perplejidad en el consumidor.

¿Qué opina el consumidor en medio de todo este embrollo? Se estima que en el intervalo comprendido entre los años 1984 y 2008 se han entrevistado a más de 100.000 personas, sobre todo en Europa, Estados Unidos y Japón para conocer su opinión sobre la biotecnología. Apenas se dispone de datos en países subdesarrollados. La heterogeneidad de las poblaciones encuestadas, del tipo de encuesta (telefónica, escrita, entrevista personal), o de las preguntas, dificulta el obtener tendencias entre consumidores de distintos países. No obstante es posible extraer ciertas características propias de poblaciones. Así, en Estados Unidos el conocimiento sobre biotecnología es bajo y su aceptación alta. En Europa la situación es contradictoria: en los países del norte de Europa el público tiende a estar informado acerca de esta

tecnología y presenta objeciones éticas y morales; por el contrario, en los países del sur el conocimiento es menor y la aceptación mayor. En cualquier caso, las opiniones varían en función del tiempo.

De las encuestas realizadas en la UE es posible extraer algunas generalidades. Hay un desconocimiento profundo sobre qué es biotecnología, ingeniería genética y alimentos transgénicos y aun así se observa un rechazo frontal a todo aquello que implique la modificación genética de animales. También se detecta que las variedades vegetales transgénicas o la producción de levaduras o bacterias lácticas transgénicas que produzcan alimentos o bebidas fermentadas transgénicas son mejor aceptadas por el consumidor, sobre todo si la modificación genética afecta positivamente al producto final. Por último todas las encuestas revelan que los consumidores europeos están unánimemente a favor del etiquetado de los alimentos transgénicos.

A la vista de todos estos resultados, uno de los puntos más importantes de la discusión es como enfocar el debate sobre los alimentos transgénicos. Hasta ahora éste siempre se ha situado en la comparación entre la biotecnología de los alimentos y el resto de las biotecnologías, sobre todo la biotecnología farmacéutica. En esa situación la balanza siempre estará decantada en contra de los alimentos transgénicos porque la percepción de beneficios es mínima al existir alternativas.

La situación sería distinta si el debate se enmarcara en que tipo de alimentación queremos para el futuro. Lo que el consumidor europeo demanda es, como dijimos al principio de este tema, mayor salud por la alimentación. En este marco los alimentos transgénicos están bien posicionados por dos razones fundamentales. La primera porque obtener alimentos eficaces contra determinadas patologías como la enfermedad celíaca, la inflamación intestinal o determinadas alergias sólo será abordable por ingeniería genética. La segunda porque en la demanda de alimentos más seguros, es decir, mejor evaluados, los alimentos transgénicos llevan mucha ventaja al resto de alimentos. En estas claves se deberá escribir el futuro de estos alimentos.

Genómica y alimentación

En el año 2003 se hizo pública la secuencia del genoma humano. Estamos compuestos por aproximadamente 23000 genes, de forma que las interacciones de los mismos con el ambiente que nos rodea da lugar a todas nuestras características. Desde entonces, a pesar del poco tiempo transcurrido, se ha generado una gran información sobre mutaciones en genes que explican que, entre otras cuestiones, determinados individuos sean altos, perciban mejor un determinado perfume o tengan una predisposición genética a desarrollar un cáncer, ser obesos o sufrir un infarto.

Podemos entenderlo mejor con un ejemplo. En uno de nuestros cromosomas hay un gen que codifica una enzima crucial para mantener los niveles en sangre de un compuesto denominado homocisteína. Estos niveles deben ser los adecuados porque si aumentan el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular es muy elevado. Pues bien, hay personas que presentan una mutación en dicho gen que da lugar a una enzima poco activa. Se denomina genotipo TT y quienes lo portan tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares. El conocer el genoma de un individuo permite pensar en como una dieta adecuada, lo que se conoce como intervención nutricional, puede ayudar a paliar en parte estos problemas genéticos. En este sentido y siguiendo con el ejemplo del genotipo TT, sabemos que una dieta rica en ácido fólico puede contrarrestar el problema del exceso de homocisteína en sangre, por lo tanto, bastará pautar este tipo de dietas en las personas con dicho genotipo para que su riesgo cardiovascular se normalice.

Evidentemente, este tipo de actuaciones preventivas pasa por conocer el genoma de las personas. Hay en marcha proyectos que persiguen secuenciar el genoma de cualquier ser humano por menos de 1000 dólares en unos pocos días. A esos precios y tiempos la aplicación de esta tecnología de secuenciación será obligatoria para las compañías de seguros o los centros de medicina preventiva.

Es claro el enorme potencial que el conocimiento del genoma humano puede tener en las pautas de alimentación, pero no será menor el que tenga la secuenciación de los genomas de otros organismos vivos, por ejemplo los que tienen interés agroalimentario. Hasta ahora se han secuenciado totalmente más de mil genomas distintos y hay más de tres mil setecientos proyectos de secuenciación en marcha. Algunos de ellos se refieren a animales, plantas o microorganismos de relevancia alimentaria, entre ellos el arroz, la levadura panadera, la bacteria *Bifidobacterium bifidum* (usada en muchos productos probióticos) o patógenos responsables de toxiinfecciones alimentarias como *Escherichia coli*. El conocimiento de los genes que componen el genoma de estos organismos permitirá en el futuro conocer sus genes clave para así definir estrategias de mejora por genética clásica (la llamada mejora asistida por marcadores) o por ingeniería genética, desarrollar mecanismos de defensa frente a su patogenicidad, o descubrir nuevas funciones fisiológicas con impacto nutricional.

Bibliografía

- Akama, K; Kanetou, J; Shimosaki, S; Kawakami, K; Tsuchikura, S; Takaiwa, F. (2009). Seed-specific expression of truncated *OsGAD2* produces GABA-enriched rice grains that influence a decrease in blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Transgenic Research*, en prensa.
- Batista, R; Oliveira, M.M. (2009). Facts and fiction of genetically engineered foods. *Trends in Biotechnology* 27: 277-286.
- Domon, E; Takagi, H; Hirose, S; Sugita, K; Kasahara, S; Ebinuma, H; Takaiwa, F. (2009). 26-week oral safety study in macaques for transgenic rice containing the major human T-cell epitope peptides from Japanese cedar pollen allergens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 5633-5638.
- Estruch, JJ; Carozzi, NB; Desai, N; Duck, NB; Warren, GW; Koziel, MG. (1997). Transgenic plants: an emerging approach to pest control. *Nature Biotechnology* 15: 137-141.
- Jank, B; Gaugitsch, H. (2001). Assessing the environmental impacts of transgenic plants. *Trends in Biotechnology* 19: 371-372.
- King, JC. (2002). Biotechnology: a solution for improving nutrient bioavailability. *International Journal of Vitamins and Nutrition Research* 72: 7-12.
- Lazarus, NR. (1996). The concept of substantial equivalence: toxicological testing of novel foods. En "OECD, Food safety evaluation". Paris, OECD; pp. 98-106.
- MacCabe, AP; Gil, JV; Ramón, D. (2001). GM-foods: one man's meat, another man's poison? *Food Science and Technology International* 7: 89.
- Mackey, MA. (2002). The application of biotechnology to nutrition: an overview. *Journal of American College of Nutrition* 21: 157S-160S.
- Pääbo, S. (1999). Neolithic genetic engineering. *Nature* 398: 194-195.

Paine, JA; Shipton, CA; Chaggar, S; Howells, RM; Kennedy, MJ; Vernon, G; Wright, SY; Hinchliffe, E; Adams, JL; Silverstone, AL; Drake, R. (2005). Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology* 23: 482-487.

Ramón, D. (2000). Genetically modified foods: a case of information or misinformation. *International Microbiology* 3: 1-2.

Shah, D; Horsch, R; Klee, H; Kishore, G; Winter, J; Tumer, N; Hironajka, C; Sanders, P; Gasser, C; Aykent, S; Siegel, N; Rogers, S; Fraley, R. (1986). Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 233: 478-481.

Usuda, K; Wada, Y; Ishimaru, Y; Kobayashi, T; Takahashi, M; Nakanishi, H; Nagato, Y; Mori, S; Nishizawa, N.K. (2009). Genetically engineered rice containing larger amounts of nicotianamine to enhance the anti-hypertensive effect. *Plant Biotechnology Journal* 7: 87-95.

Ye, X; Al-Babili, S; Klöti, A; Zhang, J; Lucca, P; Beyer, P; Potrykus, I. (2000). Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287: 303-305.

DISEÑO Y APLICACIONES DE HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA REPARACIÓN DE GENES

Guillermo Montoya

Introducción

Diferentes tipos de enfermedades son causadas por mutaciones en distintos genes del organismo. En muchos casos estas enfermedades son incurables ya que no se pueden tratar al portar el paciente la mutación en su genoma. Dentro de este tipo de enfermedades podemos encontrar desde varios tipos de cáncer a distintas enfermedades monogénicas con Xeroderma Pigmentoso; Huntington o la fibrosis quística.

Una posible estrategia para solucionar este problema sería corregir las mutaciones de los genes dañados para recuperar su función normal. La recombinación homóloga es un mecanismo muy conservado, involucrado en la reparación de las roturas de la doble hebra de ADN, para mantener la integridad del ADN genómico. Roturas de la doble cadena de ADN inducen específicamente, para su reparación, recombinación homóloga. Utilizando esta característica, la recombinación homóloga correctora inducida por cortes específicos en el ADN está surgiendo como una potente herramienta, para lograr la inserción y corrección de genes dañados. Trabajos recientes en ingeniería de proteínas han hecho posible el rediseño de endonucleasas capaces de inducir recombinación en genes específicos después de producir cortes en la doble cadena de ADN del gen de interés, abriendo un camino para la aplicación terapéutica de esta tecnología. Esta aproximación implica la introducción en el núcleo celular de un fragmento de ADN con la secuencia correcta del gen a reparar, que serviría como molde para la reparación del gen, por recombinación homóloga, tras la rotura del gen a reparar usando endonucleasas específicas.

Las "homing endonucleasas", también conocidas como Meganucleasas, son endonucleasas que reconocen y cortan secuencias específicas de ADN de más de 14 pares de bases, y en células vivas pueden estimular la recombinación homóloga, para la reparación del sitio cortado, en un factor de más de 10.000 veces. Las meganucleasas constituyen varias familias de proteínas que están codificadas por intrones o inteínas y cuyas secuencias diana se encuentran, generalmente, en los alelos homólogos carentes de los intrones o inteínas; el corte del ADN mediado por el enzima inicia la transferencia del elemento móvil

a la secuencia rota, mediado por un mecanismo de recombinación homóloga inducida por la rotura de la doble cadena de ADN. Estas enzimas han sido detectadas en todos los reinos biológicos: bacteria, archaea y eukaria, dando una idea de la alta conservación de este mecanismo genético. Gracias a su alta especificidad dadas las grandes secuencias de ADN que reconocen, son las únicas endonucleasas capaces de reconocer su único sitio de corte dentro del genoma eucariótico permitiendo, así, su uso para fines terapéuticos.

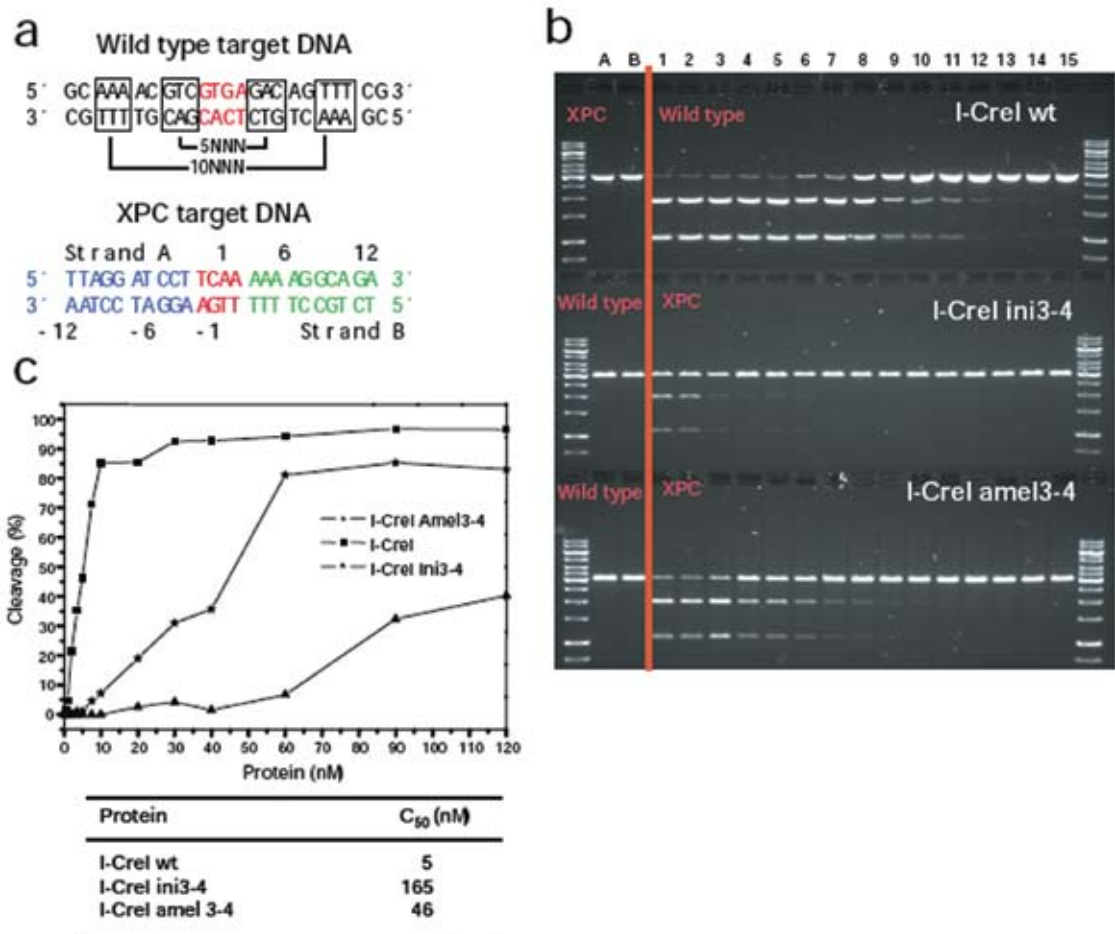


Figura 1. Actividad de restricción y especificidad de los nuevos heterodímeros. a) secuencias diana de ADN WT y XPC. Las regiones 5NNN y 10NNN, aparecen recuadradas. En el texto las bases individuales se nombran con subíndices wtA wtB, xpcA y xpcB, indicando la hebra de ADN donde se sitúan. b) Escisión de ADN diana de I-CreI y los heterodímeros in vitro. En la reacción se incubó 2 nM del ADN diana con concentraciones de proteína de 120, 90, 60, 40, 30, 20, 10, 7,5, 5, 3,5, 2, 1, 0,5, 0,25 y 0 nM (Calle 1-15), o 120 nM (Calle A), 0 nM (Lane B). c) Representación del ensayo de restricción in vitro y C₅₀ (Concentración de enzima necesaria para cortar 50% de 2 nM ADN diana).

La caracterización del proceso de "homing" llevó a imitar el proceso en células de mamíferos. El grupo de Jasin usó un sistema donde un gen trazador (codificando para neomicina) fue interrumpido con la secuencia de reconocimiento y rotura de I-SceI, y así poder medir tasas de corrección en células NIH3T3 y células ES. Utilizando un vector, con el gen de la meganucleasa I-SceI, para su expresión transitoria junto

con el gen de neomicina intacto (matriz de reparación), se detectaron correcciones específicas con frecuencias que iban desde 3×10^{-5} en células ES hasta 4×10^{-4} células 3T3. Otro grupo siguió la inserción de un fragmento reparador, también conteniendo neomicina en células NIH3T3 y PCVC7 y observaron procesos de reparación homóloga de entre $1,8 \times 10^{-4}$ y 4×10^{-4} . Aunque se han identificado varios cientos de meganucleasas, el repertorio de secuencias de ADN reconocidas por todas las meganucleasas es demasiado limitado para hacer frente a la complejidad de un genoma completo. Por lo tanto, poder modificar la capacidad de las meganucleasas para poder reconocer distintas secuencias diferentes a sus dianas naturales de forma específica podría solventar este problema.

El diseño de meganucleasas artificiales, con la capacidad de reconocer y cortar secuencias específicas de genes de interés para ser reparados es un campo de gran actividad. En el pasado, se han hecho

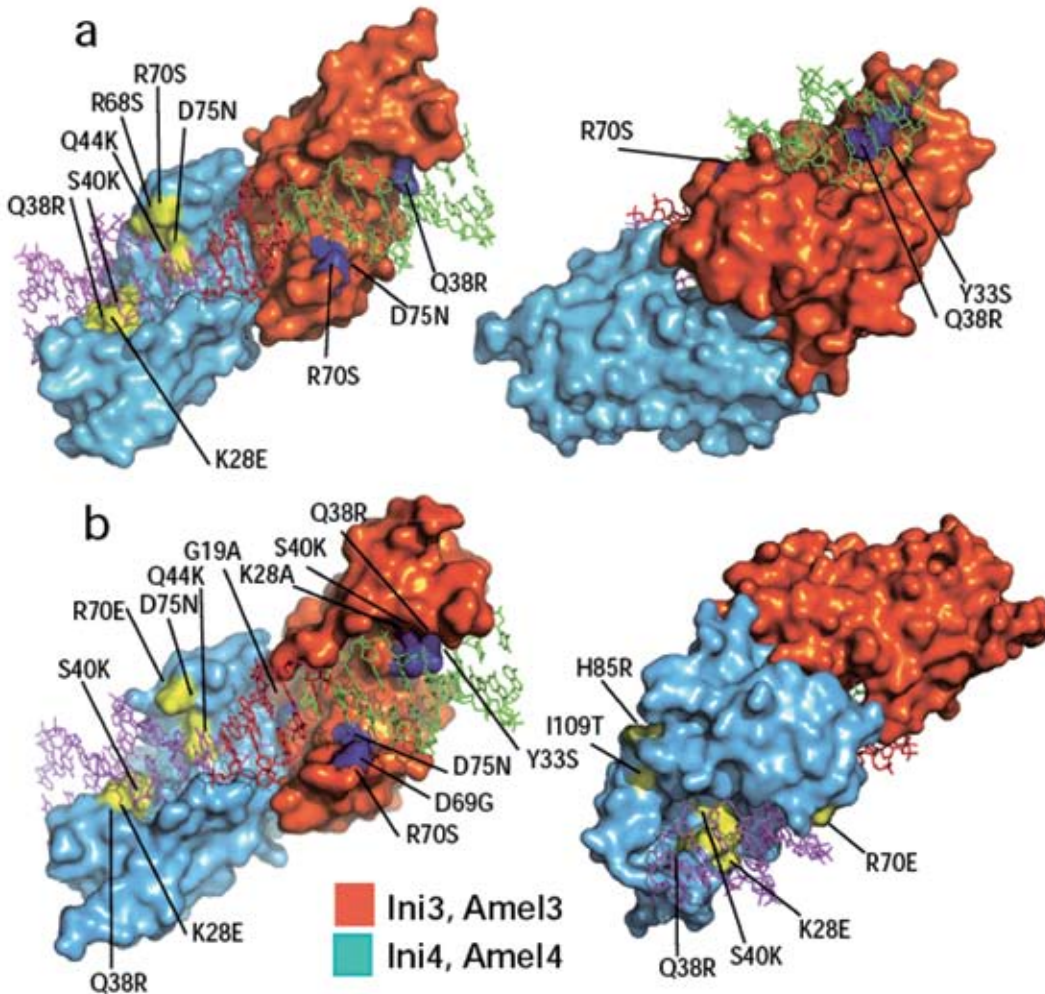


Figura 2. Estructura cristalográfica de los heterodímeros Ini3-4 y Amel3-4. Modelos de la superficie de la estructuras a) Ini3-4 y b) Amel3-4 en complejos con ADN XPC. El ADN está coloreado de acuerdo con las regiones de unión de cada monómero (violeta para Amel4, Ini4; verde para Amel3, Ini3 y rojo para los cuatro pares de bases centrales). Las mutaciones están localizadas en la superficie de la proteína en amarillo y azul para los monómeros 4 y 3 respectivamente.

intentos de fusionar dominios Zinc-Finger de unión a ADN a el dominio catalítico de la endonucleasa FokI, para inducir recombinación en varios tipos celulares, incluyendo células humanas de linfomas. Sin embargo, estas proteínas recombinantes tienen una alta tasa de toxicidad en las células a reparar debido a su bajo nivel de especificidad. Teniendo en cuenta su función biológica y extremada especificidad las meganucleasas ofrecen un excelente punto de partida, pero modificar su dominio de unión a ADN ha representado un desafío complejo. De una manera más general, modificar la especificidad de sustrato de las proteínas que cortan o recombinan ADN se ha demostrado complejo.

Diseño de meganucleasas contra el Xeroderma Pigmentoso

El Xeroderma pigmentoso (XP) es una enfermedad monogénica caracterizada por la hipersensibilidad a la luz ultravioleta. Las células de los pacientes con XP tienen un defecto en los mecanismos de reparación de escisión de nucleótidos, lo que limita su capacidad de eliminar el daño inducido por la radiación ultravioleta al ADN, lo que ocasiona una fuerte predisposición en estos pacientes a desarrollar cáncer de piel. El uso de endonucleasas de restricción de corte raro -como las endonucleasas "homing" (enzimas implicadas en la transferencia lateral de las secuencias genéticas que contienen sus dianas de restricción, HE's), también conocidas como meganucleasas -constituye una posible estrategia para reparar lesiones del ADN. Las HEs se han identificado como bisturís moleculares de alta especificidad capaces de reconocer y cortar dianas de ADN, permitiendo una eficiente transferencia dirigida de genes homólogos a través de la recombinación homóloga inducida por la rotura de doble cadena. Dos derivados heterodiméricos rediseñados a partir del enzima I-Crel, (Amel3-4 e Ini3-4) son capaces de cortar el ADN del gen humano XPC (XP grupo C), tanto *in vitro* como *in vivo*. Las estructuras cristalográficas de los complejos de las variantes I-Crel unidas a su diana XPC de ADN, antes y después de la reacción de escisión, sugieren que el mecanismo de reconocimiento y corte de restricción por las HEs rediseñadas es parecido al mecanismo de la I-Crel de genotipo salvaje (wild type). Lo que es más, estos derivados indujeron niveles altos de "gene targeting" (técnica genética que hace uso de la recombinación homóloga para reemplazar genes endógenos) en células de mamíferos, sin que se observara ninguna genotoxicidad. De acuerdo con estos resultados, podemos concluir que es posible diseñar HEs que reconozcan y corten secuencias de genes específicos, de este modo abriendo nuevas posibilidades para la ingeniería genómica y la terapia genética en pacientes con XP cuya enfermedad puede ser tratada *ex vivo*.

Hemos desarrollado un método para la generación de nuevas especificidades hacia el ADN basado en el rediseño de cada región de unión al ADN para conseguir el reconocimiento y escisión de secuencias de ADN distintas. Variantes heteroméricas de I-Cre fueron generadas utilizando una combinación de un enfoque semi-racional con métodos de alto rendimiento para crear miles de derivados homodiméricos de I-Crel con cambios locales de especificidad. Las nuevas variantes presentan mutaciones concentradas en dos subdominios de unión a ADN distintos, y escinden secuencias que difieren de la diana palindrómica de I-Crel en las posiciones ± 8 , ± 9 , y ± 10 (10NNN) o ± 3 , ± 4 , y ± 5 (5NNN, Fig. 1a). Se utilizó una estrategia combinatoria para agrupar distintos grupos de mutaciones que reconocían las regiones 10NNN y 5NNN, en grupos de proteínas recombinantes de especificidades predecibles. Estos mutantes homoméricos combinatorios cortan en una diana combinada compuesta por un mosaico de las dianas de restricción de sus moléculas parentales. Los monómeros de estos mutantes homodiméricos pueden ser combinados mediante co-expresión para crear proteínas heterodiméricas, aumentando de esta forma el número de dianas potenciales. La genoteca de mutantes resultante fue utilizada para diseñar meganucleasas que escindieran una secuencia del gen XP del grupo C contenida en el intrón entre los exones 3 y 4 del locus XPC humano.

El cribado en levaduras dio como resultado variantes heterodiméricas de I-Crel que escindían el ADN derivado del gen XPC, pero no con el nivel de especificidad necesario para conseguir "gene targeting" en células de mamífero. Este nivel de actividad podría ser debido a la secuencia de ADN XPC que difiere de la secuencia del tipo salvaje (wild type, WT) no sólo en las posiciones 10NNN y 5NNN, sino también en cuatro pares de bases centrales. El efecto de estas posiciones del ADN sobre la actividad de I-Crel no está claro. Se procedió entonces a la optimización de estas variantes por mutagénesis aleatoria seguida de cribado para seleccionar proteínas con alto nivel de actividad. Las variantes optimizadas resultantes tienen un residuo mutado cercano al sitio activo y algunas otras mutaciones que no están implicadas directamente en la unión a ADN y la catálisis. Estas enzimas escinden la secuencia diana XPC -la cual difiere en 17 bases del tipo salvaje -e inducen la recombinación dirigida. Las estructuras cristalográficas de Amel3-4 e Ini3-4 unidas a ADN XPC fueron resueltas mediante el método de reemplazamiento molecular (Fig. 2a,b). En presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} , las estructuras proporcionaban instantáneas de los estados de unión y escisión de la reacción de catálisis, haciendo posible la comparación entre estas variantes producidas por ingeniería genética y el WT. Ya que el objetivo del diseño de HE es el producir herramientas para la ingeniería genómica es de vital importancia el comprobar cuál es el impacto de esta disminución en la actividad en un ensayo real de reemplazamiento dirigido de un gen. Hemos descrito con anterioridad un sistema reportero cromosómico que contiene una diana de restricción de meganucleasa para la comparación de la habilidad de diferentes meganucleasas para inducir "gene targeting" en un contexto cromosómico parecido. Las frecuencias de reconocimiento de los heterodímeros fueron comparadas con la de I-SceI, utilizado como estándar para los estudios de transferencia genética inducida por rotura de doble hebra (DSB), y la de I-Crel. Se construyeron líneas celulares CHO con un sistema reportero lacZ insertado exactamente en el mismo lugar cromosómico y difiriendo sólo en el lugar de reconocimiento de la meganucleasa. Las líneas celulares resultantes que llevaban el gen lacZ inactivo podían ser utilizadas para determinar la eficiencia de "gene targeting" -al producirse la reparación de lacZ, cuando I-SceI, I-Crel o los heterodímeros Amel3-4 y Ini3-4 cortan en la diana XPC (Fig. 3a). La variante Amel3-4 fue casi igual de eficiente en su actividad ($2,2 \times 10^{-3}$) como lo fueron I-SceI (11×10^{-2}) y I-Crel ($7,0 \times 10^{-3}$) utilizadas como estándares. Además, la variante no optimizada de Ini3-4 indujo substancial "gene targeting" aunque menos eficiente que el heterodímero optimizado Amel3-4. Por el contrario se observó una señal muy pequeña o nula con los homodímeros o en ausencia de meganucleasa. Por último los heterodímeros Amel3-Ini4 y Amel4-Ini3, que contenían cada uno, uno de los monómeros optimizados, mostraron niveles intermedios de actividad, consistentes con su actividad de restricción *in vitro*.

Para examinar los niveles de toxicidad debidos a DSB no específico del heterodímero optimizado, medimos los niveles de fosforilación de las histonas H2AX (γ -H2AX) y su localización en focos nucleares en los sitios de DSB.

En células humanas MRC5, que contienen un sitio XPC endógeno, tras ser transfectadas con Amel3-4 y bajo las mismas condiciones utilizadas para inducir recombinación en el ensayo de gene targeting (Fig. 3a), se observó una media de focos γ -H2AX ligeramente por encima de nivel de fondo (Fig. 3b,c). Por el contrario cuando utilizamos una nucleasa con dedo de zinc de primera generación (ZFN) o una meganucleasa derivada de I-Crel con baja especificidad (Mega X), los niveles de focos γ -H2AX detectados fueron mayores (Fig. 3b,c). Por lo tanto podemos concluir que la meganucleasa de ingeniería genética Amel3-4 produce poca si alguna escisión en el sitio en células humanas, lo que demuestra que es una meganucleasa de alta especificidad comparable a I-SceI. Se obtuvieron resultados similares en células CHO-pi10_XPC2, en la línea parental (CHO-K1) y en la línea XD17, que es una línea CHO-K1 deficiente en mecanismos de reparación DSB (XRCC4-) en la que se han visto focos γ -H2AX persistentes tras irradiación.

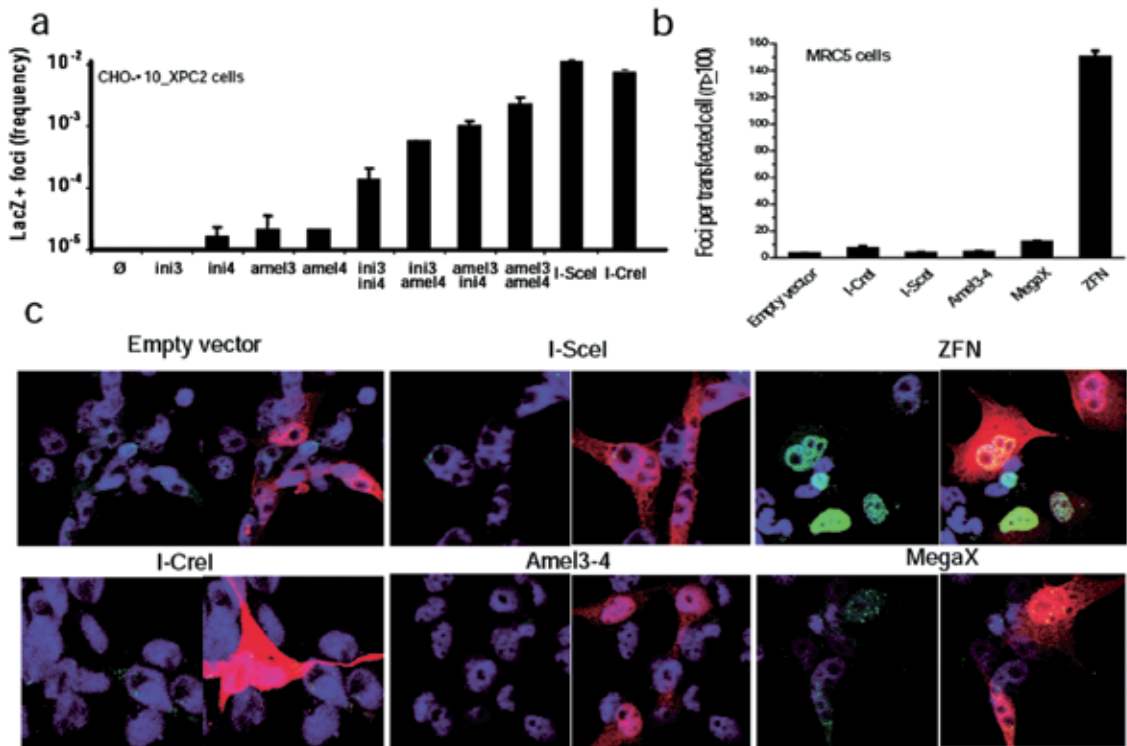


Figura 3. Análisis de la eficiencia de reparación genética ejercida por las meganucleasas rediseñadas y controles de genotoxicidad a) Se diseñó un modelo celular en células CHO-K1 (CHO-pi 10_XPC2). La función del gen reportero LacZ se restaura cuando se cotransfectan 2 ug del matriz de reparación lacZ con 1 ug del vector(es) de expresión de la meganucleasa (Métodos en la web). La línea celular que contenía el sitio de unión XPC fue transfectada solo con la matriz de reparación de lacZ (∅) o conjuntamente con el(los) vector(es) de expresión de meganucleasa (homodímeros Ini3 e Ini4, homodímeros Amel3 y Amel4, heterodímeros Ini3-4, Ini3-Amel4, Amel3-Ini4, Amel3-4, y I-SceI y I-CreI). Las barras de error representan la desviación estándar de los valores medidos. b) inmunocitoquímica de γ -H2AX. Se transfectaron células humanas MRC5 con 1 ug de plásmido(s) codificante(s) de meganucleasas, nucleasas en dedo de zinc de primera generación (Lwt-Rwt) con diana en el sitio IL2RG humano8 o el vector vacío, y 200 ng de plasmado codificante de Proteína Ro

La ingeniería de una proteína de unión a ADN es un gran reto. Los años de intentos de modificar la especificidad por el sustrato de enzimas de restricción, o de trabajo con recombinasas, ilustran la dificultad de la tarea, y los dedos de zinc producidos por diseño modular han sido la excepción durante mucho tiempo. La I-MsoI ha sido rediseñada por ordenador recientemente para cortar una secuencia de ADN que difiere en dos posiciones de su diana original. Nuestros resultados son indicativos de que esta estrategia no sería efectiva si fueran necesarios grandes cambios en la secuencia de ADN. Sin embargo, nuestro estudio también demuestra que combinando una ingeniería racional con un cribado de alto rendimiento, es posible rediseñar completamente las propiedades de reconocimiento de las meganucleasas y potencialmente de otras proteínas de unión a ADN, sin alterar la actividad ni la especificidad. En células de pacientes la eficacia del gene targeting inducido por DSB puede depender de varios factores incluidos la vectorización, la actividad de restricción, la competencia en recombinación homóloga del tipo celular, y probablemente el estado de la cromatina del sitio

diana. En contraste, la especificidad dependerá sólo de las propiedades intrínsecas de la meganucleasa diseñada. La investigación sobre células madre ha demostrado que se puede generar piel funcional con tan sólo un 1% de células madre epiteliales. La combinación de esta tecnología con nuestras endonucleasas de diseño destapa nuevas posibilidades para la terapia génica de pacientes con XP y otras enfermedades monogénicas, como enfermedades hematológicas que podría ser tratadas *ex vivo*.

Bibliografía

Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortellaro A, Morecki S, Andolfi G, Tabucchi A, Carlucci F, et al. (2002). Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 296, 2410-2413.

Argast GM, Stephens K M, Emond MJ, and Monnat RJ, Jr. (1998). I-Ppol and I-Crel homing site sequence degeneracy determined by random mutagenesis and sequential in vitro enrichment. *J Mol Biol* 280, 345-353.

Arnaudeau-Begard C, Brellier F, Chevallier-Lagente O, Hoeijmakers J, Bernerd F, Sarasin A, and Magnaldo T (2003). Genetic correction of DNA repair-deficient/cancer-prone xeroderma pigmentosum group C keratinocytes. *Hum Gene Ther* 14, 983-996.

Arnould S, Chames P, Perez C, Lacroix E, Duclert A, Epinat J C, Stricher F, Petit AS, Patin A, Guillier S, et al. (2006). Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets. *J Mol Biol* 355, 443-458.

Ashworth J, Havranek JJ, Duarte CM, Sussman D, Monnat RJ, Jr. Stoddard BL, and Baker D (2006). Computational redesign of endonuclease DNA binding and cleavagespecificity. *Nature* 441, 656-659.

Aslan G, Karacal N, and Gorgu M (1999). New tumor formation on split-thickness skin grafted areas in xeroderma pigmentosum. *Ann Plast Surg* 43, 657-660.

Belfort M, and Roberts RJ (1997). Homing endonucleases: keeping the house in order. *Nucleic Acids Res* 25, 3379-3388.

Cleaver JE (2005). Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer* 5, 564-573.

Chames P, Epinat JC, Guillier S, Patin A, Lacroix E, and Paques F (2005). In vivo selection of engineered homing endonucleases using double-strand break induced homologous recombination. *Nucleic Acids Res* 33, e178.

Chevalier BS, and Stoddard BL (2001). Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *Nucleic Acids Res* 29, 3757-3774.

Chica RA, Doucet N, and Pelletier JN (2005). Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Curr Opin Biotechnol* 16, 378-384.

Choulika A, Perrin A, Dujon B, and Nicolas JF (1995). Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15, 1968-1973.

de Boer J, and Hoeijmakers JH (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21, 453-460.

- Doyon JB, Pattanayak V, Meyer CB, and Liu DR (2006). Directed evolution and substrate specificity profile of homing endonuclease I-SceI. *J Am Chem Soc* 128, 2477-2484.
- Gaspar HB, Parsley KL, Howe S, King D, Gilmour KC, Sinclair J, Brouns G, Schmidt M, Von Kalle C, Barington T, et al. (2004). Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 364, 2181-2187.
- Lanio T, Jeltsch A, and Pingoud A (2000). On the possibilities and limitations of rational protein design to expand the specificity of restriction enzymes: a case study employing EcoRV as the target. *Protein Eng* 13, 275-281.
- Marcaida MJ, Prieto J, Redondo P, Nadra AD, Alibés A, Serrano L, Grizot S, Duchateau P, Pâques F, Blanco FJ, Montoya G (2008) Crystal structure of I-Dmol in complex with its target DNA provides new insights into meganuclease engineering- *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4;105(44):16888-93
- Pabo CO, Peisach E, and Grant RA (2001). Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biochem* 70, 313-340.
- Paques F, and Duchateau P (2007). Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. *Curr Gene Ther* 7, 49-66.
- Pabo CO, Peisach E, and Grant RA (2001). Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biochem* 70, 313-340.
- Paques F, and Duchateau P (2007). Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. *Curr Gene Ther* 7, 49-66.
- Paques F, and Haber JE (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 349-404. Porteus, M. H., and Baltimore, D. (2003). Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science* 300, 763.
- Redondo P, Prieto J, Munoz IG, Alibes A, Stricher F, Serrano L, Cabaniols JP, Daboussi F, Arnould S, Perez C, et al. (2008). Molecular basis of xeroderma pigmentosum group C DNA recognition by engineered meganucleases. *Nature* 456, 107-111.
- Rouet P, Smih F, and Jasin M (1994). Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol* 14, 8096-8106.
- Saleh-Gohari N, and Helleday T (2004). Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic Acids Res* 32, 3683-3688.
- Smih F, Rouet P, Romanienko PJ, and Jasin M (1995). Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 23, 5012-5019 .
- Smith J, Grizot S, Arnould S, Duclert A, Epinat JC, Chames P, Prieto J, Redondo P, Blanco FJ, Bravo J, et al. (2006). A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res* 34, e149.
- Sary A, and Sarasin A (2002). The genetics of the hereditary xeroderma pigmentosum syndrome. *Biochimie* 84, 49-60.
- Sung P, and Klein H (2006). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 739-750.

BIOSÍNTESIS COMBINATORIA: UNA NUEVA ESTRATEGIA PARA LA GENERACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN MICROORGANISMOS

José Antonio Salas

*Departamento de Biología Funcional (Area Microbiología) e Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Universidad de Oviedo.
Tel/Fax 985 103652. E-mail jasalas@uniovi.es*

Con el descubrimiento de la penicilina por Fleming y colaboradores y el posterior aislamiento y aplicación clínica de otros antibióticos, se abrió una nueva etapa en la lucha contra las enfermedades infecciosas al disponer de una batería de productos naturales producidos por microorganismos con capacidad de inhibir el desarrollo de otros microorganismos. Pero además, estos descubrimientos fueron la base que permitió conocer en años posteriores que muchos microorganismos podían ser una fuente de compuestos con distintas actividades biológicas útiles para la lucha no sólo contra las enfermedades infecciosas sino también para combatir a muchos parásitos, bloquear el desarrollo de insectos plaguicidas, detener el desarrollo de células cancerosas o ayudar en los trasplantes actuando como inmunosupresores. A esta variedad de compuestos se les ha dado el nombre de "productos naturales bioactivos". Todos estos compuestos han surgido a través de grandes programas de escrutinio ("screening") llevados a cabo principal, aunque no exclusivamente, por las industrias farmacéuticas y han dado lugar a los compuestos que hoy en día utilizamos a nivel farmacéutico u hospitalario (Fig. 1). Habitualmente estos productos naturales son producidos por los microorganismos en pequeñas cantidades, lo que dificulta su producción a gran escala con el fin de su comercialización. Estas dificultades han sido resueltas generalmente por las industrias farmacéuticas mediante programas de mutagénesis y selección encaminados al aislamiento de mutantes superproductores de estos compuestos. Por otro lado, y siempre que la estructura química así lo permite, algunos de estos compuestos han sido sintetizados químicamente como una alternativa al proceso biológico del cultivo del microorganismo productor en bioreactores o tanques de fermentación.

Si analizamos dentro del mundo microbiano qué grupos de microorganismos son responsables de la producción de estos productos naturales bioactivos, nos encontramos que un elevado porcentaje son sintetizados por especies pertenecientes a un grupo de bacterias, denominadas actinomicetos, habitantes habituales del suelo y que contribuyen a muchos procesos de biotransformación de la materia orgánica. El olor característico de la tierra húmeda se debe a la producción de varias sustancias volátiles (como la

geosmina) por estos microorganismos. Poseen un ciclo de desarrollo complejo pasando por fases pluricelulares miceliales y fases unicelulares. Se estima que de los aproximadamente 23.000 productos naturales bioactivos producidos por microorganismos, distintas especies pertenecientes a los actinomicetos son responsables de la producción de aproximadamente el 75% de estos compuestos (Berdy, 2005). A pesar del gran arsenal terapéutico del que se dispone, se requieren nuevos compuestos bioactivos capaces de combatir la aparición de bacterias multirresistentes a los antibióticos, el tratamiento de nuevos patógenos o enfermedades microbianas emergentes, el desarrollo de células tumorales resistentes a los fármacos habituales o el tratamiento de tumores específicos. Aunque los programas clásicos de búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos siguen jugando un papel importante, existen hoy en día nuevas alternativas que pueden dar lugar a la obtención de nuevos compuestos bioactivos o derivados de los ya existentes:

* Organismos marinos. Una de estas alternativas es la búsqueda de nuevos compuestos en nichos ecológicos no muy explotados como son los fondos marinos. Un buen número de compañías farmacéuticas y grupos académicos centran sus esfuerzos en el aislamiento de nuevos compuestos bioactivos a partir de micro y macroorganismos procedentes de ambientes marinos.

* Química combinatoria. Esta tecnología genera librerías de moléculas distintas, pero relacionadas estructuralmente, que pueden ser ensayadas utilizando tecnologías de alto rendimiento ("high-throughput screening") frente a organismos diana o ensayos enzimáticos específicos.

* Genomas microbianos. Con el desarrollo de la tecnología de secuenciación genómica el número de genomas secuenciados está creciendo exponencialmente y en este sentido la aplicación de esta tecnología a microorganismos productores de compuestos bioactivos está permitiendo descubrir nuevas rutas biosintéticas no conocidas hasta el momento en estos microorganismos.

* Biosíntesis combinatoria. Finalmente, la biosíntesis combinatoria, objeto de este artículo y que se describe en mayor detalle a continuación.

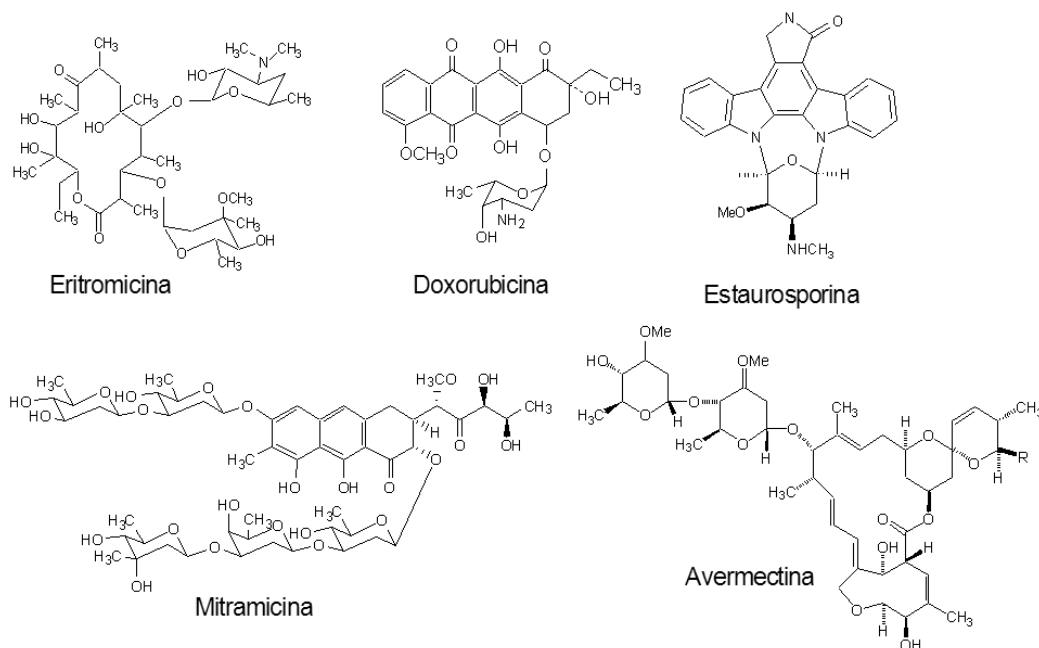


Figura 1. Estructura química de algunos productos naturales bioactivos producidos por microorganismos

Biosíntesis combinatoria

El desarrollo de la tecnología de ADN recombinante y la aplicación de la ingeniería genética a los actinomicetos han abierto importantes perspectivas en cuanto a la posibilidad de generar nuevos derivados de productos naturales bioactivos actuando sobre los genes de la ruta de biosíntesis de estos compuestos. Esta nueva tecnología, denominada "biosíntesis combinatoria", pretende crear microorganismos recombinantes a partir de microorganismos productores de un compuesto bioactivo conocido, que posean nuevas combinaciones génicas no descritas en la naturaleza. En virtud de la flexibilidad de sustrato de los enzimas del metabolismo secundario microbiano (responsables de la biosíntesis de estos compuestos) es posible introducir modificaciones químicas (mediadas por enzimas microbianos) que den lugar a la generación de nuevos derivados, habitualmente no fácilmente asequibles a la síntesis química.

La utilización de la biosíntesis combinatoria requiere en primer lugar el aislamiento y caracterización de los genes de las rutas de biosíntesis a utilizar y la asignación de funciones a cada uno de los genes y sus productos génicos. Disponiendo de este conocimiento, es posible diseñar de modo racional que combinaciones génicas necesitamos para dar lugar a la formación del nuevo compuesto deseado en base a su estructura química. Se describen a continuación algunos ejemplos de la utilización de la biosíntesis combinatoria.

Identificación de un nuevo compuesto bioactivo

Streptomyces antibioticus ATCC 11891 es el microorganismo productor del antibiótico macrólido oleandomicina. En el curso de estudios encaminados a identificar la presencia de rutas de biosíntesis "silenciosas" en este microorganismo, es decir, que no habían sido detectadas previamente por la ausencia o bajo nivel de expresión de las mismas, aislamos en nuestro laboratorio una serie de clones a partir de una genoteca en cósmidos que cuando se introducían en *Streptomyces albus* daban lugar a colonias que presentaban una pigmentación marrón-verdosa. El compuesto causante de esta pigmentación fue aislado, purificado y su estructura química elucidada mediante resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas, resultando ser un nuevo compuesto que se denominó "oviedomicina" y que inhibía el desarrollo de distintas líneas celulares tumorales e inducía la apoptosis celular. Tras el aislamiento y caracterización de los genes de la ruta de biosíntesis de oviedomicina, se generaron una serie de derivados mediante biosíntesis combinatoria que presentaban distintos grados de actividad frente a líneas celulares tumorales (Fig. 2) (Méndez et al., 2002; Lombó et al., 2004a, 2009).

Generación de un derivado de un compuesto antitumoral a través de un proceso más eficaz

Un ejemplo interesante de las aplicaciones de la biosíntesis combinatoria está relacionado con la producción de un tipo de antraciclina (epirubicina) de gran utilidad clínica en la quimioterapia del cáncer. Las antraciclinas son un importante grupo de compuestos que inhiben el desarrollo de distintas líneas celulares tumorales por lo que algunos componentes de esta familia tienen aplicación terapéutica en la lucha frente al cáncer. La doxorubicina (adriamicina) y su derivado 4'-epidoxorubicina (epirubicina) son dos de estos agentes antitumorales. Estos dos compuestos difieren únicamente en la configuración absoluta del C-4 del azúcar que forma parte de su estructura, de modo que ambos compuestos son epímeros. Desgraciadamente, la utilización de estos compuestos en el tratamiento del cáncer, conlleva efectos secundarios no deseados, uno de los cuales es su cardiotoxicidad. Sin embargo, la epirubicina es un compuesto mejor

tolerado que la doxorubicina lo que permite la utilización de mayores dosis acumulativas antes de que se produzca la cardiotoxicidad. Esto se debe probablemente a que en el hombre existe un proceso de detoxificación de la epirubicina mediante su conversión a derivados más fácilmente eliminables. La producción de epirubicina es un proceso semisintético que transcurre en dos fases. Por un lado, una fermentación microbiana para producir doxorubicina utilizando el microorganismo productor *Streptomyces peucetius*. Tras la purificación de la doxorubicina, ésta es ahora utilizada como materia prima para su conversión a epirubicina mediante síntesis química. Este es un proceso complejo que requiere un gran número de pasos de síntesis orgánica y en el que tiene lugar la formación de mezclas anoméricas que deben ser separadas mediante cromatografía. El grupo del Dr. Richard Hutchinson de la Universidad de Wisconsin (U.S.A) en colaboración con científicos de la compañía farmacéutica Pharmacia-Upjohn, diseñaron un método alternativo para la producción de epirubicina mediante la manipulación genética de la ruta de biosíntesis de doxorubicina en el microorganismo productor (Madduri et al., 1998). Estructuralmente, la doxorubicina posee un anillo tetracíclico denominado ϵ -rodomicinona al que se encuentra unido un azúcar (L-daunosamina), el cual es esencial para la actividad biológica de la doxorubicina. Hutchinson y colaboradores, identificaron todos los genes que forman parte de la ruta de biosíntesis de doxorubicina y, entre ellos, el gen *dnmV*, que participa en la biosíntesis del azúcar daunosamina, dando lugar a la formación de un enzima encargado de reducir a hidroxilo el grupo cetónico en posición 4 antes de que este azúcar sea transferido a la ϵ -rodomicinona. Mediante ingeniería genética, crearon un mutante a partir del microorganismo productor de doxorubicina en el que inactivaron el gen *dnmV*, de modo que este mutante fuese ahora incapaz de sintetizar doxorubicina, al no poder finalizar la síntesis del azúcar daunosamina. Este mutante acumulaba por tanto el anillo tetracíclico no glicosilado, ϵ -rodomicinona. Para producir epirubicina se introdujo en este mutante el gen *eryBIV*, procedente de la ruta de biosíntesis de eritromicina, que también codifica para una cetoreductasa. Sin embargo, en este caso, esta reductasa genera un epímero de la daunosamina invirtiendo la configuración absoluta del hidroxilo en posición 4 del azúcar formando de este modo 4-epidaunosamina en vez de daunosamina. El resultado fue que el mutante recuperó la capacidad de producir un compuesto activo pero, en esta ocasión y como era de esperar, el producto final no era doxorubicina sino epirubicina. Este experimento ilustra cómo la biosíntesis combinatoria puede intervenir en un proceso de biosíntesis de un compuesto bioactivo modificando la configuración absoluta de alguno de los centros quirales del compuesto y facilitando de este modo la producción de un compuesto nuevo y evitando, en este caso, el empleo de rutas sintéticas que implican un proceso mucho más complejo.

Expresión heteróloga de una ruta de biosíntesis

En ocasiones, un compuesto bioactivo es producido por un microorganismo que plantea algún problema debido a su lento crecimiento, la baja productividad del compuesto, dificultades para su cultivo en el laboratorio o de difícil manipulación genética. En estos casos, puede ser muy conveniente la producción de ese compuesto bioactivo en otro microorganismo que no plantee los problemas mencionados. La biosíntesis combinatoria puede facilitar en estos casos la resolución del problema a través de la expresión heteróloga de los genes de biosíntesis de ese compuesto bioactivo en otro microorganismo. Este es el caso de las rutas de biosíntesis de dos antitumorales como la tiocoralina y la rebecamicina, producidos por dos actinomicetos. Ambas rutas fueron expresadas en *Streptomyces albus* y *Streptomyces lividans* (Sánchez et al., 2002; Lombó et al., 2006a). En ambos casos, la productividad de estos compuestos tras su expresión en otro microorganismo mejoró en relación a la misma en el microorganismo productor original.

Generación de nuevos derivados

La biosíntesis combinatoria alcanza su mayor exponente y capacidad a la hora de generar nuevos compuestos bioactivos derivados de compuestos parentales de actividad conocida. De este modo y, en virtud de la flexibilidad de sustrato de los enzimas del metabolismo secundario, se pueden obtener derivados a partir de un compuesto bioactivo de interés con modificaciones químicas no fácilmente accesibles a la síntesis química. Se describen a continuación dos ejemplos de generación de derivados de dos antitumorales como son la mitramicina y la estaurosporina.

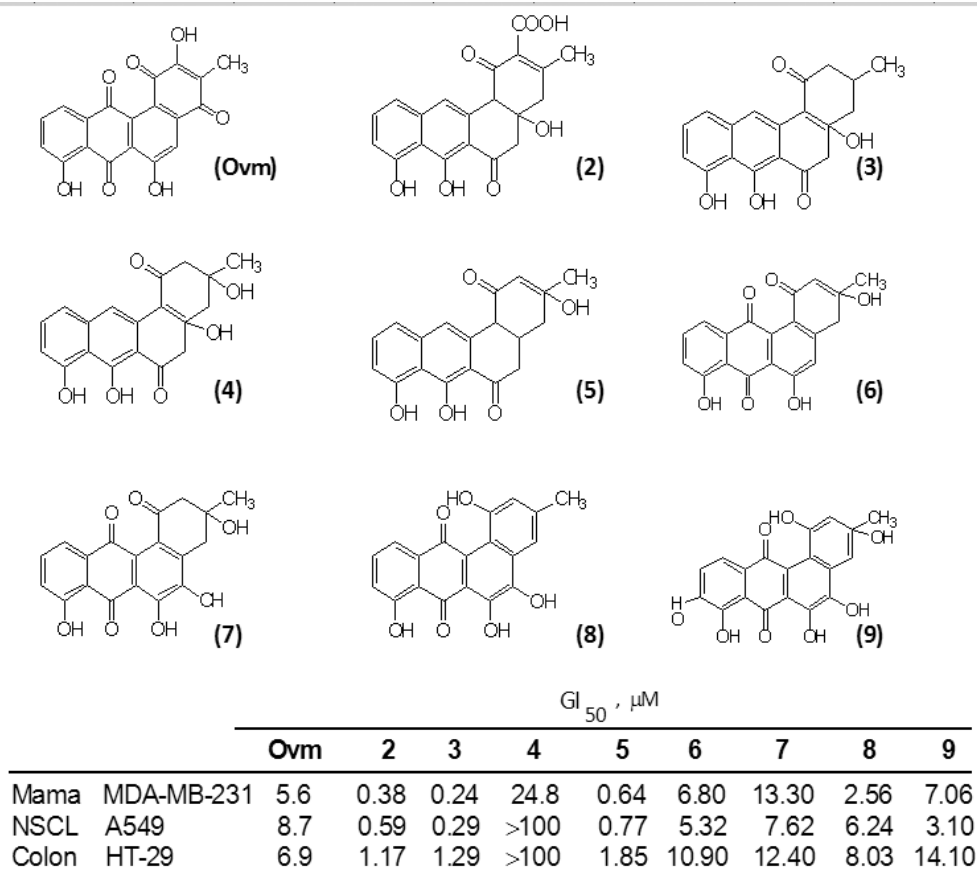


Figura 2. Estructura química de la oviedomicina (ovm) y algunos derivados generados mediante biosíntesis combinatoria y determinación de la GI₅₀ frente a tres líneas celulares tumorales

Biosíntesis combinatoria y generación de nuevos derivados de mitramicina

La mitramicina (marca registrada como Plicamicina) es un compuesto antitumoral perteneciente a la familia del ácido aureólico (Fig. 3). Es sintetizada por *Streptomyces argillaceus* y presenta aplicación clínica en el tratamiento de algunos tumores testiculares, enfermedad de Paget, hipercalcemias e hipercalcurias (Lombó et al., 2006b). La ruta de biosíntesis de mitramicina en este microorganismo ha sido clonada y caracterizada (34 genes) en nuestro laboratorio y se han generado mutantes en casi la totalidad de los genes de la misma. Se han aislado y caracterizado estructuralmente los intermediarios biosintéticos

acumulados por los distintos mutantes, lo que ha permitido asignar funciones específicas a cada uno de los genes. De este modo se han aislado una serie de compuestos (Fig. 4), muchos de los cuales presentan actividad antitumoral. Uno de estos compuestos, mitramicina SK (Fig. 3), presentó mejores niveles de actividad frente a distintas líneas celulares en comparación con la mitramicina, así como menor toxicidad celular y, en particular, frente a líneas celulares de melanoma y cáncer de colon (Remsing et al., 2003; Bataller et al., 2008).

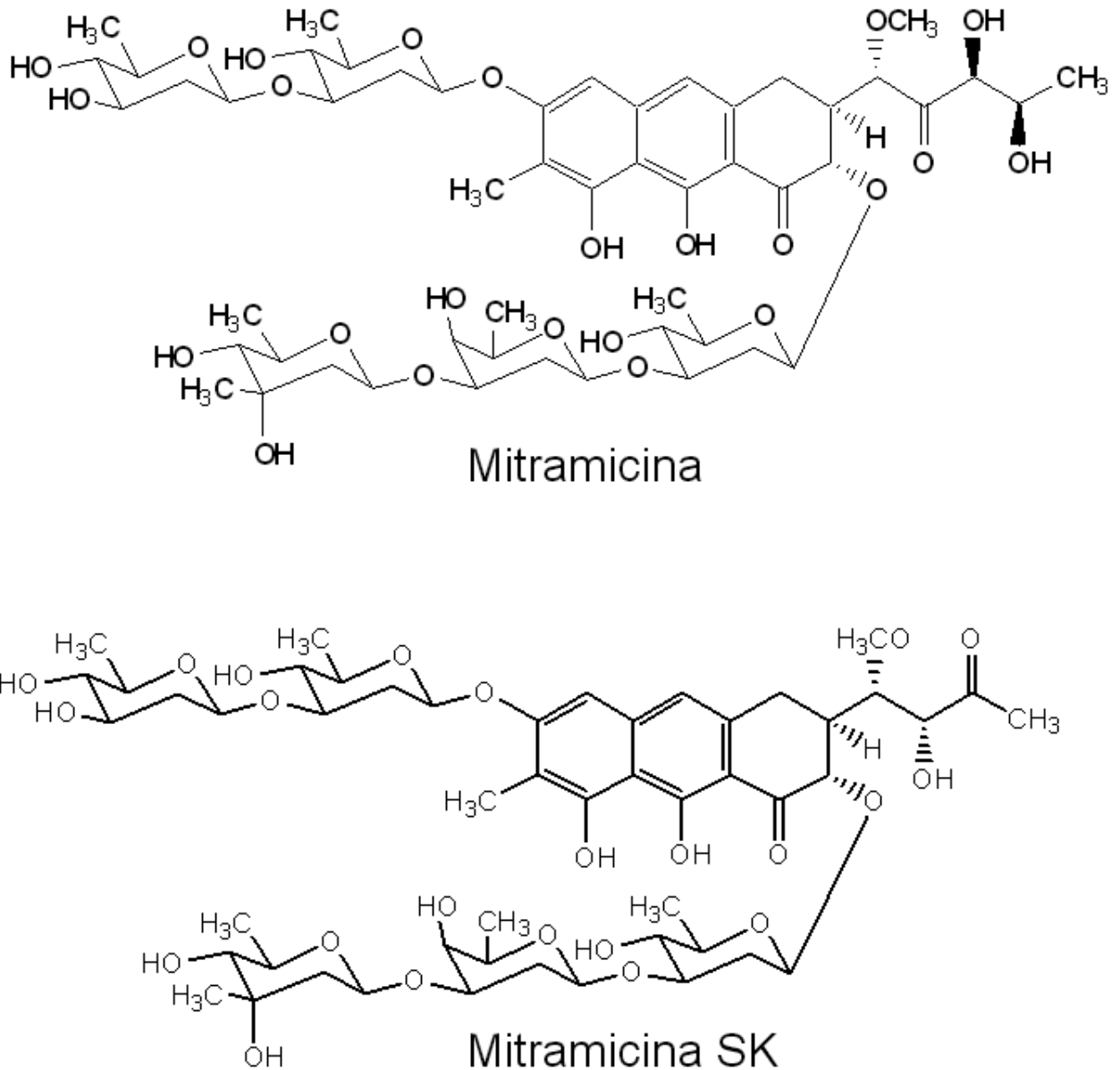


Figura 3. Estructuras químicas de la mitramicina y la mitramicina SK

La mitramicina posee en su estructura un disacárido y un trisacárido, cadenas sacarídicas importantes para su interacción con el ADN y, por tanto, para la actividad biológica. Con el fin de alterar el modelo de glicosilación de la mitramicina y de este modo generar nuevos derivados con distinto perfil de glicosilación, se introdujeron en el productor de mitramicina distintos plásmidos replicativos, cada uno de ellos capaz de conferir al huésped la capacidad de sintetizar un desoxiazúcar diferente (olivosa, micarosa, amictosa, rodinosa, etc) tanto en forma D como en forma L (Rodríguez et al., 2002; Lombó et al., 2004b; Pérez et al., 2005, 2006; Baig et al., 2008). De este modo se puede ensayar la flexibilidad de sustrato de las distintas glicosiltransferasas en cuanto al donador de azúcares. Como resultado de estos estudios se obtuvieron una serie de nuevos derivados glicosilados de la mitramicina, todos ellos presentando actividad antitumoral, y algunos con mejores índices farmacológicos que la propia mitramicina, como es el caso del derivado en el que se sustituyó el azúcar terminal del trisacárido D-micarosa por D-digitoxosa.

Biosíntesis combinatoria y generación de nuevos derivados de indolcarbazoles

La estaurosporina y la rebecamicina (Fig. 5) pertenecen a la familia de los indolcarbazoles y son sintetizados por *Streptomyces longisporoflavus* y *Lechevaliera aerocolonigenes*, respectivamente. A pesar de su semejanza estructural, poseen diferentes modos de acción. Así, estaurosporina es un inhibidor de protein quinasas, mientras que rebecamicina es un inhibidor de ADN topoisomerasas I (Sánchez et al., 2006). Todos los genes que componen las rutas de biosíntesis de ambos compuestos han sido clonados y caracterizados en nuestro laboratorio y ambas rutas se han expresado heterológamente en *Streptomyces albus*, dotando a este microorganismo con la capacidad de producir ambos compuestos bioactivos (Sánchez et al., 2002; Salas et al., 2005). Mediante biosíntesis combinatoria se han generado más de 60 nuevos

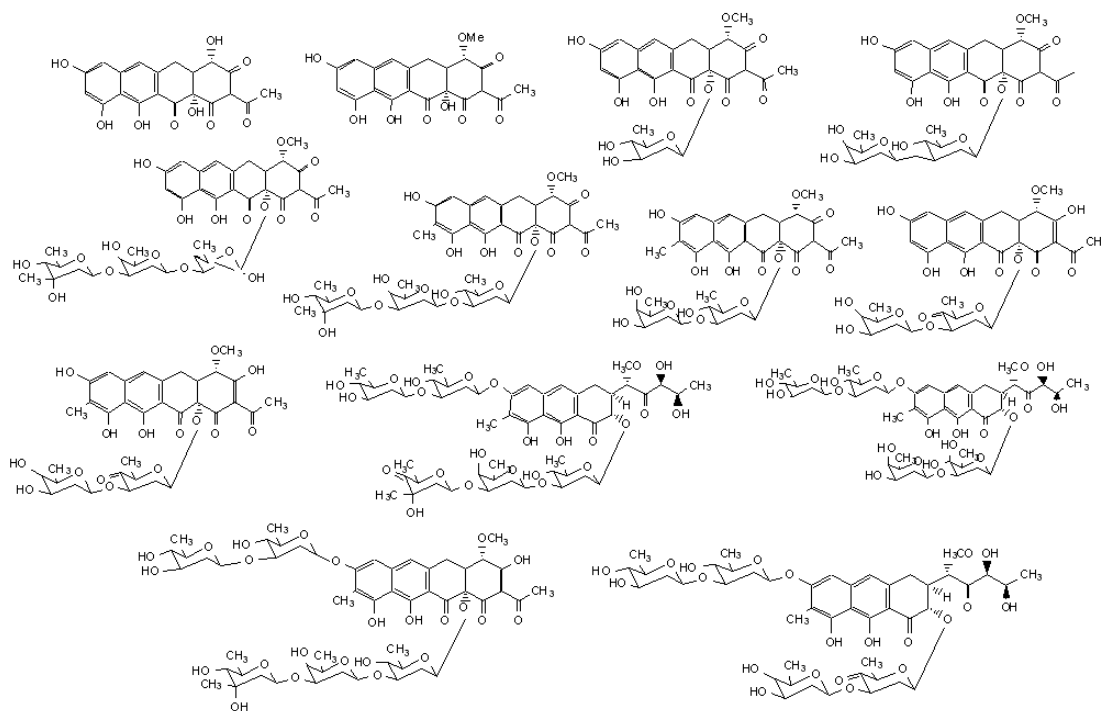


Figura 4. Estructura química de distintos derivados de mitramicina generados mediante biosíntesis combinatoria

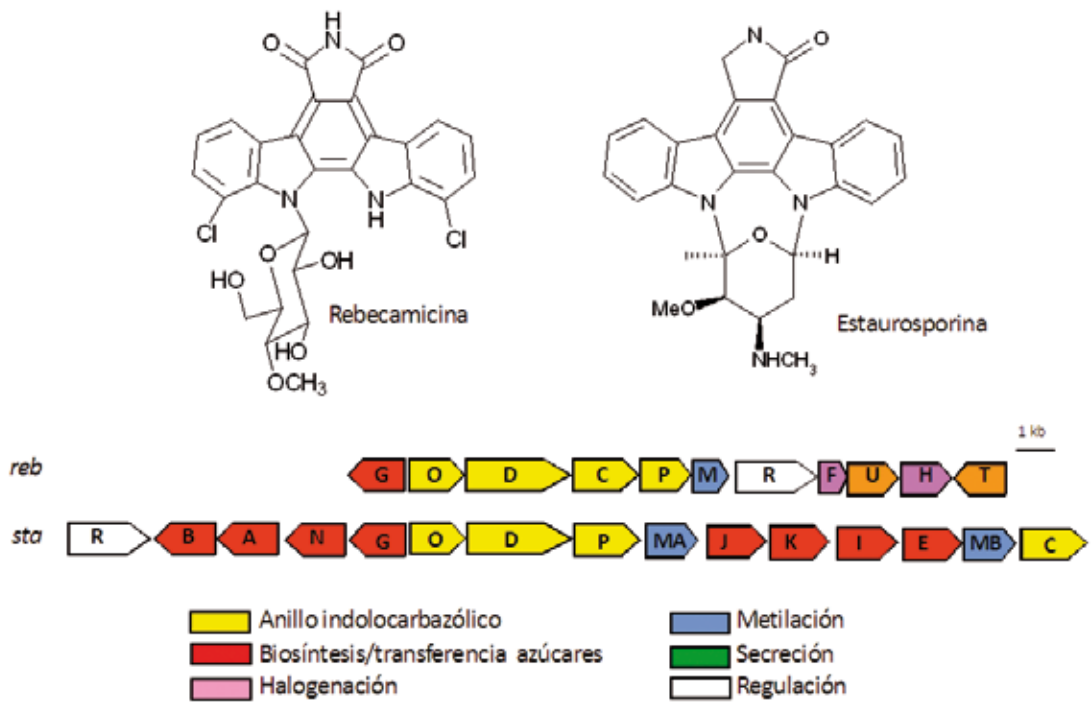


Figura 5. Estructura química de estaurosporina y rebecamicina y organización genética de sus rutas de biosíntesis

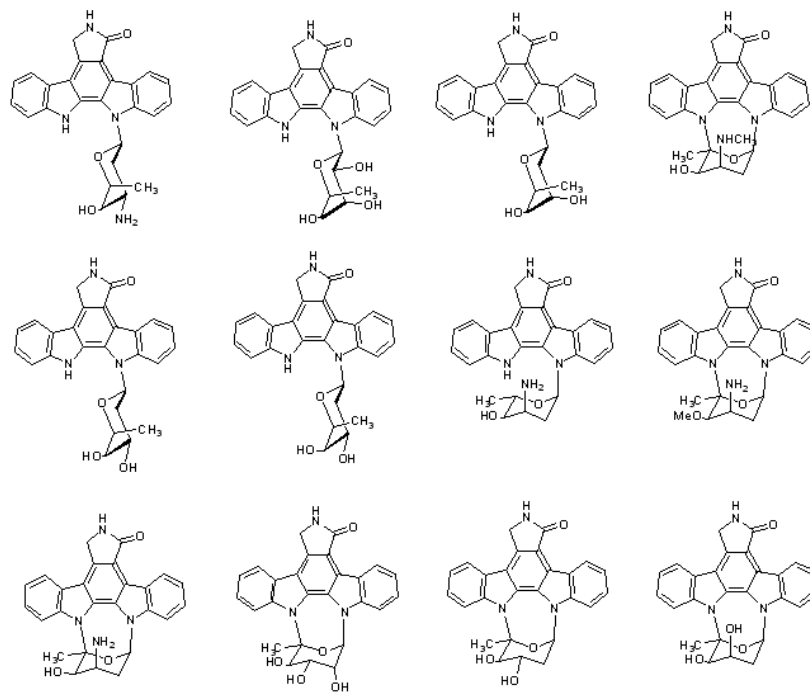


Figura 6. Derivados de estaurosporina con alteraciones en el perfil de glicosilación

indolocarbazoles híbridos entre rebecamicina y estaurosporina, conteniendo átomos de cloro en distintas posiciones de la molécula y con alteración en los perfiles de glicosilación (Fig. 6) (Salas et al., 2005; Sánchez et al., 2005, 2009; Salas and Méndez, 2009). Estos derivados han sido ensayados frente a un panel de 60 protein quinasas con el fin de detectar su actividad inhibidora y la especificidad de acción de estos inhibidores. La mayor parte de estos nuevos derivados fueron activos a concentraciones nanomolares presentando algunos de ellos especificidad de acción frente a quinasas específicas, sin causar un efecto inhibidor generalizado.

Bibliografía

- Baig I, Pérez M, Braña AF, Gomathinayagam R, Damodaran C, Salas JA, Méndez C, and Rohr J (2008). *Mithramycin analogues generated by combinatorial biosynthesis show improved bioactivity*. J. Nat. Prod. 71: 199-207.
- Bataller M, Méndez C, Salas JA, Portugal J (2008). *Mithramycin SK modulates ploidy and cell death in colon carcinoma cells*. Mol. Cancer Ther. 7: 2988-2997.
- Berdy J (2005). *Bioactive microbial metabolites*. J. Antibiot. (Tokyo) 58: 1-26.
- Lombó F, Braña AF, Salas JA, and Méndez C (2004a). *Genetic organization of the biosynthetic gene cluster for the antitumor angucycline oviedomycin in Streptomyces antibioticus ATCC 11891*. ChemBiochem 5: 1181-1187.
- Lombó F, Gibson M, Greenwell L, Braña AF, Rohr J, Salas JA, and Méndez C (2004b). *Engineering biosynthetic pathways for deoxysugars: branched-chain sugar pathways and derivatives from the antitumor tetracenomycin*. Chem. Biol. 11: 1709-1718.
- Lombó F, Velasco A, Castro A, de la Calle F, Braña AF, Sánchez-Puelles JM, Méndez C, and Salas JA (2006a). *Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor thiocoraline from a marine actinomycete and its expression in two Streptomyces species*. ChemBioChem 7: 366-376.
- Lombó F, Menéndez N, Salas JA, and Méndez C (2006b). *The aureolic acid family of antitumor compounds: structure, mode of action, biosynthesis, and novel derivatives*. Appl Microbiol Biotechnol. 73: 1-14.
- Lombó F, Abdelfattah MS, Braña AF, Salas JA, Rohr J, Méndez C (2009). *Elucidation of oxygenation steps during oviedomycin biosynthesis and generation of derivatives with increased antitumor activity*. ChemBioChem 10: 296-303.
- Madduri K, Kennedy J, Rivola G, Inveni-Solari A, Filippini S, Zanuso G, Colombo AL, Gewain KM, Occi JL, MacNeil DJ, Hutchinson CR (1998). *Production of the antitumor drug epirubicin (4'-epidoxorubicin) and its precursor by a genetically engineered strain of Streptomyces peucetius*. Nat Biotechnol. 16: 19-20.
- Méndez C, Künzel E, Lipata F, Lombó F, Cotham W, Walla M, Bearden DW, Braña AF, Salas JA, Rohr J (2002). *Oviedomycin, an unusual angucyclinone encoded by genes of the oleandomycin-producer Streptomyces antibioticus ATCC11891*. J Nat Prod. 65: 779-782.
- Pérez M, Lombó F, Zhu L, Gibson M, Braña AF, Rohr J, Salas JA, and Méndez C. (2005). *Combining sugar biosynthesis genes for the generation of L- and D-amicetose and formation of two novel antitumor tetracenomycins*. Chem Commun (Camb). 28: 1604-1606.

- Pérez M, Lombó F, Baig I, Braña AF, Rohr J, Salas JA, and Méndez C (2006). *Combinatorial biosynthesis of antitumor deoxysugar pathways in Streptomyces griseus: Reconstitution of "unnatural natural gene clusters" for the biosynthesis of four 2,6-D-dideoxyhexoses*. Appl. Environ. Microbiol. 72: 6644-6652.
- Remasing LL, González AM, Nur-e-Alam M, Fernández-Lozano MJ, Braña AF, Rix U, Oliveira MA, Méndez C, Salas JA, and Rohr J (2003). *Mithramycin SK, a novel antitumor drug with improved therapeutic index, mithramycin SA, and demycarosyl-mithramycin SK: three new products generated in the mithramycin producer Streptomyces argillaceus through combinatorial biosynthesis*. J. Am. Chem. Soc. 125: 5745-5753.
- Rodríguez L, Aguirrezabalaga I, Allende N, Braña AF, Méndez C, and Salas JA (2002). *Engineering deoxysugar biosynthetic pathways from antibiotic-producing microorganisms. A tool to produce novel glycosylated bioactive compounds*. Chem. Biol. 9: 721-729.
- Salas AP, Zhu L, Sánchez C, Braña AF, Rohr J, Méndez C, and Salas JA (2005). *Deciphering the late steps in the biosynthesis of the anti-tumour indolocarbazole staurosporine: sugar donor substrate flexibility of the StaG glycosyltransferase*. Mol. Microbiol. 58: 17-27.
- Salas JA and Méndez, C. (2009). *Indolocarbazole antitumour compounds by combinatorial biosynthesis*. Curr. Opin. Chem. Biol. 13: 152-160.
- Sánchez C, Butovich IA, Braña AF, Rohr J, Méndez C, and Salas JA (2002). *The biosynthetic gene cluster for the antitumor rebeccamycin: characterization and generation of indolocarbazole derivatives*. Chem Biol 9: 519-531.
- Sánchez C, Zhu L, Braña AF, Salas AP, Rohr J, Méndez C, and Salas JA (2005). *Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102: 461-466.
- Sánchez C, Méndez C, and Salas JA (2006). *Indolocarbazole natural products: occurrence, biosynthesis, and biological activity*. Nat. Prod. Rep. 23: 1007-1045.
- Sánchez C, Salas AP, Braña AF, Palomino M, Pineda-Lucena A, Carbajo RJ, Méndez C, Moris F, and Salas JA (2009). *Generation of potent and selective kinase inhibitors by combinatorial biosynthesis of glycosylated indolocarbazoles*. Chem Commun (Camb). 21: 4118-4120.

HEPATITIS VÍRICA INFANTIL

Dra. Mercedes Ruiz Moreno

Servicio de Pediatría. Fundación Jiménez Díaz
Universidad Autónoma de Madrid

Introducción

Las hepatitis virales cursan con grado variable de necrosis hepática por virus preferentemente hepatotropos: virus A, B, C, D, E, F, G y TT. Solo la tercera parte de la hepatitis virales (HV) en la infancia es levemente sintomática. Cursan con aumento de transaminasas y, si persisten más de 6 meses, significa cronicidad. Las más relevantes en la infancia son las causadas por los virus A, B y C (TABLA).

TABLA.- Características generales de los principales virus hepatotropos en niños

FAMILIA	VHA Picornavirus	VHB Hepadnavirus	VHC Flavivirus
SÍNTOMAS preferentemente asintomáticos	astenia, anorexia decaimiento ictericia, nauseas	astenia, anorexia decaimiento ictericia, nauseas	astenia, anorexia decaimiento ictericia, nauseas
TRANSMISIÓN	entérica	parenteral, sexual, contactos, TP, TH	parenteral, sexual, contactos, TP, TH
CRONICIDAD	no	HC, cirrosis, CHC	HC, cirrosis, CHC
GENOMA	ARN	ADN	ARN
ANTÍGENOS	Ag VHA	Ag HBs, Ag HBc Ag HBe	core E1, E2, NS3
INCUBACIÓN	1m (15-50días)	4m (45-160 días)	2m (15-150 días)
VACUNAS	Havrix® (GSK) Vaqta® (Merck)	Engerix® (GSK) Recombivax® (Merck)	no
TRATAMIENTO	no precisa	IFN; IFN-PEG lamivudina	IFN PEG + ribavirina

HEPATITIS A

Agente causal

El virus A de la hepatitis (VHA) es una partícula esférica pequeña, de 27 nm. que no tiene envuelta. Contiene una sola banda de ARN, de 7400 nucleótidos y su estructura genómica es similar a la de otros Picornavirus, aunque se diferencia de ellos en que su replicación *in vitro* es lenta y poco eficiente. Sólo se ha identificado un serotipo humano y cuatro genotipos estables que permiten distinguir su transmisión. El VHA produce efecto citopático. La eliminación del virus *in vivo* parece estar mediada por la acción de linfocitos CD8 sobre los hepatocitos infectados.

Epidemiología

La hepatitis A es una enfermedad de distribución mundial. Las cifras de su **incidencia** están subestimadas, más de 1,5 mill/año, dado que la mayor parte de los pacientes son asintomáticos y, por lo tanto, un alto porcentaje no se detecta ni puede comunicarse a las autoridades sanitarias. Su incidencia varía desde el punto de vista geográfico, con amplias diferencias entre distintos países e, incluso, dentro del mismo país o ciudad. El grado de desarrollo sanitario, higiene y hacinamiento, influye de forma marcada en el número de infecciones: En zonas muy pobladas, con malas condiciones higiénicas, la infección es temprana, hacia los 6 años, la prevalencia es superior al 90% y es asintomática. Estas zonas de **alta endemicidad** pertenecen a parte de América del Sur y África, Sudeste Asiático y Medio Este. En ellas, la incidencia de hepatitis A varía entre 41 y 150 por 10⁵ habitantes/año. Su vía de contagio es de persona a persona, por agua y alimentos contaminados. Un segundo patrón, de **endemicidad intermedia**, aparece en zonas de Brasil, China y Latinoamérica, con mejor higiene. En ellas, los niños se infectan en la adolescencia y juventud, la incidencia varía entre 11 y 40 casos/10⁵ habitantes/año y su contagio se produce de manera similar. En países desarrollados, como Estados Unidos, Australia, Japón y Europa, con **baja endemicidad**, los adultos son los susceptibles al contagio, sintomáticos y con riesgo de infectarse al viajar a zonas endémicas. En ellos la incidencia es inferior a 11x 10⁵ (AEP Manual de Vacunas de Pediatría, 2001). La mejoría de las condiciones de higiene y la profilaxis activa y pasiva frente al VHA han reducido la prevalencia y la incidencia de la enfermedad, así como retrasado la edad del contagio. El Center Disease Control ha comunicado una disminución de la incidencia de hepatitis aguda global de 92%, desde 1995 a 2007. España se encuentra actualmente entre los países de endemicidad intermedia-baja. El Centro Nacional de Epidemiología, ISCIII, informó que en 2005 la incidencia era de 2,87 casos/100.000 habitantes.

La **transmisión** del VHA tiene lugar fundamentalmente por **vía entérica**, fecal-oral, bien por contacto de persona a persona o a través de comida o agua contaminada por vertido de residuos. El consumo de moluscos o pescado crudo infectado es un frecuente factor de transmisión, responsable en ocasiones de importantes brotes de hepatitis A.

El VHA se reproduce o replica, fundamentalmente, en el hígado de personas infectadas. Es excretado con la bilis y aparece en heces entre una y dos semanas antes de la clínica. En la semana posterior disminuye su presencia en heces y finaliza el periodo de infectividad. Los niños y lactantes suelen excretar el VHA durante un periodo más prolongado que los adultos, hasta incluso de varios meses tras el inicio de las manifestaciones clínicas.

El ARN del VHA (ARN-VHA) puede ser detectado en sangre durante todos los periodos de la enfermedad e, incluso, hasta 30 días después de su inicio, pero el contagio **parenteral** es una rareza al no haber portadores crónicos. La vía **sexual** es relevante en la adolescencia y en los expuestos a prácticas

sexuales oroanales. La transmisión **perinatal**, de la madre al feto, es escasa o ausente y su mecanismo es desconocido. El recién nacido (RN) puede infectarse durante el nacimiento, al entrar en contacto con heces maternas contaminadas. El mayor riesgo de contagio en la infancia aparece en comunidades donde suceden brotes recurrentes de hepatitis A, especialmente niños entre 3 y 5 años y sus cuidadores. El contagio **nosocomial** del VAH es poco frecuente. En niños con retraso mental, **institucionalizados**, la incidencia del VHA es mayor, dependiendo de la ocasional entrada de un nuevo residente casualmente infectado. La transmisión **escolar** de niño a niño no es usual por lo que, ante la aparición de varios casos en un mismo centro, debe investigarse una posible fuente de infección común. Todas estas poblaciones constituyen grupos de riesgo de infección por VHA y habría que considerarlas en un programa sistemático de profilaxis activa.

Clínica

Tras un periodo medio de incubación de 28 días (rango, 15-50), la enfermedad se puede presentar con o sin síntomas. Cuando es sintomática se identifica como forma aguda y cursa con pródromos inespecíficos, generalizados o de predominio gastrointestinal, fiebre, malestar general, astenia, anorexia, náuseas, vómitos, dolor abdominal, artralgias y mialgias. Síntomas catarrales como rinorrea, tos, fotofobia y cefalea también pueden aparecer en niños. Tras esta sintomatología inicial, ocasionalmente tienen coluria e ictericia. No es frecuente tener vísceromegalia y el número de sintomáticos aumenta con la edad. La hepatitis A es leve, e incluso inaparente, en la mayoría de los casos infantiles. Raras veces es **colestásica**, y entonces cursa con ictericia prolongada que puede acompañarse de prurito y siempre con buena evolución. Puede ocurrir **hepatitis fulminante** (0,4%, rango 0,1-2%) que depende de la edad, en < 14 años es de 0,1% y, en mayores, de 1,1%. La tasa global de **mortalidad** es de 2-4‰, siendo inferior a 1‰ en niños < 15 años y aumentando con la edad. El fallo hepático fulminante es causa de trasplante hepático. La infección puede cursar con complicaciones en otros órganos, por los inmunocomplejos, pero es rara en la infancia.

Los síntomas persisten menos de dos meses, aunque entre el 10 y 15% presenta un curso más prolongado o **recidivante**. Las recaídas son más frecuentes en la infancia y cursan con nuevo incremento de transaminasas, IgM antiVHA en suero y AgVHA en heces. Esta infección nunca se cronifica.

Diagnóstico

Se sospecha por el aumento, casi siempre casual, de aminotransferasas, entre 10 y 100xN UI/L. El incremento del tiempo de protrombina es signo de gravedad.

El diagnóstico de infección aguda se confirma con la positividad de los anticuerpos IgM frente a las proteínas de la cápsida viral (IgM antiVHA). Los anticuerpos IgG aparecen en pocas semanas del inicio de la enfermedad, son neutralizantes y proporcionan inmunidad durante toda la vida, lo que les convierte en un buen marcador de prevalencia.

Prevención

Como ya se ha dicho, la incidencia y la prevalencia de hepatitis A han ido disminuyendo en las últimas décadas en los países desarrollados pero, a pesar de ello, continúa siendo un problema importante de salud pública. Además, la población inmigrante contribuye a la difusión de la infección, al ir a lugares de baja endemicidad. Deben adoptarse mecanismos para evitar el contagio. Son de 3 tipos:

1. **Medidas generales** de educación sanitaria general y a grupos de riesgo, potabilización del agua, control de residuos, optimización de la higiene y vigilancia de seguridad alimentaria.

2. **Inmunoprofilaxis pasiva** con inmunoglobulina polivalente (IG). Es útil, y de efecto inmediato, tanto en preexposición como postexposición. Antes del previsible contacto se emplea en dosis de 0,02 ml/kg, intramuscular, con otra aplicación dentro de las dos semanas posteriores a la exposición. Protege durante 2-3 meses. Con una dosis de 0,06 ml/kg se consigue una profilaxis efectiva, de más del 85%, y su efecto es más prolongado.

3. **Inmunoprofilaxis activa**, con vacuna. Dos estrategias: vacunar a los grupos de riesgo y vacunación universal. La OMS (2002), aconsejó aplicar una u otra según la prevalencia del país. En las zonas de alta endemicidad no recomienda la vacunación universal. En zonas de endemicidad intermedia, al poder haber adultos susceptibles de infectarse, sí la aconseja. En países donde la endemicidad es baja, la OMS aconseja vacunar únicamente a los grupos de riesgo, especialmente adultos viajeros. Ocasionalmente, la profilaxis puede urgir y entonces debe ser mixta, con una sola dosis de IG y otra de vacuna.

El coste de la vacuna no debe limitar su implantación, ya que los análisis de coste-eficacia han encontrado más efectiva la vacunación universal (Comité Asesor de Vacunas de la AEP).

En España existen dos vacunas frente al VHA y ambas están inactivadas y son inocuas y seguras. La vacuna Havrix® se obtiene a partir de la cepa HM175 cuyo virus inicialmente procede de heces humanas infectadas e inoculadas en células diploides humanas. Se inactiva con formaldehído y se adsorbe con hidróxido de aluminio, como adyuvante. Tiene dos presentaciones, la pediátrica, con 720 U (ELISA) y la de adultos con 1.440 U.

La otra vacuna, Vaqta®, deriva de la cepa CR326F que procede del mono. También el virus está inactivado con formol y adsorbido con sales de aluminio amorfo como adyuvante. La dosis es de 50 U/ml y su presentación pediátrica es de 25 U.

La **pauta** para ambas vacunas es de 2 dosis, recomendando la 2ª a los 6-12 meses de la primera. Son altamente inmunogénicas y logran seroconversión con títulos altos y duraderos de anticuerpos neutralizantes. Su **inmunogenicidad** es elevada, obteniéndose niveles protectores de anticuerpos, del 97 al 100 % en niños entre 2 y 18 años, que aumentan al 100% tras la segunda dosis. En niños < 2 años de edad expuestos a contagio, se recomienda IG, ya que la presencia de los anticuerpos adquiridos de forma pasiva desde la madre podría interferir con la inmunogenicidad de la vacuna. Presentan asumibles acontecimientos adversos (AA)

La administración concomitante de otras vacunas (hepatitis B, DTPa, polio, meningocócica, Hemófilus B, fiebre amarilla y tifoidea) no interfiere con la respuesta inmune. Por ello, si se decide su uso universal, puede administrarse con comodidad y de forma simultánea dentro del calendario vacunal en niños mayores de dos años. La vacuna combinada con la de hepatitis B es igualmente inmunogénica para ambos virus y más práctica, Twinrix®, y consiste en 10mcg de AgHBs (VHB) y 360 U de la vacuna VHA. (Bernaola y cols 2009, Stojanov y col. 2008)

Tratamiento

No precisa, se recomienda barrera entérica y terapia sintomática.

HEPATITIS B

Agente causal

El virus B de la hepatitis (VHB) pertenece a la familia de los Hepadnavirus. Tiene morfología esférica y consta de una cubierta externa, en la que se localiza el antígeno de superficie (AgHBs) y una nucleocápside interna. Esta última contiene una molécula circular y parcialmente bicatenaria de ADN, con una cadena completa de 3,2 kb y otra incompleta de menor longitud, el antígeno del core (AgHBc), el antígeno e (AgHBe) y la enzima ADN-polimerasa (ADN-p) implicada en la replicación viral (Figura 1).

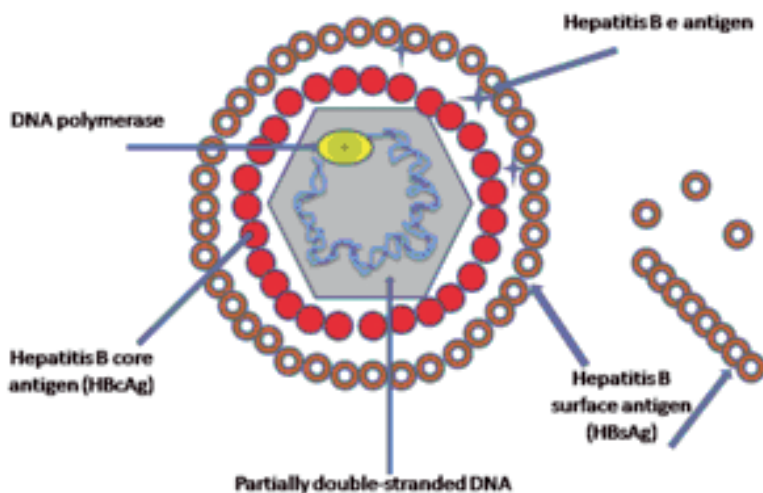


Figura 1. Virus hepatitis B

La cadena completa del ADN VHB contiene cinco secuencias de lectura abierta, tramos de codones que se solapan entre sí, denominadas S, C, P, X y la proteína procesadora de ARNm. Cada una de ellas codifica diferentes proteínas. Así, la S da lugar a las proteínas de la envuelta o AgHBs; la C, dividida en las regiones precore y core, codifica para el AgHBc y el AgHBe; la P codifica para la ADN-p y la X para una proteína denominada HBx. Se han descrito mutaciones en la secuencia de alguna de estas regiones que dan lugar a modificaciones en el producto final, con relevancia en el curso y tratamiento de la enfermedad.

El VHB no es citopático sino que la afectación hepática está mediada por el sistema inmune del huésped, fundamentalmente células T citotóxicas y citoquinas, al reconocer los antígenos diana expresados en la membrana de los hepatocitos infectados por el VHB y lisarlos.

Epidemiología

De los 2 billones de personas vivas en el mundo que han sido infectadas en algún momento por el VHB, al menos 350 millones son, en la actualidad, portadores crónicos de la infección, con una mortalidad de 6⁵-1,2⁵ mill/año. Este grupo es susceptible de desarrollar, a lo largo de su vida, complicaciones

importantes, como cronicidad (HC), fallo hepático, cirrosis o CHC (15-40% de las HC), además de constituir el reservorio viral de nuevas infecciones. El tiempo evolutivo de la enfermedad es uno de los principales factores implicados en el desarrollo de las complicaciones, motivo por el que el control de la enfermedad en la infancia es fundamental.

La **prevalencia** del VHB no es uniforme mundialmente y ha tenido un cambio sustancial desde que se aplicaron normas de detección del AgHBs en sangre de donantes, que disminuyeron la transmisión parenteral y, sobre todo, con la implantación en la infancia de la vacunación universal. Según su presencia, la **endemicidad global** se clasifica actualmente en: **alta**, > 8 % (sudeste Asiático, África, Latinoamérica, China y este de Europa), que cursa con 60% de riesgo de infección crónica y es más prevalente en niños, **intermedia**, 2-7% (sur de Europa, América, Asia Central y Medio Este), caracterizada por una tendencia a la cronicidad de 20-60% y **baja**, < 2%, más frecuente en países industrialmente desarrollados, evolución menor del 20% a infección crónica y con prevalencia en grupos de riesgo. En España, la incidencia anual actual es de 100-150 casos/10⁵ habitantes y la de portador crónico de 0,7-2% desde la vacunación universal, que comenzó en 1992 (Domínguez y col, 2008, Margolis y col, 1990, Salleras y col, 2000 y Datos de la Memoria Anual de Actividades del centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana, 1992). El AgHBs puede estar en todos los fluidos corporales y sus vías de transmisión son a través de sangre, saliva o semen. En la infancia, la vía preferente es la perinatal (TP), de madre a hijo.

Transmisión perinatal

Esta vía es importante en países de alta endemicidad. Las gestantes pueden transmitir la infección al hijo a través de la placenta, con paso del AgHBs al feto, en el canal del parto y mediante un contacto estrecho entre ambos. En caso de hepatitis aguda de la gestante, la transmisión al RN es mayor cuanto más próxima al parto haya sido la adquisición de la infección (3^{er} trimestre). En HC, la posibilidad de contagio depende principalmente del grado de replicación viral (RV). Si la infección es muy activa y la gestante, además del AgHBs tiene en suero AgHBe o ADN VHB, la tasa de transmisión oscila entre 80 y 95%. Cuando la replicación es casi inaparente y la madre es portadora del AgHBs y del antiHBe, la TP, en caso de presentarse, lo hace con una tasa inferior al 20% (0-20%). La tasa de AgHBs en embarazadas es menor del 1% en países desarrollados y, de ellas, entre 5 y 7% tienen AgHBe, así que dos de cada mil niños tendrían probabilidad de infectarse en el periodo neonatal. Por todo ello, se debe determinar sistemáticamente la presencia de AgHBs a todas las embarazadas en el tercer trimestre de la gestación y, si es positivo, aplicar profilaxis activa y pasiva al RN. La mayor frecuencia de TP ocurre en el parto, por soluciones de continuidad en la piel del RN que facilitan el contacto con sangre o fluidos maternos. Sin embargo, la práctica sistemática de cesárea no disminuye la tasa de TP, por lo que no está contraindicado el parto vaginal. El AgHBs está también en la leche materna pero tampoco la lactancia artificial ha disminuido el porcentaje de transmisión de la infección.

La TP suele cursar con inmunotolerancia viral, lo que produce la referida mayor tendencia a la cronicación.

Transmisión horizontal

La infección por VHB podría ocurrir en la infancia, antes de la vacunación universal, al convivir con algún pariente infectado, a través de objetos compartidos, contaminados con sangre o secreciones. Así, en este medio familiar, el riesgo de infección entre los convivientes era cuatro veces superior al de la

población general. Un riesgo similar aparecía en instituciones cerradas, que era mayor en caso de niños minusválidos psíquicos, especialmente en el síndrome de Down, quizá por su alteración inmunitaria.

Transmisión sexual

Esta vía tiene importancia durante la adolescencia en los no vacunados, y se debe al desprecio por las normas sanitarias, específicas, de protección. La práctica homosexual aumenta el riesgo de contagio, también en adolescentes (9%), siendo factores de riesgo la promiscuidad y el sangrado, lo cual es más frecuente en el receptor sexual. Ya que la mayor incidencia sucedía entre 15 y 24 años, en 1991 se puso en marcha el programa de vacunación universal frente al VHB en adolescentes, concretamente a la edad de 12 años, consiguiéndose un descenso entre los años 92 y 96, de hasta 49% en la tasa de infección aguda en este grupo etario.

Transmisión parenteral

Desde el cribado de AgHBs en donantes, esta transmisión ha disminuido considerablemente. Sin embargo, un número impreciso de unidades de sangre podría estar contaminada al detectar solo AgHBs en donantes, situación mejorable al determinar antiHBc o ADN VHB (Sacher y col, 2000). Finalmente, procedimientos de biología molecular permitirían detectar donantes infectados con la infrecuente mutación S, incapaces de expresar el AgHBs.

También los usuarios de drogas por vía parenteral (UDVP), evolutivamente frecuente en adolescentes, son grupo de riesgo de infección (5-10%), lo cual va en aumento. El contacto accidental con material inyectable, usado y arrojado en parques y lugares públicos, ha pasado de un riesgo previo de 0,2%, a ser actualmente inaparente, por la vacunación universal en RN.

Patogenia

El VHB llega por la sangre a los hepatocitos donde se multiplica. No produce daño hepático pero presenta sus antígenos diana (HBe, HBc) en la membrana celular, que son reconocidos fundamentalmente por los linfocitos T citotóxicos que, con las citoquinas, atacan las células infectadas produciendo su lisis. Del equilibrio existente entre infección y respuesta inmunológica dependerá el curso de la enfermedad, que puede oscilar desde infección aguda, con curación completa asociada a memoria inmunológica, u ocasional hepatitis fulminante (<1%), hasta patología crónica más o menos expresiva, dependiendo de la vía de transmisión. En la TP el VHB no es reconocido por el sistema inmune, por tolerancia inmunológica del huésped al virus, dando lugar a un estado de portador crónico, asintomático, replicativo viral y sin daño hepático. Histológicamente, el hígado muestra desde leves cambios, por la inmunotolerancia, a hepatitis persistente, crónica activa y cirrosis. El carcinoma hepato celular (CHC) es más tardío.

Clínica

La infección por virus B pone en marcha la función inmunológica y puede evolucionar de forma aguda, crónica y con complicaciones.

Aguda

El periodo de incubación es de 14 a 180 días, media 60-90. Cuando la función inmunológica del huésped es eficaz, y las células T identifican claramente los antígenos diana expresados en la membrana

de los hepatocitos infectados, se produce su necrosis, manifestada con gran incremento de transaminasas, y la recuperación de la infección es completa. Sucede en 10-25% de los infectados (< 10% niños y > 90% adultos). Desaparecen los marcadores de replicación viral (AgHBe, ADN VHB) y sigue la seroconversión a antiHBe, normalización de transaminasas y mejoría de la inflamación hepática. El último anticuerpo en aparecer es el antiHBs. Los anticuerpos HBe y HBs se mantienen toda la vida e indican curación y protección frente a una posible reinfección.

Fulminante

En raras ocasiones (<1%), la infección cursa con una súbita reacción intensa de la inmunidad celular y se produce gran lisis de hepatocitos infectados, con fallo hepático, coma y muerte, salvo trasplante hepático urgente.

Crónica

Los pacientes no aclaran el AgHBs en los seis meses posteriores al contagio y siguen con afectación hepática e incremento de transaminasas. El estudio histológico evidencia daño necrótico variable. La respuesta inmunológica al VHB es insuficiente y, en una **1ª fase**, el virus está en RV activa, con ADN en cantidad $>10^5$ copias/ml. Esta fase persiste una media de 7 años, que puede ser de décadas en la TP y es asintomática y muy contagiosa, identificando a los pacientes por la historia familiar o por controles analíticos rutinarios. En niños es poco probable la afectación extrahepática.

Después de un periodo variable, sigue la **2ª fase**, o de transición, en la que produce un despertar inmunológico y mejora la respuesta defensiva. Las células T citotóxicas identifican y lisan los hepatocitos infectados, como ocurría en la hepatitis aguda. Progresivamente va disminuyendo la cantidad de ADN VHB por PCR ($<10^5$ copias/ml), se negativiza el AgHBe que seroconvierte a antiHBe e inicialmente aumenta la necrosis hepática y la ALAT. En los casos de TP la seroconversión es solo del 5% anual y oscila entre 14 y 17% en los que adquirieron la infección a una edad posterior. La **3ª fase** de la HC, de baja RV, se caracteriza por menor daño hepático, regresión de fibrosis, anti HBe, normalidad de ALAT y detección de ADN VHB (PCR) solo en tejido hepático. Es la fase de menor o nulo contagio. La desaparición del AgHBs es lenta (0,5/año) y, en su mayoría, evolucionan a la curación total, con antiHBs y antiHBe duraderos.

Complicaciones

Las principales complicaciones de la HC son: tendencia a cirrosis, mutaciones virales y asociación evolutiva con CHC.

Las **mutaciones** del VHB se producen frecuentemente, con objeto de escapar de la vigilancia inmunológica, al disminuir los epitopos. Corresponden a sustitución puntual de nucleótidos, deleciones y cambios de las secuencias de aminoácidos, con la consecuencia de alterar la biología viral. Habitualmente, en el mismo huésped existe población viral mixta, un grupo de VHB salvaje y un grupo mutado. La mayoría de las mutaciones son abortivas y no progresan, pero existen algunas que sí lo hacen. La **mutación en la región preS/S** es muy antigénica, ya que la preS es la más variable, con el determinante "a", que es buen epítipo para los anticuerpos neutralizantes y el utilizado para la vacuna recombinante. Su mutación permite el escape de la vacuna actual. La **mutación precore**, A1896G, es un cambio de guanina por adenina, y cursa con ADN VHB y antiHBe, pero no puede codificar para el AgHBe. Provoca una patología más agresiva,

mayor tendencia a cirrosis a partir de la segunda década de la vida y peor respuesta al tratamiento. La **mutación de la proteína X** afecta al promotor del core, puede variar la replicación viral y cursa con antiHBe. Finalmente, entre las relevantes, está la **mutación del gen P**, de la polimerasa, que se ha descrito en los tratados con lamivudina que desarrollan resistencia al tratamiento; es la conocida como YMDD.

Aunque el paciente presente anticuerpos HBe y HBs, el ADN VHB puede permanecer integrado en el genoma del hepatocito desde fases anteriores, con potencial riesgo de **carcinoma hepático** en sujetos susceptibles, más frecuente en cirróticos. El genoma integrado no puede expresarse ni actuar como diana para las células T, falla el control inmunológico y el virus permanece. El riesgo de CHC aumenta con el tiempo y guarda relación con la duración de RV, lo que obliga a realizar un seguimiento a largo plazo, con alfa fetoproteína y ecografía abdominal para su detección y tratamiento precoces. La **cirrosis** y/o el CHC se presentan en el 15% de las HC y, aunque se han descrito en niños, son más frecuentes desde los 20-40 años.

Generalmente, una vez normalizadas las transaminasas y tras la seroconversión a antiHBe, el paciente suele permanecer estable indefinidamente. Sin embargo, en casos de inmunodepresión puede existir **reactivación** de la enfermedad, con alta RV, gran aumento de ADN VHB, de transaminasas y del daño histológico (cirrosis y CHC) y suele cursar con antiHBe, con o sin AgHBe. Esta situación se ha observado en 1-4% de los niños que habían seroconvertido. Otra posible complicación evolutiva de la infección crónica por VHB es la grave sobreinfección por **virus delta**, que es excepcional en la infancia.

Prevención

El control de la infección por VHB se basa, por una parte, en medidas de higiene, detección de marcadores en gestantes (1992), donantes de sangre u órganos, control de la barrera placentaria y evitar la instrumentalización en el parto y, por otra, en la inmunoprofilaxis específica, tanto activa como pasiva.

Profilaxis pasiva

Consiste en la administración de IG hiperinmune frente al VHB (IGHB). Se utiliza preferentemente en casos de post-exposición al virus, bien por hijos de gestantes portadoras de AgHBs, o en no vacunados y con contacto accidental o con familiares infectados. En la profilaxis de la TP, la IGHB se inyecta en cantidad de 0,5 ml (100U) inmediatamente al parto, y con la primera dosis de vacuna, pero en lugares diferentes del cuerpo. En los casos de contacto accidental, en personas que no estén previamente vacunadas, debe administrarse una dosis de IGHB de 0,06 ml/Kg, al tiempo de iniciar la pauta vacunal y en las primeras 48 horas tras el mismo. Es aconsejable en ellos una segunda dosis de IGHB al mes de la primera.

Profilaxis activa

Es la vacuna. Fue desarrollada a mediados de los años 70 con plasma de pacientes con HC. Desde 1989 las vacunas son recombinantes, producidas por ingeniería genética mediante la inserción del gen del AgHBs en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Inicialmente, la vacunación se dirigió a grupos de riesgo, pero era incierto el control y, desde 1991, el CDC recomendó la **vacunación universal** en la infancia, considerando prioritarios los RN, por su mayor evolución desfavorable, y los adolescentes, por su mayor frecuencia. En adultos, la vacunación es necesaria sólo en los **grupos de riesgo**, tanto de infectarse como de ser portadores crónicos. Con la

vacunación universal se ha conseguido reducir el porcentaje de niños con AgHBs sérico, de 10,5% a 1,7%. Por otra parte, la incidencia del CHC en niños de 6 a 9 años, nacidos entre 1974-1984, desde 0,52/10⁵ ha disminuído a 0,13/10⁵ en los nacidos entre 1984 y 1986.

Hay dos vacunas, Engerix-B®, 10 mcg para menores de 10 años (0,5 ml) y 20 mcg (1ml) para mayores y la HB Vaxpro®, pediátrica con 5 mcg (0,5 ml) y de adultos 10 mcg (1ml). La pauta general de administración consiste en tres dosis, con un intervalo de uno o dos meses entre la primera y la segunda y de unos seis meses con respecto a la tercera. En los recién nacidos la vacunación universal consiste en una primera dosis, al nacimiento y, las otras dos, coincidiendo con la primera y tercera dosis de las demás vacunas del calendario.

Para evitar la TP la mejor inmunoprofilaxis es la combinada, activa y pasiva, mediante la administración de IGHB y vacuna en hijos de portadora, lo cual reduce el riesgo a menos del 5%, que es motivado, quizá, por contagio intraútero o por tener la gestante un VHB mutante S.

En hijos de madres portadoras de AgHBs se ha recomendado la segunda dosis de vacuna al mes de la primera y, si fuera prematuro, una dosis neonatal a partir de los 2 kg de peso y las otras 3 dosis según lo habitual. Diversos estudios han demostrado similar capacidad antigénica, igual tolerancia, duración y eficacia cuando se emplean otras pautas. La respuesta a la vacuna es del 99% cuando se vacunan niños y preadolescentes entre 2 y 19 años y no es necesaria una revacunación posterior. En los RN la respuesta es del 95% y los prematuros precisan control a los 6 meses de la 3ª dosis. En general, títulos protectores (antiHBs >10U) aparecen a las 2 semanas de la 2ª dosis, con eficacia variable en inmunodeficientes y pacientes en diálisis. Los AA son discretos.

Existen vacunas combinadas, A+B, Twinrix®, y con DTPa, VPI, HiB y HB, Infarix®, igualmente eficaces, inocuas y seguras. Puede administrarse simultáneamente con otras vacunas.

Tratamiento

En estas infecciones virales es importante la aplicación de medidas higiénicas universales, terapia sintomática y evitar fármacos con toxicidad hepática (alcohol, aflatoxina). Ocasionalmente, en caso de complicaciones, es necesaria la hospitalización del enfermo. Si el curso es fulminante se precisará trasplante urgente. La HC en fase de RV y daño hepático sí debería tratarse, para acortar la replicación del VHB, disminuir la potencial infección, selección de mutaciones, evolución a cirrosis y a CHC, reservorio infectivo del VHB y control de su difusión.

Aunque se han ensayado muchos tratamientos, es el interferón alfa (IFN*) obtenido por ingeniería genética, solo o pegilado (IFN PEG) y la lamivudina, análogo de nucleósidos, los más empleados. El primero no es suficiente en el 50-60% de los casos y tiene efectos adversos destacados. La lamivudina interfiere en la actividad de la enzima transcriptasa reversa, es bien tolerada y de administración oral, aunque a veces su efecto finaliza con el tratamiento, crea resistencias y se ha vinculado a mayor aparición de mutantes virales, en concreto del gen de la polimerasa, mutación YMDD. Existen otros análogos a nucleótidos con resultados prometedores.

La respuesta al tratamiento se define por el aclaramiento de los marcadores virales de replicación, seroconversión a antiHBe, normalidad de transaminasas y mejoría de la lesión histológica. Se debe hacer un seguimiento a largo plazo clínico, serológico, bioquímico y con pruebas de imagen, para diagnóstico y tratamiento precoces de las complicaciones referidas.

HEPATITIS C

Agente causal

El virus C de la hepatitis (VHC) pertenece a la familia Flaviviridae. Se identificó en 1987 por científicos dirigidos por Bradley, del CDC y Houghton de Chiron Corp. Desde entonces, con aplicación de técnicas de biología molecular, secuenciaron los aminoácidos del ARN VHC. Por clonación molecular estudiaron el virus con detalle y desarrollaron técnicas, progresivamente con mayor sensibilidad y especificidad, para detectar los anticuerpos. Su aplicación para el cribado de sangre de donantes hizo que el riesgo del contagio parenteral cayera drásticamente.

Es un virus envuelto y esférico, de un diámetro aproximado de 50 nm. La cápside proteica, de forma icosaédrica, protege al genoma, formado por una sola cadena de ARN de polaridad positiva, de 9,6 Kb (Figura 2). Contiene un marco de lectura abierta, que codifica para una poliproteína precursora de 3010-3037 aminoácidos que, por acción de proteasas, produce tres proteínas estructurales, que forman las partículas virales: core (C), envuelta (glicoproteínas E1 y E2), que están cerca del extremo 5' terminal (5'NCR). El péptido de membrana p7 las separa de las 6 proteínas no estructurales: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B, adyacentes a una región 3' (3'NCR). Los extremos 3' y 5' son secuencias no codificadoras que flanquean la lectura abierta. La porción 5'NCR es una secuencia muy bien conservada que inicia la traducción, RV y ensamblaje del genoma. Todas las proteínas tienen funciones concretas. Este

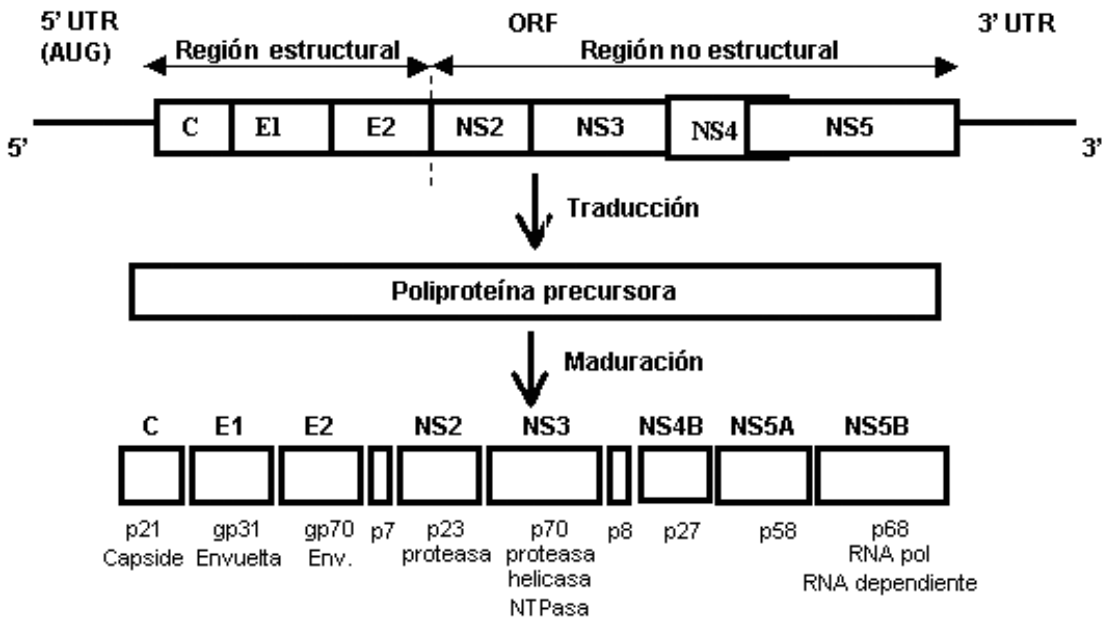
Figura 2. Partes del genoma del VHC y proteínas codificadas.

ORF: marco de lectura abierta.

5'UTR y 3'UTR: proteínas no codificantes.

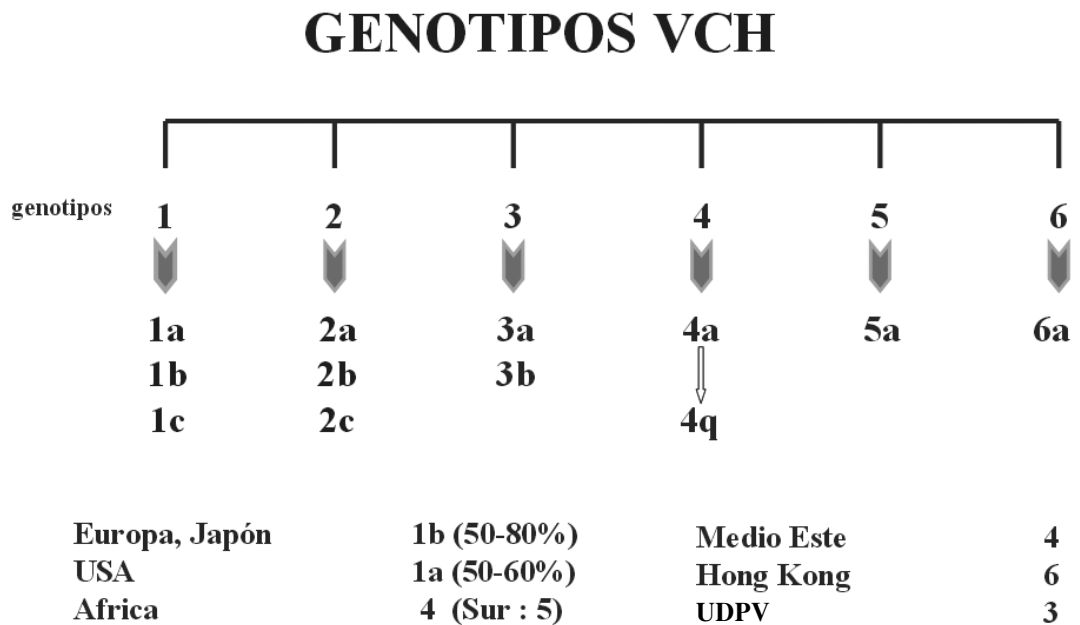
Proteínas estructurales: C, core; E1 y E2, glicoproteínas de la envuelta

Proteínas no estructurales: 6 NS (2-5)



genoma se caracteriza por una significativa heterogeneidad genética y de las proteínas codificadas, lo cual repercute en la biología viral, selección de mutantes con facilidad para el escape inmunológico, dificultad para la obtención de vacuna y tendencia a la cronicidad. El gen E2, hipervariable (HVR1) cambia mucho genéticamente y el core y las regiones 3' y 5' NCR están conservadas. Las mutaciones E2 contienen epítomos de neutralización del virus, función que evitan sus mutaciones. Según la secuencia de nucleótidos se han determinado 6 genotipos (1-6) del VHC divididos en más de 100 subtipos (letras minúsculas), dentro de los que además se reconocen diversas quasiespecies (Figura 3). La homología de los genotipos es del 66-69%, la de los subtipos de 77-80% y la de las quasiespecies del 98%. Esta caracterización viral, de los genotipos, subtipos y quasiespecies, ha permitido conocer mejor la biología del VHC, su prevalencia, vías de contagio, mecanismos de tendencia a la cronicidad y resistencia al tratamiento.

Figura 3. Variedad genética del virus hepatitis C e implicaciones epidemiológicas



Dusheiko G et al, 1994 / Castillo I et al, 1995 / Davidson F et al, 1995 / Bortolotti F et al, 1996

Epidemiología

La prevalencia se conoce mediante determinación de anticuerpos por técnicas de EIA-3, preparados con Ag derivados del genotipo 1a y, en el futuro, de un Ag de fusión, quimérico, con múltiples epítomos, lo cual aumentará su sensibilidad y especificidad. Se estima en 130-170x10⁵ portadores (2-3% de la población mundial), con diferente distribución geográfica, p.e. en Europa y USA, más del 80% son del grupo 1a o 1b. La prevalencia en la infancia es baja, entre 0,1 y 0,4% en el mundo occidental y de 0,5 a 2% en la población general. La prevalencia en España es intermedia, de 1-2,6%, el genotipo más frecuente el 1b, la tasa de cronicidad 80%, con una incidencia, en 1997, de 6,62 y, en 2003, de 2,3x10⁵ habitantes.

Transmisión

El VHC se contagia por vía parenteral, sexual, TP y contacto familiar. Este aspecto ha variado sustancialmente en los últimos años con la implantación de medidas generales de detección de portadores e incentivación de hábitos higiénicos.

Parenteral

Esta vía ha sido importante a través de transfusiones o trasplantes, en hemofílicos, neoplásicos, dializados y drogadictos (40-80%) pero, a partir de la introducción en 1990 de la identificación de técnicas de cribado, su riesgo ha descendido drásticamente tras transfusiones, <2%, y por pinchazos accidentales, 2-4%, pero persiste alta en los UDPV (40%) que posiblemente continuará, siendo la fuente prevalente de infección actual y, con ello, de TP.

Perinatal

El riesgo global se estima en 5-6%, con un rango entre 0 y 25%. El RN puede adquirir la infección en la gestación, durante el parto o después. Hay factores que la incentivan: nivel alto de ARN materno en el parto (3-7%), coinfección con el VIH (10%) y menor número de quasiespecies del VHC en RN que en sus madres. Si bien hay correlación entre el tiempo de rotura de membranas y la tasa de infección por VHC, no hay evidencia de que disminuya con cesárea o lactancia artificial. Prácticamente, la TP es la única vía relevante en niños.

Una madre que ha tenido un niño infectado por VHC no tiene mayor riesgo de infectar a un segundo hijo, ya que la duración de la infección materna no parece ser factor de riesgo de TP.

No percutánea

Es infrecuente y poco importante, menor que la del VHB, incluso en niños. La vía sexual es posible, con una prevalencia del 5% y otra posible, es la práctica de tatuajes o colocación de *piercing* en adolescentes.

Transmisión desconocida

En la mayor parte de los casos de hepatitis C, diagnosticados en menores, no es posible identificar algún factor de riesgo ni la vía de infección, aspectos que también ocurren en el 10% de los pacientes adultos.

Clínica

La infección por VHC puede presentarse con un curso agudo, difícil de precisar por su falta de síntomas, con importante progresión silente a la cronicidad (50-85%), tanto en niños como en adultos. En la infancia es infrecuente la complicación con hepatitis fulminante y sí es posible un estado de portador asintomático. La persistencia de RV e incremento fluctuante de ALAT dura muchos años, sin tratamiento. Entre 1/3 y 1/5 de HC evolucionan a cirrosis y el 15% de ellos a CHC, pero siempre en tejido cirrótico.

El curso de la infección puede depender de factores atribuibles al VHC y otros relativos al huésped. Entre los segundos, el estado inmunológico, coexistencia con otras patologías y exposición a otros virus o tóxicos, como alcohol, en adolescentes. Entre los factores virales: genotipo viral, (siendo el subtipo 1b el más frecuente, de mayor efecto patogénico y el que responde peor al tratamiento antiviral), tamaño del inóculo, carga genómica, presencia de mutantes y tasa de mutaciones, complicación tan importante en este virus.

Se considera HC por TP cuando persiste la RV a los 3 años de vida. Cursa con niveles bajos y fluctuantes de ALAT y ARN VHC en suero e hígado, asocia daño histológico leve-moderado, evoluciona silenciosamente a HC y no suele asociar complicaciones.

En niños con HC VHC es posible detectar autoanticuerpos no organoespecíficos, incluso del tipo anti-LKM1, hasta en el 10% de los casos, aunque a unas concentraciones muy bajas. La razón para ello pudiera ser la similitud inmunogénica entre el genoma viral y el antígeno contra el que van dirigidos dichos anticuerpos, lo que podría provocar una inmunogenicidad similar. Para diferenciar estas dos entidades es útil valorar el nivel de anti-LKM1, alto en las hepatitis autoinmunes II, la severidad de la histología hepática y determinar la reactividad de anticuerpos al citocromo CYP2D6.

Diagnóstico

Los marcadores diagnósticos de infección por VHC son anti VHC, por EIA 3 (70%), aumento de ALAT y presencia de ARN VHC por PCR (único en inmunodeprimidos). Solo es preciso conocer el genotipo y subtipo en caso de tratamiento o investigación y, entonces, también la cuantificación de ARN VHC, que oscila entre 10^4 - 10^6 UI/ml. La TP se sospecha por la historia materna, chequeo en el lactante al tercer mes (ARN VHC y ALAT) y también anti VHC a los 18 meses, ya que hasta entonces pueden detectarse anticuerpos maternos. Los inmunodeprimidos o coinfectados con VIH no forman anti VHC, y solo presentan ARN VHC en suero. La biopsia hepática debería realizarse para comprobar daño histológico y decidir tratamiento. Suele haber leve citolisis lobulillar, inflamación portal y fibrosis, que aumenta a partir de los 10 años. Imprescindible un seguimiento clínico y de ALAT cada 6 meses, control, con FibroScan, de la progresión a fibrosis y ecografía y α fetoproteína para el CHC.

Pronóstico

La infección por VHC evoluciona con mayor agresividad en pacientes multitransfundidos, talaémicos, hematológicos, hepatópatas y con patología oncológica, lo que puede relacionarse con la enfermedad primaria, estado inmunológico del huésped y sobrecarga de hierro en tejido hepático. A pesar del peor pronóstico en estos casos, su curso sigue siendo relativamente benigno en la infancia. No suele acompañarse a esta edad de daño orgánico extrahepático.

Prevención

En la actualidad no se dispone de vacuna anti VHC, debido a su gran heterogenicidad viral y capacidad mutagénica. La Asociación Americana de Pediatría (AAP) y el CDC han publicado recomendaciones preventivas para evitar los factores de riesgo anteriormente explicados. Además de aplicar los controles en inóculos parenterales y educar acerca de la conducta social y sexual a los adolescentes y drogadictos por vía intravenosa, se debe proporcionar a la población medidas higiénicas suficientemente seguras que permitan a los pacientes crónicos, fundamentalmente niños, integrarse en una vida normal, sin complejos

ni exclusión personal en sus ambientes sociales, escolares o profesionales. Las autoridades sanitarias no han legislado concretamente en este último aspecto.

Profilaxis pasiva

La IG no ha dado resultado en la prevención pre o post-exposición. Algunos datos sugieren que los anticuerpos anti VHC pudieran ser protectores, al menos cuando se administran en forma de preparación policlonal de inmunoglobulinas procedentes de múltiples donantes, infectados con diferentes genotipos y quasiespecies, pero no es completamente seguro.

Profilaxis activa

Debido a su alta tasa de cronicidad, hipotético diagnóstico, limitada eficacia del tratamiento actual en el genotipo más frecuente y los AA de la medicación, la **vacuna** supondría una estrategia rentable para el control de la enfermedad. Debería dirigirse a grupos de riesgo, según prevalencia (UDVP u oral, personal sanitario, pacientes en hemodiálisis y los que requieran transfusiones múltiples). Sería razonable, a pesar del bajo riesgo de transmisión, vacunar a las parejas sexuales de pacientes infectados y, en cualquier caso, a los hijos de gestantes con ARN viral.

Su desarrollo es difícil por las características del VHC y su facilidad para el escape inmunológico. La presión inmunitaria sobre las glicoproteínas E1 y E2, especialmente de la región hipervariable RHV1, generan mutaciones que, como resultado, evitan la inmunovigilancia, provocan cronicidad de la infección, resistencia al tratamiento y dificultad para la obtención de una vacuna eficaz. Los objetivos que se persiguen con los estudios de producción de vacuna son de dos tipos, prevenir el contagio o evitar la evolución a la cronicidad y al CHC; para ello debe inducir amplia y fuerte respuesta de células T específicas, T CD4 y T CD8, linfocitos T citotóxicos y citoquinas respectivas, que eviten la infección potencial de los genotipos, subtipos y quasiespecies del VHC.

Se han superado dificultades importantes para el estudio concreto biológico del virus: disponibilidad de animales de experimentación y, desde 2005, un medio adecuado de cultivo. Desde entonces se está más cerca de la obtención de una vacuna adecuada, pero aún lo suficientemente lejos para su aplicación en humanos y queda mucho camino hasta lograr el desarrollo de una vacuna eficaz y segura frente al VHC.

Con objeto de obtener la vacuna se han utilizado diversas estrategias, entre las que destacan:

1. Subunidades proteicas: glicoproteínas recombinantes de la envoltura o de la cápside, con adyuvantes facilitadores para obtener respuesta inmunitaria duradera.
2. Partículas semejantes a virus.
3. Vacunas basadas en péptidos sintéticos del VHC, con epítomos de células T y adyuvante sintético.
4. Vacunas con células dendríticas o macrófagos, madurándolas con péptidos y proteína core y transfiriéndolas a vectores (virus o bacterias).
5. Proteína de fusión NS3-core, utilizando para su expresión levadura recombinante.
6. Vacunas con ADN, combinándolo con diferentes compuestos: proteínas recombinantes, variante reducida de la proteína del core, plásmidos con expresión de antígenos estructurales y no estructurales o plásmidos con citoquinas.
7. Estrategias con ADN recombinante para la sensibilización y, como adyuvantes, proteínas virales o citoquinas para efecto de mantenimiento o recuerdo.

Las respuestas a todos los ensayos han sido parciales, provocando diferentes cantidades de anticuerpos neutralizantes con distinta función *in vitro* e *in vivo* y duración limitada.

En cuanto a la prevención de la progresión de la severidad de la HC del VHC, los pacientes deben vacunarse contra los virus A y B de la hepatitis, tratarse las enfermedades hepáticas concomitantes y evitar tóxicos hepáticos.

Tratamiento

En adultos sí está indicado, tanto en hepatitis agudas como en crónicas, por la tendencia a complicaciones importantes y por disminuir la tasa de cronicidad anual. Los niños tienen igual tratamiento pero no está indicado por debajo de los 3 años de edad, por posible daño neurológico, ni en casos de infección aguda. Tampoco se debe tratar a embarazadas ni aplicar procedimientos obstétricos invasivos. En este último caso, si la gestante tuviera además VIH (riesgo de TP de 19%) habría que tratarla con antirretrovirales y estaría indicada la cesárea.

El tratamiento, al igual que en los adultos, ha sido aprobado por la FDA. Consiste en la asociación de IFN PEG (2a o 2b) 1-1,5 mcg/kg/semana, IM, con rivabirina, 15mg/kg/día, oral, lo cual es bien tolerado en general, aunque precise de estricto control clínico, por las complicaciones de estos fármacos. También debe controlarse la carga viral, comprobando su disminución, a las 4 y 12 semanas. Si el genotipo es 1 o 4, el tiempo de tratamiento será de 48 semanas, si es 2 o 3 la duración puede ser de 24. La eficacia (negativización del ARN VHC tras 6 meses de finalizar el tratamiento y biopsia normal) es del 50% para los genotipos 1 y 4 y del 100% para el resto. Los coinfectados con VIH deben recibir previamente antirretrovirales.

CONCLUSIONES

La frecuencia de infección por **VHA** ha disminuído tras adoptar medidas generales de higiene, inmunización pasiva pre y postexposición y vacunación de grupos de riesgo. No obstante, sigue siendo un problema importante de salud pública. La edad de contagio ha ido retrasándose y es excepcional en la infancia en países desarrollados, siendo amenaza para los viajeros a zonas de alta endemidad. La vacuna es eficaz, inocua, segura y de efectos duraderos.

El reservorio actual del **VHB** lo constituyen los infectados previamente a la aplicación universal en la infancia de la vacuna y los grupos de riesgo que, tras el cribado en sangre de donantes, queda limitado en la práctica a los UDVP e inmunodeprimidos, no respondedores a la vacuna. Aún existe el riesgo de transmisión perinatal de la madre infectada a su hijo recién nacido, pero la combinación de profilaxis activa y pasiva en él es muy eficaz. La infección puede evolucionar a la cronicidad, cirrosis y carcinoma hepático. El tratamiento disminuye el tiempo de replicación viral pero su eficacia es inferior al 40% y tiene efectos adversos, por lo que su aplicación en niños estaría indicada solamente en casos de daño hepático o evolución grave. La HC precisa un control duradero, clínico, bioquímico, con marcadores virales y pruebas de imagen.

La infección por **VHC** cursa en su mayoría de forma asintomática por lo que es difícil el diagnóstico. Su prevalencia ha descendido gracias al cribado de sangre y adaptación de medidas eficaces para esterilizar sus derivados. Sin embargo, falla la profilaxis pasiva, de IG, y hasta ahora no se ha podido obtener la vacuna, debido al extraordinario carácter mutágeno que tiene el VHC, por lo que sigue siendo un importante problema de salud mundial. El 80% de las infecciones evolucionan a la cronicidad y, aunque leves en la infancia, a partir de los 10 años de la transmisión vertical el daño hepático es mayor, pudiera evolucionar a cirrosis y, en estos, a carcinoma hepático. El tratamiento es eficaz, tanto en niños como en adultos, pero su resultado es débil para el genotipo más frecuente en España.

Bibliografía

- Bernaola E, Jiménez F, Baca M et al. *Calendario vacunal de la Asociación Española de Pediatría: Recomendaciones 2009*. An Pediatr (Barc) 2009; 70:72-82.
- Bode JG, Brenndörfer ED, Häussinger D. *Hepatitis C virus (HCV) employs multiple strategies to subvert the host innate antiviral response*. Biol Chem 2008; 389:1283-1298.
- Consenso para el tratamiento de las hepatitis B y C*. Gastroenterol Hepatol 2006; 29 (Supl 2).
- Bortolotti F, Verucchi G, Cammá C et al. *Long term course of chronic hepatitis C in children: from viral clearance to end-stage liver disease*. Gastroenterology 2008; 134:1900-1907.
- Chang MH, Hadzic D, Rouassant SH et al. *Acute and chronic hepatitis: Working Group report of the Second World Congress of Pediatric, Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2004; 39 (Suppl 2) S 584-588.
- Daniels D, Grytdal S, Wasley A. *Center for Disease Control and Prevention (CDC) "Surveillance for acute viral hepatitis- United States 2007"*; MMWR Surveill Summ 2009; 22:58:1-27.
- Domínguez A, Oviedo M, Carmona G et al. *Impact and effectiveness of a mass hepatitis A vaccination programme of preadolescents seven years after introduction*. Vaccine 2008; 26:1737-1741.
- Elisofon SA, Jonas MM. *Hepatitis B and C in children: current treatment and future strategies*. Clin Liver Dis 2006; 10:133-168.
- Gerotto M, Resti M, Dal Pero F et al. *Evolution of hepatitis C virus quasispecies in children with chronic hepatitis C* Infection 2006; 34: 62-65.
- Girard MP. *Vaccines for the future* Ann Pharm Fr 2009; 67:203-212.
- Hierro L, González de Zárate A. *Hepatitis crónica*. Pediatr Integral 2007;XI: 247-256.
- Jara P, Hierro L, de la Vega A et al. *Efficacy and safety of peginterferon-alpha2b and ribavirin combination therapy in children with chronic hepatitis C infection*. Pediatr Infect Dis J 2008; 27:142-148.
- Jonas MM *Children with hepatitis C*. Hepatology 2002; 36 (5 Suppl):S 173-178.
- Lavanchy D. *Chronic viral hepatitis as a public health issue in the world*. Best Practice and Research Clinical Gastroenterology 2008; 22:991-1008.
- Leal A, Millán A, Ruiz Moreno M. *Hepatitis víricas en la infancia*. En Carreño V, Castillo I (Eds) Hepatitis Víricas, Springer-Verlog Ibérica. Barcelona 2001:553-592.
- Sacher RA, Peters SM, Bryan JA. *Testing for viral hepatitis. A practice parameter*. Am J Clin Pathol 2000;113:12-17.
- Shah U, Kelly D, Chang MH et al. *Management of chronic hepatitis B in children* J Pediatr Gastroenterol Nutr 2009; 48: 399-404.
- Wakita T, Pietschmann T, Kato T et al. *Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned genome*. Nat Med 2005; 11:791-796.
- Zhao Z, Smith PJ, Luman ET. *Trends in early childhood vaccination coverage: progress towards US Healthy People 2010 goals*. Vaccine 2009; 27:5008-5012.

HEMANGIOBLASTOS EN TEJIDO ADIPOSO ADULTO

M^a Dolores Miñana¹, Araceli Encabo¹, Severiano Marín², Amparo Navarro¹ y Francisco Carbonell³

¹ *Fundación Investigación Hospital General Universitario de Valencia*

² *Servicio Cirugía Plástica y Reparadora. Consorcio Hospital General Universitario de Valencia*

³ *Servicio Inmunohematología. Centro Transfusiones de la Comunidad Valenciana*

En la ontogenia temprana, la hemopoiesis está estrechamente asociada con la red endotelial, tanto en los islotes hemáticos extraembrionarios del saco vitelino como en el embrión propiamente, a nivel de la aorta dorsal. Estos aspectos sugieren una muy estrecha relación entre estas dos estirpes celulares a lo largo del desarrollo, sustentando la hipótesis de la existencia de un precursor común, el denominado "hemangioblasto" (1,2).

Esta hipótesis está apoyada por estudios realizados con células embrionarias (ESC) de origen murino (mESC) y humano (hESC), y en modelos animales *in vivo*, incluyendo el pez cebra, pollo y ratón.

Usando los sistemas de cultivo de las ESC, se han aislado y caracterizado las células formadoras de colonias de blastos (BL-CFC), cuyos cultivos clonales generan células endoteliales y hematopoyéticas, identificándose con los hemangioblastos.

La identidad molecular y la plasticidad de los hemangioblastos no han sido completamente caracterizadas. Se sabe que moléculas tales como la proteína morfogenética-4 (BMP-4), el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), entre otros, están implicadas en la generación de ambas estirpes celulares (3,4). Además, la manipulación genética de las ESC ha demostrado que los genes *Fli1*, *Scl*, *Runx1*, *Hhex*, *Mixl1*, *Bmp4*, *Smad1*, *Gata2* y lisocardiolipina acetiltransferasa (*Lycat*) son esenciales en la generación de las BL-CFC (5-9). Sin embargo, aún no se sabe como estos genes y/o proteínas interaccionan entre sí y cuantos otros elementos clave son importantes en el desarrollo y diferenciación del hemangioblasto.

¿Está sustentada la hipótesis del hemangioblasto?

La existencia de un precursor común para las células endoteliales y hematopoyéticas fue postulada a principios del siglo XX. En la actualidad el término "hemangioblasto" se usa para denominar a una

célula progenitora con capacidad para generar progenitores hematopoyéticos y endoteliales. El desarrollo de la estirpe endotelial en el embrión de los vertebrados depende de los receptores tirosin-quinasa. La inactivación de los receptores tek, tie, VEGF-R1 y VEGF-R2, por recombinación homóloga, ha demostrado que estos receptores son esenciales para el desarrollo del sistema vascular del embrión, actuando cada receptor en diferentes aspectos o fases de la diferenciación endotelial (10-12). En particular, los ratones deficientes en VEGF-R2 mueren entre los días 8,5 y 9,5 de desarrollo embrionario, por la falta de células hematopoyéticas y endoteliales en el saco vitelino (10).

Esta observación sugirió que el VEGF-R2 debería expresarse en el hemangioblasto, y ser esencial para su posterior diferenciación. Sin embargo, no fue posible excluir la hipótesis de que el fallo hematopoyético fuera un efecto secundario derivado de la ausencia de un microentorno endotelial.

Para distinguir entre estas dos hipótesis, Eichmann y colaboradores (13) aislaron las células VEGF-R2⁺ del mesodermo de embriones de pollo en la fase de gástrula, antes de la formación de los islotes hemáticos, y las cultivaron en ausencia o en presencia de VEGF. Los autores observaron que en cultivos clonales, las células VEGF-R2⁺ generaban colonias hematopoyéticas y endoteliales. La decisión parece estar regulada por la unión de los ligandos al VEGF-R2. Así, la diferenciación endotelial requiere del VEGF, mientras que la hematopoyética tiene lugar en su ausencia, estando significativamente disminuida en presencia del VEGF. Por ello, estas observaciones sugieren, aunque no demuestran, la existencia del hemangioblasto.

Muchos de los descubrimientos embriológicos y moleculares se han realizado usando quimeras de ave. Con este sistema se demostró la existencia de células progenitoras hematopoyéticas intraembrionarias (14,15). La hematopoyesis intraembrionaria se inicia con la formación de "clusters" intra-aórticos estrechamente asociados con el endotelio del suelo aórtico, que migran después en forma de grupos difusos de células, denominados focos paraaórticos, hacia el mesenterio (16). Ambas formaciones celulares expresan el gen c-myb, esencial en la hematopoyesis definitiva.

Para dilucidar el origen de las células hematopoyéticas asociadas al suelo aórtico, Pardanaud y colaboradores reemplazaron los últimos somitas o el mesodermo lateral del embrión de pollo por los de codorniz, y trazaron la distribución de las células QH1⁺ (este anticuerpo reconoce tanto las células endoteliales como las hematopoyéticas en el pollo), demostrando que la vascularización del embrión procede de precursores endoteliales derivados de dos regiones distintas, del mesodermo esplacnopleural y del mesodermo paraxial. Los precursores del mesodermo esplacnopleural vascularizaron los órganos viscerales, la pared corporal, el riñón y la parte ventral de la aorta, además de dar lugar a los precursores hemopoyéticos intraaórticos, mientras que los derivados del mesodermo paraxial vascularizaron los territorios complementarios y nunca contribuyeron a la hematopoyesis (17).

Este hallazgo fue posteriormente confirmado por el equipo de Dieterlen-Lièvre. Estos autores marcaron las células endoteliales con lipoproteínas de baja densidad acetiladas y conjugadas con el colorante DiI (Ac LDL-DiI) y analizaron la expresión del VEGF-R2 y del CD45, que se expresa únicamente en las células de estirpe hematopoyética. Este estudio dinámico permitió visualizar la aparición de los primeros progenitores hemopoyéticos intraembrionarios en el suelo de la aorta. La doble tinción VEGF-R2/CD45 demostró que las células progenitoras hematopoyéticas (HSC) emergen de novo y derivan del endotelio pre-existente. Brevemente, las expresiones del VEGF-R2 y del CD45 estuvieron siempre dissociadas, y una disminución en la expresión del VEGF-R2 se observó antes y durante la emergencia de las HSC, coincidiendo el cambio de VEGF-R2 a CD45 con el inicio de la hematopoyesis. Unas pocas células situadas en la frontera entre las células aplanadas y redondeadas estuvieron desprovistas de ambos marcadores, lo que sugiere que el

VEGF-R2 se pierde antes de que se exprese el CD45. Cuando los "clusters" ya están presentes, el suelo de la aorta aparece como un mosaico de células endoteliales y hematopoyéticas situadas una al lado de la otra (18). Esta segregación anatómica de los dos fenotipos, explicaría la imposibilidad de obtener colonias mixtas *in vitro* (13). Además, en el ratón, el flk-1, específico de endotelio, y el c-kit, expresado por las HSC, parecen ser mutuamente excluyentes a nivel de los clusters intraaórticos (19). Por lo tanto, las células endoteliales homogénicas, en el suelo de la parte ventral de la aorta, exhiben características de hemangioblastos, aunque no se puede descartar que en este proceso particular de hemopoyesis intraaórtica, el elusivo hemangioblasto, pueda ser esa célula que pierde el VEGF-R2. El concepto de endotelio homogénico está también bastante fundamentado en embriones de ratón y humanos (20,21).

Los marcadores hematopoyéticos y endoteliales, incluyendo VE-cadherina, VEGF-R2/KDR, C-Myb, Runx1, Lmo2, CD31, CD34 y CD45 se expresan de forma muy solapada en la parte ventral de la aorta. Además, las células CD34⁺CD31⁺CD45⁻ aisladas del saco vitelino humano, aorta dorsal, hígado embrionario y médula ósea fetal produjeron células sanguíneas y fueron capaces de establecer cultivos hematopoyéticos a largo plazo (22). Estos resultados sugieren que al menos una parte de las células hematopoyéticas en el embrión humano y en el feto se originan de las células de la pared vascular. Así pues, las células endoteliales homogénicas exhibirían características de hemangioblastos. Todas estas observaciones en embriones de pollo, ratón y humano han jugado un papel muy importante en la evolución del concepto del hemangioblasto, y en su identificación en los sistemas de diferenciación de las células embrionarias.

Las células formadoras de colonias de blastos tienen características de hemangioblastos

Las células embrionarias se aislaron por vez primera de la masa interna de los blastocistos de ratón a los 3,5 días post-coito (dpc) en 1981 (23,24). Las ESC son células pluripotentes que, cuando se cultivan en presencia de agentes que inhiben su diferenciación, tales como una monocapa de fibroblastos embrionarios y/o el factor inhibidor de leucemia (LIF), proliferan manteniendo su capacidad para diferenciarse en cualquier tipo celular (23). La eliminación de los agentes inhibidores de la diferenciación induce a las ESC a diferenciarse de manera espontánea, siguiendo un patrón temporal de desarrollo que, en muchos casos, recapitula la embriogénesis temprana. A medida que las ESC se diferencian en suspensión forman agregados celulares tridimensionales denominados cuerpos embrioides (EB) que, con el tiempo, aumentan en número de células y en complejidad (25).

El signo cardinal de la hematopoyesis en los EB es la formación de islotes hemáticos. Este desarrollo *in vitro* sigue un patrón reproducible que recapitula aspectos de la hematopoyesis en el saco vitelino. Por tanto, el sistema de diferenciación de las ESC en células hematopoyéticas y endoteliales es una herramienta muy poderosa para el estudio de las fases tempranas, tanto a nivel celular como molecular.

Usando este sistema, el grupo de Keller demostró que las células hematopoyéticas, incluidos los primitivos eritrocitos, se desarrollaban a partir de los EB y, en respuesta al VEGF, al ligando del c-kit y al medio condicionado de una línea celular endotelial, estos precursores generaban colonias que contenían células inmaduras ó blastos que expresaban genes característicos de precursores hematopoyéticos y endoteliales, incluyendo tal-1/SCL, CD34 y flk-1, aunque no el Brachyury (Bry), un marcador de mesodermo primitivo (26).

Posteriormente, este mismo grupo demostró que al transferir estas colonias de blastos a un medio líquido que contenía factores que permitían el crecimiento de células endoteliales y hematopoyéticas, una

proporción muy significativa de colonias generaba precursores hematopoyéticos así como células adherentes con características de célula endotelial (3). Estas observaciones sirvieron para demostrar que la célula formadora de colonias de blastos (BL-CFC) era bipotente y como tal, podía representar *in vitro* el equivalente del hemangioblasto. Además, los estudios cinéticos realizados con EB demostraron que las BL-CFC con potencial para generar endotelio y hematopoyesis deben representar una población transitoria que se desarrolla en fases muy tempranas y que persiste durante un corto período de tiempo en los EB, indicando que su desarrollo debe preceder al inicio de la hematopoyesis.

Para definir con más precisión la población de hemangioblastos, los investigadores han insertado genes reporteros en distintos locus de los genes *Bry* y *Scl* (esencial en hematopoyesis) en líneas de ESC. Ello ha permitido demostrar que las células *Bry*⁺*Flk1*⁺ están enriquecidas en BL-CFC, siendo las células *Flk1*⁺*Scl*⁺ las que exhiben mayor actividad de hemangioblasto (27,28).

Casi 20 años después del aislamiento de las ESC de ratón (mESC), se pudieron derivar líneas de ESC de blastocistos humanos (hESC). Estas células expresaron marcadores de célula embrionaria, tales como SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 y fosfatasa alcalina (29). De manera similar a lo sucedido con las mESC, la diferenciación *in vitro* de las hESC constituyen un sistema apto para dilucidar los orígenes de la hematopoyesis humana. En estos últimos años se ha demostrado que las hESC generan, cuando se cultivan con líneas celulares que soportan la hematopoyesis, células CD34⁺ que dan lugar a todas las células hematopoyéticas, incluidas las de la serie linfocítica (30,31).

Más recientemente, el grupo de Civin con el sistema de ESC/EB, demostró que los hEB cultivados durante 7-12 días generaban, cuando se cultivaban en medio clonogénico sin suero, colonias de células semi-adherentes compuestas por células mesodérmicas y hemato-endoteliales, de las que surgían colonias de blastos hematopoyéticos conteniendo colonias eritroides de características embrionarias. Sin embargo, los hEB cultivados durante 12-20 días generaban colonias hematopoyéticas más maduras, expresando simultáneamente genes de la globina de origen embrionario/fetal y adulto (32). Estos resultados, aunque no demuestran la existencia del hemangioblasto, si parecen reproducir el patrón de hematopoyesis que tiene lugar durante el desarrollo del saco vitelino en humanos.

Como se ha mencionado anteriormente, la BL-CFC parece exhibir características de hemangioblasto. Usando el sistema de ESC/EB/BL-CFC, en el que la diferenciación de las hESC se ha inducido en ausencia de suero y en presencia de BMP-4, VEGF y bFGF, Kennedy y colaboradores demostraron que la capacidad formadora de las BL-CFC era máxima con hEB de 3-4 días, y después declinaba hasta ser imperceptible a los 5-6 días, justo antes del inicio de la eritropoyesis temprana y de la aparición del antígeno CD31. Sólo las células KDR⁺ de hEBs de 3 días generaron BL-CFC, que no expresaban el gen *Bry*, pero si los genes hematopoyéticos *SCL*, *GATA1*, *RUNX1*, además de *KDR* y *CD31*. El hecho de que las BL-CFC de 6 días dieran colonias mixtas de células adherentes endoteliales y no adherentes hematopoyéticas, sugiere que ellas representan la progenie del hemangioblasto humano (33).

Utilizando también un sistema libre de suero para generar los hEB a partir de las hES, pero en presencia de morfógenos y de citocinas que actúan en la hematopoyesis temprana, BMP-4, VEGF, SCF, TPO y FL, el grupo de Lanza también ha demostrado que las BL-CFC exhiben características de hemangioblastos. Al igual que lo observado por Kennedy y col. (33), las BL-CFC no expresaron el gen *Bry*, pero sí los genes implicados en la hematopoyesis. Sin embargo, el *KDR* sólo se expresó en los hEBs, probablemente reflejo de las distintas condiciones de cultivo utilizadas (34). Además, estos autores demostraron que las BL-CFC o hemangioblastos eran funcionales al contribuir en la neo-vascularización de los vasos dañados en varios modelos animales de isquemia.

Aunque está aceptado que las células que expresan el receptor del VEGF (flk1/KDR) contienen a los hemangioblastos tanto en ratones como en humanos, la gran cantidad de células KDR⁺ (10%-40%) obtenidas en el proceso de diferenciación de las hESC, ha suscitado la búsqueda de otros marcadores más específicos. En esta línea de actuación Zambidis y colaboradores han demostrado que la enzima convertidora de la angiotensina (ACE), que regula la presión sanguínea, la angiogénesis y la inflamación puede ser un nuevo marcador de los hemangioblastos obtenidos a partir de las hESC. Las BL-CFC que expresaron BB9/ACE no sólo tenían una gran actividad enzimática ACE, sino que también expresaron transcritos del angiotensinógeno, precursor que al ser catalizado por la renina es convertido en angiotensina I (ANG I), que posteriormente será catalizado por ACE convirtiéndose en el péptido bioactivo angiotensina II (ANG II). Los autores han demostrado que la inhibición de la actividad ACE o del receptor de la ANG II, reducía de manera muy severa la capacidad de los hEBs de generar colonias hematopoyéticas (35).

A pesar de los avances de estos últimos años sobre el desarrollo de la hematopoyesis, y en particular sobre la identificación del hemangioblasto, el mecanismo por el que se originan las células hematopoyéticas a partir del hemangioblasto no ha empezado a dilucidarse hasta muy recientemente. Para investigar los distintos pasos que conducen a la generación de las células hematopoyéticas, Lancrin y colaboradores (36) siguieron el desarrollo de las BL-CFC a partir de células KDR⁺ aisladas de mESC, por fotografía en modo "time-lapse". Los autores observaron que en las primeras 36-48 horas se formaba una estructura redonda muy compacta de la que surgían células redondas no adherentes que al proliferar, generaban una BL-CFC. Los análisis por citometría de flujo revelaron que en el primer día de cultivo las células eran mayoritariamente Tie2⁺ CD41⁻, y sólo unas pocas células expresaban el CD41, que define el compromiso hematopoyético, siendo la mayoría de las células al cuarto día de cultivo, CD41⁺Tie2⁻, expresando un 30% de las mismas el CD45. Estos análisis demuestran la naturaleza dinámica del desarrollo de una BL-CFC. Es interesante resaltar que en el período de los 4 días de cultivo se generaba una población celular transitoria Tie2⁺c-kit⁺, que contenía a las células CD41⁻ (de naturaleza endotelial) y CD41⁺ (hematopoyéticas). Sorprendentemente las células Tie2⁺c-kit⁺CD41⁻ expresaban factores de transcripción asociados con la hematopoyesis temprana y, en cultivo generaban células hematopoyéticas CD41⁺.

Además, estos autores, utilizando mESC de ratones *Runx*^{-/-} y *Scl*^{-/-} demostraron que Runx1 es indispensable para la generación de la hematopoyesis definitiva a partir de la población celular Tie2⁺c-kit⁺CD41⁻, mientras que Scl es un factor crítico para la generación de estas células, al no generarse BL-CFC a partir de las mESC Flk1⁺. Por lo tanto, se puede concluir que las células Tie2⁺c-kit⁺CD41⁻ constituyen una población celular de endotelio hemogénico y avalan los estudios anteriormente realizados con embriones de ratón y humanos (20,21).

Actualmente se acepta que los hemangioblastos son la primera generación de células que dan lugar a las estirpes endotelial y hematopoyética. Los últimos estudios parecen indicar que estos precursores, pasando por un intermediario celular, el endotelio hemogénico, darían lugar a la hematopoyesis definitiva. Sin embargo, hay que demostrar la funcionalidad de estas células *in vivo*.

Si bien la mayoría de estudios ha focalizado su interés en la hematopoyesis, menos atención se ha dedicado al estudio de los angioblastos, los progenitores de las células endoteliales. Se ha considerado que estos derivarían del hemangioblasto, pero los primeros estudios con embriones de ave demostraron que en la formación de la aorta intervenían dos endotelios diferentes, de los cuales, el derivado del mesodermo paraxial no tenía potencial hematopoyético (17). Estudios cinéticos realizados con mESC cultivadas sobre una monocapa de células de estroma (OP9), y uso de ratones transgénicos GFP bajo el control del promotor del gen Oct3/4 sugieren que a partir del mesodermo Oct3/4 positivo se generarían células

CD31⁻ con características de angioblastos y células CD31⁺ que exhibirían propiedades de angioblastos y hemangioblastos (37).

Hemangioblastos en adultos

Existen evidencias que apoyan el hecho de que los hemangioblastos podrían existir en la vida adulta. Así, Pelosi y colaboradores aislaron células CD34⁺KDR⁺ de sangre de cordón umbilical humano y observaron que en cultivo generaban colonias mixtas de hemato-endotelio, mientras que las células CD34⁺KDR⁻ no (38), y el grupo de Scott demostró que las HSC tanto de ratón como humanas exhibían actividad hemangioblástica al revascularizar la retina isquémica de ratones adultos (39,40). Del mismo modo se ha demostrado que las células CD133⁺ aisladas de sangre periférica movilizada se comportan en cultivo como células bipotentes (41).

A diferencia de lo que se observa con los hemangioblastos embrionarios, la mayoría de las células hematopoyéticas CD34⁺ expresa el antígeno CD45, es decir están comprometidas con la estirpe hematopoyética, y en lo que respecta a las células CD133⁺, estas están contenidas en la subpoblación celular CD34⁺.

Estos estudios demuestran que en el adulto, debe existir un pequeño "pool" de HSC que mantiene características de hemangioblasto. Si es una reminiscencia de la etapa del desarrollo embrionario, o si por el contrario permanecen en el nicho medular para generar HSC y mantener así la hematopoyesis a lo largo de la vida del individuo queda por demostrar.

Hemangioblastos en el tejido adiposo adulto

El tejido adiposo blanco está compuesto por adipocitos y una población celular muy heterogénea, denominada fracción vascular estromal (FVS). Las células de la FVS comparten muchas de las características de las células estromales, más conocidas como células troncales mesenquimatosas, de la médula ósea. Así, exhiben capacidad de diferenciación *in vitro*, tienen carácter inmunosupresor e inducen la angiogénesis en tejido isquémico, de un modo similar al inducido por las de la médula ósea (42-45).

La FVS está compuesta por una subpoblación de origen hematopoyético (CD45⁺) y otra subpoblación que contiene a las células estromales (CD45⁻), y que supone aproximadamente el 75% de toda la celularidad. Sin embargo, y a diferencia de lo que se observa en otros tejidos de origen mesodérmico, la subpoblación celular CD45⁻ puede llegar a contener hasta un 90% de células CD34⁺, incluyendo las células endoteliales CD34⁺CD31⁺ de la microvasculatura, estando la adipogénesis restringida a las células CD34⁺CD31⁻CD105⁻ (46).

De manera sorprendente, las células CD45 negativas, aisladas mediante selección inmunomagnética con un grado de pureza superior al 95% son capaces de generar unidades formadoras de colonias (CFU) hematopoyéticas cuando se cultivan en un medio clonogénico, óptimo para la determinación de progenitores hematopoyéticos, determinados como CFU, a partir de las HSC CD34⁺, con una frecuencia estimada de una CFU por cada 140.000 células CD45⁻. Asimismo, se comportan como verdaderos progenitores hematopoyéticos, al expandirse tras un período de incubación de 7 días en un medio libre de suero, que permite la expansión de las HSC CD34⁺.

En humanos la expresión de los antígenos CD34 y CD105 está restringida a las estirpes endotelial y hematopoyética, expresándose el CD105 en los precursores KDR⁺ con potencial hematopoyético durante

el desarrollo embrionario (47). Los análisis realizados han demostrado que el número de CFUs formadas se correlaciona muy bien con el número de células KDR⁺. Es más, tras el proceso de expansión en medio líquido no sólo se mantiene la correlación sino que la capacidad formadora de CFUs aumenta, pasando de 2,4 CFUs a 4,0 CFUs por cada 1.000 células KDR⁺.

Los análisis por citometría de flujo demostraron que las células CD45⁺KDR⁺ eran positivas para el CD105 y el Tie2, exhibían una baja o nula expresión de CD34 y CD31, y una variable proporción de las mismas era CXCR4 positiva.

Considerando que el VEGF-R2/KDR es un determinante molecular de los hemangioblastos y de los precursores hematopoyéticos más primitivos, que el desarrollo del tejido adiposo tanto en el período embrionario como en el adulto está íntimamente asociado al desarrollo de la red vascular, y que la vascularización es un proceso crítico para el mantenimiento de la fisiología del tejido adiposo (48,49) era tentador especular que a lo largo de la vida post-natal se hubiera preservado un "pool" de hemangioblastos, o de células con propiedades hemangioblásticas, que contribuyeran al mantenimiento de los progenitores endoteliales y hematopoyéticos.

A tal fin, en un ensayo clásico de trans migración, se sometieron las células CD45 negativas a un gradiente de VEGF. Este ensayo de quimiotaxis permitió recuperar la mayoría de las células KDR⁺. La inmunocitoquímica reveló la alta proporción núcleo/citoplasma de estas células, índice de su carácter primitivo o indiferenciado.

Se pudo observar que, cuando se cultivaban estas células, en un medio que contiene metilcelulosa y factores que permiten el desarrollo de progenitores hematopoyéticos y endoteliales, aparecían aproximadamente a los 12 días, células redondeadas que, al proliferar, formaban todos los tipos de CFU (eritroides y mieloides). Una semana después de esta primera onda hematopoyética empezaban a surgir colonias mixtas compuestas por células adherentes elongadas y células redondeadas no adherentes, que exhibían un gran potencial proliferativo. Atendiendo al número de células KDR⁺ sembradas se pudo estimar una frecuencia de 10 CFUs y 3 colonias mixtas por cada 10.000 células KDR⁺.

Para determinar la naturaleza de las colonias mixtas, se analizaron las células no adherentes por citometría de flujo, demostrándose que eran células comprometidas a la estirpe hematopoyética. Además, las colonias eritroides eran primitivas, pues la glicoforina se expresaba en células nucleadas. De manera sorprendente, estas colonias contenían un elevado porcentaje de células CD34⁺ que no expresaban CD45, por lo que se trataba de células hematopoyéticas más primitivas. Una proporción de las células adherentes expresó KDR, CD105 y CD133.

La inmunocitoquímica de las células adherentes demostró una coexpresión de CD45, CD31 y vWF, lo que evidencia el carácter mixto (hemato-endotelial) de estas células.

Las células no-adherentes hematopoyéticas de las colonias mixtas exhibieron un gran poder de proliferación al generar CFUs en cultivos secundarios. Sin embargo, a diferencia de las colonias primarias, más del 70% de las células CD45⁺ correspondieron a monocitos CD14⁺, lo que denota su mayor compromiso, o madurez. Aún así, aproximadamente un 40% de las células que todavía no expresaba el CD45 tenía un inmunofenotipo de célula inmadura, CD13⁺CD105⁺CD34⁺.

Las células adherentes cultivadas en un medio de cultivo, adecuado para la proliferación de las células endoteliales, generaron células que expresaban el CD31, vWF, captaban Ac LDL-Dil y formaban estructuras capilares, por lo que se comportaban como verdaderas células endoteliales (50).

Así pues, la FVS del tejido adiposo humano contiene, además de precursores de adipocitos y células estromales, propiamente dichas, un pequeño "pool" de precursores hematopoyéticos que, atendiendo a la ontogenia de las células hematopoyéticas, son de carácter primitivo, pues no expresan ni el CD45 ni el CD43.

Si resulta sorprendente que exista este pequeño reservorio en un tejido, que aunque de origen mesodérmico, no es hematopoyético en origen, no menos sorprendente es que existan células bipotentes de características hemangioblásticas.

La determinación de las características moleculares de estas células permitirá establecer en un futuro su desarrollo ontogénico. Ello facilitará nuestra comprensión sobre como se han mantenido en la vida adulta, que mecanismos están implicados en su regeneración, y como afecta el nicho estromal a su compromiso y diferenciación en una u otra estirpe celular.

Bibliografía

1. Sabin FR. Studies on the origin of blood vessels and of red corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. *Contrib Embryol.* 1920; 9:213-262.
2. Wagner RC. Endothelial cell embryology and growth. *Adv. Microcirc.* 1980; 9:45-75.
3. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, et al. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998; 125:725-732.
4. Lu SJ, Feng Q, Caballero S, et al. Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. *Nat. Methods* 2006; 6:501-509.
5. Hidaka M, Stanford WL, Bernstein A. Conditional requirement for the flk-1 receptor in the in vitro generation of early hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7370-7375.
6. Faloon P, Arentson E, Kazarov A, et al. Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. *Development* 2000; 127:1931-1941.
7. Chung YS, Zhang WJ, Arentson E, et al. Lineage analysis of the hemangioblast as defined by FLK1 and SCL expression. *Development* 2002; 129:5511-5520.
8. Wang C, Faloon P, Tan Z, et al. Mouse Lyscat controls the development of hematopoietic and endothelial lineages during in vitro embryonic stem cell differentiation. *Blood* 2007; 110:3601-3609.
9. Zafonte BT, Liu S Lynch-Kattman M, et al. Smad1 expands the hemangioblast population within a limited development window. *Blood* 2007; 109:516-523.
10. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376:62-66.
11. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376:66-70.
12. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Bucholz K, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995; 376:70-74.
13. Eichmann A, Corbel C, Nataf V, et al. Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 5141-5146.

14. Dieterlen-Lièvre F. On the origin of haematopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *J Embryol Exp Morphol.* 1975; 33:607-619.
15. Dieterlen-Lièvre F. Hemopoiesis during avian ontogeny. *Poultry Science Reviews.* 1994; 5:273-305.
16. Dieterlen-Lièvre F, Martin C. Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. *Dev Biol.* 1981; 88:180-191.
17. Pardanaud L, Luton D, Prigent M, et al. Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hematopoiesis. *Development* 1996; 122:1363-1371.
18. Jaffredo T, Gautier R, Eichmann A, Dieterlen-Lièvre F. Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development* 1998; 125:4575-4583.
19. Yoshida H, Takahara N, Hirashima M, et al. Hematopoietic tissues, as a playground of receptor tyrosine kinases of the PDGF-receptor family. *Dev Comp Immunol.* 1998; 22:321-332.
20. North T, Gu TL, Stacy T et al. *Cbfa2* is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. *Development* 1999; 126:2563-2575.
21. Tavian M, Coulombel L, Luton D et al. Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood* 1996; 87:67-72.
22. Oberlin E, Tavian M, Blazsek I, Péault B. Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. *Development* 2002; 129:4147-4157.
23. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292:154-156.
24. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981; 78:7634-7638.
25. Dang SM, Kyba M, Perlingeiro R, et al. Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems. *Biotechnol Bioeng* 2002; 78:442-453.
26. Kennedy M, Firpo M, Choi K, et al. A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive hematopoiesis. *Nature* 1997; 386:488-492.
27. Fehling HJ, Lacaud G, Kubo A, et al. Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development* 2003; 130:4217-4227.
28. D'Souza SL, Elefanty AG, Keller G. *SCL/Tal-1* is essential for hematopoietic commitment of the hemangioblast but not for its development. *Blood* 2005; 105:3862-3870.
29. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-7.
30. Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, et al. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98:10716-10721.
31. Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, Slukvin II. Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* 2005; 105:617-626.
32. Zambidis ET, Peault B, Park TS, et al. Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematoendothelial, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development. *Blood* 2005; 106:860-870.

33. Kennedy M, D'Souza SL, Lynch-Kattman M, et al. Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood* 2007; 109:2679-2687.
34. Lu SJ, Feng Q, Caballero S, et al. Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. *Nature Methods* 2007; 4:501-509.
35. Zambidis ET, Park TS, Yu W, et al. Expression of angiotensin-converting enzyme (CD143) identifies and regulates primitive hemangioblasts derived from human pluripotent stem cells. *Blood* 2008; 112:3601-3614.
36. Lancrin C, Sroczynska P, Stephenson C, et al. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* 2009; 457:892-895.
37. Furuta C, Ema H, Takayanagi SI, et al. Discordant developmental waves of angioblasts and hemangioblasts in the early gastrulating mouse embryo. *Development* 2006; 133:2771-2779.
38. Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, et al. Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood* 2002; 100:3203-3208.
39. Grant MB, May WS, Caballero S et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002; 8: 607-612.
40. Cogle CR, Wainman DA, Jorgensen ML, et al. Adult human hematopoietic cells provide functional hemangioblast activity. *Blood* 2004; 103:133-135.
41. Loges S, Fehse B, Brockmann MA, et al. Identification of the adult human hemangioblast. *Stem cells Dev.* 2004; 13:229-242.
42. Puissant B, Barreau C, Bourin P et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 2005; 129:118-129.
43. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7:211-228.
44. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13:4279-4295.
45. Nakagami H, Morishita R, Maeda K, et al. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler Thromb.* 2006; 13:77-81.
46. Sengenès C, Lolmède K, Zakaroff-Girard A et al. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* 2005; 205:114-122.
47. Cho SK, Bourdeau A, Letarte M et al. Expression and function of CD105 during the onset of hematopoiesis from Flk1(+) precursors. *Blood* 2001; 98:3635-3642.
48. Hausman GJ, Richardson RL. Adipose tissue angiogenesis. *J Anim Sci* 2004; 82: 925-934.
49. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, et al. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes* 2007; 56:1517-1526.
50. Miñana MD, Carbonell-Uberos F, Mirabet V, et al. IFATS Collection: Identification of Hemangioblasts in the adult human adipose tissue. *Stem Cells* 2008; 26:2696-2704.

FACTORES NEUROTRÓFICOS PARA LA SUPERVIVENCIA NEURONAL

José López Barneo

Instituto de Biomedicina de Sevilla

Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla

Avenida Manuel Siurot s/n, 41013 Sevilla, España

Teléfono: 955 012648. Telefax: 954 617301. Email: lbarneo@us.es

Introducción

Los factores neurotróficos (FNT) son pequeñas proteínas naturales necesarias para el desarrollo y la supervivencia de las células nerviosas, así como para el mantenimiento de su fenotipo morfológico y funcional. En su formulación más clásica la "hipótesis neurotrófica" postula que para la instauración y mantenimiento de las conexiones nerviosas los tejidos diana secretan sustancias que estimulan la vitalidad de las neuronas que envían fibras a los mismos, favoreciendo de este modo un balance adecuado entre el número de células que proyectan los axones y las que los reciben. La supervivencia de las motoneuronas espinales que proyectan a los músculos esqueléticos, por ejemplo, depende de FNTs producidos por el tejido muscular. Durante el desarrollo se generan en muchas zonas del cerebro mayor número de neuronas del que finalmente sobreviven, produciéndose por tanto, una "muerte neuronal fisiológica" cuyo resultado final depende de la adecuada distribución temporal y espacial de FNTs.

El concepto de neurotrofismo tiene sus orígenes en el trabajo de Santiago Ramón y Cajal y sus colaboradores quienes descubrieron los conos de crecimiento de los axones y propusieron que éstos se orientan y crecen hacia los tejidos diana "atraídos por factores quimiotácticos", en recuerdo del efecto que los focos infecciosos ejercen sobre los leucocitos de la sangre. La búsqueda exhaustiva de este tipo de factores por Victor Hamburger, Rita Levi Montalcini y Stanley Cohen condujo al descubrimiento y aislamiento del factor de crecimiento nervioso (NGF, "nerve growth factor") en la década de los años 1950 (ver Levi-Montalcini, 1987), lo que inauguró uno de los campos más activos y prometedores de la neurociencia moderna y resultó en la concesión del Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 1986 por este descubrimiento.

Actualmente existen varias decenas de factores que se consideran neurotróficos (ver más adelante), aunque la distinción entre éstos y los “factores de crecimiento” (inductores de proliferación celular) o las “neuropoyetinas” se ha desdibujado. De hecho el NGF y otras neurotrofinas pueden estimular la proliferación de algunos tipos de células. Después de más de 50 años de existencia el campo de los FNTs continúa aportando nuevos descubrimientos seminales relativos a la biología de la comunicación neuronal y al desarrollo y mantenimiento del cerebro. Además de sus efectos sobre la supervivencia celular los FNTs tiene un papel fundamental en la “calidad de vida” de las neuronas. Estos factores regulan la migración y el crecimiento neuronal (de dendritas y axones), así como las interacciones entre neuronas (sinapsis) y entre éstas y las células gliales, subyacentes a los fenómenos plásticos del cerebro como el aprendizaje o la memoria. Por tanto, los FNTs tienen un papel crítico en el mantenimiento de la función del sistema nervioso durante toda la vida del individuo (Huang y Reichardt, 2001).

Debido a las funciones biológicas fundamentales indicadas anteriormente, los FNTs están involucrados en conductas complejas cuyas alteraciones son la base de desórdenes psiquiátricos como la ansiedad, la depresión y los trastornos del aprendizaje, o de patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), entre otras. Los FNTs pueden administrarse exógenamente, bien como proteínas puras o mediante terapia génica. Además, la mayoría de los efectos de la terapia celular (con células diferenciadas o con progenitores celulares) posiblemente se deben a la liberación de factores tróficos. Debido a estas propiedades farmacológicas los FNTs se están ensayando como terapias experimentales para las enfermedades neurodegenerativas y para las lesiones medulares o la isquemia cerebral.

En este capítulo se presenta de forma resumida las características generales de los FNTs, sus acciones biológicas, y el uso de los mismos en terapias neurológicas experimentales. Posteriormente se describe el trabajo realizado por el grupo que dirige el autor y por otros laboratorios sobre el papel de los FNTs, especialmente el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, “glial cell line-derived neurotrophic factor”) en la patogénesis y tratamiento de la EP.

Características y acciones generales de los factores neurotróficos

Durante las últimas décadas se han descrito varias decenas de sustancias de naturaleza proteica con efecto neurotrófico o neuroprotector similares al NGF. Sin embargo las propiedades y acciones biológicas de muchos factores neurotróficos se mezclan con las de factores de crecimiento y de citoquinas que, muy frecuentemente, actúan sobre tejidos extraneurales. Por tanto, no existe una clasificación precisa de FNTs aunque por razones didácticas éstos podrían dividirse en: i) neurotrofinas; ii) factores de la familia del GDNF iii) otros (neuropoyetinas, factores angiogénicos, etc).

El término **neurotrofinas** se suele emplear para referirse a factores neurotróficos estructuralmente relacionados con el NGF. En mamíferos existen, además del NGF, el BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4 (NT-4), que se piensa derivan de un gen ancestral común. Las neurotrofinas son fundamentales para el desarrollo (y posiblemente mantenimiento) del sistema nervioso periférico, sobre todo las neuronas sensoriales y simpáticas. Se sintetizan en áreas de proyección de estas neuronas como por ejemplo en las glándulas salivares o en los folículos pilosos de la piel. Las neurotrofinas, especialmente el BDNF, también se expresan en neuronas del sistema nervioso central, donde pueden ejercer además efectos para o autocrinos. Las neurotrofinas se pueden sintetizar en los focos inflamatorios, ya que las citoquinas liberadas estimulan la producción de NGF por las células

gliales periféricas (células de Schwann). La producción de neurotrofinas por la glia reactiva del sistema nervioso central no parece estar definitivamente demostrada.

Las neurotrofinas ejercen su acción biológica a través de receptores Trk (“tropomyosin related kinase”), que son proteínas con un dominio transmembranario y con actividad tirosina quinasa en su dominio intracelular. El descubrimiento de estas moléculas fue una sorpresa ya que no se esperaba que los receptores de neurotrofinas (moléculas implicadas en la supervivencia neuronal) fuesen esencialmente similares (con actividad tirosina quinasa propia) a los de factores mitogénicos típicos como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Existen receptores Trk A, B y C con afinidades relativas específicas para cada neurotrofina. La unión de neurotrofinas a sus receptores pone en marcha numerosas vías de señalización intracelular (MAP quinasa PI-3 quinasa, Jun quinasa, cdc-42/ras/rho proteína G, etc) que estimulan los mecanismos de supervivencia e inhiben los procesos de muerte celular. Igualmente la estimulación de estos receptores induce la expresión de canales iónicos, enzimas para la síntesis de neurotransmisores, y otros genes que dotan del fenotipo característico a las diferentes neuronas (ver para detalles Huang y Reichardt, 2001; Segal, 2003) (Figura 1).

La acción celular de las neurotrofinas implica la unión a sus receptores (localizados en los terminales axónicos), la dimerización y la internalización, transportándose al núcleo donde ejercen su acción sobre la expresión genética. Existen numerosos datos experimentales que en el caso del NGF apoyan este mecanismo “canónico” de acción retrógrada, aunque no está definitivamente demostrado para todos los FNTs. Es incuestionable que la unión a los receptores pone en marcha, además, cascadas de señalización locales, y en el caso del BDNF se sabe que ejerce efectos rápidos sobre la actividad sináptica que ocurren en minutos y no requieren transporte al núcleo o inducción de la expresión genética (Figura 1).

Existe un segundo tipo de receptor con menor afinidad hacia todas las neurotrofinas ($p75^{NTR}$) cuya función y mecanismos de acción son menos conocidos. Las neurotrofinas se sintetizan como péptidos mayores denominados pro-neurotrofinas (o incluso pre-pro-neurotrofinas) que se activan por rotura proteolítica. Recientemente, se ha mostrado que las pro-neurotrofinas, también secretadas extracelularmente en diferentes zonas del sistema nervioso, se unen con alta afinidad al receptor $p75^{NTR}$ e inducen en las células efectos contrarios a las neurotrofinas, dando lugar a un sofisticado mecanismo de regulación recíproco en la acción de estas moléculas (Huang y Reichardt, 2001; Lu y cols., 2005). La sobreproducción de pro-neurotrofinas (por déficit del procesamiento intracelular a neurotrofinas) parece estar incrementada en algunos procesos patológicos como la EA y en daños traumáticos de la médula espinal o el cerebro.

Las neurotrofinas son necesarias para el desarrollo del sistema nervioso periférico, sobre todo los ganglios sensoriales y simpáticos. Parece que también son importantes para el mantenimiento de neuronas de la corteza cerebral, cerebelo, hipocampo y del sistema colinérgico basal. La dependencia de las neurotrofinas en diferentes grupos neuronales se ha estudiado en modelos animales con destrucción (“knockout”) de sus genes mediante recombinación homóloga en la célula germinal. Estos modelos genéticos, aunque de interés indudable, están sujetos a compensación durante el desarrollo embrionario y en algunos casos no son viables, lo que impide establecer de forma inequívoca el verdadero papel funcional del gen estudiado (ver Ibañez, 2008 y el apartado “GDNF y enfermedad de Parkinson”).

El segundo gran grupo de FNTs es el formado por el **GDNF y los miembros de su familia** (neurturina, artemina y persefina). Todos son proteínas relacionadas entre sí pertenecientes a la familia estructural del TGF β (“transforming growth factor β ”). Estos factores se sintetizan fuera del cerebro (en músculo, piel y vísceras) y son necesarios para el desarrollo del sistema nervioso autónomo (simpático

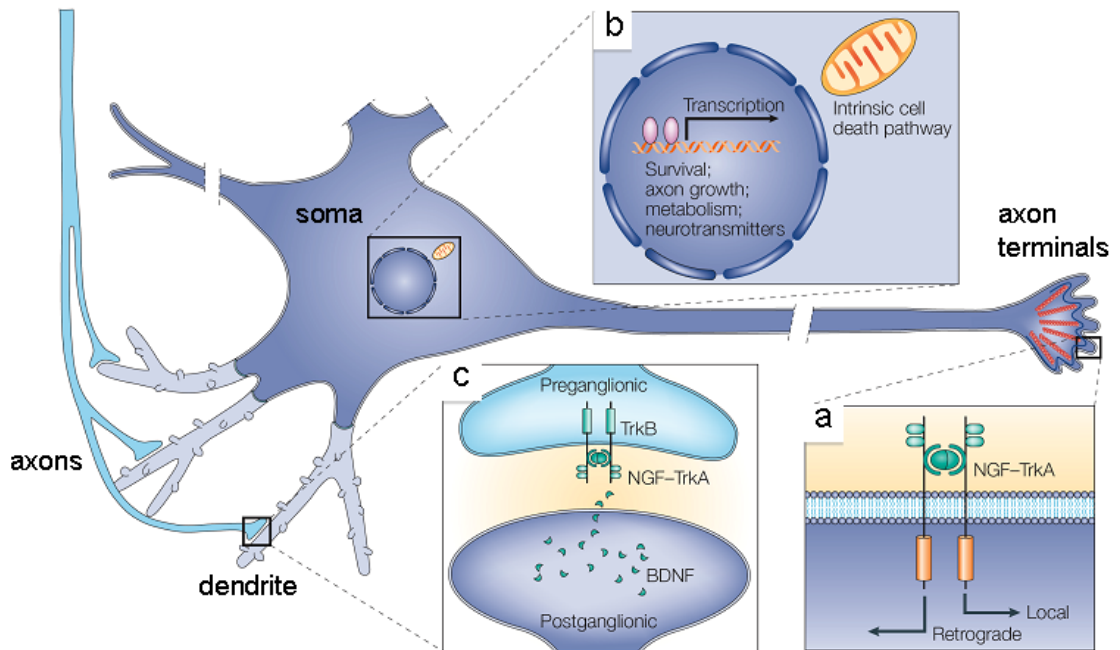


Figura 1. Mecanismo de señalización retrograda de los factores neurotróficos. Los factores neurotróficos (NGF en la figura) se sintetizan en el área donde proyecta el axón de la neurona en cuya membrana existen receptores (Trk en la figura) (a). La unión del factor trófico al receptor puede ejercer efectos locales o transportarse retrógradamente por el axón al núcleo de la célula, donde promueve la inducción de genes de supervivencia y estimula el metabolismo, la síntesis de transmisores y el crecimiento del axón (b). Las dendritas de la neurona ("postganglionic" en c) liberan también factores neurotróficos que son recaptados por los axones ("preganglionic" en c) que llegan a ellas. Modificado de Zweifel y cols. 2005.

y parasimpático), gánglios sensoriales y motoneuronas espinales. Del GDNF depende la migración de los progenitores de la cresta neuronal que colonizan el intestino y de los que deriva el sistema nervioso entérico, por lo que el déficit, incluso parcial, de este factor resulta en aganglionismo del colon (enfermedad de Hirschprung). El GDNF y los miembros de su familia también se liberan en el SNC donde contribuyen al mantenimiento de grupos neuronales específicos, particularmente las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas, por lo que en ocasiones se les conoce como factores dopaminotróficos. Sin embargo, los animales con ablación genética del GDNF (y los otros factores dopaminotróficos) no muestran en el momento de nacer déficits de neuronas catecolaminérgicas, lo que indica que el papel neuroprotector de las neuronas centrales se adquiere en la vida adulta. Independientemente de su papel como FNT, el GDNF es necesario para el desarrollo del riñón y los animales con ablación del gen GDNF mueren al nacer por agenesia renal (Moore y cols., 1996; Sánchez y cols., 1996).

Los factores dopaminotróficos ejercen su acción biológica por la unión a receptores con dos componentes, una proteína extrínseca extracelular ($GFR\alpha$) que se ancla a la membrana por un dominio lipídico y que al unir el ligando se desplaza y dimeriza con otra proteína común (RET) que, como en el caso de los receptores Trk, tiene un segmento transmembranario y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa. Existen varios subtipos de $GFR\alpha$ que unen con afinidad variable a cada tipo de factor trófico. Por ejemplo, el GDNF se une con mayor afinidad al $GFR\alpha1$. Las vías de señalización intracelular activadas por los factores dopaminotróficos son en esencia similares a las descritas para las neurotrofinas. Igualmente,

se piensa que la acción del GDNF y los otros miembros de su familia depende de la endocitosis del complejo ligando-receptor y el transporte retrógrado al núcleo. No obstante, los datos experimentales disponibles son fragmentarios y se piensa que al igual que las neurotrofinas, estos FNTs tienen acciones locales y efectos rápidos que no requieren modificación de la transcripción. Numerosos datos experimentales sugieren que, además del complejo GFR α /RET, el GDNF puede ejercer acciones biológicas a través de otros tipos de receptores, particularmente de N-CAM ("cell adhesion molecule") (Figura 2A; Ibáñez, 2008). Como las neurotrofinas y otras moléculas, los factores de la familia del GDNF se sintetizan como "pre-pro-factor" y posteriormente se procesan intra o extracelularmente. La regulación de este proceso todavía se desconoce con detalle.

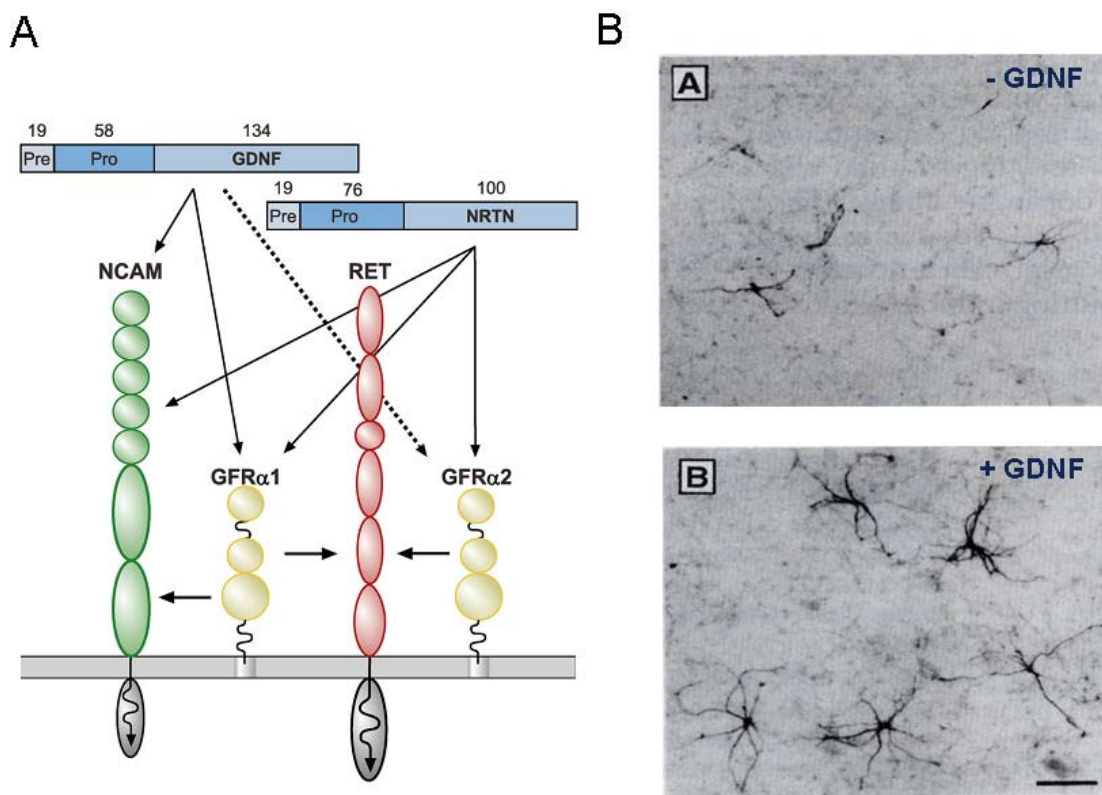


Figura 2. Acciones biológicas de los factores dopaminotróficos. (A) Interacción del GDNF y de la neurturina con sus receptores. Los factores se sintetizan como precursores que tras procesado enzimático proteolítico se convierten en las moléculas maduras. El GDNF se une preferente a GFR α 1 y la neurturina al GFR α 2. Tras la unión del ligando, GFR α se acopla a RET cuyo dominio intracelular adquiere actividad tirosina quinasa. Al menos para el caso del complejo GDNF-GFR α 1 existe la posibilidad alternativa de unión a NCAM. Modificado de Andressoo y Saarna, 2008. (B) Efecto de la ausencia (BA) o presencia (BB) de GDNF sobre neuronas mesencefálicas de ratón en cultivo. Nótese el incremento en el número y tamaño de dendritas en las neuronas tratadas con GDNF. Modificado de Lin y cols., 2003.

Por su acción dopaminotrófica tanto *in vivo* como *in vitro*, existen multitud de trabajos relativos a la participación del GDNF (y los otros miembros de la familia) en la patogénesis de la EP (ver Pascual et al., 2008). Igualmente, se ha investigado con bastante detalle la posible utilidad de la administración de GDNF como terapia antiparkinsoniana (Kirik y cols. 2004).

Además de las dos grupos indicados anteriormente existen **otros factores neurotróficos** menos “típicos” que también parecen contribuir al mantenimiento neuronal. La descripción detallada de estos factores está fuera de los objetivos de este artículo. No obstante, merece la pena hacer mención de las somatomedinas, particularmente del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-1 “insulin-like growth factor”), que se producen en grandes cantidades fuera del cerebro y que se transportan al mismo atravesando la barrera hematoencefálica. Existen moléculas con conocido poder trófico y estimulante del crecimiento de tipos celulares no neurales (como la eritropoyetina o el factor vascular derivado del endotelio; VEGF) que están demostrado tener acciones farmacológicas (e incluso fisiológicas) en el mantenimiento neuronal. El significado funcional de estos “nuevos” FNTs está todavía por precisar.

Los factores neurotróficos en terapias neurológicas

El efecto de los FNTs sobre la supervivencia neuronal ha estimulado su uso en terapia contra enfermedades neurológicas. Hasta la fecha se han realizado numerosos estudios preclínicos en modelos animales y ensayos clínicos en pacientes, algunos todavía en fase de desarrollo. Los resultados de estos estudios, aunque no espectaculares, son suficientemente alentadores como para que la terapia basada en FNTs se considere como prometedora y haya estimulado tanto la investigación básica como la creación de empresas biotecnológicas con inversiones económicas considerables.

Los aspectos más críticos de las terapias basadas en FNTs son la elección del factor trófico adecuado y su administración en concentración suficiente en el lugar preciso. Los FNTs son pleotrópicos y ejercen sus acciones (al menos farmacológicamente) sobre neuronas muy diversas. Los más utilizados hasta la fecha son las neurotrofinas (NGF y BDNF) y el GDNF. De entre las múltiples formas de administración ensayadas están el suministro directo de la proteína, la infección neuronal con vectores virales que contiene el gen del FNT y el trasplante de células que producen el/los FNTs de forma natural (células diferenciadas o células progenitoras) o que están manipuladas genéticamente para inducir en ellas la producción del FNT deseado.

El tratamiento con FNTs se está utilizando en diversas enfermedades neurodegenerativas (END), de entre las que destacan la EP (que se describe en el apartado siguiente), la EA, la corea de Huntington y la ELA. La EA, la END más frecuente con unas 400.000 enfermos en España, es una patología difusa (placas de péptido beta amiloide y ovillos neurofibrilares con proteína tau hiperfosforilada), que afecta a zonas amplias del cerebro (especialmente corteza, hipocampo y sistema colinérgico basal). No obstante la enfermedad en sus orígenes está circunscrita al giro dentado del hipocampo y la corteza entorrinal. La administración de factores neurotróficos (sobre todo NGF y BDNF) en el hipocampo (o de células productoras de los mismos) reduce el déficit cognitivo en modelos animales de EA. Igualmente, la administración sistémica de IGF parece inducir una mejoría histológica y funcional de los animales estudiados. Existen actualmente estudios clínicos basados en la transfección de NGF en neuronas colinérgicas del hipocampo usando técnicas de transferencia génica con virus adenoasociados (AAV). Dado que los niveles de pro-neurotrofinas (que se unen con alta afinidad al receptor $p75^{NTR}$) están incrementados en la EA, se está investigando la posible aplicabilidad terapéutica de los antagonistas de este receptor.

La EH es una afección genética producida por la sobreproducción de una proteína tóxica, la huntingtina. En esta enfermedad se produce degeneración progresiva de las neuronas de proyección de estriado que participan en el control motor, por tanto cursa con movimientos anormales de tipo coreico. La administración intraestriatal de FNTs (especialmente BDNF y GDNF) produce mejoría en modelos animales

de la enfermedad. En pacientes existen pocos estudios, pero hay al menos un ensayo en marcha basado en la administración de neurturina mediante AAV.

La ELA es una END que, aunque poco frecuente, es devastadora porque produce parálisis progresiva por destrucción de las motoneuronas espinales y bulbares que controlan los movimientos voluntarios. El curso de esta enfermedad suele ser rápido y en ocasiones produce la muerte de los individuos en pocos meses. Existen numerosos estudios (algunos en pacientes) basados en la administración de factores tróficos (IGF-1 por ejemplo) directamente o con AAV. Se ha probado (hasta ahora con poco éxito) el implante intraespinal, intratecal, o incluso intravenoso de numerosos tipos celulares (células mesenquimales de médula ósea, progenitores neuronales, células modificadas genéticamente, entre otros) cuyo mecanismo de acción se desconoce aunque se piensa que los efectos terapéuticos se deben a la liberación de FNTs.

Los FNTs también se están incorporando como agentes terapéuticos en casos de neurotraumas (especialmente la lesión medular) y en el ictus cerebral (ver López-Barneo y cols. 2008a). Las lesiones agudas (traumáticas o isquémicas) del sistema nervioso producen no sólo muerte celular inmediata sino que cursan con daños secundarios debido a una cascada de eventos deletéreos (producción de especies proinflamatorias, factores necróticos, especies reactivas de oxígeno, etc) que se originan en el lugar de la lesión (Blesch y cols., 2002). La administración directa de FNTs o de células que los producen parece que estimula la viabilidad de las células (neuronas y glia), reduce la extensión del daño tisular y favorece la recuperación funcional. En el caso de las lesiones medulares el trasplante celular (células gliales, células madre neurales y otras) tiene como objetivo no solo la liberación de FNTs sino servir de sustrato y guía para el crecimiento de los axones dañados.

GDNF y enfermedad de Parkinson

La EP es una patología neurodegenerativa que se debe a la muerte progresiva de grupos neuronales específicos, particularmente las neuronas dopaminérgicas (ND) del mesencéfalo ventral (sustancia negra y área tegmental ventral). Otros grupos neuronales afectados incluyen los ganglios del sistema nervioso autónomo, el núcleo dorsal del vago, el Locus coeruleus y el bulbo olfatorio. Las ND proyectan al núcleo estriado (caudado y putamen en primates) constituyendo la vía nigro-estriatal (VNE). Por tanto, el defecto neuroquímico más relevante en la EP es la falta de dopamina en el estriado. Debido a que la VNE es un componente fundamental del sistema extrapiramidal de control motor, los síntomas cardinales de la EP, al menos en sus fases iniciales, son de tipo motor (temblor, rigidez en las articulaciones, movimientos lentos y alteraciones en la marcha).

Las causas de la EP se desconocen, aunque se piensa que la enfermedad se contrae por la combinación de factores predisponentes genéticos y la exposición a causas ambientales. Un porcentaje de los casos de EP (aproximadamente el 10-15%) es de tipo familiar y se debe a genes que se transmiten por herencia mendeliana. Incluso en estas circunstancias la penetrancia no es superior al 30-40% lo que indica que otros factores son necesarios para desencadenar la enfermedad. La mayoría de los casos de EP son de tipo esporádico. La patogenia de la EP se cree que es multifactorial y en ella intervienen alteraciones mitocondriales, en el procesamiento de las proteínas y en la función sináptica. Las neuronas afectadas pierden su fenotipo e inician un proceso degenerativo que finalmente conlleva a estrés oxidativo, inflamación y la destrucción celular. Aunque se piensa que el déficit de FNTs podría ser la causa o al menos contribuir a la aparición de la EP, no existen por el momento evidencias directas de que esto ocurra en el hombre. Si existen multitud de datos experimentales mostrando que la aplicación exógena de FNTs tiene un efecto protector sobre las ND mesencefálicas y otras neuronas afectadas en la EP (ver más adelante).

La terapia de la EP es de tipo pro-dopaminérgica, y tiene como objetivo el compensar la falta de dopamina en el cerebro. Para ello se administra por vía oral la L-dopa (sustancia precursora de la dopamina que atraviesa la barrera hematoencefálica) y otros fármacos como los agonistas de los receptores dopaminérgicos o los inhibidores de las enzimas que oxidan la dopamina (monoamino oxidasa y catecoloximetil transferasa). Aunque esta terapia tiene resultados clínicos satisfactorios, no frena la progresión de la enfermedad y por lo tanto pierde eficacia progresivamente. Por esta razón desde hace años se intenta la búsqueda de nuevas aproximaciones terapéuticas y entre ellas la terapia celular, cuyo objetivo inicial es el implante intraestriatal de células productoras de dopamina para reemplazar las neuronas destruidas (y de este modo restaurar el nivel dopaminérgico estriatal), ha recibido atención especial (López-Barneo y cols. 2008a). Las células más utilizadas en los ensayos realizados en humanos han sido las neuronas dopaminérgicas procedentes de cerebro de fetos. Aunque en algunos estudios se describieron efectos clínicos muy satisfactorios tras el implante celular, los resultados de dos ensayos doble ciego (con control del efecto placebo) realizados en los últimos años han concluido que el efecto clínico de la terapia celular restauradora es muy pequeño y por esa razón ha dejado de utilizarse (Freed y cols., 2001; López-Barneo y cols., 2008a). El interés de la mayoría de los grupos se ha desplazado hacia la terapia neuroprotectora, basada en la aplicación intracerebral de FNTs con el propósito de frenar o al menos desacelerar el curso de la enfermedad. Dentro de los FNTs que se han ensayado en modelos animales de parkinsonismo, el GDNF (y recientemente la neurturina) son los que se han transferido, aunque a nivel experimental, a la clínica humana.

Las relaciones entre el GDNF y la EP son estrechas desde la identificación del FNT a mediados de los años 1990, debido a que los estudios iniciales mostraron un potente "efecto farmacológico" neuroprotector y estimulador del crecimiento de las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas tanto *in vitro* como *in vivo* (Lin y cols., 1993; Tomac et al., 1995; Arenas et al., 1995; Figura 2B). Los experimentos iniciales fueron seguidos de numerosos estudios en modelos de parkinsonismo animal en roedores y primates indicando que la administración intraestriatal de GDNF incrementa la supervivencia y resistencia a agentes tóxicos de las ND e induce crecimiento de su arborización axónica ("sprouting") (Kirik y cols. 2004). Estos estudios, sin embargo, no pudieron mostrar una asociación "fisiológica" entre el GDNF y las ND mesencefálicas pues los animales con ablación de gen GDNF, aunque morían al nacer por agenesia renal y déficit de inervación del intestino, mostraban un desarrollo normal de la VNE y de otros centros nerviosos catecolaminérgicos centrales y periféricos (Moore y cols., 1996).

Los estudios farmacológicos preclínicos indicados en el párrafo anterior condujeron a la realización de un estudio abierto piloto en 5 pacientes a los que se administró GDNF (sintetizado por bacterias transfectadas con DNA recombinante humano) a través de una cánula implantada permanentemente en el putamen. Los resultados clínicos iniciales (a los 6-12 meses del tratamiento) de este estudio fueron no solo positivos sino que, además, el estudio histológico de uno de los pacientes que falleció por causas ajenas a la terapia antiparkinsoniana, mostró "sprouting" de los terminales axónicos dopaminérgicos en el estriado (Gill y cols. 2003). No obstante un estudio posterior en 34 pacientes realizado a doble ciego tuvo que interrumpirse debido a que los efectos clínicos observados por la administración de GDNF no fueron significativamente superiores a los controles (Lang y cols. 2006). Adicionalmente, algunos pacientes tratados mostraron anticuerpos neutralizantes contra el GDNF recombinante que produjeron signos de afectación del cerebelo.

El interés por el GDNF como potencial terapia antiparkinsoniana se ha revitalizado recientemente por estudios de nuestro grupo basados en un modelo de ratón GDNF "knockout" condicional, en el que la

producción del factor neurotrófico se mantiene normal y una vez que el animal es adulto se escinde el gen de su sitio produciéndose un alelo nulo (Pascual y cols. 2008). Este modelo animal resulta en la disminución de los niveles de GDNF proteína en el estriado hasta menos del 40% de su valor normal y permite estudiar la función del gen en el adulto sin mecanismos compensatorios que puedan haberse puesto en marcha durante la vida embrionaria. Nuestros resultados han demostrado que la producción de GDNF en el estriado es absolutamente necesaria para el mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra y el área tegmental ventral. La ausencia de GDNF produce una muerte neuronal progresiva que también afecta a otras neuronas del sistema nervioso central y periférico. El efecto de la falta de GDNF es particularmente obvio en el caso de las neuronas noradrenérgicas del Locus coeruleus, que prácticamente desaparecen (Figura 3). La muerte neuronal inducida por el déficit de GDNF es selectiva pues no afecta a neuronas dopaminérgicas del hipotálamo y a extensas áreas de la corteza y del hipocampo. Este patrón de muerte neuronal es muy parecido al que se observa en pacientes con EP. Los animales con ablación condicional de GDNF desarrollan un síndrome motor aquinético característico de los animales parkinsonianos (Pascual y cols. 2008). Por otra parte, los estudios de expresión de GDNF en el animal adulto indican que este factor neurotrófico se produce selectivamente en las áreas de proyección de las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas. Estos resultados sugieren que, al menos en el ratón, el GDNF tiene un papel fisiológico muy importante, siendo indispensable para la supervivencia de las neuronas catecolaminérgicas que desaparecen en los enfermos parkinsonianos. Por tanto, la administración de GDNF debe tener un efecto protector sobre estas células nerviosas. Posiblemente el reto metodológico sea el poder suministrar el GDNF de forma y en cantidad adecuada para que sea recaptado por las neuronas que padecen el proceso neurodegenerativo.

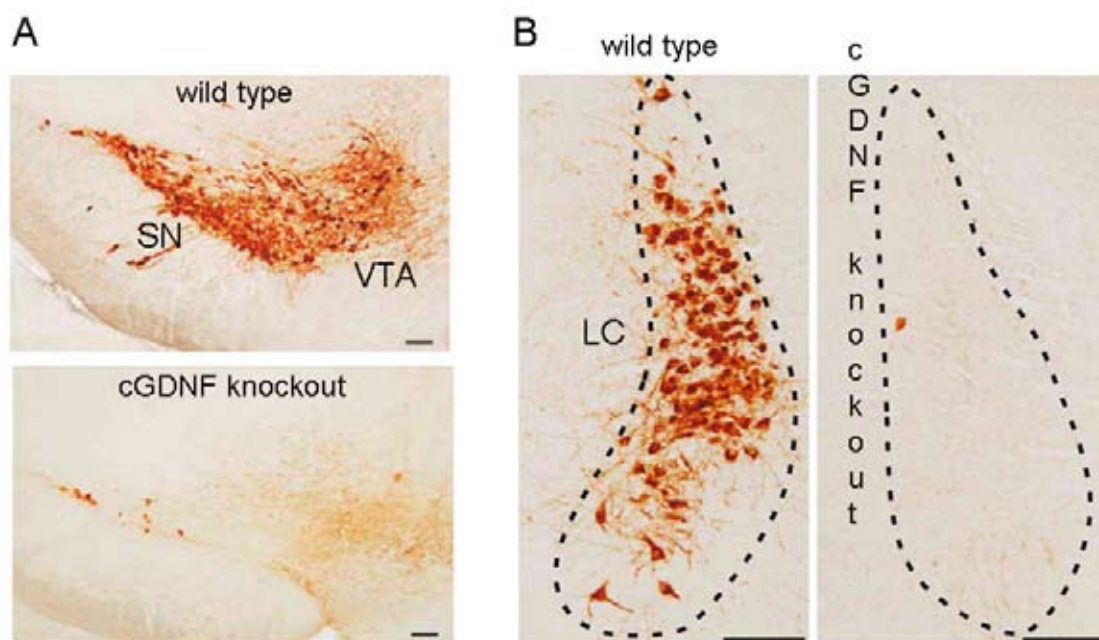


Figura 3. Pérdida de neuronas catecolaminérgicas en el ratón adulto tras ablación condicional del gen GDNF (cGDNF knockout). (A) Sección del mesencéfalo al nivel de la sustancia negra (SN) y el área tegmental ventral (VTA) ilustrando la destrucción masiva de neuronas dopaminérgicas (TH positivas) en ausencia de GDNF. (B) Sección del tronco del encéfalo al nivel del Locus coeruleus (LC) mostrando la desaparición casi completa de las neuronas noradrenérgicas (TH positivas). Wild type: animal control. Modificado de Pascual y cols. 2008.

Trasplantes de células del cuerpo carotídeo productoras de dopamina y GDNF en la enfermedad de Parkinson

El cuerpo carotídeo (CC) es una estructura derivada de la cresta neural formada por progenitores que durante la vida embrionaria emigran desde ganglio cervical superior y se asientan en la bifurcación de la arteria carótida. En el adulto, el parénquima del CC lo forman acúmulos de células (denominados glomérulos) en íntimo contacto con vasos sanguíneos (el CC es una de las estructuras más irrigadas del cuerpo) e inervadas por fibras nerviosas sensoriales del ganglio petroso que terminan en el centro respiratorio del tronco del encéfalo. Los glomérulos del CC están formado por dos tipos celulares fundamentales: i) las células glómicas, o tipo I, que son parecidas a neuronas y que tienen canales iónicos voltaje-dependientes y pueden generar potenciales de acción. Estas células sintetizan numerosos transmisores, fundamentalmente dopamina que se almacena en vesículas con centro denso. La identificación histológica de las células glómicas se realiza por su tinción positiva con anticuerpos contra el enzima tirosina hidroxilasa (TH) limitante en la síntesis de catecolaminas. ii) Las células sustentaculares, o tipo II, con prolongaciones que envuelven a las tipo I y que se tiñen con anticuerpos contra marcadores gliales como la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) (López-Barneo y cols. 2008b) (Figura 4A-C).

Las células glómicas son quimiorreceptores arteriales que detectan cambios en la composición físico-química de la sangre (particularmente los cambios en la tensión de oxígeno). En respuesta a la hipoxemia, las células glómicas liberan en poco segundos transmisores (dopamina, ATP y otros) que activan las fibras nerviosas aferentes para estimular el centro respiratorio y producir hiperventilación (López-Barneo y cols. 2001; López-Barneo, 2003) (Figura 4D).

Hace aproximadamente una década nuestro grupo inició un proyecto dirigido a llevar a la clínica el trasplante de CC para el tratamiento de la EP. Dada la naturaleza dopaminérgica del CC, la idea básica fue utilizar esta glándula para hacer autotrasplantes y compensar el déficit de dopamina intraestriatal. El CC es un órgano par y la extirpación de uno de ellos es compatible con una vida normal. Los estudios preclínicos en roedores y monos fueron satisfactorios ya que produjeron mejoría clínica casi completa (Espejo y cols., 1998; López-Barneo y cols., 2008a). Estos estudios también sugirieron que el efecto beneficioso del implante de CC en el parkinsonismo experimental no se debe tanto al efecto de la dopamina que el implante suministra como a una acción trófica que induce "sprouting" en las fibras dopaminérgicas nigroestriatales aun no destruidas. Esta hipótesis se confirmó al demostrar que el CC del adulto contiene varios factores neurotróficos, especialmente GDNF que se produce por las células glómicas y en cantidades muy superiores a las que se detectan en cualquier otro órgano del adulto (Toledo-Aral y cols., 2003; Villadiego et al., 2005) (Figura 5). Además de GDNF, el CC contiene BDNF y NT-3. La capacidad de producir GDNF se mantiene en las células trasplantadas, las cuales sobreviven durante casi toda la vida del animal de experimentación.

Es posible que la mezcla de FNTs que contiene el CC se ha seleccionado evolutivamente para asegurar la supervivencia de las células quimiorreceptoras, que están en un ambiente particularmente rico en oxígeno (sometidas a un estrés oxidativo) y cuya función biológica es informar al cerebro de cambios en variables (oxígeno, glucosa, pH, dióxido de carbono, etc) potencialmente deletéreos para la integridad neuronal. Podría ser que la mezcla de FNTs del CC sea también la más apropiada para el mantenimiento de las ND mesencefálicas del adulto.

Los resultados preclínicos satisfactorios aconsejaron llevar a cabo estudios abiertos piloto en 14 pacientes con parkinsonismo avanzado. Los enfermos sufrieron extirpación unilateral al CC que tras ser troceado mecánicamente en unos 150 agregados celulares (de unas 200 células cada uno) se implantaron

estereotáxicamente de forma bilateral en el putamen (Figura 6). El implante de CC ha mostrado ser una técnica segura que en más del 80% de los pacientes produjo algún tipo (entre el 15 y el 60%) de mejoría clínica. En algunos casos, esta mejoría se han mantenido durante varios años tras el trasplante. No obstante, en la mayoría de los pacientes los efectos favorables del implante son transitorios y pasados 12 meses de la intervención muestran una tendencia al empeoramiento, con vuelta a la situación clínica prequirúrgica (Arjona y cols. 2003; Mínguez-Castellanos y cols. 2007). Dado que algunos de nuestros estudios han sido abiertos, no se puede descartar que parte (o toda) la mejoría clínica inducida por el implante de CC se deba a un efecto placebo (muy acusado en enfermos parkinsonianos). Aunque algunos datos indican que este no debe ser el caso, esta posibilidad no es descartable hasta que se realicen ensayos más amplios, cegados y con análisis de placebo frente a control.

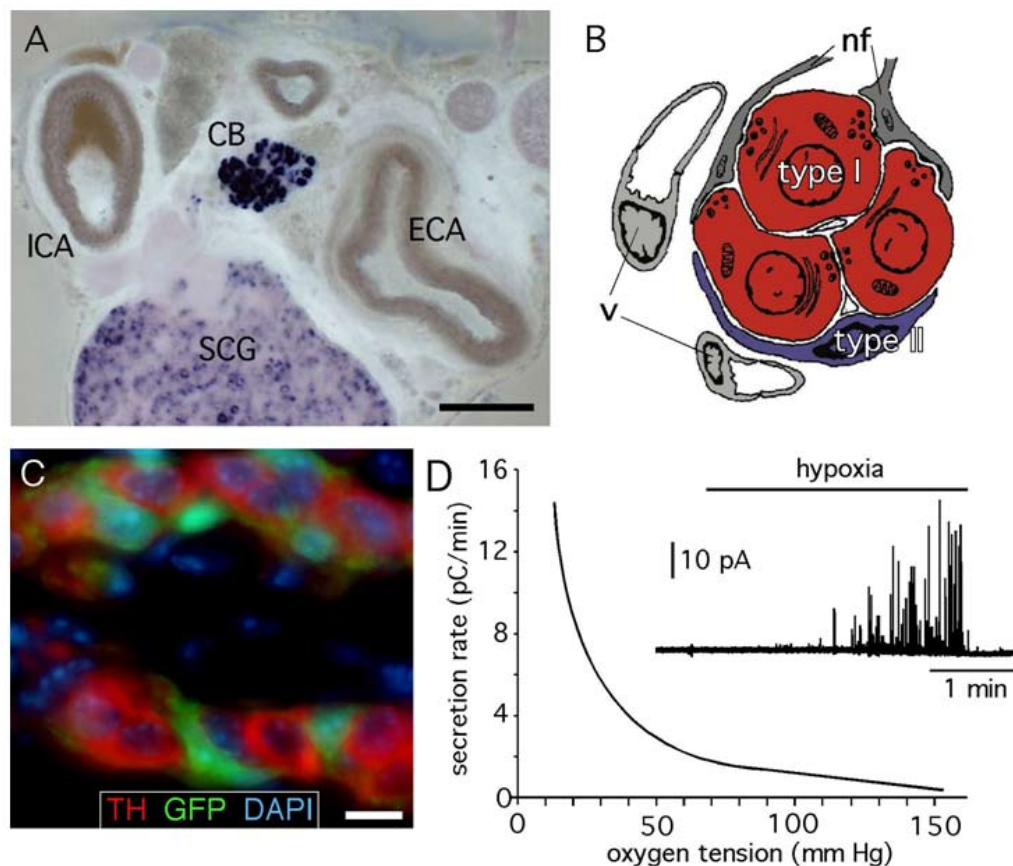


Figura 4. Organización anatómica y funcional del cuerpo carotídeo (CC). (A) Sección histológica de la bifurcación carotídea de ratón analizada por hibridación *in situ* con una sonda contra el RNAm de la tirosina hidroxilasa (TH; color azul). Se pueden identificar los grupos (glomérulos) de células TH+ que forman el CC. Se indican las arterias carótida interna (ICA) y externa (ECA) y el ganglio cervical superior (SCG). (B) Representación esquemática de un glomérulo de CC con indicación de las células tipo I y tipo II, los vasos sanguíneos (V) y las fibras nerviosas aferentes (nf). (C) Sección histológica del CC de un ratón transgénico GFAP-GFP (proteína ácida fibrilar de la glía-proteína fluorescente verde) teñido con anticuerpos contra TH (rojo) y GFP (verde). Los núcleos celulares están teñidos con DAPI (azul). Nótese que en este modelo animal las células tipo II GFAP+ expresan GFP. (D) Secreción de catecolaminas en células glómicas de conejo en función de la tensión de oxígeno. El inserto ilustra la respuesta secretora de una célula glómica mediante amperometría. Modificado de Pardal et al., 2007 y López-Barneo et al., 2009. Barras de calibración: 300 μm (A) and 10 μm (C).

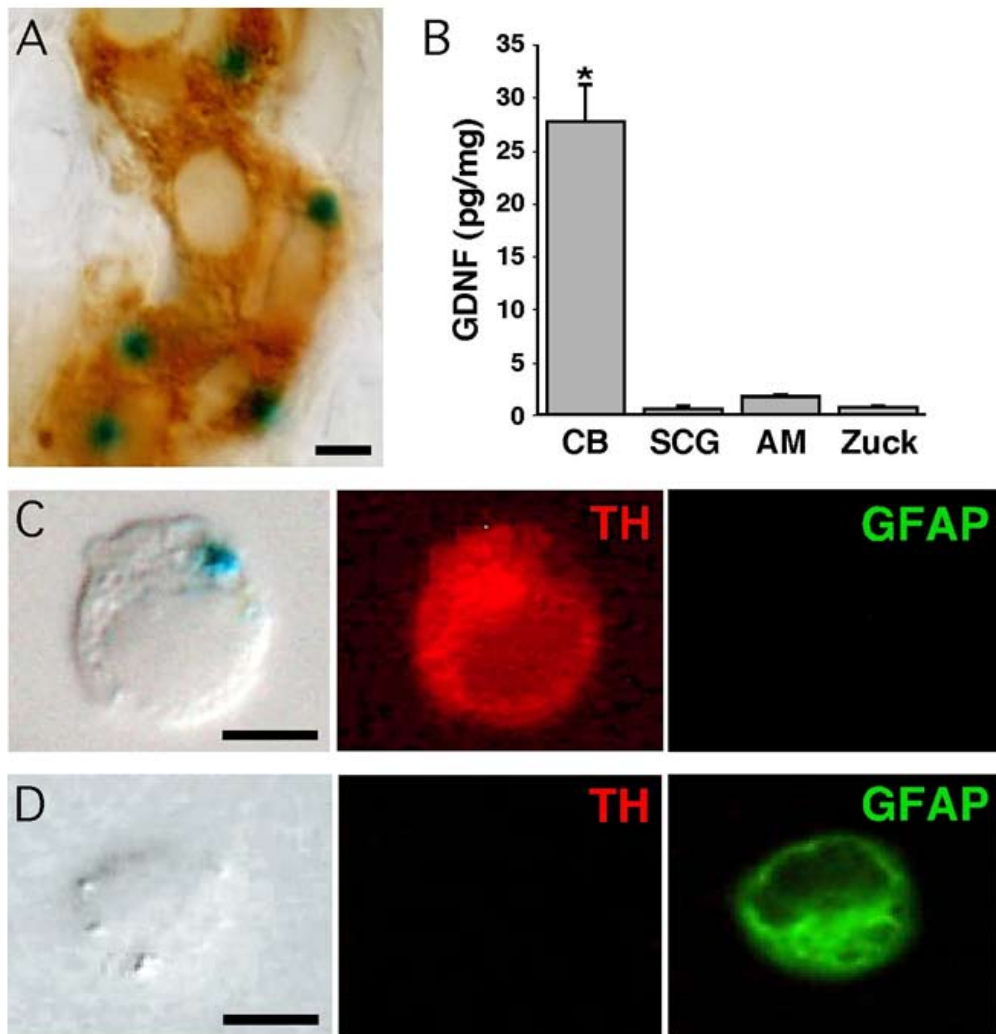


Figure 5. Expresión de GDNF en las células glómicas del cuerpo carotídeo (CC). (A) Tinción X-gal (puntos verdes) mostrando la expresión de GDNF en un CC in situ perteneciente a un ratón de 5 meses heterocigótico *GDNF/lacZ*, (Sánchez y cols. 1996). Las células glómicas están contrateñidas con un anticuerpo contra la TH (marrón claro). (B) Niveles de GDNF (en picogramos por miligramo) medidos por ELISA en tejidos de rata. El número de medidas fue: CC (6), ganglio cervical superior, SCG (6), médula adrenal, AM (8), y órgano de Zuckermandl, Zuck (3). (C) Expresión de GDNF (precipitado azul) en una célula glómica dispersa del CC TH positiva (fluorescencia roja) y GFAP negativa. (D) Ausencia de expresión de GDNF y TH en una célula sustentacular tipo II que es GFAP+ (fluorescencia verde). Las células mostradas en (C) y (D) se obtuvieron de CCs de ratones heterocigóticos *GDNF/lacZ*. Modificada de Villadiego y cols., 2005. Barras de calibración: 10 μm (A) and 5 μm (C y D).

Una de las limitaciones más importantes del autotrasplante de CC en la EP es el pequeño tamaño del órgano, con pocas células activas y por tanto con una potencia terapéutica pequeña. Además el CC se hace fibrótico con la edad, disminuyendo no solo la densidad del parénquima sino el número de células TH positivas. Por tanto, y a pesar de que los resultados experimentales y clínicos son alentadores, parece necesario disponer de una población más numerosa de células del CC antes de que sea aconsejable llevar a cabo un ensayo amplio con control de placebo en pacientes.

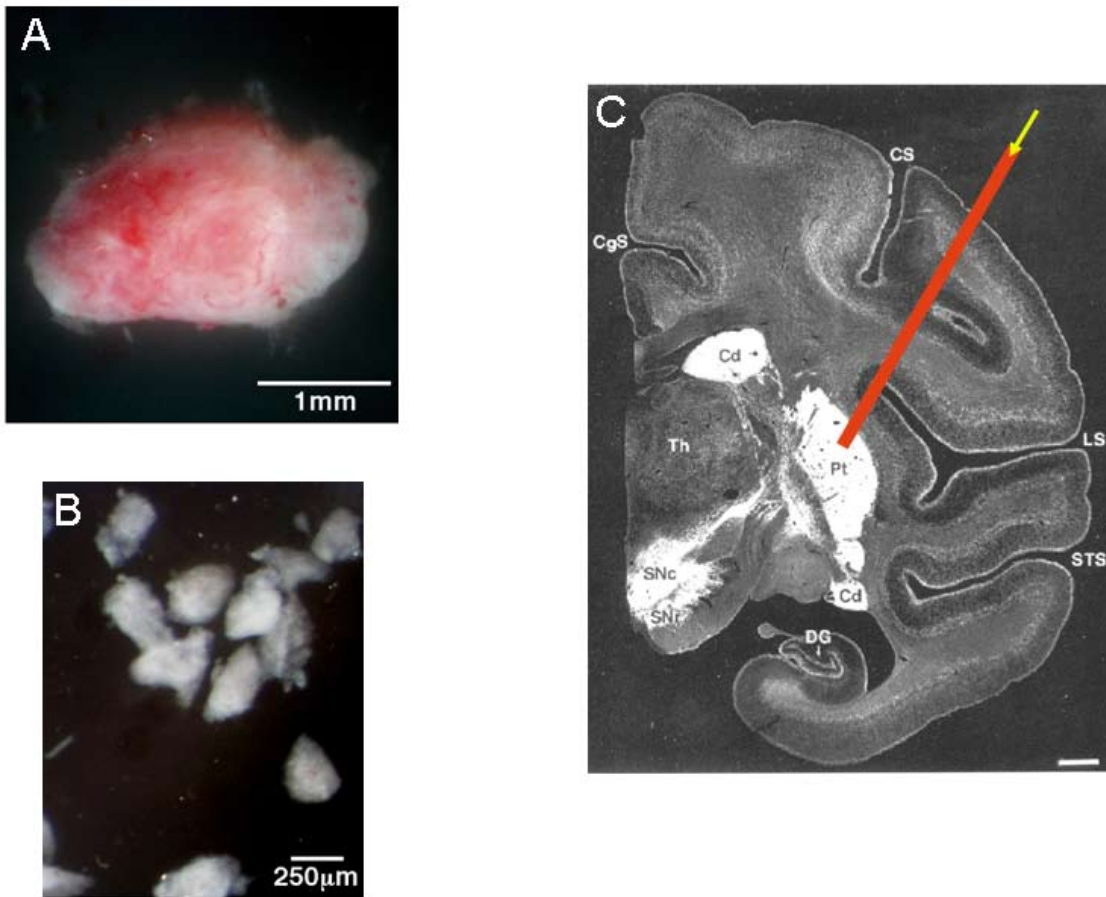


Figura 6. Trasplante intraputamenal estereotáxico de células del cuerpo carotídeo (CC) en pacientes con enfermedad de Parkinson. (A) CC resecado de un paciente parkinsoniano después de limpiarlo de tejido conectivo. (B) Agregados celulares de CC trasplantados a través de una aguja estereotáxica según se ilustra en (C). Pt, putamen; Cd, núcleo caudado; Th, tálamo; SNc, pars compacta de la sustancia negra; SNr, pars reticulata de la sustancia negra. Modificado de López-Barneo y cols. 2008a.

El cuerpo carotídeo es un nicho neurogénico del sistema nervioso periférico adulto

La necesidad de contar con mayor cantidad de tejido para llevar a cabo los implantes en pacientes parkinsonianos, nos condujo a investigar la posibilidad de expandir el CC *in vitro*. Existen abundantes datos en la literatura mostrando que, a diferencia de otros tejidos de origen neural, el CC adulto puede crecer *in vivo* cuando los individuos sufren hipoxemia crónica. Esta situación ocurre en personas o animales que habitan a grandes alturas (como en algunas ciudades americanas o asiáticas) o en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

En ratones expuestos durante dos semanas a un ambiente con baja tensión de oxígeno (10%, aproximadamente 70 mmHg) el CC crece varias veces su valor normal con un incremento del número de células glómicas TH positivas. Este hecho nos indujo a pensar que el CC adulto tiene una población de

células progenitoras capaces de activarse por la hipoxia para proliferar y diferenciarse a nuevas células glómicas. Las células progenitoras se han identificado *in vitro* mediante su capacidad para formar colonias (neuroesferas) clónicas. Las neuroesferas se forman inicialmente alrededor de un núcleo central con numerosas células nestina positivas (marcador de progenitor neural) de donde emergen una o varias protuberancias

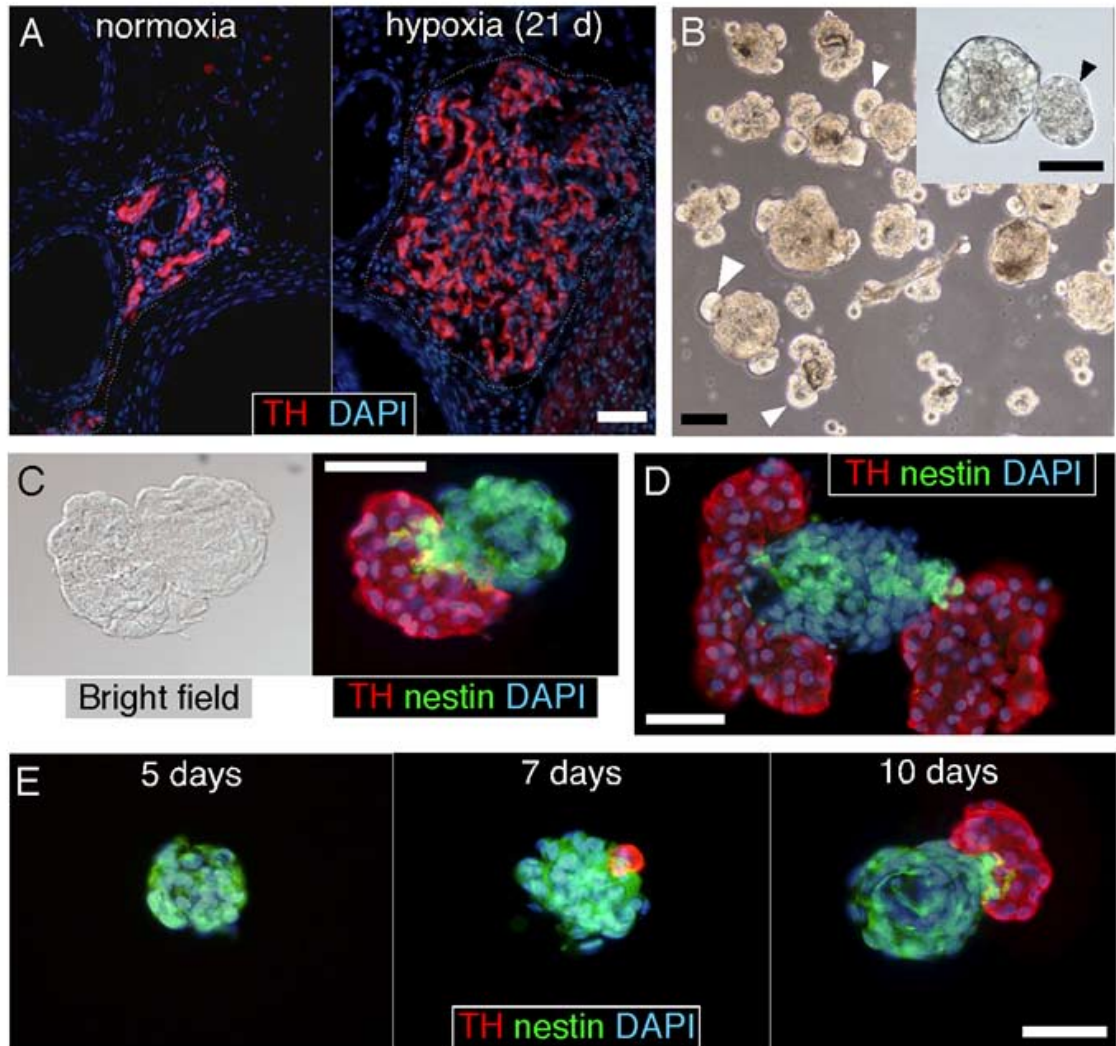


Figura 7. Crecimiento del cuerpo carotídeo (CC) por la hipoxia crónica e identificación de las células progenitoras responsables. (A) Incremento del tamaño del CC de un ratón mantenido en hipoxia (10% O_2) durante 21 días. B. Neuroesferas formadas a partir de células dispersas del CC después de 10 días en cultivo. El inserto muestra un ejemplo de protuberancia típica (flechas) emergiendo del centro de la neuroesfera. C. Análisis inmunohistoquímico de la sección de una neuroesfera (campo claro a la izquierda) indicando la presencia de progenitores nestina positivos dentro del centro de la neuroesfera y células TH+ dentro del brote de diferenciación (derecha). D. Neuroesfera crecida (20 días en cultivo) con protuberancias de diferenciación a células TH+ muy desarrolladas. E. Organización de las neuroesferas con el centro lleno de progenitores nestina positivos que preceden la aparición de células glómicas TH positivas en la periferia. Barras de calibración: 50 μm (A), 100 μm (B), 50 μm (C, D, E). Modificado de Pardal y cols., 2007.

de células TH positivas que crecen con el tiempo en cultivo. Las células de estas protusiones recuerdan morfológicamente a las células glómicas de los glómerulos que se observan en el CC *in vivo* (Figura 7). Además, las células TH+ neoformadas tienen las mismas propiedades electrofisiológicas y quimiorreceptoras de la células glómicas estudiadas *in situ*, manteniendo la capacidad para sintetizar GDNF (Pardal y cols., 2007). Las células madre/progenitoras del CC son GFAP positivas, lo que sugiere que una subpoblación de células sustentaculares son en realidad progenitores activables por la hipoxia.

Los datos experimentales descritos anteriormente muestran que el CC es un nicho neurogénico que en el adulto puede activarse, gracias a la existencia de una población de progenitores de estirpe glial. Aunque el CC es el primer nicho neurogénico que se ha descrito en el sistema nervioso periférico adulto, es importante destacar que se parece a los nichos neurogénicos descritos en el sistema nervioso central (zona subventricular y giro dentado del hipocampo) que también tienen una dotación de células progenitoras de tipo glial que tras activarse y convertirse en progenitores en expansión se diferencian a neuroblastos (Álvarez-Buylla y Lim, 2004; Kokovay y Temple, 2007).

Datos recientes de nuestro laboratorio indican que el CC humano adulto contiene los mismos progenitores que se han descrito en roedores, lo que ofrece posibilidades para que el CC de pacientes o de donantes sanos pueda expandirse *in vitro*, y suministrar el número suficiente de células glómicas, productoras de GDNF y otros FNTs, que puedan ser utilizadas en terapia celular antiparkinsoniana.

Agradecimientos

El autor desea agradecer a sus colaboradores, coautores de los trabajos científicos que se citan en este artículo, su estímulo y apoyo continuo. La investigación que se desarrolla en el laboratorio está actualmente financiada por la Fundación Marcelino Botín, el Plan Nacional de I+D (Ministerio de Innovación y Ciencia) y la Junta de Andalucía. El grupo del autor forma parte del Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED).

Bibliografía seleccionada

Álvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 2004; 41: 683-686 -2004.

Andressoo J-O, Saarma M. Signalling mechanisms underlying development and maintenance of dopaminergic neurons. *Current Opinion in Neurobiology* 2008; 18: 297-306.

Arenas E, Trupp M, Akerud P, Ibáñez CF. GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron*. 1995; 15: 1465-1473.

Arjona V, Mínguez-Castellanos A, Montoro RJ, et al. Autotransplantation of carotid body cell aggregates for treatment of Parkinson's disease. *Neurosurgery* 2003; 53: 321-330.

Blesch A, Lu P, Tuszynski MH. Neurotrophic factor, gene therapy, and neural stem cells for spinal cord repair. *Brain Research Bulletin* 2002; 57: 833-838.

Espejo E F, Montoro RJ, Armengol JA, López-Barneo J. Cellular and functional recovery of parkinsonian rats after intrastriatal transplantation of carotid body cell aggregates. *Neuron* 1998; 20: 197-206.

Freed CR, Greene PE, Breeze RE, et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *New England Journal of Medicine* 2001; 344: 710-719.

Gill SS, Patel NK, Hotton GR, et al. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nature Medicine* 2003; 9: 589-595.

Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual Review of Neuroscience* 2001; 24: 677-736.

Ibañez CF. Catecholaminergic neuron survival: getting hooked on GDNF. *Nature Neuroscience* 2008; 11; 735-736.

Kirik D, Georgievska B, Bjorklund A. Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. *Nature Neuroscience* 2004; 7:105-110.

Kokovay E, Temple S. Taking neural crest stem cells to new heights. *Cell* 2007; 131: 234-236.

Lang AE, Gill S, Patel NK et al. Randomized control trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Annals of Neurology* 2006; 59: 459-466.

Levi-Montalvini R. The nerve growth factor 35 years later. 1987; 237: 1154-1162.

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993; 260:1130-1132.

López-Barneo J, Pardal R, Ortega-Sáenz P. Cellular mechanisms of oxygen-sensing. *Annual Review of Physiology* 2001; 63: 259-287.

López-Barneo, J. Oxygen and glucose sensing by carotid body cells. *Current Opinion in Neurobiology* 2003; 13: 493-499.

López-Barneo J, Mínguez-Castellanos A, Toledo-Aral J, Rodríguez-Gómez JA.

Cell therapy for Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. En: " Cell Therapy", D García Olmo, JM García-Verdugo, J Alemany, MA González, JA Gutiérrez-Fuentes, (eds.), Mac Graw Hill/Interamericana (2008a) pp. 337-362.

Lopez-Barneo J, Ortega-Saenz P, Pardal R, Piruat JI, Pascual A. Carotid body oxygen sensing. *European Respiratory Journal* 2008b; 32: 1386-1398.

López-Barneo J, Pardal R, Ortega-Sáenz P, Durán R, Villadiego J, Toledo-Aral J. The neurogenic niche in the carotid body and its applicability to antiparkinsonian cell therapy. *Journal of Neural Transmission* 2009; 116: 975-982.

Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nature Reviews Neuroscience* 2005; 6: 603-614.

Minguez-Castellanos A, Escamilla-Sevilla F, Hotton GR, et al. Carotid body autotransplantation in Parkinson disease: A clinical and PET study. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 2007; 78: 825-831.

Moore MW, Klein RD, Farinas I, et al. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 1996; 382: 76-79.

Pardal R, Ortega-Sáenz P, Duran R, López-Barneo J. Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult carotid body. *Cell* 2007; 131: 364-377.

Pascual A, Hidalgo-Figueroa M, Piruat JI, Pintado CO, Gómez-Díaz R, López-Barneo J. Absolute requirement of GDNF for adult catecholaminergic neuron survival. *Nature Neuroscience*, 2008; 11: 755-761.

Sánchez MP, Silos-Santiago I, Frisen J, et al., Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 1996; 382: 70-73.

Segal R. Selectivity in neurotrophin signalling: theme and variations. *Annual Reviews of Neuroscience* 2003; 26: 299-330.

Sweifel LS, Kuruvilla R, Ginty DD. Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nature Reviews Neuroscience* 2005; 6: 615-625.

Toledo-Aral J, Méndez-Ferrer S, Pardal R, Echevarría M, López-Barneo J. Trophic restoration of the nigrostriatal dopaminergic pathway in long-term carotid body grafted parkinsonian rats. *The Journal of Neuroscience* 2003; 23: 141-148.

Tomac A, Lindqvist E, Lin LF, Ogren SO, Young D, Hoffer BJ, Olson L. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF *in vivo*. *Nature* 1995; 373: 335-339.

Villadiego J, Méndez-Ferrer S, Valdés-Sánchez T, Silos-Santiago I, Fariñas I, López-Barneo J, Toledo-Aral JJ. Selective glial cell line-derived neurotrophic factor production in adult dopaminergic carotid body cells *in situ* and after intrastriatal transplantation. *The Journal of Neuroscience* 2005; 25: 4091-4098.

IMPACTO DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA MEDICINA FORENSE

Ángel Carracedo

Instituto de Medicina legal. Universidad de Santiago de Compostela

RESUMEN

El análisis de la variación del ADN ha supuesto una enorme revolución en Medicina forense. Desde que en 1985 Alec Jeffreys introdujo la huella genética ha habido una evolución continua en el tipo de marcadores y en las tecnologías. Los microsatélites en cromosomas autosómicos son actualmente los marcadores más utilizados, pero los polimorfismos nucleotídicos simples (SNPs) van emergiendo como marcadores de futuro y son ya útiles para muchas aplicaciones específicas, al igual que ocurre con polimorfismos en cromosomas sexuales o el ADN mitocondrial que son herramientas fundamentales para los investigadores forenses.

Genética forense: de los grupos sanguíneos a los polimorfismos de ADN nuclear

La Genética forense es una especialidad de la Genética que incluye un conjunto de conocimientos de Genética necesarios para resolver ciertos problemas jurídicos. Los tipos de pericia más solicitados al laboratorio de Genética forense por los tribunales son casos de investigación biológica de la paternidad, pericias de criminalística biológica (estudio de vestigios biológicos de interés criminal como manchas de sangre, espermatozoides, pelos, etc.) y, finalmente problemas de identificación. Una de las actividades más importantes del campo son las bases de datos de ADN con fines de identificación criminal. La primera base de datos y la más amplia es la del Reino Unido. Es muy amplia y contiene unos tres millones de perfiles de ADN, introduciéndose más de 1000 perfiles diarios de sospechosos, convictos o muestras encontradas en el lugar de los delitos

Antes de la aplicación del ADN los marcadores genéticos que se utilizaban para estas finalidades (HLA, proteínas, enzimas, grupos sanguíneos) presentaban grandes limitaciones cuando se trataba de analizar muestras degradadas o en minúscula cantidad lo que sucede con mucha frecuencia en el trabajo

forense. Esto era particularmente cierto para el análisis de esperma o manchas de esperma y pelos o cabellos donde era excepcional proporcionar algún dato acerca de la correspondencia de un vestigio a un presunto agresor con lo que la ayuda a la justicia era muy limitada.

Los polimorfismos de ADN de mayor uso en medicina forense se encuentran en el ADN repetido en tándem y clásicamente se utilizan los denominados minisatélites y microsatélites que consisten en repeticiones de fragmentos de ADN de número variable. La repeticiones en el ADN microsatélite son de tamaño pequeño (de 2 a 6 pares de bases) por lo que se suelen denominar STRs (“short tandem repeats”).

Poniendo un ejemplo, un STR puede tener una estructura como ACTT ACTT ACTT ACTT ACTT ACTT ACTT ACTT... hasta un número n de repeticiones. Los individuos nos diferenciamos por el número de repeticiones de esa secuencia. Un individuo 8-12 para ese STR significa que tiene 8 veces la unidad de repetición (ACTT) en un lugar específico de un cromosoma (locus génico) y 12 veces en el locus correspondiente del cromosoma homólogo.

Los minisatélites y microsatélites además de ser extraordinariamente polimórficos (esto es variables entre los individuos de una población), poseen una herencia mendeliana simple. Esto significa que el individuo 8-12, que antes pusimos de ejemplo, ha heredado uno de los alelos de su madre y otro de su padre biológico.

En el campo forense utilizamos básicamente STRs de 4bp y 5bp en la unidad de repetición. Los de menos repeticiones son muy propensos a artefactos (bandas tartamudas) lo que dificulta la interpretación de perfiles de ADN obtenidos a partir de mezclas de diferentes individuos.

En 1984, el genetista británico Alec Jeffreys y su grupo descubrieron la enorme variación que tienen los minisatélites entre los individuos y acuñaron el término “DNA fingerprint” (huella genética de ADN) y realizaron las primeras aplicaciones forenses.

El análisis de minisatélites mediante sondas se abandonó recientemente por algunas dificultades es su empleo forense, siendo el principal el hecho de que es muy difícil analizar ADN degradado o en pequeña cantidad con sondas y esto dificulta gran parte de las aplicaciones forenses.

Por fortuna, ésto fue solucionado con la aparición de la reacción en cadena de la polimerasa y el descubrimiento de los microsatélites.

El primer sistema analizado por PCR con fines forenses fue un polimorfismo de ADN codificante de la región HLA: el locus HLA DQA1, que se detectaba mediante sondas que reconocen cada alelo del sistema previamente fijadas a una membrana. Posteriormente se utilizaron minisatélites de pequeño tamaño, pero fue el descubrimiento de los microsatélites o STRs la que abrió unas enormes posibilidades a este campo. Sus ventajas eran notables ya que ofrecían junto a pequeños tamaños (y por lo tanto más resistencia a la degradación), un buen poder de discriminación y facilidades para ser amplificados de forma simultánea con PCR multiplex (esto es amplificar varios sistemas STR simultáneamente a partir de la misma muestra).

El análisis de los productos amplificados se ha facilitado en gran medida gracias al uso de fluorocromos y sistemas automatizados (secuenciadores automáticos de ADN) que permiten la visualización de varios mini o microsatélites simultáneamente.

Los polimorfismos analizables por PCR antes de ser aceptados para la práctica forense deben cumplir una serie de requisitos y pasar sucesivos controles de validación.

Actualmente se suelen analizar hasta 15 STRs (estandarizados y validados) a partir de la misma muestra biológica utilizando secuenciadores automáticos y PCR multiplex. Los multiplexes comerciales de Applied Biosystems (Identifiler) y Promega (Powerplex 16) que contienen 15 STRs y el marcador de sexo amelogenina son los más utilizados. Un ejemplo se puede ver en la Figura 1.

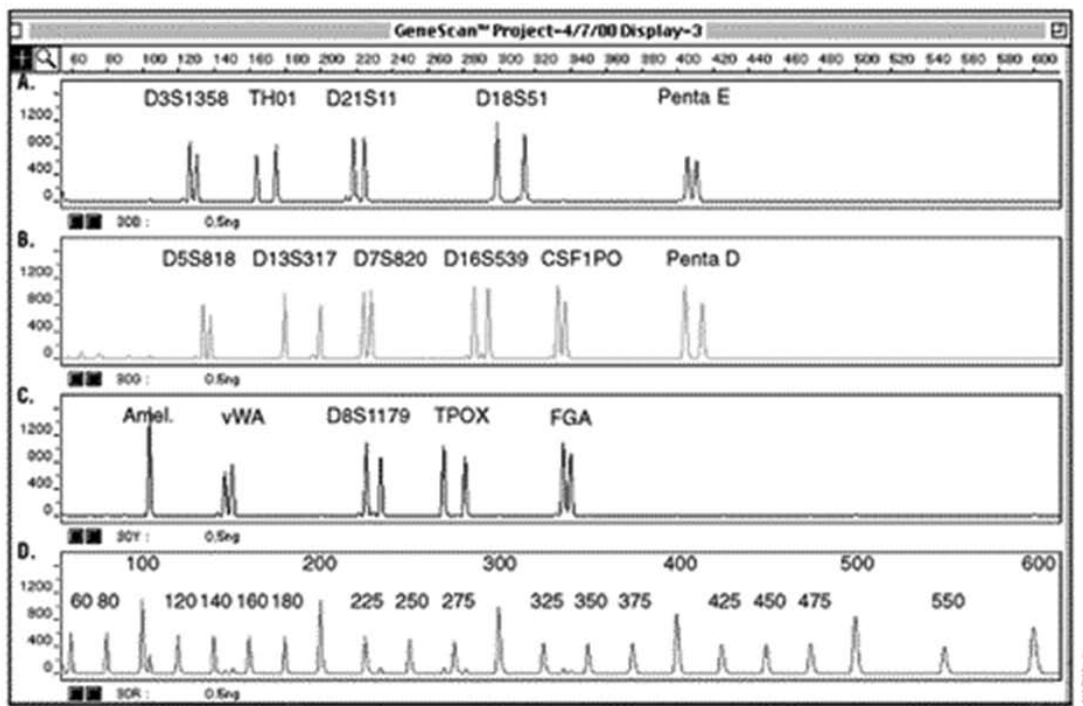


Figura 1. Multiplex de STRs utilizando el kit comercial PowerPlex16 (Promega) que incluye 15 STRs y el marcador de sexo amelogenina marcados con diferentes fluorocromos. En la calle final se ve un estándar interno

Para análisis de criminalística biológica se prefiere usar STRs con un pequeño tamaño en el producto amplificado (menos de 200 bp) pues el tamaño es inversamente proporcional a la degradación y en muestras muy degradadas sólo cabe esperar éxito con la amplificación de estos sistemas. Actualmente se han diseñado numerosos multiplexes disponibles comercialmente con este tipo de STRs que se suelen denominar miniSTRs. También son muy interesantes las repeticiones de 5 nucleótidos (pentanucleotide repeats) cuando se trata de analizar muestras mezcladas con diferentes individuos pues tienen menos artefactos que otros STRs. En varios multiplexes disponibles comercialmente se incluyen este tipo de STRs.

Para una revisión de los marcadores y métodos en uso véase Butler (2001) y Jobling y Gill (2004).

Los polimorfismos de ADN mitocondrial

Hasta no hace muchos años, el estudio de los polimorfismos de ADN se había centrado mayoritariamente en el análisis de marcadores nucleares. Sin embargo durante estos últimos años, el interés por este genoma mitocondrial ha crecido considerablemente. El ADNmt posee múltiples aplicaciones en el campo de la Genética Forense debido fundamentalmente a su modo de herencia, su elevada tasa de

mutación y a la existencia de miles de moléculas por célula, lo que permite su estudio en condiciones en las que el material biológico a analizar se encuentra en mal estado o en cantidad insuficiente para estudiar cualquier otro marcador nuclear.

El ADNmt humano es una molécula ADN circular, cerrado y de doble cadena y relativamente pequeño ya que mide 16.569 bp y fue secuenciado en su totalidad por primera vez en 1981 por Anderson y *cols.* Aunque representa menos del 1% del ADN celular total, posee un gran número de copias. Se estima que las células de mamíferos contienen varios miles de copias de ADNmt dependiendo del tipo de tejido. Esta es característica es la que le confiere más posibilidades de éxito en muestras degradadas.

El ADNmt se hereda prácticamente solo por vía materna.

Hay dos regiones principales en el genoma mitocondrial una gran región codificante (90%) y una región pequeña de aproximadamente 1,2 kb conocida como *región control*. Esta región es muy polimórfica y contiene dos regiones hipervariables bien caracterizadas, conocidas como la región hipervariable I (HVI) y la región hipervariable II (HVII), de aproximadamente 400 bp cada una. Todos estos elementos de control hacen que esta región no sea en conjunto selectivamente neutra.

La identificación forense mediante ADNmt se basa fundamentalmente en el estudio de esta región no codificante. De la misma manera, dada su alta variabilidad, es de gran utilidad en el estudio antropológico de la evolución humana ya que las diferencias interpoblacionales a nivel mitocondrial son un reflejo molecular de acontecimientos históricos que se han venido sucediendo durante los últimos milenios.

También están cobrando un valor cada vez mayor el estudio de variaciones nucleotídicas simples en región codificante (SNPs) del ADNmt que permiten definir con mayor precisión el haplogrupo al que pertenece una muestra lo que aumenta su valor identificativo. Por ejemplo, un porcentaje importante de las muestras europeas pertenecen al haplogrupo H (esto es, a un mismo linaje) sin posibilidad de diferenciar unos individuos de otros si no se recurre al análisis de SNPs de región codificante que aumenta sensiblemente el poder del test.

El ADNmt es importante en genética forense en dos circunstancias: en el análisis de pelos y cabellos y en el análisis de muestras degradadas.

Por su mejor comportamiento en muestras degradadas el ADNmt es esencial para muchos casos de identificación a partir de restos óseos. Se han obtenido secuencias de ADNmt en muestras de miles de años y la prueba ha servido para solucionar numerosos enigmas históricos como la identificación, antes indicada, de los restos de la familia Romanov.

La mayoría de los laboratorios de Genética forense utilizan hoy día el ADNmt, siendo su mayor problema el control de la contaminación y la valoración estadística. La Sociedad Internacional de Genética Forense (ISFG) ha publicado recomendaciones estrictas para su uso apropiado.

La valoración estadística exige el que se disponga de bases de datos poblacionales muy amplias (es decir perfiles de ADNmt totalmente anónimos con el fin de estimar su frecuencia) y en este sentido se está haciendo un esfuerzo colaborativo importante a nivel mundial.

Los polimorfismos del cromosoma Y

A pesar de representar sólo el 2% del componente cromosómico humano, el cromosoma Y posee unas características que le diferencian del resto de los cromosomas y le confieren gran utilidad desde el

punto de vista tanto forense como antropológico de las que la más importantes son primero que la mayor parte del cromosoma Y no recombina durante la meiosis. Esto determina que todas las secuencias localizadas en esta región no pseudoautosomal, son heredadas como un bloque de padres a hijos, constituyendo un grupo de ligamiento. La única fuente posible de variación es producida por eventos mutacionales.

La segunda es que presenta una baja diversidad a pesar de lo cual se han descrito numerosos polimorfismos. De todos ellos los más interesantes a efectos forenses son los microsatélites, aunque los marcadores bialélicos (mayoritariamente SNPs) están empezando a tener una gran importancia por su sensibilidad para poder ser analizados en muestras mínimas, y por la posibilidad de definir con precisión el haplotipo y poder así dar datos sobre el origen geográfico posible de una muestra.

Actualmente se pueden encontrar en bases de datos genómicas centenares de STRs de cromosoma Y pero también se ha estandarizado su uso. Así, los STRs que integran el llamado "haplotipo mínimo" (DYS19, DYS385, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392 y DYS393) son usados por la mayoría de los laboratorios forenses en la actualidad y existen multiplexes comerciales ampliamente usados.

Los microsatélites localizados en el cromosoma Y, han irrumpido con gran fuerza en el panorama de los marcadores genéticos de uso forense, debido a que suponen una ayuda inestimable para ciertas situaciones forenses específicas como son algunos casos de investigación de la paternidad difíciles y especialmente casos criminales con mezcla de ADN masculino y femenino. Así, los polimorfismos de cromosoma Y son importantes en el análisis de muestras en delitos contra la libertad sexual en las que el esperma u otras células del agresor están mezcladas con células femeninas de la víctima; ya que si son utilizados marcadores autosómicos, se obtiene una amplificación preferencial del mayor de los componentes (usualmente DNA femenino), que enmascara el perfil genético del asaltante.

Además de los microsatélites está siendo cada vez más importante el uso de polimorfismos nucleotídicos simples (SNPs) de cromosoma Y. Estos completan la información de los STRs y son útiles para conocer el origen geográfico de la persona que dejó la muestra.

La Sociedad Internacional de Genética forense (ISFG) ha publicado recientemente recomendaciones para el uso correcto de estos polimorfismos, su nomenclatura y especialmente la valoración estadística de los resultados, que comparte los problemas del ADNmt. Como en éste, existe la necesidad para los polimorfismos de cromosoma Y de grandes bases de datos poblacionales para estimar la frecuencia de los haplotipos y se ha realizado un esfuerzo colaborativo a nivel mundial muy importante en este sentido (www.ystr.org).

STRs y SNPs de cromosoma X también están siendo cada vez más usados en la resolución de casos de paternidad difíciles como herramientas complementarias a todas las anteriores.

SNPs y los métodos de futuro

A diferencia de otros campos de la Genética, los avances tecnológicos en el área forense suelen tener una aplicación a la realidad pericial relativamente lenta por la necesidad de validación previa y de incorporación a programas de control de calidad.

Los polimorfismos de más futuro, y ya en la mayoría de los casos en una fase de validación avanzada son los más simples, esto es los SNPs de cromosomas autosómicos. Estos poseen una tasa de mutación muy baja lo que los hace idóneos para pruebas de paternidad.

Frecuentemente, debido a la alta tasa de mutación de los STRs, aparecen en las pruebas de paternidad inconsistencias que parecen exclusiones pero que son mutaciones. Al incluirlas en los cálculos estadísticos la probabilidad de paternidad baja drásticamente. El uso de paneles de SNPs está solucionando todos esos casos. Además está demostrando ser particularmente útil en los casos de paternidad con relaciones familiares en el grupo (por ejemplo, que los posibles padres sean dos hermanos), así como en paternidades que se han de realizar a partir de material degradado (por ejemplo, tras exhumación de los restos óseos del presunto padre).

Dado que el tamaño de los productos amplificados puede ser mínimo, la eficacia de los SNPs en material degradado y en bajo número de copias supera con creces a los STRs.

Su simplicidad los hace susceptibles de análisis a gran escala y particularmente de análisis con chips o microarrays de ADN.

Entre todos los tipos de nuevas tecnologías quizá los formatos basados en MALDITOF MS ("Matrix assisted laser deionization time-of-flight mass spectrometry") son los de mayor futuro sin olvidar formatos electroforéticos basados en miniselección. Así, la mayor parte de los laboratorios forenses avanzados que los han incorporado en la rutina emplean SNaPshot (una tecnología basada en miniselección y electroforesis) y GenPlex (una tecnología que combina OLA –una técnica de aplicación basada en ligasas– y PCR).

El número de SNPs que se necesitan a efectos forenses es relativamente bajo comparado con otras aplicaciones de los SNPs en Genética humana. Unos 50-60 SNPs de frecuencias equilibradas tienen aproximadamente el mismo nivel de discriminación que 12 STRs. El grupo SNPforID (www.SNPforID.org) ha validado un set de 52 SNPs autonómicos que está siendo muy empleado y también diversos sets de SNPs para otras aplicaciones forenses de los SNPs.

En este sentido, una de las aplicaciones más interesantes es el uso de AIMs (marcadores informativos de ancestros) para predecir el origen geográfico de la persona que ha dejado una muestra biológica. Este tipo de prueba ha sido empleado con éxito en los atentados del 11-M de Madrid para predecir el origen geográfico de perfiles no identificados encontrados en objetos importantes para la investigación judicial del caso (Phillips et al. Plos One, 2009). La eficacia del método es muy alta hasta el punto de poder predecirse con una elevada probabilidad en muchos casos si una muestra es sureuropea o norteafricana, dos poblaciones tan próximas geográficamente y con una larga historia compartida.

Los SNPs son también importantes y lo serán aún más en el futuro para predecir características físicas de un individuo a partir de una muestra con fines de investigación policial. Así, a partir de un vestigio, ya se puede decir si una persona tiene el pelo pelirrojo y se está haciendo una investigación muy intensa en otras características físicas como color de los ojos, de la piel, lateralidad, rasgos faciales, etc.

ADN en bajo número de copias y mezclas de perfiles de ADN

La sensibilidad de las técnicas actuales ha hecho posible que se puedan obtener perfiles de ADN a partir de sólo unas pocas copias (agarrar una prenda o un objeto unos pocos segundos ya es suficiente para dejar un perfil). Por desgracia esto ha hecho más compleja la interpretación al aumentar el número de casos en los que existe una mezcla de perfiles de ADN.

El análisis de mezclas de ADN es pues una práctica habitual en la rutina forense y es uno de los mayores retos. Su interpretación es delicada dado que se hace imposible diferenciar qué alelos pertene-

cen a cada contribuyente a la mezcla. Si además la mezcla está desequilibrada (uno de los contribuyentes aportó más cantidad de fluido biológico que el otro u otros) podemos cometer errores al asignar alelos que en realidad son artefactos de la amplificación (*stutters*) o al no detectar alelos que realmente existen en la mezcla (*drop out* alélico).

Para solucionar los problemas de interpretación de mezclas de perfiles se han creado programas informáticos que nos ayudan a la interpretación de mezclas (Pendulum) cuando no existe la posibilidad de la separación física de los perfiles genéticos. Por otro lado, en casos de delitos contra la libertad sexual, donde la separación física es posible, es cada vez más frecuente el uso de técnicas que aíslan mediante láser cada espermatozoide que visualizamos e introducimos en un tubo para extraer su ADN independientemente del de la víctima, evitándose así los perfiles mezcla.

Automatización y rapidez del análisis forense

Uno de los principales problemas hoy en los laboratorios forenses es el gran número de datos electrónicos que se generan regularmente. Desde que una muestra llega al laboratorio hasta que se escribe el informe pericial son muchos los pasos que se dan y los resultados analíticos que se producen. Hemos de tener en cuenta el carácter judicial de las muestras que analizamos, y como tales han de estar controladas en todo momento, siguiendo una cadena de custodia tanto de los efectos como de las sub-muestras que se generan de ellos. Por tanto, en los últimos años ha sido necesario desarrollar sistemas informáticos que permitieran el manejo fácil y seguro de toda esta información generada, los LIMS (*Laboratory Information Management Systems*). Estos sistemas nos permiten saber dónde están en cada momento las muestras que se analizan y en qué fase del análisis se encuentran (trazabilidad), nos proporcionan las herramientas necesarias para las revisiones administrativas de cada caso y contienen módulos analíticos para estudios de ADN (comparación y almacenamiento de perfiles genéticos, análisis estadísticos, etc).

Las técnicas de análisis en sí también están automatizándose. Existen hoy en día robots para extraer ADN de un elevado número de muestras en un par de horas, aunque aún no están preparados para muestras críticas.

Los sistemas miniaturizados compactos (lab-on-a-chip) están actualmente en fase de diseño y experimentación. Han sido de muy difícil desarrollo al basarse aun actualmente la identificación en STRs lo que exige recorridos electroforéticos de cierta distancia pero han cobrado un nuevo auge con la potencial aplicación de los SNPs. En el futuro próximo se dispondrá de sistemas que se puedan llevar a la escena del crimen y estén conectados de forma directa con bases de datos. En algunos países, dada la insuficiencia actual de este tipo de aproximaciones, se utilizan laboratorios móviles que se llevan a la escena del crimen para tratar de minimizar el tiempo de respuesta.

La valoración de la prueba biológica.

Cuando se analizan polimorfismos genéticos en manchas biológicas y se trata de ver si corresponden a un individuo, cuya sangre también es analizada, pueden suceder dos situaciones: que no coincidan uno o varios marcadores analizados o que coincidan todos.

En el primer caso podemos decir que la mancha analizada no corresponde al individuo con un margen de error prácticamente despreciable y que depende, en todo caso, de la seguridad analítica del laboratorio, de ahí la importancia de la acreditación y los controles de calidad.

El problema se presenta cuando coinciden los grupos analizados en el individuo y la mancha. La pericia de ADN, en caso de coincidencia entre la mancha y el acusado, puede tener un enorme valor, pero también este valor puede ser relativo.

La respuesta que, entonces, los jueces esperan del perito es el conocer la probabilidad de que esa mancha de sangre, ese pelo o ese esperma provenga de ese individuo.

Antes de nada hay que aclarar que aunque coincidan varios marcadores, siempre existirá una incertidumbre sobre si la mancha pertenece al individuo, que, en muchas ocasiones, puede ser mínima, pero siempre es cuantificable y no puede hablarse en ningún caso de incriminación o seguridad absoluta. Siempre se ha de proceder a la valoración probabilística de la coincidencia de perfiles de ADN, contempladas desde la perspectiva de la acusación y la perspectiva de la defensa y expresadas como una proporción entre ambas (de ahí que se utilicen siempre razones de verosimilitud para expresar el valor de la prueba).

Como se trata en definitiva de ver la probabilidad de los perfiles de ADN observados en caso de que el acusado haya cometido el crimen (o sea el padre biológico por ejemplo) respecto a que otro haya cometido el crimen (una persona al azar) se necesitan obtener primero las frecuencias de los marcadores utilizados en la población objeto del caso en cuestión. En este sentido, la genética forense es una rama aplicada de la genética de poblaciones humanas y se exige un entrenamiento en este campo de todos los expertos en genética forense.

La comunicación del valor de la probabilidad es algo también muy importante y que dista de ser fácil. El experto que necesita un intenso entrenamiento en este aspecto debe de evitar caer en las llamadas falacias del fiscal y de la defensa y contemplar el valor de la prueba desde una perspectiva justa.

Para una revisión de este importante apartado véase Buckleton et al. (2005) y Evett y Weir (1998).

La estandarización y el control de calidad

Más importante que todo el desarrollo científico de la prueba de ADN ha sido en mi opinión el profundo cambio conceptual que ha experimentado la Ciencia forense de mano de la Genética forense en las dos últimas décadas.

Este cambio conceptual afecta a dos aspectos: uno, el que acabamos de comentar, de valoración estadística de la prueba y el segundo la necesidad de una estandarización no sólo para hacer posible la comparación de resultados entre los laboratorios sino para probar la calidad del laboratorio y de sus resultados.

Este cambio representa el paso del forense tradicional con opiniones basadas en la experiencia y en la intuición y que dan un valor absoluto a las mismas, al científico moderno con opiniones basadas en la evidencia científica, en el razonamiento y que sabe que todas tienen incertidumbre y que ésta se puede cuantificar.

Pero, ¿por qué son los estándares tan importantes en Genética forense?

Controles de calidad

Sin un acuerdo en estándares es imposible gestionar controles de calidad y éstos son cada vez más necesarios en todos los laboratorios forenses.

En muchos países la pericia es de libre designación por el juez y en la mayoría las partes solicitan peritos para segundas opiniones, pero ¿cómo sabe un juez o las partes que un laboratorio tiene un nivel adecuado?. Sin controles de calidad y progresos en acreditación es imposible.

Sin que los peritos se pongan de acuerdo en estándares la gestión de controles de calidad es imposible. Aquí surge la primera necesidad que justifica su existencia.

Segundas opiniones

La segunda opinión o contrapericia es una necesidad tan básica en Ciencias forenses como una pericia bien hecha.

Si cada laboratorio utiliza los marcadores que quiere o les denomina de forma diferente a otros laboratorios, no habría forma de valorar los datos que un laboratorio emite, impidiéndose la posibilidad de una contrapericia.

Validación de procedimientos

Un procedimiento es válido cuando la comunidad científica así lo establece. Los procedimientos han de ser comprobados por los científicos, validados por las comisiones apropiadas y establecidos estándares para su uso.

Experiencia

Una de las mayores ventajas en ponerse de acuerdo y establecer estándares comunes, es el conocimiento que se deriva del uso de sistemas concretos que redundan en beneficios indudables para su aplicación en la práctica.

Así, gracias al uso común de marcadores, podemos tener una mejor estima de frecuencias poblacionales y conocer la existencia o no de problemas genético-poblacionales para sistemas concretos, se puede conocer con mayor exactitud la tasa de mutación o la existencia de alelos raros y una estima eficaz de su frecuencia, acumularemos más datos sobre la estructura de esos sistemas, etc.

Comparación de bases de datos poblacionales e integración de bases de datos criminales comunes

El establecimiento de estándares comunes permite comparar datos y permite usar e integrar bases de datos de frecuencias.

Además la mayor movilidad internacional de los delincuentes especialmente en delitos como terrorismo y crimen organizado hace conveniente el establecimiento de bases de datos con fines de identificación criminal comunes que sólo se logrará con el establecimiento de los estándares adecuados.

Los estándares en el laboratorio forense pueden ser agrupados en estándares técnicos y de procedimiento.

Los estándares técnicos incluyen el tipo de marcadores genéticos que deben de ser usados, su nomenclatura, la metodología válida para su análisis, los métodos estadísticos utilizados para la valoración de la prueba, la elaboración del informe final y su comunicación.

Las estándares de procedimiento incluyen todos aquéllos necesarios para una acreditación de laboratorios e incluyen aspectos como la organización del laboratorio, el personal (su formación entrenamiento específico, experiencia, responsabilidades, etc), la documentación y control de las pruebas, los protocolos de laboratorio, el calibrado y mantenimiento de los equipos, los controles externos e internos, las auditorías externas y su frecuencia, etc.

En cuanto a los estándares técnicos, y a pesar del número de marcadores y estrategias que hoy día existen para el análisis de polimorfismos de ADN, existe una tendencia hacia el uso común de marcadores. Esto es posiblemente debido a los esfuerzos de estandarización de algunos grupos, a la existencia de kits comerciales para el análisis de ADN con fines forenses, a la influencia de algunos grupos líderes en el campo y también al decidido esfuerzo de los genetistas forenses por conseguir estándares comunes y a las pruebas de suficiencia ("proficiency testing") que sólo admiten un número determinado de sistemas.

La mayoría de los laboratorios en Europa siguen las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Genética Forense (ISFG, International Society for Forensic Genetics), sociedad que agrupa a la casi totalidad de peritos a nivel mundial, lo que facilita enormemente la estandarización y lo que implica que todos los laboratorios usen la misma nomenclatura.

La estandarización técnica está ya contemplada por el Consejo de Europa en su Recomendación R (92)1 de 10 de febrero de 1992 sobre "El uso de análisis de ADN en el marco de la Justicia Penal" establece en su artículo 10:

"Los estados miembros promocionarán la estandarización de los métodos de ADN tanto a nivel nacional como internacional. Esto lleva involucrado la adecuada colaboración interlaboratorial en la validación de los procedimientos analíticos y de control"

Todos los grupos de trabajo de la ISFG (www.isfg.org) contribuyen de forma decisiva a la estandarización y al control de calidad, pero sin duda el Grupo de Español y Portugués (GEP-ISFG) es uno de los más activos y el que mejor sistema de pruebas de suficiencia posee a nivel mundial. En él se integran más de 100 laboratorios de España, Portugal y de la totalidad de los países iberoamericanos.

De los grupos de estandarización más globales destacan en Norteamérica el grupo SWGDAM ("*Scientific Working Group for DNA Analysis and Methods*") y en Europa los grupos EDNAP ("*European DNA Profiling Group*") y grupo de trabajo de ADN de ENFSI ("*European Network of Forensic Science Institutes*").

EDNAP es un grupo muy activo creado en 1989 y como hemos indicado contribuyó de forma decisiva la estandarización del uso de SLPs y STRs simples y complejos. Desde 1991 EDNAP es un grupo de trabajo de la ISFG y sus trabajos no sólo han permitido mejorar los estándares en metodología, marcadores genéticos y nomenclatura sino que han servido de modelo para otros esfuerzos de estandarización.

El grupo de trabajo de ADN de ENFSI es otro grupo importante de estandarización cuyas actividades comenzaron en 1996. El grupo integra, en principio, a laboratorios que hacen pericia oficial, aunque en la práctica agrupa de forma casi exclusiva a laboratorios policiales europeos y laboratorios judiciales o Institutos de Medicina Legal en aquellos países donde no existen laboratorios policiales.

EDNAP y ENFSI coordinan bajo la tutela de la ISFG los esfuerzos de estandarización en Europa realizando EDNAP los trabajos de estandarización y validación de nuevas tecnologías y ENFSI los aspectos más prácticos de la pericia como las bases de datos de ADN.

Todos los esfuerzos de estandarización son importantes pero éstos deben de estar coordinados de alguna manera para evitar solapamientos y para que al final no se produzca una guerra de estándares.

En este sentido la Comisión de ADN de la ISFG trata de coordinar estos esfuerzos y emite regularmente recomendaciones para el uso de polimorfismos de ADN en la práctica forense. La comisión de ADN de la ISFG está integrada por el "board" de la ISFG junto con representantes de los principales grupos de estandarización (EDNAP-STADNAP y SWGDAM) y expertos externos elegidos según los aspectos concretos que se traten. Un listado de las recomendaciones de la Comisión de ADN pueden encontrarse en la web de la ISFG (<http://www.isfg.es>).

En cuanto a los estándares de procedimiento están igualmente contemplados en el artículo 6 de la recomendación R(92) 1 del Consejo de Europa sobre "Acreditación de laboratorios e instituciones y control del análisis de ADN" que establece:

"El análisis de ADN es un procedimiento científico sofisticado que sólo debe de ser realizado en laboratorios que posean los medios y experiencia adecuados.

Los estados miembros velarán que esté disponible una lista de laboratorios o instituciones que satisfagan los siguientes criterios:

-Un nivel elevado de conocimiento y competencia profesional asociado a procedimientos apropiados de control de calidad

-Integridad científica

-Seguridad adecuada de las instalaciones y de los materiales objeto del examen

-Medidas pertinentes para garantizar una confidencialidad absoluta respecto a la identificación de la persona de la que se proporcionan los resultados del análisis de ADN.

-Garantías de que las condiciones que se enuncian en la presente recomendación serán respetadas.

Los estados miembros deberán tomar disposiciones para que los laboratorios acreditados sean supervisados regularmente".

A pesar de esta recomendación no en todos los países europeos se exige la acreditación de forma oficial (por ejemplo no en España) aunque todos avanzan hacia ella.

A nivel mundial sólo se ha logrado por la ISFG una estandarización de los procedimientos en materia de paternidad habiendo acordado los representantes de los grupos europeos, americanos (en Norteamérica es la AABB en este aspecto de la pericia la responsable de los estándares) y asiáticos seguir las normas ISO 17025 con algunas especificaciones concretas. Es posible que pronto se alcance un acuerdo similar en materia de pericia penal, posibilitando así que los genetistas forenses podamos trabajar con un marco de referencia similar a nivel mundial y con una calidad uniforme y realizando cada vez mejor en nuestro trabajo diario en bien de la justicia.

Bibliografía

1. Buckleton J. , Triggs C.M., Walsh S.J. (2005) Forensic DNA evidence interpretation. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA.

2. Butler J.M. (2001) *Forensic DNA typing*. Academic Press, London, UK.
3. Evett I, Weir B.S (1998). *Interpreting DNA Evidence*, Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.
4. Jobling MA, Gill P. (2004) Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet.* 5(10):739-751.
5. Phillips C, Prieto L, Fondevila M, Salas A, Gómez-Tato A, Álvarez-Dios J, Alonso A, Blanco-Verea A, Brión M, Montesino M, Carracedo A, Lareu MV. Ancestry analysis in the 11-M Madrid bomb attack investigation. *PLoS One.* 2009 Aug 11;4(8):e6583.