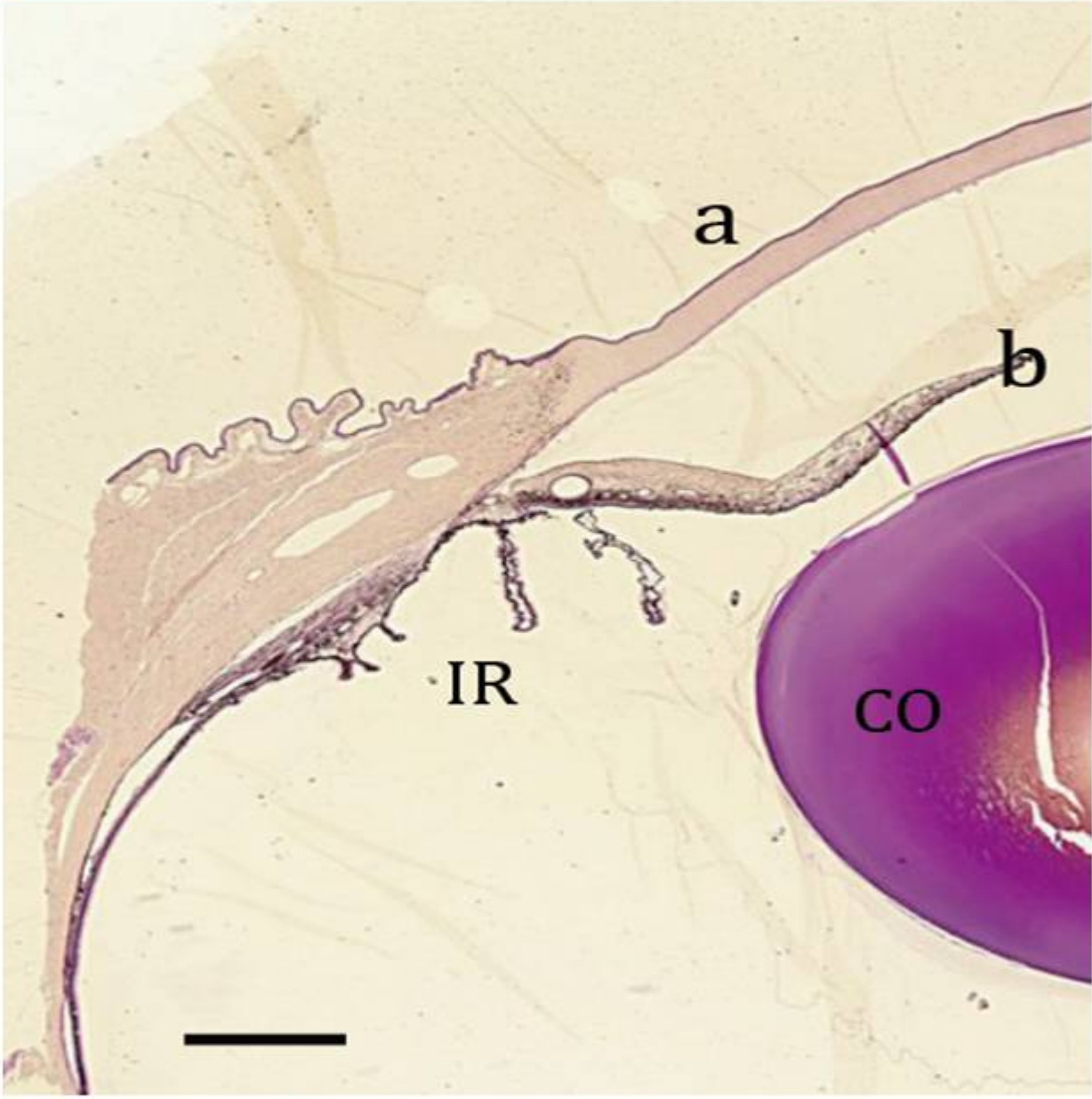
ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

RANF

An. R. Acad. Nac. Farm.
Vol. 78. n. 2 2012
ISSN 1697-4271
Publicación electrónica trimestral



EDITORIAL

Discurso de agradecimiento de la Excma. Sra. Dª Mª Teresa Miras Portugal, Presidente de la RANF, en la entrega del Premio Miguel Catalán de la Comunidad de Madrid

María Teresa Miras Portugal

Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia
Recibido el 20 de abril de 2012
e-mail: edicion@ranf.com

Excma. Señora Presidenta de la Comunidad de Madrid, Sra. Consejera, Autoridades, compañeros premiados, amigos.

Es un gran honor recibir el premio de Investigación, Miguel Catalán, a la carrera científica. Teniendo en cuenta la gran calidad de los investigadores que me han precedido en ser galardonados con tal distinción.

Este Premio a una vida de trabajo indica que ha pasado mucho tiempo desde los primeros años en mi Galicia natal, donde antes puedo asegurarles que llovía. Todavía resuena en mis oídos la frase cientos de veces repetida por mi padre, cuando me veía trabajando en aquellas labores primorosas que hacíamos de niñas: "deja eso y coge un libro", mis padres consiguieron que la lectura y la observación de la naturaleza fueran pasión que se ha incrementado con el tiempo. Mi esposo Fernando Varela, gran matemático, añadió plenitud y el valor de los números a mi vida. Nuestra mejor obra son nuestros hijos Fernando y Alberto, juntos hemos recorrido una hermosa aventura vital, que proseguimos.

Este acto me permite agradecer sinceramente en primer lugar a la Comunidad de Madrid, que crece con el ingenio y la creatividad de sus gentes y aplica el criterio universal de adopción a los que en ella trabajan.

Agradecer al Jurado que tan generosamente ha juzgado mis méritos.

A las instituciones que me han financiado, la consejería de Educación de la Comunidad de Madrid; los Ministerios de Sanidad y Educación y Ciencia, con sus diversas denominaciones, la Comunidad Europea y otros organismos internacionales.

Agradecer las ayudas de Fundaciones privadas: de modo especial La Fundación Ramón Areces y en estos últimos años la generosidad de la Fundación Marcelino Botín. Esta encomiable labor de Mecenazgo es indispensable para

ayudar a los jóvenes científicos, creativos y vocacionales, tan necesarios para mantener a nuestro país en una sociedad avanzada.

Gratitud a mis maestros, Don Ángel Santos y Don Alberto Sols y al gran neurocientífico de la Universidad de Estrasburgo el Profesor Paul Mandel. Allí aprendí el ejercicio de la racionalidad cartesiana, el obligado respeto y análisis de las ideas ajenas y a no subestimar la calidad de las ideas propias.

La ciencia es una actividad social y colectiva, a nuestro modo construimos catedrales de gran belleza, que requieren planificación, tiempo, inteligencia y financiación. La investigación biomédica necesita un grupo de investigación cohesionado, y he tenido la inmensa suerte en estos casi 40 años de trabajo de tener colaboradores entusiastas y de gran inteligencia, a los que realmente dedico este premio, que es el suyo.

Nuestra ambición es conocer lo que pasa en el cerebro humano. Tarea compleja que requiere una pequeña parábola: Llevamos jugando al ajedrez casi dos mil años, con 32 piezas, moviéndose en 64 casillas, con unas normas rígidas y ¡Aun no hemos sido capaces de agotar todas sus posibilidades! ¿Cuántos años necesitaremos para identificar las posibilidades del cerebro humano con sus 100.000 millones de neuronas, 1011 , que son sus piezas de juego y su cableado de axones que permite formar 1.000 billones de conexiones sinápticas, 1015, que son las casillas sobre las que se mueven? Estas cifras son realmente difíciles de imaginar, aunque comiencen a resultarnos familiares en esta época de déficits y quiebras.

Hemos trabajado en una idea original enteramente, gestada, trabajada y defendida desde la Universidad Complutense, Institución que tanto ha dado a esta Comunidad de Madrid y a la que agradezco haya propuesto mi candidatura para este premio. ¡Y hemos tenido suerte!

Don Santiago Ramón y Cajal, nuestro gran neurocientífico, Profesor de la Universidad Complutense y también madrileño de adopción, describía las neuronas de las estructuras cerebrales como elementos de un bosque tropical exuberante. Por suerte, hoy cultivamos las neuronas y puedo demostrar, como apasionada que soy de la botánica por mi formación farmacéutica, que son de inigualable belleza. Gracias a las nuevas tecnologías podemos analizar su capacidad funcional individualmente mediante video microscopia, identificarlas con colores fluorescentes como un arco iris. A pesar de que el diámetro de una neurona sea entre 200 y 1.000 veces menor que el de una moneda de un céntimo de euro, unidad monetaria que los científicos manejamos con gran maestría.

Es en estas neuronas donde hemos establecido la importancia fisiológica de los nuevos compuestos que hemos descubierto, capaces de acelerar ó de frenar el crecimiento de las prolongaciones neurales y otras muchas funciones en la

ramificación del cableado cerebral. Todas ellas etapas esenciales en la formación del cerebro adulto en plenitud que define los límites de nuestra identidad.

Pero cuando esos límites se difuminan y uno no es consciente de la piel que habita, como diría Almodóvar, también madrileño de adopción, y las devastadoras enfermedades neurodegenerativas nos encierran en soledad no buscada, es cuando nos preguntamos si lo que hemos descubierto para construir podría servir para frenar ó regenerar lo que se deteriora. Los resultados son prometedores para ralentizar el crecimiento de las placas de Alzheimer y el deterioro del control del movimiento. Y cada vez que descubrimos algo nuevo, por pequeño que sea, desbordamos de optimismo. Esto me preocupa, pues como decía Don Antonio Mingote, también madrileño de adopción, el pesimista es un optimista bien informado. Por el momento lo que desconocemos del funcionamiento de nuestro sistema nervioso es tan amplio como nuestra galaxia, por ello no hay motivo todavía para el pesimismo.

Finalizo diciendo que nuestro cerebro es el único lugar donde tiene sentido la inscripción del templo de Apolo en Delfos: Conócete a ti mismo. Para ello es esencial cruzar el bosque galáctico/cerebral que imaginó Cajal, identificando cada uno de los elementos de ese bosque animado poblado con nuestra propia vida.

Muchas gracias.

Excmo. Sr. D. Benito del Castillo García

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Deseo iniciar esta sección con una presentación, que considero original, y que tras mi última visita a las universidades venezolanas de Mérida (Universidad de los Andes: ULA) y Caracas (Universidad Central de Venezuela: UCV), creo que debe ser conocida mejor.

Se trata del Serpentario de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela (Caracas). Está ubicado en el piso 8 de la Facultad de Farmacia en un área de 30 m^2. Aloja a 200-250 serpientes de la familia Viperidae, todas pertenecientes a la ofidio fauna venenosa de Venezuela.

La temperatura ambiente del Serpentario es de 26-27ºC y 60% de humedad. Las principales especies de serpientes pertenecen a los géneros Crotalus y Bothrops. Este Serpentario fue inaugurado en el año 1969 y pertenece al Laboratorio de Investigaciones Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia.

En dicho Laboratorio se estudian las características tóxicas de todos los venenos de la ofidio fauna venezolana.

Este Laboratorio está dirigido por el Dr. Héctor Scannone y con él trabaja un grupo de investigadores que desarrollan numerosos proyectos para conocer todas las características de los venenos y su actuación sobre humanos y otras especies animales.

A partir de 1980 se comenzó la producción de antivenenos en la sede de la Facultad de Farmacia, empleando parainóculos de los venenos de las citadas serpientes, en equinos, siendo coordinado este programa por el Dr. Oswaldo Grillo. En 1981, se prepararon las primeras ampollas de suero antiofídico.

En 1983, se creó el Centro de Biotecnología de la Facultad de Farmacia de la Universidad, que es el responsable de los medicamentos antiofídicos producidos.

Posteriormente, en 1983, bajo la dirección de la Dra. Jeanette Scannone se comienza con la producción de sueros antiescorpiónicos. En el año 2002, se crea una empresa universitaria para comercializar todos estos productos antivenenos producidos en este centro (Facultad de Farmacia – Fundación UCV).

Es muy importante señalar que la Facultad de Farmacia de la UCV es la única institución del país que produce antiveninas, las cuales son distribuidas a lo largo del territorio venezolano, puesto que es el único tratamiento disponible allí, para salvar la vida tras accidentes ofídicos y escorpiónicos.

También es mi propósito, reseñar en estas páginas la reunión habida del 10 al 12 de mayo de 2012, promovida por la Organización de Farmacéuticos Ibero-Latinoamericanos, que ha celebrado en Oviedo, el XVI Encuentro OFIL América-España, con un apretado programa científico.

Caben destacar muchos y variados temas de interés farmacéutico, tales como "La problemática medioambiental de los residuos de medicamentos", donde se expuso que los nutracéuticos y los medicamentos, tanto de uso humano como animal representan más de 4.500 medicamentos (1.090 pequeñas moléculas en EEUU), además de otros agentes contaminantes que van a parar a mares, ríos y lagos.

En la UE, disponemos de dos directivas: 2001/83/EC, para humanos y la 92/18/CEE, de ámbito veterinario.

También se indicó que la Agencia Americana de Medio Ambiente, lleva a cabo una importante labor de seguimiento de residuos y desarrollo analítico. La fotodegradación, nuevas tecnologías, etc., se consideraron como aspecto de especial trascendencia, así como las nuevas resistencias bacterianas, efectos sobre la fauna silvestre, fertilización de suelos, efectos acumulativos, metabolitos en el medio, ensayos de riesgo ambiental, SIGRE, envases no reciclables, etc.

Otra interesante aportación presentada en el Encuentro OFIL versó sobre "¿Qué farmacéutico necesitamos?" El disertante, que fue el primer Decano de Farmacia de la Universidad San Jorge de Zaragoza, expuso su punto de vista, con mayor inclinación hacia la Atención Farmacéutica y Farmacoterapia, según la experiencia de una Universidad nueva y ambiciosa, con una oferta diferente a las clásicas públicas, asumiendo también la responsabilidad de los recientes cambios sociales ante una polimedicación de la sociedad y una morbi-mortalidad evidente, asociada a los medicamentos. Todo ello, indicó, es una clara misión del farmacéutico implicado con la Salud Pública, agente sanitario y científico, que debe estar relacionado siempre con el médico, el paciente (calidad asistencial) y otros profesionales sanitarios.

Así, deberá satisfacer las necesidades farmacoterapéuticas del paciente. Propicia, por tanto, la especialización en Farmacia Asistencia.

El anterior Decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, hoy día uno de los mayores especialistas en Atención Farmacéutica a nivel mundial, prodiga con frecuencia sus enseñanzas por Iberoamérica. En este encuentro expuso un interesante resumen de su actividad, exponiendo cuales son las principales barreras para la implantación de la Atención Farmacéutica. También puso de relieve las claves para abordar la actual situación de la oficina de farmacia, ya que sostiene que el farmacéutico debe intervenir en los tres niveles en que se atienden a los pacientes crónicos y polimedicados; por tanto deberá modificarse la estructura de las actuales farmacias, buscando la confidencialidad. La Universidad y las corporaciones profesionales farmacéuticas, deberán ir sincronizadas y presentar sus propuestas a la administración sanitaria. En cualquier caso, considera, que el farmacéutico necesita apoyo y ayuda para lograr el deseable cambio y así poder enfocar nuevos servicios orientados al paciente. Será pues necesario establecer un modelo jerárquico de servicios cognitivos. Conviene en que los farmacéuticos comunitarios deben hacer y publicar trabajos de investigación específicos de esta área.

Puesto que la oficina de farmacia es la salida mayoritaria de nuestros alumnos, estima que debe aumentar la formación clínica, tanto en grado como en posgrado; incluso compartida con Medicina, así como talleres de formación en las habilidades y destrezas necesarias. Se deberá dar la máxima calidad de servicio. La formación continuada requerirá, variadas unidades formativas y de competencias. El seguimiento faramcoterapéutico, aportará efectividad y seguridad, que serán indicadores fáciles para el farmacéutico que actúe en atención farmacéutica. Así pues, se deberán alcanzar mayor niveles de consenso internacional, incrementar el número de profesores vinculados, para consolidar la enseñanza de la atención farmacéutica, incluso recomienda la creación de departamentos propios de "Prácticas Profesionales", así como la acreditación de las competencias farmacéuticas.

Un destacado representante del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, también Profesor Asociado de la Facultad de Farmacia de la UCM, presentó un interesante trabajo sobre "Asistencia sanitaria al paciente con asma/EPOC". Enunció como es posible la colaboración entre médicos, pacientes y farmacéuticos en estos temas, que además sirven como revulsivo profesional para medir la efectividad de las acciones realizadas en las oficinas de farmacia y así poder constatar trabajos de investigación, fundamentalmente con enfermos crónicos asistidos en programas de Educación Sanitaria por equipos multidisciplinares. En el trabajo presentado se consideraron numerosas variables sociodemográficas, así

como la adherencia a los tratamientos prescritos. La intervención educativa fue importante, dado que EPOC es una de las principales causas de mortalidad en España.

Por parte, de Colombia intervino una destacada asesora del Ministerio de Salud, Directora Técnica del Centro de Información de Medicamentos de la Universidad Nacional de Colombia. Presentó un importante trabajo sobre los "Avances en Latinoamérica de la Farmacoepidemiología". En su país considera que las reclamaciones técnicas y judiciales, así como el gasto sanitario actual están produciendo una hiperinflación farmacéutica, que hace insostenible el sistema. Considera que es preciso tener presente la evolución de determinados medicamentos (monoclonales, enzimas…) que se ha triplicado en los últimos cinco años, fundamentalmente debido a una excesiva presión tecnológica. Por tanto existe una responsabilidad social y farmacéutica para una adecuada gestión pública del gasto en medicamentos. Considera necesario el fortalecimiento de la Red de Farmacovigilancia Panamericana, fomentado las buenas prácticas y la armonización en las Américas. Considera que se está produciendo una rápida presencia de medicamentos biotecnológicos en esta región.

De indudable interés fue una mesa redonda en la que se presentó el modelo de "Atención Farmacéutica en Brasil", fundamentalmente tras los consensos de 2002 sobre asistencia farmacéutica y atención farmacéutica, lo que obligó a plasmar nuevas directrices curriculares. En el abanico universitario brasileño, en 2009 existían estudios de atención farmacéutica en 63 centros, fundamentalmente en la región sur y suroeste, vinculado a las universidades, así como en farmacias hospitalarias universitarias. Se plantearon y resolvieron varias interrogantes en el ámbito brasileño: ¿qué piensa el médico sobre la atención farmacéutica?, ¿qué piensa en paciente?, ¿qué piensa el farmacéutico?, ¿qué espera el paciente sobre el servicio?, ¿qué piensan los estudiantes de Farmacia? Expuso los resultados emanados en los diferentes foros de discusión filosófica sobre los servicios farmacéuticos, fundamentalmente públicos.

Por parte de la farmacia hospitalaria se presentó un concienzudo trabajo sobre "La trazabilidad de medicamentos en Uruguay". Este país presenta en la actualidad una economía floreciente, pero considera que también hay que buscar mejores estrategias para alcanzar eficacia en salud y eficiencia de recursos, a fin de lograr las recomendaciones recientes de la OMS.

Singular proyección tuvo el trabajo presentado por el responsable de una importante empresa internacional sobre "Patentes Farmacéuticas". Indicó que el 16% de la Industria Farmacéutica de la Unión Europea depende de su I+D. Recuerda que poner un nuevo medicamento en el mercado supone un gasto de 581,3 M€ a lo largo de doce años y solo un número ínfimo de moléculas alcanzarán

el mercado. La patente es un contrato entre la sociedad y el inventor, que le protege. Se exigen tres requisitos: que tenga un mínimo grado de inventiva, sea susceptible de aplicación industrial y suficientemente descrita. La publicación de un "paper" por tanto descarta la patente, ya que se divulga el descubrimiento. Enumeró las exigencias de la Oficina Española de Patentes y Marcas, los derechos de exclusiva que confiere la patente, las excepciones así como diversos ejemplos de invenciones objeto de patentes farmacéuticas. Estableció la diferencia entre patente de producto y de proceso; asimismo expuso como lograr los certificados complementarios de protección y algunas previsiones legales de tipo regulatorio, así como las prohibiciones existentes que hubo en España hasta el 7 de octubre de 1992 previo a la firma de ADPIC. También consideró la forma fácil de acceso para el conocimiento de la caducidad de una patente.

Finalmente, se realizó una tercera mesa redonda en la que se abordaron temas tan interesantes como los "Ensayos clínicos oncológicos: tendencias y líneas de futuro" dirigido por los responsables del Servicio de Farmacia Hospitalaria del 12 de Octubre de Madrid.

Deseo reseñar también otro asunto de interés, ya que en estos últimos días se ha realizado en Sao Paulo un importante Seminario sobre Farmacovigilancia, con la importante participación española del Dr. Mariano Madurga, de la AEMPS, y Vicepresidente de OFIL, organizado por la patronal de las compañías farmacéuticas de esa importante ciudad brasileña, bajo la dirección del Dr. Paulo D. Moretto, también destacado miembro de la Academia de Farmacia de Brasil, que será la organizadora, en 2013, de la reunión de la Asociación Internacional de Academias de Farmacia.

Concluyo esta sección, relatando los aspectos mas relevantes de una serie de actividades superpuestas, que se han desarrollado en Perú en la ciudad de Arequipa, organizadas por el Prof. Dr. Alberto Briceño, Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en la Universidad Católica de Santa María (UCSM). Esta Universidad con tradición de excelencia en Perú, fue la elegida como sede del III Congreso de Educación Farmacéutica y la V Convención de la Asociación de Facultades y Escuelas de Farmacia y Bioquímica del Perú (de la cual el Dr. Briceño es el Presidente), desde el 29 de mayo al 2 de junio.

Considero también digno de destacar que estas actividades se han hecho coincidir con los actos conmemorativos del 35 aniversario de la creación de su Facultad de Farmacia, en que se han reunido numerosos farmacéuticos salidos de sus aulas, para crear la Asociación de Antiguos Alumnos de dicho centro. Estos actos han tenido el decidido apoyo del Colegio de Farmacéuticos de Arequipa.

Como parte del programa del 35 aniversario, y del III Congreso, antes aludido, se han organizado 10 cursos de laboratorio, teórico-prácticos, cada uno con una duración de 12 horas, en jornadas de mañana, para así poder asistir en las tardes a las sesiones del congreso.

Para impartir los cursos fueron invitados destacados especialistas peruanos de amplia experiencia. Así pues, el gerente de Asuntos Regulatorios del Perú, impartió el curso de "Regulación de dispositivos médicos". En la actualidad está bullendo en este país todo lo relativo a los Productos Sanitarios (equivalente en España), tanto a nivel académico como profesional.

Notable interés despertaron otros cursos, tales como "Control de calidad de productos farmacéuticos", "Aseguramiento metrológico en laboratorios" y "Cromatografía gaseosa y Espectrometría de masas aplicado al análisis de contaminantes". En este último curso se emplearon los modernos equipos, recientemente adquiridos para los laboratorios de la UCSM.

También se dictaron otros dos cursos de características distintas, titulados "Farmacia homeopática" y "Seguimiento farmacoterapéutico". Asimismo, fueron incluidos un par de cursos, eminentemente prácticos, sobre "Extracción de aceites esenciales" y "Evaluación de la capacidad antioxidante". Ambos de indiscutible interés para el desarrollo y uso científico de los productos naturales de Perú. Destacó también otro curso de laboratorio de HPLC, importante técnica cromatográfica de amplia utilización y proyección.

De gran actualidad resultó el curso impartido sobre "Uso de bases de datos en la investigación farmacológica".

Personalmente participé antes de estas actividades, en un encuentro de una mañana completa, con alumnos de Farmacia de quinto curso, en que todas las posibilidades del buen trabajo científico y sanitario, quedaron desgranadas en un ejercicio apasionante. Posteriormente hice otro tanto con un grupo de colegiados, a quienes presenté la experiencia española, para concluir con una rueda de prensa conjunta, con el Decano de la Facultad y el Presidente del Comité Científico del Congreso, Dr. Jaime Cárdenas, activo profesor de Química Orgánica.

Las tres jornadas centrales del Congreso de Educación Farmacéutica contaron con un selecto conjunto de conferenciantes y temas de indiscutible interés. Destacaría la presentada por el Prof. Dr. José Juárez, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de San Marcos, de Lima (Decana de las Américas) sobre "Los desafíos y exigencias para el docente universitario en la carrera de Farmacia". El Dr. Fernando Quevedo, tenía anunciada otra ponencia sobre "El farmacéutico es, sobre todo, un profesional de la salud. ¿Responden a esa exigencia los currícula de las Facultades y Escuelas en el Perú?" El Rector de la Universidad

de Cajamarca, Dr. W. Ruiz Vigo, ilustre farmacéutico disertó sobre la "Importancia de los estudios botánicos en el Área de Farmacia". Tres profesores del emblemático Massachusetts College of Pharmacy, de Boston (USA) nos presentaron interesantes temas, tales como "Inhibidores de la FAAH" (Dr. A. Pino), "Narcolepsia" (Dr. T. Maher, eminente especialista y director del Departamento de Farmacología) y "Situación actual de la Farmacia y de los estudios de Farmacia en Norteamérica" (Dr. D. Pisano, Decano de su Facultad). Posteriormente desglosaré su interesante conferencia que nos permitirá conocer las similitudes y diferencias fundamentales con el modelo académico de la UE, surgido tras la publicación de la Directiva 36/2005.

Siguiendo con el relato de las conferencias del III Congreso de Educación Farmacéutica celebrado en Arequipa, indicaré que hubo otras notables aportaciones, así pues, la Dra. Reyes, de la UNANCV, disertó sobre "Alimentos naturales *vs* Alimentos transgénicos". Otras presentaciones interesantes fueron las de la Dra. G. García, de Lima, "Como asegurar el éxito de un fármaco en el mercado, desde el laboratorio de desarrollo".

La segunda jornada sobre Educación Farmacéutica la inició la Dra. Carla Rodríguez, de UPAGU, Cajamarca, exponiendo una interesante alocución sobre "Aplicación de los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia". Posteriormente, el Dr. José Aliaga, director de estudios de Farmacia de la Universidad "Cayetano Heredia" de Lima, centró su intervención sobre "La certificación profesional y su relación con la acreditación de la carrera de Farmacia y Bioquímica". El Dr. I. Torres, Decano de la Facultad de Ciencias de la Salud de UPAGU, Cajamarca, pronunció una conferencia sobre la "Mejora de la calidad educativa a través de estrategias activas y colaborativas". El Doctor Carlos T. Quirino, de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, de México, habló sobre "Coloides y cristales líquidos en Nanomedicina".

El catedrático de Toxicología de la Universidad Arturo Prat, de Chile, impartió dos importantes conferencias, sobre "Análisis toxicológico de Drogas de Abuso y su aplicación a casos de Medicina Forense", su colega de Farmacia, en esa prestigiosa Universidad del norte de Chile, disertó sobre "Composición y estudio de aceites esenciales como actividad biológica". El que suscribe, único miembro español invitado, impartió dos conferencias: "Las Técnicas Instrumentales en análisis y control de medicamentos, empleadas en las modernas Farmacopeas", y "Evolución histórica y función social de la Farmacia en la actualidad". El Dr. Enrique N. León Soria, Decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad Wiener de Lima, presentó el trabajo titulado: "Hitos en la historia de los productos naturales"; el Dr. Benjamín Paz Aliaga, Jefe del Departamento de Bioquímica y Biotecnología en la UCSM, nos presentó una ponencia sumamente novedosa sobre

"Farmacogenómica: Visión y perspectivas". La Dra. Susana Macín, de la UAM-X, de México, disertó sobre "Respuesta microbiológica e inmunológica; un tratamiento periodontal no quirúrgico. Un ejemplo de colaboración farmacéutica, bioquímica y odontológica". La Dra. Macín y el Dr. Quirino, hoy eminentes profesores en México, hicieron sus tesis doctorales en la UCM.

Por parte de la corporación farmacéutica, hubo dos interesantes presentaciones: la primera, pronunciada por el Presidente (Decano) del Colegio de Farmacéuticos de Lima, Dr. Mario Viñas, sobre los "Avances tecnológicos en Farmacia Hospitalaria", en que amenizó su presentación con numerosos ejemplos de farmacias hospitalarias de Perú, España y EE.UU. Asimismo, el Presidente Nacional del Colegio Peruano de Farmacéuticos, recientemente elegido, tras años de inestabilidad profesional, presentó una visión optimista, pero real, de la Farmacia y de los farmacéuticos de Perú, así como la necesidad de contar en esta nueva etapa con la colaboración de las Universidades y Academia de Farmacia de su país.

Ya al final del Congreso de Educación Farmacéutica, el Dr. C. T. Quirino, a la sazón Secretario Administrativo, y el Dr. I. Torres, Secretario General de la Conferencia Iberoamericana de Facultades de Farmacia (COIFFA) y yo mismo, presentamos las nuevas actividades de esta asociación internacional, y los proyectos para el futuro congreso y asamblea general, que se desarrollarán en Colombia y Brasil, respectivamente.

Asimismo, se presentó públicamente en la UCSM, la Red Internacional de Ciencias de la Salud, que tiene como objetivo organizar Programas de Postgrado conjuntos en Farmacia, Odontología y Enfermería, sin una estructura rígida formal, impartidos por profesores de amplia experiencia y prestigio, promovido en distintas universidades (UAM-X, UCM, UPAGU, UNMPSFXCH,…)

Antes, aludí a la presentación del Dr. Pisano. Indicó que los estudios superiores de Farmacia en EE.UU. surgieron en 1821, en Filadelfia y dos años más tarde, se establecieron en Boston. Cuando él fue Decano de Worcester, en el año 2000, ya había 82 facultades. En enero de 2012, el número había ascendido a 127, de las cuales 119 están acreditadas; siendo mayor el número de privadas que de públicas. Las enseñanzas están impartidas por un total de 5.900 profesores, la mayoría de ellos con dedicación exclusiva. La acreditación de los centros dura 8 años.

Existen 69 programas de grado; tras los cuales se obtiene el título profesional de Pharm. Dr.

Para lograr el doctorado (Dr. in Pharmacy), es preciso como mínimo cursar dos años más.

El número de estudiantes en EE.UU. es de 58.900, de los cuales el 60% son mujeres. La media es de 116 alumnos por aula, en las clases teóricas.

Tras cursar los estudios, es preciso para poder ejercer profesionalmente, realizar un examen a nivel nacional. Los exámenes (NAPLEX, es de tipo test y consta de 185 preguntas; en el MPJE, se han de responder 90 cuestiones), se realizan vía informática. Las cuestiones son muy variadas (farmacoterapia, salud, dispensación farmacéutica,…).

En EEUU, ejercen en la actualidad 285.000 farmacéuticos (60% en oficina de farmacia, 18% en hospitales,…). Según el Dr. Pisano, las ofertas de trabajo son abundantes y variadas, aunque también notan la crisis económica mundial. En el mundo académico, como en el gobierno estatal, la presencia farmacéutica es menor; alrededor del 2% en ambos casos.

Según él, en Canadá, el trabajo para los jóvenes farmacéuticos es más fácil.

INFORMACIÓN ACADÉMICA

Antonio L. Doadrio Villarejo

Académico de número de la Real Academia Nacional de Farmacia
e-mail: edicion@ranf.com

ACTIVIDADES

En el último trimestre, hemos realizado un total de 15 sesiones científicas, de las cuales cuatro, fueron dedicadas a tomas de posesión de nuevos académicos correspondientes, tres nacionales y uno extranjero; cinco conferencias; cinco mesas redondas y una tertulia científica.

Las tomas de posesión de académicos correspondientes nacionales, se consumaron en las personas de D. Luis Rivera de los Arcos, D. Jorge Camarasa García y D. Manuel Guzmán, en las sesiones del 1 y 22 de marzo, y del 7 de junio, respectivamente.

El Ilmo. Sr. D. Luis Rivera de los Arcos, es catedrático de Fisiología en la Facultad de Farmacia de la UCM. Su discurso de ingresó versó sobre la: "Fisiología y Disfunción del Endotelio Vascular" y fue presentado en nombre de la Academia por el académico de número Excmo. Sr. D. Albino García Sacristán.

El Ilmo. Sr. D. Jorge Camarasa García, es catedrático de Farmacología en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. Su discurso de ingreso fue: "Neuropsicofarmacología de las drogas de diseño: del LSD a las catinonas". Le presentó el Excmo. Sr. D. Juan Tamargo Menéndez.

El Ilmo. Sr. D. Manuel Guzmán, es catedrático de Bioquímica y Biología Molecular en la Facultad de Ciencias Biológicas en la UCM y tomó posesión con su discurso titulado: "Endocannabinoides: Un nuevo sistema de comunicación en nuestro organismo". Fue presentado, en nombre de la Corporación, por su Presidenta, Excma. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal.

El 12 de abril, tomó posesión como académico correspondiente extranjero el Prof. Alexei Verkhratsky, Professor of Neurophysiology, Faculty of Life Sciences, en The University of Manchester, UK, con su discurso de ingreso, titulado: "Physiology and pathophysiology of neuroglia". Le presentó también la Excma. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal. A esta toma de posesión, hay que añadir las de Ruth Duncan, Nicholas Peppas y Samuel I. Stupp, en un simposio internacional que

posteriormente comentaré, lo que hacen un total de cuatro académicos extranjeros los que tomaron posesión en el trimestre.

Las cuatro conferencias fueron pronunciadas por:

El reputado científico y académico de número de nuestra Corporación, Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, que nos habló el 15 de marzo, de la vacuna del SIDA que su equipo de investigación del CNB, CSIC, tiene en estudios clínicos, mediante su conferencia titulada: "Vacuna frente al VIH/SIDA: Un largo recorrido".

El 29 de marzo, lo hizo el Ilmo. Sr. D. Daniel P. de la Cruz Sánchez Mata, académico correspondiente de la RANF y catedrático de Botánica de la UCM, quien pronunció una conferencia sobre su investigación geobotánica en California, titulada: "La vida vegetal en hábitats extremos: estudios sobre vegetación y flora ultramáfica en la provincia biogeográfica Californiana (California, Oregón, USA)".

El 3 de mayo, la Academia celebró su sesión científica del jueves, en este caso, con la conferencia del Excmo. Sr. D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo, académico de número de la RANF, titulada: "Fármacos antigripales: actuales, y otros (prometedores) en fase de investigación".

El 10 de mayo, la Dra. Del Val pronunció una conferencia en nuestra Sede, titulada: "Control de las infecciones virales por linfocitos T citolíticos". Margarita Del Val se doctoró en Ciencias Químicas por la Universidad Autónoma de Madrid. Actualmente, es Investigadora Científica del CSIC en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM).

Finalmente, el 14 de junio, el Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza, académico de número de la RANF y ex Director de la UNESCO, pronunció una interesante conferencia, titulada: "Fuentes energéticas para un desarrollo sostenible global".

En cuanto a las mesas redondas, el 8 de marzo tuvo lugar la de: "Vacunas y Vacunaciones: ¿Hacia dónde vamos?" Intervinieron como ponentes los Dres. D. Ángel Gil, Catedrático de Medicina Preventiva y Salud Pública en la Universidad Rey Juan Carlos (Madrid), D. Juan Picazo, Catedrático de Microbiología de la Universidad Complutense, adscrito al Hospital Clínico San Carlos (Madrid) y Dña. Cristina Méndez, responsable médico del área de vacunas de la farmacéutica Pfizer SCBU (España). El 19 de abril, la segunda Mesa Redonda organizada por la Comisión de Aguas Minerales y Mineromedicinales, sobre el Balneario de “El Raposo”, en Badajoz. El jueves 24 de mayo, sobre "Medicina personalizada y desarrollo farmacéutico: una perspectiva bioética", dentro de unos actos donde en primer lugar, se celebró una Tertulia Científica sobre: "Las nuevas perspectivas del desarrollo clínico de medicamentos", en la que intervinieron como ponentes los Dres. Dña. Carmen Ayuso del Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz de

Madrid y D. José Antonio Sacristán, Director médico de la farmacéutica Lilly. A continuación, en la Mesa Redonda, organizada por la sección sexta de "Historia, Legislación y Bioética" y coordinada por su presidente, Excmo. Sr. D. César Nombela, intervinieron como ponentes el Dr. Jaime del Barrio, del Instituto Roche en Madrid, que trató sobre el "Impacto de la Medicina personalizada en el desarrollo de medicamentos" y el Prof. Paul Enck de la Universidad de Tubinga, que disertó sobre "Minimize, maximize or personalize the placebo response". El jueves 31 de mayo, sobre: "Ensayos de protección frente a helmintos", presentada por el Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández, Vicepresidente de la RANF, que también intervino con la primera ponencia: "Introducción a la inmunidad de las mucosas". Posteriormente, lo hicieron los Dres.: D. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz, Académico Correspondiente de la RANF, que habló sobre: "Nuevos antígenos y adyuvantes frente a nematodos" y D. Antonio Muro Álvarez, Catedrático de Parasitología en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca, que lo hizo con: "Vacunas frente a trematodosis: pasado, presente y futuro". Finalmente, el 13 de junio, en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de amigos de la RANF, celebramos una mesa redonda sobre: “Farmacia Industrial y Galénica, especialidad prioritaria en el Sector Sanitario”, que fue moderada por el Excmo. Sr. D. N. Víctor Jiménez Torres, Académico de Número de la RANF, que tuvo dos partes; en la primera intervinieron como ponentes D. Vicente Hernández, Vocal Nacional de Farmacéuticos de Industria del Consejo General de Colegios Farmacéuticos, que habló sobre: “Visión desde la Industria farmacéutica”, D. Juan Manuel Irache, Profesor de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Navarra, sobre: “Visión del Programa de Formación” y Dª. Celia Olmos, alumna de la Especialidad: “Visión desde la realidad de la residencia”. En la segunda parte se produjo un coloquio con la intervención de los Dres.: Alfonso Moreno, Presidente del Consejo Nacional de Especialidades en Ciencias de la Salud; Emilio Esteve, Director Técnico de Farmaindustria; José María Suñé, Profesor de la Facultad de Farmacia de la U. de Barcelona; Begoña Escalera, Profesora de la Facultad de Farmacia de la U. de Alcalá; Luis Alberto del Río, Profesor de la Facultad de Farmacia y responsable de la Especialidad en la U. de San Pablo CEU, Madrid; Guillermo Torrado, Profesor de la Facultad de Farmacia de la U. de Alcalá; José Carlos Montilla, Presidente de la Comisión Nacional de la Especialidad y Francisco Taxonera, Vice-Presidente de la Comisión Nacional de la Especialidad.

Además, organizado por nuestra Academia y con la financiación de la Fundación Ramón Areces, celebramos en nuestra Sede del 24 al 25 de abril, un Simposio Internacional titulado: "Fármacos, Nanomedicina y Biomateriales: un objetivo común". El evento fue un éxito de asistencia contando con mas de 240 inscritos. Se impartieron conferencias de gran nivel, contando como ponentes con personalidades internacionales en su campo. Intervinieron los profesores Carmen Avendaño, Mariano Esteban, Häkan Engqvist, Wim Hennink, Luis Liz-Marzán,

Clément Sanchez, Ramón Martínez Máñez, Enrique Gómez Barrena, Simo Schwartz y José A, Plannell. Asimismo, dentro de la planificación del simposio, el día 25, tomaron posesión como Académicos Extranjeros de la RANF, los prestigiosos profesores, Ruth Duncan, de la Cardiff University, Nicholas A. Peppas, Director del Center on Biomaterials, Drug Delivery, Bionanotechnology and Molecular Recognition, Department of Biomedical Engineering, University of Texas Austin y Samuel I. Stupp, Director del Institute for BioNanotechnology in Medicine, Northwestern University, Chicago. El congreso estuvo coordinado por María Vallet Regí académica de número de la Real Academia Nacional de Farmacia, quien también presentó a los nuevos académicos en nombre de la Corporación.

NECROLÓGICAS

La Academia celebró dos sesiones necrológicas, en memoria de dos de nuestros académicos de número fallecidos, como es estatutario. El día 26 de abril, fue dedicada al Excmo. Sr. D. José Luis Vila Jato y el 17 de mayo, tuvo lugar la del Excmo. Sr. D. Guillermo Tena Núñez, este último en situación de Supernumerario.

ACADÉMICOS

Nuestro compañero, académico de número, el jesuita Don Guillermo Giménez Gallego, ha sido nombrado Rector de los Profesores de la Universidad de Comillas.

Nuestra Presidente María Teresa Miras Portugal recibió el 11 de abril, de la Presidente de la Comunidad de Madrid Esperanza Aguirre el Premio de Investigación Miguel Catalán 2011 en reconocimiento a su trayectoria profesional. Además, presidirá la Comisión de Expertos que se encargará de la reforma del sistema universitario español, aprobado en Consejo de Ministros, a propuesta del Ministro de Educación, Cultura y Deporte, José Ignacio Wert. Asimismo, fue investida Académica Correspondiente de la Academia Nacional de Farmacia de Francia, el día 2 de mayo, por el Presidente de la Academia Nacional de Farmacia de Francia, Jean Paul Chiron.

Nuestra compañera, académica de número Mª Vallet Regí, ha sido nombrada por el Consejo de Gobierno de la Universidad del País Vasco en la sesión celebrada el 21 de junio, por unanimidad, Doctora Honoris Causa por la UPV/EHU. Además, en la ceremonia inaugural del IX Congreso Mundial de Biomateriales celebrado del 1 al 5 de junio en Chengdu, una de las mayores aglomeraciones urbanas de China con más de 14 millones de habitantes, fue nombrada Fellow de la Unión Internacional de Sociedades de Ciencia e Ingeniería de Materiales (FBSE).

Noticias completas en: http://rss.ranf.com/index.php

Sesiones en diferido en: http://www.mediaranf.com/

José M. Ortiz Melón

Editor científico
e-mail: edicion@ranf.com

The Ancient Drug Salicylate Directly Activates AMP-Activated Protein Kinase. Hawley et al. Science 336, 918-922 (2012)

¿UNA ASPIRINA AL DÍA?

El salicilato, un producto natural encontrado en el la corteza del árbol del sauce, es también el producto activo de la hidrólisis de la aspirina en el organismo y ha sido utilizado en medicina desde tiempos remotos. Los mecanismos moleculares que subyacen los efectos benéficos del salicilato no han sido sin embargo desentrañados. Recientemente, un grupo de investigadores británicos (Hawley et al.) han descubierto, que el salicilato, activa al regulador metabólico AMPK (AMP proteína quinasa) una enzima que estimula la utilización de grasa en ratones.

AMPK, es una proteína quinasa que monitoriza cambios en energía intracelular, y está conservada en todos los eucariotas. Se activa por una disminución en la concentración de ATP intracelular y el concomitante incremento de AMP y ADP. En respuesta a varios tipos de estrés celular, AMPK actúa como un mecanismo homeostático para restaurar el ATP intracelular induciendo rutas catabólicas e inhibiendo rutas biosintéticas que consumen energía.

La quinasa AMPK existe en las células como un heterotrímero, compuesto por una subunidad α de serina-treonina quinasa y dos subunidades reguladoras β y γ. Una serie de estrés celulares como la privación de oxígeno o de glucosa, producen una disminución de ATP citosólico y un aumento de ADP y AMP, y dan lugar a activación de AMPK. La subunidad γ contiene dominios que unen ADP y AMP e inducen un cambio conformacional que aumenta la fosforilación (y por tanto la activación) de la subunidad catalítica (Figura 1).

Además de la activación por privación de nutrientes, AMPK es activada también por compuestos xenobióticos y agentes farmacológicos, muchos de los cuales actúan sobre la mitocondria para disminuir los niveles celulares de energía. Entre estos, se encuentran agentes hipoglucemiantes como las tiazolidinodionas

(rosiglitazona) y el universalmente conocido compuesto biguanido, metformina, ampliamente empleado en el tratamiento de la diabetes. Todos estos compuestos disminuyen los niveles de ATP al inhibir el complejo I de la cadena de transporte electrónico. La metformina, deriva de un compuesto encontrado en la planta medicinal Galega officinalis. De la misma manera, otros productos de origen vegetal como el resveratrol de las uvas y el vino, el galato de epilocatequina (EGCG) del té verde, o la capsaicina de la pimienta, activan también a AMPK. En un paralelismo interesante con estos productos naturales, el salicilato es también un producto natural.

La conexión entre los fármacos antidiabéticos y el control hepático por AMPK de la homeostasis de glucosa y de lípidos ha acelerado el interés en encontrar activadores de AMPK. Sin embargo, la identificación de activadores directos de quinasas es mucho mas difícil que la identificación de inhibidores, que por lo general, son análogos competitivos de ATP. Hasta la fecha solo un compuesto llamado A769662 ha sido descrito. Se descubrió en un rastreo de mas de 700.000 compuestos para encontrar agentes capaces de activar AMPK "in vitro". A769662 no actúa imitando la unión de AMP o ADP sino por un mecanismo diferente, que implica a la subunidad ß-1 de AMPK. La subunidad ß-2 puede restaurar la respuesta al estrés energético en células deficientes en ß-1, pero aun así, este heterotrimero, no puede ser activado por A769662 ya que la activación por salicilato requiere la presencia de la subunidad ß-1 funcional.

Tanto el salicilato, como el A769622, inducen un cambio de utilización preferencial de carbohidratos a utilización preferencial de lípidos en ratones, y este efecto está abolido en ratones deficientes en la subunidad ß1. Los autores demuestran que la oxidación de ácidos grasos estimulada por salicilato requiere la activación de AMPK pero que otros efectos sobre la glucosa sanguínea y la concentración de insulina tras el tratamiento prolongado con salicilatos no precisan de AMPK.

Es de esperar, que estudios futuros permitan arrojar mas luz sobre otros efectos, que a dosis terapéuticas de aspirina y compuestos relacionados, dependan de la activación de AMPK. Esto es especialmente relevante a la vista de que la aspirina y otros activadores de AMPK como metformina han sido relacionados con una disminución del riesgo de cáncer, así como la posibilidad, de que derivados de salicilatos muestren potencial como antidiabéticos.

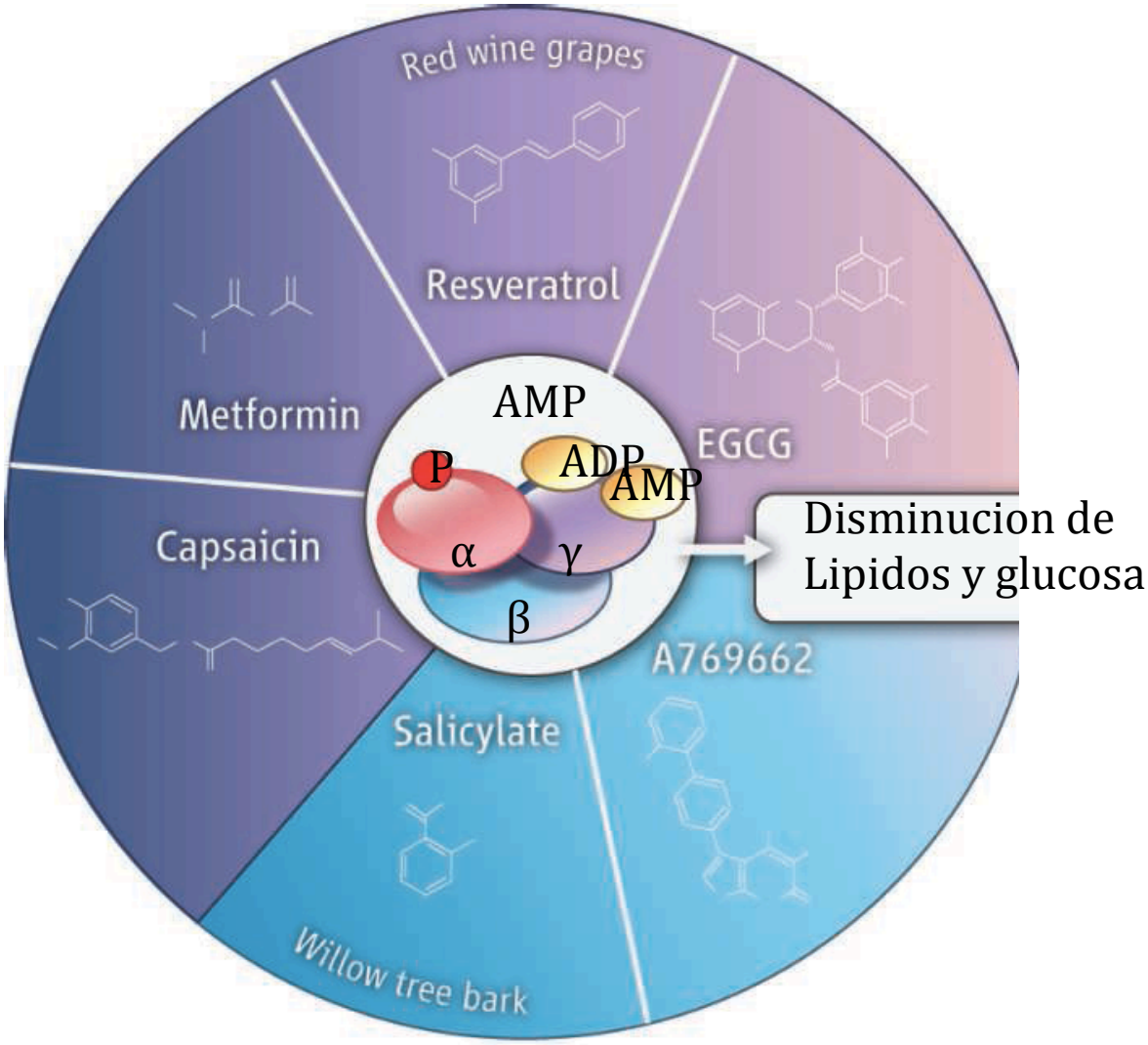


Figura 1.- Productos naturales y su actividad sobre las subunidades de AMPK

NOTICIAS CIENTÍFICAS: ANÁLISIS

Mª del Carmen Avendaño López

Académica de Número
e-mail: edicion@ranf.com

Fármacos inmunoconjugados en la terapia del cáncer

En la reunión anual de la American Society of Clinical Oncology (ASCO) celebrada en Chicago del 1-5 de Junio se ha producido una gran excitación que ha trascendido a toda la prensa alrededor de los primeros datos de un ensayo en Fase III con Tratuzumab-MCC-DM1 (T-DM1), un tratamiento para el cáncer de mama desarrollado por Genentech (hoy asociado a Roche). Dicho tratamiento, que a finales de año solicitará su aprobación a la FDA, utiliza la tecnología de conjugación ImmunoGen para conectar una citotoxina al anticuerpo de la misma empresa Herceptin®, dirigido específicamente al receptor HER2 (1) (Figura 1). El agente citotóxico es DM1, un antimitótico muy potente derivado del producto natural maitansina 1 que inhibe la polimerización de tubulina con una potencia 1000 veces mayor que la vincristina(2). La porción conectora es [N-maleimidometil] ciclohexano-1-carboxilato (MCC), que se enlaza a residuos de lisina al anticuerpo y al agente citotóxico a través de un enlace tioéter, siendo la relación fármaco/anticuerpo 3,5:1 aproximadamente.

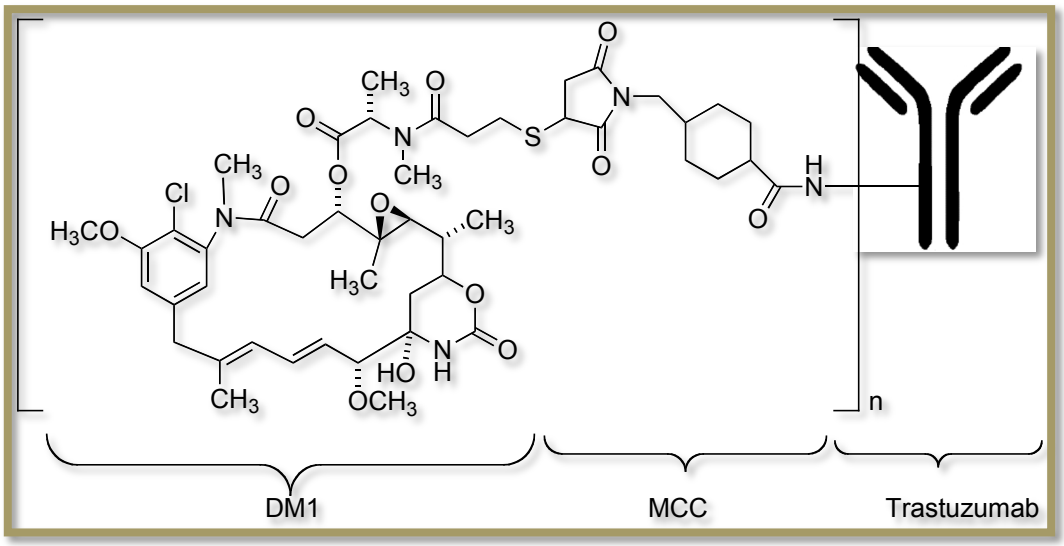


Figura 1.- Tratuzumab-MCC-DM1 (T-DM1), n = 3-4.

Los datos demuestran que retrasa en más de tres meses la progresión del cáncer de mama en pacientes con una mutación del receptor HER2, y aunque este retraso pueda parecer poco significativo sí lo es teniendo en cuenta que todos las pacientes de este estudio habían sido tratadas previamente con otras terapias a las que ya no respondían. También es significativo señalar que los efectos secundarios son poco importantes.

Esta noticia se ha sumado a la aprobación el año pasado de brentuximab vedotin (Adcetris®, Figura 2), otro Conjugado Anticuerpo-Fármaco (Antibody-Drug Conjugate, ADC) desarrollado por Seattle Genetics para el tratamiento de linfomas de Hodgkin (HL), tras el trasplante autólogo de células madre, o en los que han fracasado al menos dos regímenes de quimioterapia combinada, y para el tratamiento de linfoma anaplásico de células grandes tras el fracaso de al menos un régimen de quimioterapia (3). Este conjugado, está formado por el anticuerpo IgG1 quimérico cAC10, específico para el receptor humano CD30, el inhibidor de la polimerización de tubulina monometil auristatina (NMAE) obtenido por síntesis, y un conector que incorpora el dipéptido valina-citrulina. Este último, es estable en el fluido extraceular, pero se hidroliza por catepsina una vez que el conjugado ha penetrado en la célula tumoral, liberando el agente antimitótico. La FDA notificó en enero a los profesionales de la salud que se había producido algún caso de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), una infección cerebral poco frecuente pero grave, que puede causar la muerte, asociados al uso de Adcetris®,

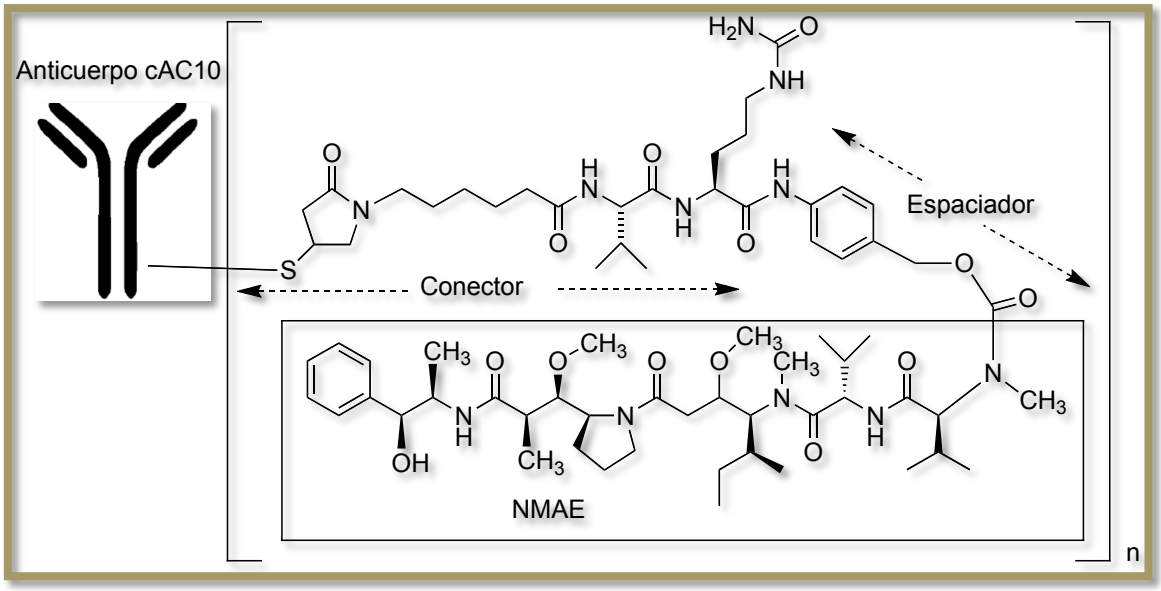


Figura 2. -Brentuximab vedotin (Adcetris®, n = 3-5)

La utilización de un anticuerpo monoclonal (mAb) conjugado con un agente citotóxico para dirigirlo a una diana específica de la superficie tumoral tiene al menos 30 años de existencia, pero su desarrollo ha estado plagado de fracasos. Sin

embargo, los dos acontecimientos mencionados anteriormente han cambiado la perspectiva de las compañías farmacéuticas enfocadas a la oncología, centrando su atención en la tecnología ADC (4). Los fracasos que se han encontrado a lo largo de estos años, se atribuyen a que se utilizaban toxinas de estructura proteica cuyo enlace a un anticuerpo resulta difícil, siendo además altamente inmunogénicas. Además, los anticuerpos se dirigían a dianas proteicas que se expresaban en células tumorales y en células sanas, con lo que se perdía su especificidad. Finalmente, se subestimaba la dificultad que supone diseñar una porción conectora adecuada entre el anticuerpo y la toxina.

El único conjugado ADC comercializado antes que Adcetris® fue gentuzumab ozogamicina (Milotarg®, Figura 3) (5), desarrollado por Wyeth y adquirido en 2009 por Pfizer. Éste se aprobó en el año 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda CD-33 positiva, pero fue retirado en el año 2010 porque no pudo demostrar que era suficientemente eficaz y seguro. Las causas a las que puede atribuirse este fracaso son varias. Por una parte, el anticuerpo humanizado que se seleccionó (mAb hP67.6) estaba dirigido a la proteína de adhesión CD-33, que se encuentra en la superficie de las células mieloides normales y leucémicas aunque no en las células hematopoyéticas de la médula ósea. Por otra, el grupo conector es muy inestable, por lo que parte del agente citotóxico se liberaba antes de que el anticuerpo alcanzara su diana. La toxina ozogamicina (calicheamicina) inhibe la síntesis de ADN e induce apoptosis.

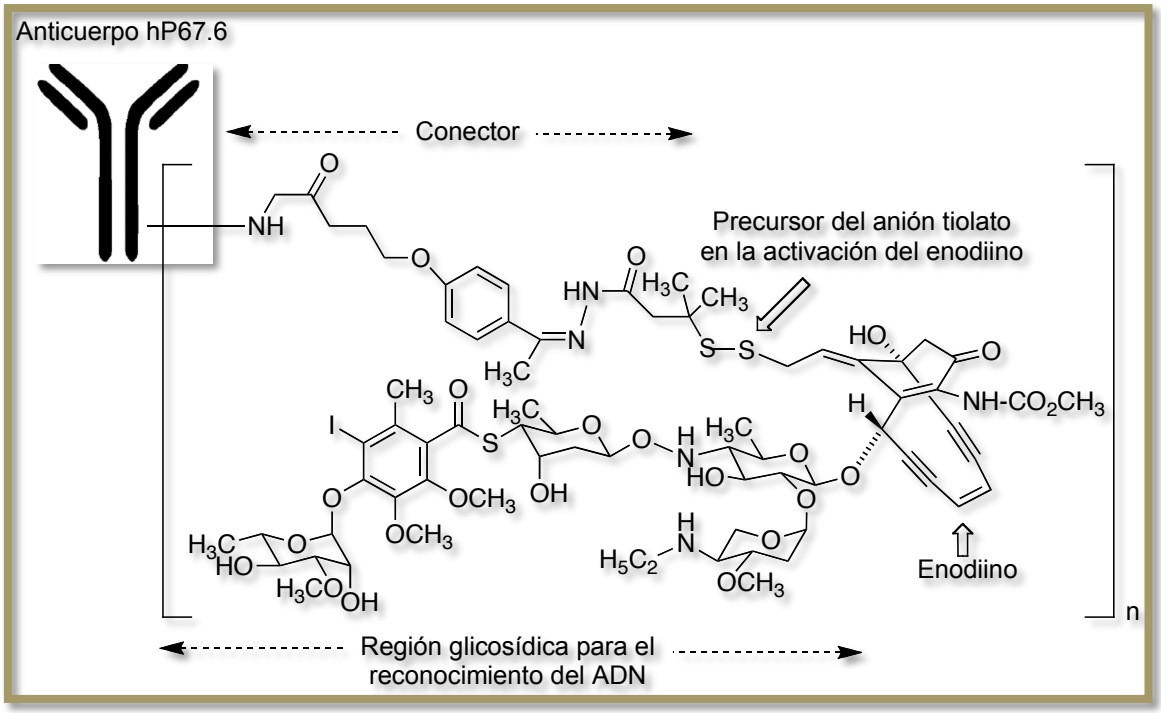


Figura 3.- Gentuzumab ozogamicina (Mylotarg®, n = 2-3).

Aunque los efectos secundarios eran semejantes a los que produce la quimioterapia convencional, Mylotarg® se aceptó rápidamente, produciendo unas ganancias de 7,6 millones de dólares en el cuarto trimestre del año 2000. La vida de este conjugado parece que no ha acabado, ya que este año se ha publicado un estudio clínico en Fase 3 concluyendo que el uso de dosis más bajas y fraccionadas permite la liberación acumulativa de la citotoxina y aumenta la supervivencia de los pacientes con leucemia mieloide aguda (6).

Actualmente, se quieren encontrar nuevas moléculas para enlazarlas a anticuerpos y nuevas formas de conexión, así como manipular los anticuerpos de forma que pueda controlarse el lugar de unión y el número de moléculas que se desee enlazar. De los 20 fármacos antitumorales que Genentech tiene actualmente en estudios clínicos, 8 son ADCs. Lo mismo ocurre en la unidad de oncología de Pfizer o en la firma Celtic Therapeutics.

Las citotoxinas que se enlacen al anticuerpo han de ser extremadamente potentes. Seattle Genetics ha utilizado auristatinas e ImmunoGen maitansina, antimitóticos inhibidores de la polimerización de tubulina. En la búsqueda de diversos mecanismos de citotoxicidad, se estudian en la actualidad agentes bisalquilantes con estructura de pirrolo[1,4]benzodiazepinas, y se trata de evitar que los costes de las citotoxinas seleccionadas eleven todavía más el coste total del tratamiento. Pfizer explora con prefencia citotoxinas de origen natural sintetizadas por ingeniería microbiana, y utiliza métodos semisintéticos para obtener análogos que puedan acoplarse a un grupo conector. Tanto en Adcetris® como en T-DM1 este grupo conector es estable, por lo que el conjugado se internaliza en las células antes de que la citotoxina se libere por la acción de enzimas en el primer caso, o por digestión en el lisosoma en el segundo.

Respecto a los grupos conectores se trabaja para que sean poco estables (a veces puede ser ventajoso), o muy estables para que se libere la toxina tras la internalización o para que la toxina emigre a través de la membrana celular a las células vecinas. Al mismo tiempo, la citotoxina tiene que conjugarse de forma apropiada, sin desactivarse al unirse a través del gupo conector. Pfizer está utilizando el mismo conector y la misma citoxina de Mylotarg® en inotuzumab ozogamicina, otro ADC que se encuentra en fase clínica II para el tratamiento de linfomas no Hodgkin, pero aquí el anticuerpo [(HzIgG4SerPro)-Lys-NH2] se dirige a CD22, un receptor mucho más específico que CD33 al que se dirigía Mylotarg®.

Finalmente, ImmunoGen acaba de recibir la aprobación de la FDA para comenzar los ensayos clínicos con IMGN853 (M9346A-sulfo-SPDB-DM4), un producto para el tratamiento de cánceres de ovario y otros tipos de tumores sólidos que sobreexpresan el receptor 1 del ácido fólico (FOLR1) que está formado por el anticuerpo monoclonal M9346A, que se une selectivamente a dicho

receptor, conjugado con emtansina, un citotóxico muy potente a través de nuevos grupos conectores diseñados en dicha firma (7).

Conclusión

Hace 35 años, aproximadamente, los anticuerpos monoclonales se definieron como "magic bullets" siendo los medicamentos que más se han expandido para tratar varias enfermedades, incluido el cáncer (8). Los conjugados con una citotoxina se ha denominado "atomic missils", por lo que habrá que pensar que son el arma más potente que existe en la lucha contra el cáncer. El tiempo nos lo dirá.

Referencias

1. Lewis Phillips, G. D.; Li, G.; Dugger, D. L.; (2008) "Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate", Cancer Res., 68, 9280-9290.

2. Remillard, S.; Rebhun, L. I.; Howie, G. S.; et al.; (1975) "Antimitotic activity of the potent tumor inhibitor maytansine", Science, 189, 1002-1005.

3. Minich, S. S.; (2012) "Brentuximab Vedotin: A New Age in the Treatment of Hodgkin Lymphoma and Anaplastic Large Cell Lymphoma", Ann. Pharmacother., 46, 377-383.

4. L. M. Jarvis; (2012)" Rethinking Antibody-Drug Conjugates", Chem. Eng. News, 90, 12-18.

5. Takeshita, A.; Shinjo, K.; Naito, K.; Matsui, H.; Sahara, N.; Shigeno, K.; Horii, T.; Shirai, N.; Maekawa, M.; Ohnishi, K.; Naoe, T.; Ohno, R.; (2005) "Efficacy of gemtuzumab ozogamicin on ATRA- and arsenic-resistant acute promyelocytic leukemia (APL) cells", Leukemia, 19, 1306-1311.

6. Castaigne, S.; Pautas, C.; Terré, Ch.; Raffoux, E.; Bordessoule, D.; et al.; (2012), "Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study", The Lancet, 379, 1508-1516.

7. Whiteman, K. R.; Johnson, H. A.; Sun, X.; Mastico, R.; et al.; (2012) "Abstract 4628: Anti-tumor activity and pharmacokinetics of the anti-FOLR1-maytansinoid conjugate IMGN853 is maintained over a wide range of maytansinoid-to-antibody ratios", Proceedings: AACR 103rd Annual Meeting 2012, 31-Apr 4, 2012; Chicago, Cancer Res., 72, doi: 10.1158/1538-7445.AM2012-4628.

8. Segota, E.; Bukowski, R. M.; (2004) "The promise of targeted therapy: cancer drugs become more specific", Cleve. Clin. J. Med., 71, 551-560.

Glicopatología, glicoterapéutica y marcadores tumorales glicánicos

José Antonio Cabezas Fernández del Campo

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Catedrático Emérito de la Universidad de Salamanca. Spain.
Recibido el 14 de abril de 2011.
e-mail: edicion@ranf.com

RESUMEN

La desregulación (por causas genéticas o adquiridas) de la actividad de ciertas glicosiltransferasas, glicosidasas o isomerasas que catalizan los procesos metabólicos en que participan los glicoconjugados –moléculas resultantes de la unión entre glúcidos y prótidos o glúcidos y lípidos- ocasiona anomalías en la estructura química de estos compuestos, por originarse moléculas (generalmente truncadas o con ramificación aberrante) incapaces de efectuar sus funciones biológicas normales. Surgen así *anomalías por almacenamiento*, provocadas por disfunción o ausencia de la actividad catabólica a cargo de enzimas lisosómicas (“*Lysosomal Storage Disorders*”) o *desórdenes congénitos de glicosilación* (“*Congenital disorders of Glycosylation, CDG*”) que afectan a la biosíntesis de estas sustancias. La Glicopatología resultante se halla estrechamente vinculada con procesos infecciosos por:virus (gripe, SIDA, etc.), bacterias (*E. coli, Streptococcus* sp., *Helicobacter pylori*, etc.), hongos o protozoos, así como con *procesos cancerosos o inmunitarios*.

Afortunadamente, se dispone en la actualidad de eficaces agentes (de naturaleza glicoconjugada), pertenecientes a la rama denominada Glicoterapéutica, capaces de prevenir o de curar las consecuencias de tales anomalías, o destinados al normal mantenimiento de los seres humanos. Así, antibióticos aminoglicosídicos, inhibidores enzimáticos, enzimas (como la glucocerebrosidasa), vacunas de polisacáridos conjugados, anticoagulantes (como la heparina), condroitín-sulfato u hormonas (como la eritropoyetina). Además, las técnicas biotecnológicas están siendo últimamente aplicadas para la preparación o el perfeccionamiento de algunos de estos fármacos.

Asimismo, existen valiosos marcadores tumorales, de cuya composición forma parte un componente glicánico, relacionados frecuentemente desde el punto de vista

estructural con antígenos de algunos grupos sanguíneos, que (sin ser estrictamente específicos) resultan de gran utilidad para el diagnóstico, pronóstico y, sobre todo, para el seguimiento del estado de salud de pacientes de diversos tipos de cáncer. También, ciertas lectinas pueden considerarse como *indicadores* de estos trastornos, aunque no como auténticos *marcadores tumorales*.

Palabras clave: Glicopatología; Glicoterapéutica; Marcadores tumorales; Marcadores tumorales glicánicos; Glicoconjugados; Anomalías por almacenamiento causadas por enzimas lisosómicas; Desórdenes congénitos de glicosilación; Glicosilación y Terapéutica.

ABSTRACT

Glicopatology, Glycotherapeutic and Glycan Tumor Markers

The disregulation (due to genetic or acquired factors) of the activity of certain glycosyltransferases, glicosidases or isomerases which catalyse the metabolic processes related to the glycoconjugates –molecules resulting of the link between carbohydrates and proteins or between carbohydrates and lipids- produces anomalies in the chemical structure of these compounds (generally truncated structures or aberrant chain branching) who preclude their normal biological functions. So, *Lysosomal Storage Disorders* (by abnormalities in the catabolic way) or *Congenital Disorders of Glycosylation* (by abnormalities in the biosynthetic route) arise. Infectious processes, either by viruses (influenza, AIDS, etc.) or bacteria (*E. coli, Streptococcus* sp., *Helicobacter pylori*, etc.) or fungi or protozoa, as well as cancer or immune processes, belong to the chapter of the Glycopathology.

Fortunately, several efficient agents (which are glycoconjugates) are now available to prevent or heal the above-mentioned illness or to maintain the health state of humans. So, aminoglycosidic antibiotics, enzymatic inhibitors, enzymes (such as glucocerebrosidase), polysaccharide conjugate vaccines, anticoagulants (heparin), chondroitin-sulphate or hormones (erytropoetin), etc. Lately, the biotechnological techniques are employed for the preparation or the improvement of these drugs.

Furthermore, there are several Glycan Tumor Markers, with structures related to those of certain antigens of blood groups, which are very useful for the diagnostic, prognostic and, mainly, for the follow-up of cancer patients (even if they are not strictly specific for this illness). Also, certain lectins might be considered as *indicative* of this disorder, although not true markers.

Keywords: Glicopathology; Glycotherapeutics; Tomo(u)r Markers; Glycan Tumo(u)r markers; Lysosomal Storage Disorders; Congenital Disorders of Glicosylation; Glicosylation and Therapeutics.

1. INTRODUCCIÓN

Conceptos generales y antecedentes históricos

Si ya en el **siglo XVIII** se reconocía la diferencia entre la composición química del mundo mineral y la de los organismos vivos, dando origen a las denominaciones de "Química Inorgánica" y "Química Orgánica" –pasando ésta a definirse acertadamente después como la "Química del carbono"- para las disciplinas que, respectivamente, estudiaban estas cuestiones, es en el **siglo XIX** cuando se perfilan en esta última ciencia las diferencias entre los distintos *principios inmediatos* –sustancias caracterizadas mediante un análisis suave por sus propiedades físicas y químicas-, que fueron clasificados como *hidratos de carbono, grasas* y *sustancias albuminoideas*, correspondientes a los llamados, después más precisamente, *glúcidos, lípidos* y *prótidos*, respectivamente, dentro de la entonces incipiente Bioquímica.

Lógicamente, a medida que se avanzaba en el conocimiento de la composición de estas sustancias –que pronto se observó eran particularmente complejas y lábiles-, se apreció que existían, además, compuestos formados por la unión fuerte de algunos componentes de esos principios inmediatos, entre sí. De este modo, se reconoció, ya en **1865**, por Eichwald (médico ruso que trabajaba en Alemania con Scherer), que tanto las *mucinas* de algún tipo de quiste ovárico como las secreciones del caracol se hallaban formadas por una "genuina proteína y otra porción que se libera como azúcar". Esta es quizá la primera definición que anticipa acertadamente el concepto que después se consideraría específico del grupo de las *glicoproteínas* o *glicoproteidos*, a su vez pertenecientes a lo que, en **1973**, bautizaría el investigador francés Jean Montreuil –recientemente fallecido- con el nombre de *"glycoconjugués"* (= *glicoconjugados* = "*glycoconjugates*").

La composición, estructura, funciones y peculiaridades de dichos glicoconjugados, además de en los textos de Bioquímica, se hallan descritas en revisiones y artículos sobre esta materia (1-5). Brevemente, algunos de los logros conseguidos en este campo han sido los siguientes: Ya en la década de **1930** se averiguaron datos importantes sobre la naturaleza química de dichos compuestos, conocimientos que se ampliarían a partir de **1940** acerca de las rutas biosintéticas de los mismos, estableciéndose, por otro lado, después de **1950**, la estructura de grupos sanguíneos y *polisacáridos* bacterianos, hasta perfeccionarse a partir de **1960** la información relativa a la estructura de las glicoproteínas, así como lo esencial sobre la intervención de las *glicosiltransferasas* en los procesos de biosíntesis, con datos que se ampliaron y afianzaron acerca de este mecanismo, en la década de **1970**, gracias especialmente al trabajo del Premio Nobel Luis F. Leloir y sus colaboradores.

También a partir de 1970 se avanzó notablemente en el conocimiento inicial que se tenía acerca de la *vinculación existente entre ciertas enfermedades y estructuras anómalas de algunos glicoconjugados*, a causa de la degradación anormal de dichos compuestos motivada por la disfunción o ausencia de actividad de ciertas *glicosidasas* de origen lisosómico. En seguida, se pudo detectar que tales deficiencias podían proceder asimismo de las anomalías en los procesos de su biosíntesis, siendo particularmente graves las de origen genético, ocasionadas por *glicosiltransferasas* o glicosidasas no lisosómicas.

El conjunto de datos relativos a la composición y a los mecanismos de biosíntesis y degradación de los glicoconjugados que tienen lugar normalmente en los seres vivos constituye el objeto de la *Glicobiología*. Esta entidad puede considerarse como una rama de la Bioquímica, de forma similar a otras, como la Enzimología; o, quizá más acertadamente como una orientación peculiar de la Bioquímica en que se concede un papel relevante no sólo al aspecto estructural de los glicoconjugados sino especialmente a la faceta de su decisiva participación en numerosas, complejas e importantísimas funciones biológicas; lo cual justificaría su propia denominación: Glico-*biología*.

Pero, si por causas genéticas o del entorno los patrones normales de la composición de cualquiera de los grupos de glicoconjugados (glicoproteínas, *glicolípidos* y *glicolipoprotéidos*) o sus componentes (*glicopéptidos, ácidos siálicos, gangliosidos* o *derivados del fosfatidilinositol*, etc.) resultan aquéllos alterados significativamente y se producen anomalías en las funciones biológicas en que participa alguno de estos compuestos, este estudio queda incorporado dentro de la *Glicopatología*. Ha sido a partir de la década de **1980** y, principalmente en la de **1990**, cuando se ha progresado más en el conocimiento de la participación de la fracción glucídica –la constituida por los denominados *glicanos*- en las correspondientes funciones biológicas, sean éstas fisiológicas o patológicas. Obviamente, se ha profundizado en el estudio de las enzimas que catalizan estos procesos: glicosiltransferasas (cuyos genes han sido clonados), glicosidasas, isomerasas, etc.; y, asimismo, en el esclarecimiento de la estructura tridimensional de algunas glicoproteínas.

Finalmente, en la década del **2000**, el aspecto glicotecnológico ha experimentado un notable avance, orientado fundamentalmente a una preparación más perfeccionada de fármacos, dentro de la nueva *Glicoterapéutica* –de raíces, sin embargo remotas-, aspecto que se trata de desarrollar en el seno de la naciente *Glico(bio)tecnología*.

2. GLICOPATOLOGÍA

2.1. Algunos datos relativos a alteraciones en los procesos catabólicos

En la primavera de 1962, se recibió en el "Physiologisch-Chemisch Institut" de la Universidad de Colonia por su Director Prof. Ernst Klenk (codescubridor de los ácidos siálicos) la inesperada noticia siguiente: En el laboratorio de Prof. Jean Montreuil, en Lille, habían encontrado que un muchacho eliminaba habitualmente por orina una notable cantidad de compuestos conteniendo el *ácido* siálico N-*acetilneuramínico* (cuya estructura había sido establecida por E. Klenk y su colaborador Hans Faillard en 1954). Tal noticia fue recibida en Colonia con escepticismo por los que allí investigábamos sobre la naturaleza de este y otros ácidos siálicos en sueros, eritrocitos, tejido nervioso, etc. Retrospectivamente, se puede deducir que esta información constituye un valioso dato, verosímilmente el primero, sobre el trastorno denominado *sialuria*. En la actualidad, se sabe que es motivado por la disfunción o inactividad de la enzima *sialidasa* (= neuraminidasa, EC 3.2.1.18), que ocasiona la interrupción del proceso normal de degradación de los *sialoglicoconjugados*, provocando la acumulación de *sialiloligosacáridos*; (véanse Figura 1 y Tabla 1).

Algunas de las alteraciones mejor conocidas acerca de glicoproteínas (Figura 1 y Tabla 1), glicolípidos (Figuras 2 y 3 y Tabla 1) y *glicosaminoglicanos* (Tabla 1), por ausencia, inactividad o disfunción de las enzimas o isoenzimas que catalizarían el proceso normal catabólico de dichos compuestos, quedan resumidas en estas figuras y tabla. Puede observarse que dichas alteraciones llevan frecuentemente el nombre del investigador que las descubrió o analizó principalmente, además de la indicación abreviada de la anomalía en cuestión.

Tales **anomalías por almacenamiento** ocasionan un aumento anormal de la concentración del producto de la etapa inmediata anterior (por no haber sido degradado), cuya etapa se convierte irregularmente en etapa final del proceso. Ello ha facilitado, desde hace años, los primeros estudios sobre dichos trastornos, conocidos en la nomenclatura anglosajona como "***Lysosomal Storage Disorders***".

El origen, genético o adquirido, de estas anomalías puede ser variado. Así: *a)* por no ser sintetizada la enzima o la isoenzima correspondiente, debido a causas genéticas; *b)* por no ser catalíticamente activa dicha enzima o isoenzima; *c)* por no hallarse éstas en la localización adecuada; *d)* por ser inestables; *e)* por faltar el agente activador que les es imprescindible para su acción; *f)* por actuar en el proceso un agente inhibidor, que bloquea éste. (Tales agentes inhibidores pueden ser doblemente útiles: para el estudio del proceso metabólico o como potenciales fármacos; véase más adelante, Figura 4).

Tabla 1.- Alteraciones patológicas relacionadas con glicoconjugados

Disfución enzimática	Sustancia acumulada	Trastorno
α-L-Fucosidasa	Glicoconjugados conteniendo L-fucosa	Frucosidosis
Asparragenil-*N*-acetilglucosaminidasa	Glicoconjugados conteniendo asparragina	Asparragenil-*N*-acetilglucosaminuria
Sialidasas α(2>3) y α(2>6)	Sialiloligosacáridos α(2>3) y α(2>6)	Sialidosis (tipo A)
Sialidasa α(2>6)	Sialiloligosacáridos α(2>6)	Sialidosis (tipo B)
β-Galactosidasa	Gangliósido GM_1 y Oligosacáridos con galactosa terminal	Gangliosidosis GM_1
β-Hexosaminidasa A (=β-*N*-Acetilhexosaminidasa A)	Gangliósido GM_2	Enfermedad de Tay Sachs
β-Hexosaminidasa A y B (=β-*N*-Acetilhexosaminidasa A y B)	Gangliósido GM_2 y otros glicoconjugados	Enfermedad de Sandhoff
α-Manosidasa	Oligosacáridos con manosa terminal	α- Manosidosis
Glucocerebrosidasa	Glucocerobrósido	Enfermedad de Gaucher
Galactocerebrosidasa	Galactosilesfingosina	Enfermedad de Krabbe
Cerebrosidasa-sulfatasa	Cerebrósido-sulfato	Leucodistrofia metacromática
α-Galactosidasa	Ceramida-trihexósido	Enfermedad de Fabry
Ceramidasa	Ceramida	Enfermedad de Faber
Enfingomielinasa	Esfingomielina	Enfermedad de Nieman-Pick
α-L-Idutonidasa -L-Idutonidasa	Heparán-sulfato y dermatán-sulfato	Mucopolisacaridosis I_H (Enfermedad de Hurler) y Mucopolisacaridosis I_S (Enfermedad de Schele)
α-L-Idutonidasa-sulfatasa	Heparán-sulfato y dermatán-sulfato	Mucoposacaridosis II (Enfermedad de Hunter)
Sulfamidasa	Heparán-sulfato	Mucoposacaridosis III_A (Enfermedad de Sanfilippo A)
α-*N*-Acetilglucosaminidasa	Heparán-sulfato	Mucoposacaridosis III_B (Enfermedad de Sanfilippo B)
N-Acetilgalactosamin-6-sulfato-sulfatasa, y galactosa-6-sulfato-sulfatasa	Queratán-sulfato y condroitin-sulfato	Mucopolisacaridosis IV (Enfermedad de Morquio)
β-Glucuronidasa	Dermatán-sulfato y heparán-sulfato	Mucopolisacaridosis VI

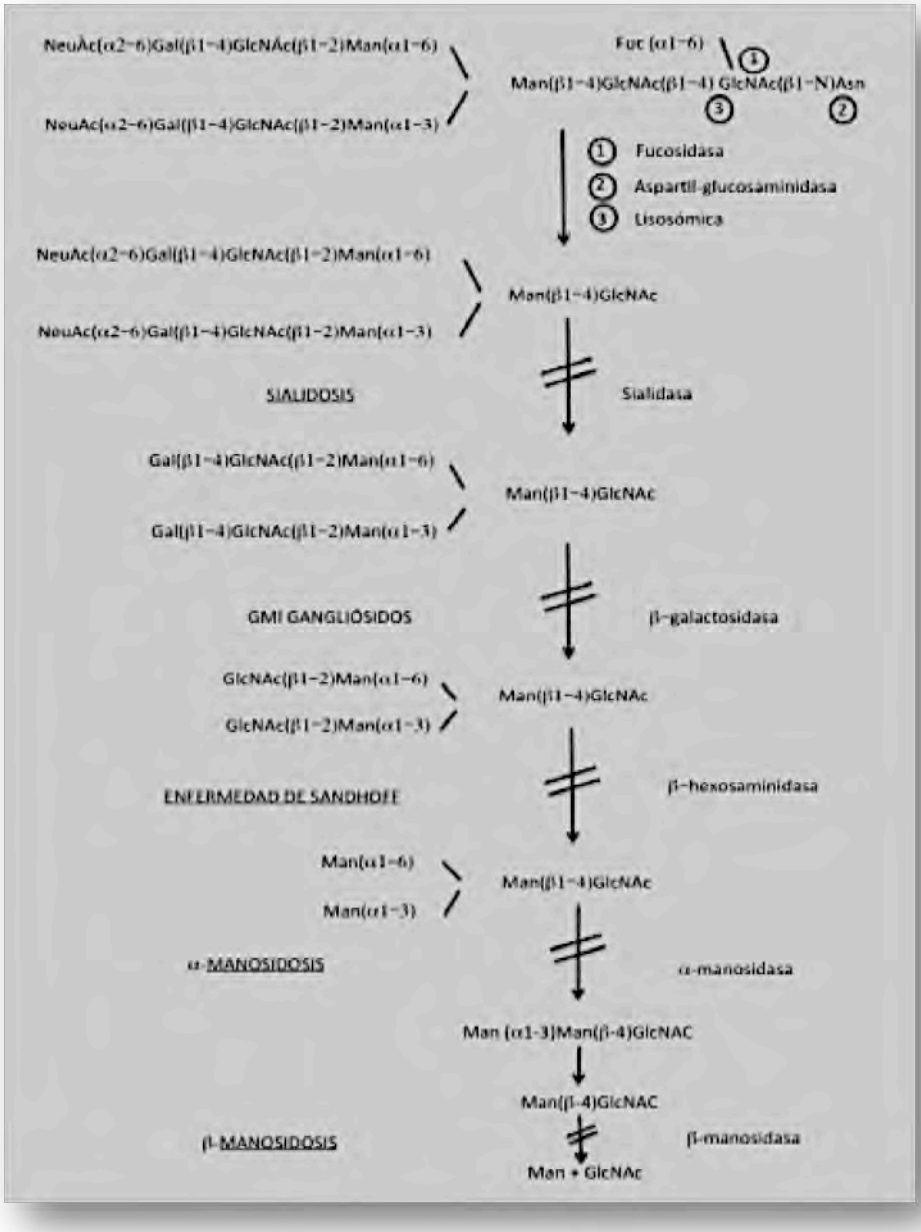


Figura 1.- Degradación de una glicoproteína. El proceso catabólico puede ser interrumpido, anormalmente, en alguna etapa (II) ocasionando la acumulación del correspondiente compuesto y generalmente el subsiguiente trastorno. Por el contrario, en condiciones normales el proceso continuaría hasta concluir en el o los productos finales.

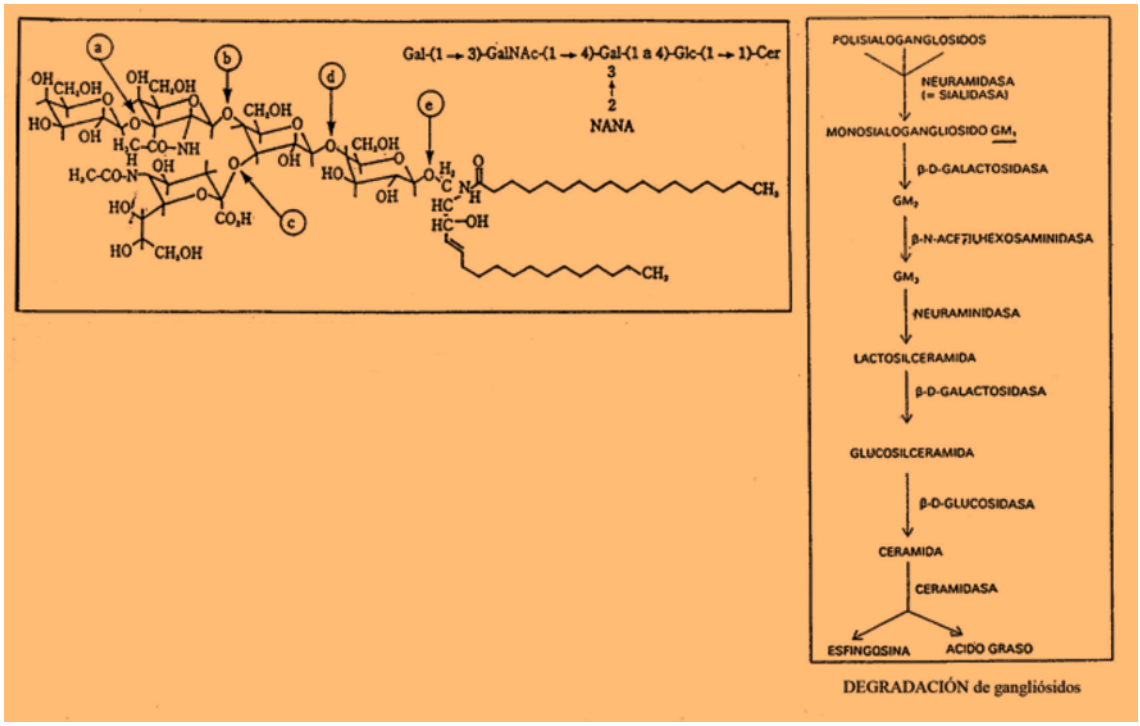


Figura 2.- Degradación normal del gangliósido GM1; a: β-Galactosidasa, b: β-N-acetilgalactosaminidasa; c: neuraminidasa; d: β-galactosidasa; y e: β-glucosidasa.

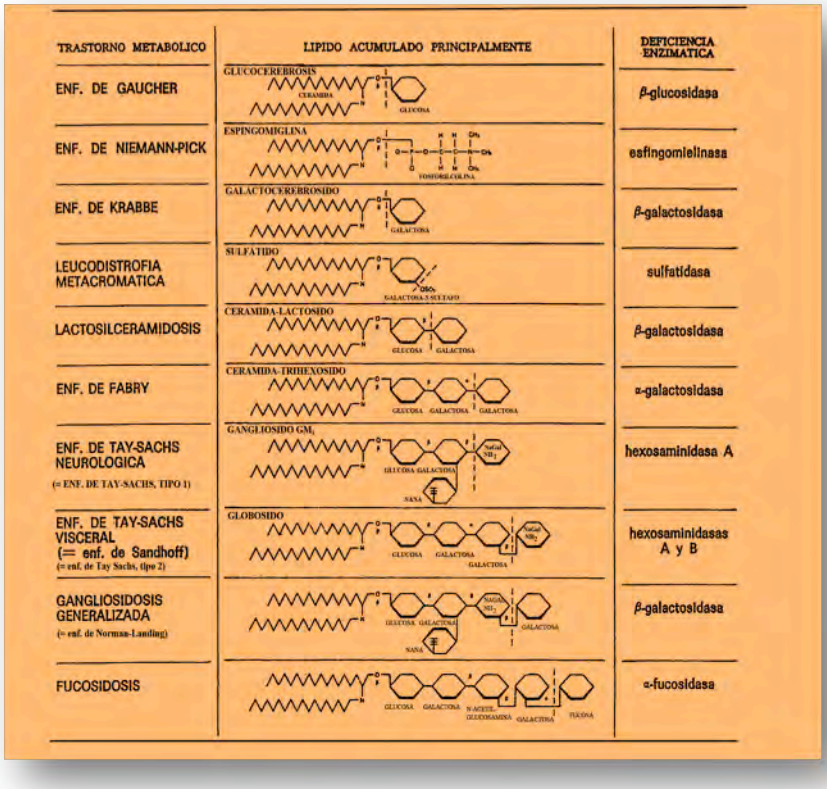


Figura 3.- Esfingolipidosis.

2.2. Glicopatología relativa principalmente a procesos biosintéticos

Al conjunto de anomalías relacionadas con la degradación de glicoconjugados se ha añadido posteriormente otro grupo que afecta a los procesos de biosíntesis. En este caso se trata de anomalías vinculadas con cualquiera de las numerosas enzimas que participan en tan complejo proceso -cuyo detalle no procede intentar hacer aquí- que la célula efectúa en diversos compartimentos (retículo endoplásmico, aparato de Golgi, etc.).

Mutaciones en 7 de los 30-40 *genes* necesarios para la síntesis y transferencia de oligosacáridos desde el donador lipídico a los aceptores nacientes de la proteínas causan los **Desórdenes Congénitos de Glicosilación Tipo I** (***"Type I Congenital Didorders of Glycosilation, CDG***". El **Grupo II** incluye todas las etapas de la ruta de procesado de los glicoconjugados de enlace *N*, probablemente con > 50 genes, de los que sólo 4 son defectuosos (6). Por lo menos 11 tipos de CDG han sido descritos.

Las enzimas afectadas son: isomerasas, glicosiltransferasas y sus componentes (donadores y aceptores), y glicosidasas (integradas en las membranas, diferentes de las de localización lisosómica). Así, para el *Tipo I*: *Ia*, fosfomanomutasa; *Ib*, fosfomanoisomerasa; *Ic*, α1,3glucosiltransferrasa; *Id*, α1,3manosiltransferasa; *Ie*, manosafosfatoliquilsintasa; *If*, (relacionado con doliquilmanosafosfato); *Ig*, α1,2manosiltransferasa. *Tipo II*: *IIa*, *N*-acetilglucosaminiltransferasa-II; *IIb*, α-glucosidasa-I; *IIc*, transportador de guanosíndifosfato-fucosa; y *IId* (6). Transferasas y glicosidasas, alargando y recortando, respectivamente, la cadena glicánica en formación determinan la estructura definitiva del glicoconjugado.

Principalmente las mutaciones que afecten a cualquiera de ellas pueden ocasionar la formación de *estructuras aberrantes*, generalmente truncadas o con ramificaciones anómalas, carentes de actividad biológica normal.

Los pacientes de glicoproteinosis, glicolipidodosis y mucopolisacaridosis de esta procedencia presentan alteraciones de índole varia, que suelen afectar al sistema nervioso, provocando lesiones que habitualmente dañan la capacidad intelectual, los movimientos, o ceguera, o la muerte a corta edad. Estadísticamente, la frecuencia de estos trastornos no suele ser elevada, salvo en grupos de población caracterizados por su endogamia, como el de los judíos askenazíes.

2.3. Glicopatología relativa a mecanismos inmunitarios

El *antígeno Tn* [cuya estructura es: β-Galactosa (1-3) *N*-Acetilgalactosamina-Serina/Treonina] puede actuar como un antígeno que ocasiona trastornos por *mecanismos autoinmunes*. El proceso es debido a la

capacidad de respuesta a la producción de anticuerpos frente a antígenos de tipo glicoconjugado, ya sea éste de procedencia endógena o exógena.

La llamada "*enfermadad del suero*", ocasionada frecuentemente (antes de la era de los antibióticos) al usarse sueros de caballos inmunizados para prevenir la infección que provocaría la bacteria causante del tétanos, se debe a que los "*anticuerpos HD*" –así llamados por haber sido investigados en la década de 1920 por los checos M. Hangunitziu y H. Deicher, independientemente- existentes en dichos antisueros contienen un *glicoesfingolípido* de cuya molécula forma para el *ácido N-glicolilneuramínico* (ácido siálico no biosintetizado por los seres humanos y del cual éstos carecen o, si lo poseen, es en ínfima proporción, procedente de ciertos alimentos). Ahora bien, no sólo gangliósidos integrados por este ácido sino también glicoproteínas que lo contengan pueden desencadenar la temida reacción anafiláctica (para más detalle, véase artículo de la referencia 7).

Análogamente, este aspecto ha de tenerse en cuenta asimismo en la utilización por los humanos de órganos procedentes de otras especies (como el cerdo) en los denominados *xenotrasplantes*, al poder contener dichos órganos residuos inmunogénicos.

Es de advertir, sin embargo, que la capacidad de originar anticuerpos las células humanas frente a antígenos de naturaleza glicoconjugada es, en general, poco elevada. Probablemente ello es debido al efecto de "enmascaramiento" que efectúa la fracción glicánica situada en la parte periférica de la molécula del glicoconjugado.

Por otro lado, una glicosilación anormal en *inmunoglobulinas* se estima como cofactor en la patogénesis de : *artritis reumatoidea* y en la *glomeronefritis* (afectando a la IgG); en *trastrornos alérgicos, asma,* y *enfermedad celíaca* (respecto a la IgE).

2.4. Glicopatología relacionada con procesos infecciosos

«Todas las células en la Naturaleza están cubiertas con un denso revestimiento de glicanos, que es importante no sólo para los procesos biológicos de los hospedadores sino también para la unión ["binging"] de los patógenos a las células» (8).

Referido este revestimiento únicamente a los ácidos siálicos, se considera que existen de dichos ácidos «10 millones en la membrana del eritrocito humano» (9).

Téngase en cuenta que el primer contacto que un agente patógeno (sea virus, bacteria, hongo o protozoo) establece con la membrana de la célula a la que se va a unir, pudiendo provocar ulteriormente la infección, es con un residuo

terminal de tipo glicoconjugado; frecuentemente (pero no siempre) con un resto de *ácido* N-*acetilneuramínico* integrante de un gangliosido o una glicoproteína.

Tabla 2.- Moléculas receptoras de la bacteria *Helicobacter pylori*

Composición / Proceso biológico / Función	Referencia
Ciertos glicoesfingolípidos ácidos.	Saitoh, H. *et al.,FEBS L.*, 1991
αFuc | Proteínas del grupo Lewis b: αFuc-βGal-GlcNac—.	Boren, T. *et al.*, *Science*, 1993
La 3'sialil-lactosa y el antígeno Lewis b [NeuAc(α2-3)-Gal(β1-4)Glc] son agentes terapéuticos, por inhibir competitivamente la unión entre bacteria y hospedador.	Halcomb, R. *et al.*, *JACS*, 1994
Poligliocosilceramidas	Miller, H. *et al.*, *Glyco. J.*, 1996
Ácidos polisiálicos α-2,3 (para ciertas cepas)	Hirmo, S. *et al.*, *Glyco. J.* 1996
Glicoproteínas de neutrófilos con la secuencia terminal NeuAc(2,3)-βGal-GlcNAc-βGal-GlcNAc.	Teneberg, S. *et al.*, *JBC*, 1997
Gangliósido GM3 y glicoproteínas. *[Posible uso terapéutico de sialil-lactosa y poliglicosilceramidas sialiladas]*.	Lingwood, C., *BBA*, 1999
Gliocoesfingolípido sialil-dimérico-Lewis x sería el receptor de las adhesinas (proteínas expresadas por el *H. pilori*). *Las personas de grupo sanguíeno O se hallan más predispuestas a sufrir úlcera péptica]*.	Mahdavi, J., *Science* 2002
Gangliósidos (excepto los que contengan NeuGc, NeuAcα6 ó NeuAcα8) se unen mediante la adhesina.	Roche, N. *et al.*, *Infect. & Immun.*, 2004
Glicoproteínas de neutrófilos: NeuAc(2-3)- βGal-GlcAc-βGal-GlcNAc.	Roche, N. *et al.*, *Infect. & Immun.*, 2004
Antígenos fucosilados de los grupos sanguíneos O, A y B.	Aspholm, M., *Science*, 2004
La unión del *H. pylori* a los sialoglicoconjugados celulalares necesita: los grupos carboxilo y acetamido, la cadena glicerol del NeuAc, partes de la Gal; es secundaria la GlcNAc. *El NeuAc libre es inactivo como inhibidor.*	Johansson, P., *Glycobiol.*, 2005
La endosimbiosis entre el H. pylori *y las células del estómago "podría contribuir a la tumoregénesis gástrica"*.	Giannakis, M., *PNAS*, 2008
Neoglicanos, derivados de la *N*-acetil-lactosamina se unen a *H. pylori*	Miller, H., *Glycobiol.* 2009

Algunos ejemplos son los siguientes: *a)* En lo concerniente al ***virus*** *de la gripe*, este proceso está muy analizado, desde hace algunas décadas; pero aún quedan aspectos por esclarecer. Datos sobre el tipo de enlace de los componentes glicánicos de los glicoconjugados del tracto respiratorio participantes en la unión del virus y posterior penetración de éste en la célula infectada se hallan en publicaciones recientes (10-16). *b)* Por su especial interés, se sigue investigando lo relativo a *glicoproteínas* como la *gp120*, vinculadas a la infección por VIH causante del SIDA (17). *c)* La **bacteria** *Escherichia coli* puede unirse, según el tipo a que

pertenezca, a glicoproteínas o a esfingolípidos (de variada composición en este caso) del tracto urinario o del intestino. *d)* Esto mismo ocurre si se trata de la bacteria *Neisseria gonorrheae*. *e)* En cambio, para *Streptococcus pneumoniae* la fijación se hace en el tracto respiratorio merced al componente glicánico formado por *N*-Acetilglucosamina (β1-3)Galactosa. *f)* La bacteria *Helicobacter pylori* viene siendo muy estudiada desde la década de 1990 por su relación con la úlcera y el cáncer gástricos. Alguno datos relativos a estos procesos, así como a su posible tratamiento, se resumen en la Tabla 2. *g)* El **hongo** *Candida albicans* efectúa su unión con la piel y mucosas mediante el disacárido Galactosa (β1-4) Glucosa. *h)* En cambio, para el **protozoo** *Entamoeba histolytica* esta unión con las células del intestino se hace mediante Galactosa (β1-4) *N*-Acetilglucosamina. *i)* Por último, para el protozoo *Giardia lamblia* dicha unión, también en el intestino, la realiza el monosacárido activado Manosa-6-Fosfato.

2.5. Glicopatología en relación con el cáncer y otros trastornos

Hacia mediados de la década de 1960, Leonard Warren y Mary-Catherine Glick, en la Universidad de Pensilvania (EE.UU.), mostraron las peculiaridades que presentan ciertos *glicopéptidos de células transformadas*. Más tarde, se dio a conocer este importante resultado como "*fenómeno de Warren-Glick*". Las alteraciones en las estructuras de los glicoconjugados han sido intensamente analizadas después por A. Kobata (en Japón) y por S.-H. Akomori (en EE.UU.) y otros.

Se ha detectado un incremento en la concentración del *ácido* N—*glicolilneuramínico* en procesos tumorales, ácido que en adultos humanos se halla normalmente a concentraciones escasísimas o nulas. Sin embargo, ocurre lo contrario en el estado embrionario.

En relación con este estado, conviene mencionar a las *lectinas*. Éstas son proteínas o mayoritariamente glicoproteínas de tipo no inmune presentes en toda clase de organismos, capaces de unirse (por su porción peptídica) de forma muy específica y reversible a componentes glicánicos. Aunque su clasificación ha intentado hacerse tomando en consideración su estructura (puesto que ya se conoce incluso la estructura tridimensional de algunas de ellas), suelen utilizarse las clasificaciones fundadas en su especificidad respecto a los monosacáridos integrantes de los glicoconjugados o las relacionadas con el origen del material de su procedencia. Interés especial tienen las lectinas llamadas "*siglecs*" (de "*sialic acid binding immunoglobulin superfamily lectins*"), caracterizadas por reconocer íntegramente la molécula del ácido siálico. Una de las cinco de ellas es la *sialoadhesina* (= *siglec* 1). En conexión con el cáncer, se distinguen tres tipos de lectinas: *a)* las endógenas que se expresan tanto en tejidos tumorales como en los normales; *b)* las que se hallan sólo en tumores y en tejidos en desarrollo, pero no

en tejidos adultos (por lo que se consideran *de expresión oncofetal*); y *c)* aquellas cuyas características no permiten que se las incluya en ninguno de los dos grupos anteriores.

Otro ácido siálico, el N-*Acetil-9-O-acetilneuramínico*, que integra glicoproteínas, experimenta una desacetilación en la posición 9 en carcinomas humanos de colon, mientras que en melanomas se detecta en él una acetilación incrementada en esa misma posición (pero para dicho ácido componente del gangliósido GD3). Ciertos cambios se han detectado también en los *ácidos polisiálicos*.

El capitulo de los glicoconjugados en relación con el cáncer es difícil de interpretar todavía, pero de gran significación. (Véase, más adelante, lo relativo a *marcadores tumorales*).

Por otro lado, el *gangliósido GM1*y otros gangliósidos han sido relacionados con trastornos del sistema nervioso y la *enfermedad de Parkinson*.

Además, no hay que olvidar que, en 1999, Prusiner y colaboradores encontraron diferencias de glicosilación entre las isoformas de las sialoglicoproteínas normales y patológias que constituyen los *priones*.

Finalmente, alteraciones en los *glicosaminoglicanos* se han vinculado con ciertas enfermedades como *nefrolitiasis* causantes de cálculos renales.

3. GLICOTERAPÉUTICA

3.1. Generalidades

Si todo lo expuesto hasta aquí podría inducir a una impresión pesimista acerca de la previsible situación de los humanos frente a trastornos que podrían ser ocasionados por virus, bacterias, protozoos, etc. (alteraciones producidas mediante los mecanismos en que están implicados los glicoconjugados tanto del agente patógeno como de la célula receptora), afortunadamente para ésta, «la diversidad, complejidad, hidrofilia y movilidad estructural de los glicanos de la superficie celular, así como su naturaleza combinatoria, determinan la posibilidad de cambios rápidos para evitar que los patógenos se enlacen a los glicanos »(8); por lo que el riesgo de infección se restringe o se impide. De todos modos, tales cambios son independientes de los que pudieran afectar al componente protídico (en el caso de las glicoproteínas), al lipídico (si se tratara de los glicolípidos) o a ambos (si fueran los glicolipoprotéidos), ya que los procesos de biosíntesis y degradación de dichos componentes son distintos.

Desde un punto de vista histórico, podrían distinguirse *diversas etapas en la utilización de fármacos de naturaleza glicoconjugada*. Así: 1ª) Ciertos antibióticos aminoglicosídicos (como la estreptomicina) o agentes anticoagulantes (como la

heparina) o vacunas constituidas por polisacáridos bacterianos han venido utilizándose desde hace ya bastantes años, inicialmente en ocasiones (alguno de ellos) de modo empírico. 2ª) *a)* Otro grupo comprendería a aquellos compuestos que fueron ideados para bloquear el ciclo biológico de un virus, como el de la gripe, al inhibir la actividad de una enzima que es indispensable para la liberación del virus recién formado en la célula hospedadora, y su propagación. Se trata en este caso de un análogo estructural del que hubiera sido el producto normal de la reacción enzimática. *b)* Otros inhibidores que bloqueen alguna etapa de la biosíntesis de un glicoconjugado vírico se pueden convertir en potenciales agentes terapéuticos. Pero la posibilidad de que se bloquee también la biosíntesis del respectivo glicoconjugado de la célula que se pretende proteger limita la aplicación de estos inhibidores (que suelen ser análogos estructurales del sustrato enzimático o alcaloides) (Figura 4). 3ª) Otro grupo de agentes, de más reciente estudio, intenta actuar, no en relación con el sustrato o el producto implicados en la reacción enzimática, sino sobre la propia enzima que cataliza una etapa del proceso. Una variante de este método consiste en modificar las peculiaridades del proceso mediante técnicas biotecnológicas. Así se pueden obtener fármacos de composición algo diferente de los respectivos aislados de diversos materiales naturales, y con mejores propiedades biológicas; tal es el caso de eritropoyetinas y heparinas artificiales (5).

3.2. Algunos ejemplos de fármacos de tipo glicoconjugado

En la publicación de la referencia 4 se comentan datos relativos a medicamentos que son glicoconjugados, comprendiendo esta revisión hasta el año 2000. Allí se mencionan, entre otros, a los siguientes:

- Antibióticos aminoglicosídicos (estreptomicina, neomicina, gentamicina, kanamicina y tobramicina).
- Citocinas.
- Antiinflamtorios (que actúan oponiéndose a la adhesión a endotelios).
- Manosa (para curar trastornos como alguno del antes indicado grupo CDG, ocasionados por deficiencias relacionadas con dicha hexosa).

Otros fármacos también descritos en esa revisión (4) han experimentado desde entonces perfeccionamientos ya sea por modificación de su estructura o en las técnicas de su preparación (frecuentemente por Biotecnología); o han surgido otros nuevos.

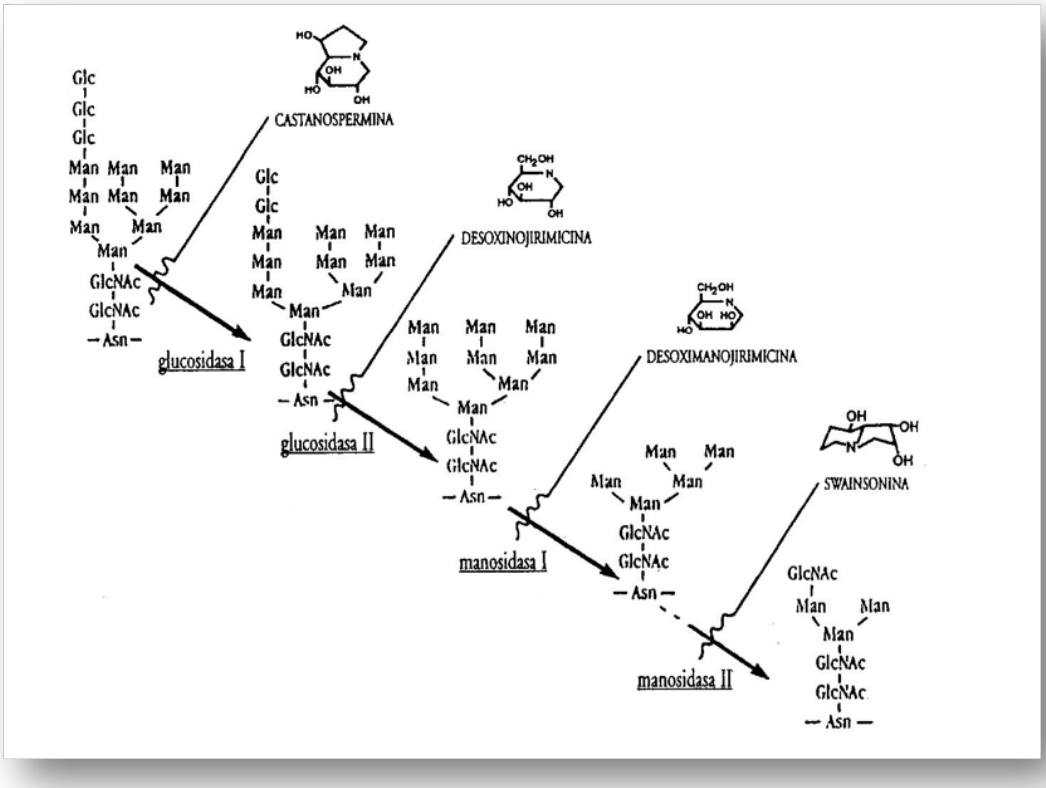


Figura 4.- Estructura de la castanospermina y de la desoxinojirimicina (inhibidores de la glucosidsa I –la desoxinojirimicina también lo es de la glucosidasa II-), de la desoximanojirimicina (inhibidor de la manosidasa I), y de la swainsonina (inhibidor de la manosidasa II).

Así, en lo referente a *vacunas de polisacáricos conjugados*: *a)* Ya desde 1976, como mínimo, se disponía de *vacunas poliosídicas* contra enfermedades por meningococos A y C, neumonías y fiebres tifoideas. Purificados los antígenos respectivos, una vez introducidos en el organismo receptor, determinan la proliferación de linfocitos B y la secreción de inmunoglobulinas. Son "antígenos T-independientes". Desde la década de 1980 se viene investigando sobre un nuevo concepto de vacunas: las *vacunas de polisacáridos* (= *poliósidos*) *conjugados*. En ellas, el acoplamiento químico del polisacárico capsular específico de cada serotipo con una proteína transportadora convierte a los poliósidos en "antígenos T-dependientes". *b)* Como candidatos a vacunas contra *Leishmania* se han preparado sintéticamente, desde 1999, *neoglicoconjugados* (neoglicoproteínas y neoglicolípidos) conteniendo enlaces fosfodiester entre unidades repetidas de tipo glucídico. Entre ellas: Gal-Man, o Gal-Man-Gal-(Glc)-Man, etc. *c)* También se han intensificado, a partir del año 2000, los estudios acerca de *vacunas contra algunos tipos de cáncer*. Así, para el cáncer de mama y el ovárico, la constituida por el *sialil-Tn sintético*; y para el de próstata, el *globósido H. d)* En 2004, se ha descrito que un conjugado obtenido por vía sintética, constituido por *polirribosilfosfato*, está dirigido preferentemente contra infecciones provocadas por *Haemophilus*

influenzae, Streptococcus pneumaniae y también *Neisseria meningitidis*. *e)* Análogamente, para evitar efetos perjudiciales que puede ocasionar el uso de la *heparina* natural (tales como trombocitopenia por interacciones con el factor plaquetario 4, etc.), se han preparado *heparinas sintéticas*, como la constituida por un pentasacárido, la cual posee las propiedades antitrombóticas deseadas y carece de dichos inconvenientes. *f)* Por otro lado, se sigue estudiando la participación de los *proteoglicanos* del tipo del *heparan-sulfato*, actuando como receptores, en los procesos del desarrollo celular (tales como la adhesión, la motilidad, la proliferación, la diferenciación o la morfogénesis). *g)* Además, los *heparán-sulfatos*, por su efecto inhibidor sobre el crecimiento de tumores y metástasis, podrían considerarse como potenciales agentes anticancerosos. *h)* Asimismo, se investiga el papel de dichos *heparán-sulfatos* en la regulación de la homeostasis tisular, al actuar protegiendo contra las degradaciones proteolíticas que pueden producirse en los factores de crecimiento, citocinas, etc. Así, cuando se origina una agresión o una lesión celular, las enzimas denominadas heparanasas se activan y son causa de la liberación de citocinas al degradar los heparán-sulfatos. Ahora bien, ciertos heparán-sulfatos (conteniendo grupos funcionales seleccionados) pueden proteger contra esas degradaciones proteolíticas. *i)* En cuanto al *condroitin-sulfato*, téngase en consideración que resulta útil en el tratamiento de las artrosis de rodilla y cadera, si se emplea en las primeras fases de estos trastornos. *j)* Finalmente, acerca de los compuestos de tipo glicoconjugado dotados de *actividad antigripal* actualmente autorizados (*oseltamivir* = "tamiflu" y *zanamivir* = "relenza"), que son inhibidores de la enzima vírica sialidasa o neuraminidasa (E.C. 3.2.1. 18), antes indicados, su composición, mecanismo de acción, etc., se hallan detallados especialmente en las publicaciones de las referencias 10, 13 14 y 16. *k)* De modo análogo, lo concerniente a la hormona *eritropoyetina*, a la enzima *glucocerebrosidasa* y a *otros sialoconjugados* de interés terapéutico puede consultarse en la reciente revisión de la referencia 5.

3.3. Datos posteriores al año 2000 relativos a glicosilación y terapéutica

Si ya en los comienzos de la década de 1990 aparecen artículos relativos a estos temas, como los de las referencias 18-20, a partir del año 2000 se ha incrementado notablemente su número. Los títulos de las referencias 21-32 indican claramente su contenido, que abarca diversas facetas de tan complejo asunto.

Acerca de la importante cuestión de la obtención de este tipo de medicamentos por técnicas biotecnológicas, conviene recordar que los sistemas enzimáticos empleados para ello –ya sean procedentes de bacterias, levaduras, insectos o, frecuentemente, de células de ovario de hámster chino (CHO = "Chinese hamster ovary")- no siempre garantizan la biosíntesis de un glicoconjugado de idéntica estructura química a la del natural (dada la habitual microheterogeneidad

de estos compuestos), pero mediante glicosilaciones o desglicosilaciones ulteriores adecuadas pueden obtenerse fármacos de igual o, frecuentemente, mayor actividad biológica que las de sus homólogos naturales (4).

3.4. Algunos grupos recientes de fármacos de naturaleza glicoconjugada, y aspectos económicos con ellos relacionados

Principalmente a partir de los comienzos de la década de 2000, se ha incrementado, sobre todo en EE.UU., el número de empresas –vinculadas frecuentemente al ámbito universitario- dedicadas a la fabricación de medicamentos pertenecientes a este grupo. Parece ser que sus resultados económicos han sido generalmente muy notables, pero también algunas de ellas fueron clausuradas, dado su escaso rendimiento.

Procede aquí comentar únicamente la índole de algunos de los fármacos que han sido oficialmente aceptados en los últimos años, una vez superados los exigentes trámites para su aprobación. Destacan: Análogos de *iminoglúcidos* (que perfeccionan antiguos antibióticos de esta naturaleza, evitando algunos de los efectos secundarios desfavorables de aquéllos), *oligosacáridos conjugados* (como componentes de vacunas), vacunas conteniendo el *gangliósido GM2* o vacunas conteniendo un *glúcido bacteriano acoplado a una proteína*; y también, *enzimas relacionadas con procesos de glicosilación y desglicosilación* (como variedad de nuevas terapias). Asimismo, atención especial está mereciendo el grupo de los "*sugar mimics*", que son moléculas muy similares estructuralmente a ciertos glúcidos, capaces de bloquear la biosíntesis de estos compuestos en procesos cancerosos o en enfermedades como la hepatitis C, o de reducir la biosíntesis del glicolípido que se acumula en la enfermedad de Gaucher.

Respecto a los aspectos económicos, es significativo el ejemplo de las ventas de una *eritropoyetina* (la comercializada con el nombre de "Aranesp®") cuyas cifras en la década de 2000 no han cesado de aumentar y fueron en el año 2005 de 2.500 millones de dólares (EE.UU.) (5). Otro glicoconjugado de amplio uso es la *heparina*, con el consiguiente elevado importe económico. Y piénsese en la altísima cuantía que representan mundialmente las *vacunas antigripales* (33) (que deben ser renovadas anualmente), incluso en ausencia de pandemias; pero que ahorran en actividad laboral no perdida, ausencia de hospitalizaciones y en bienestar cantidades muy superiores (16). Evidentemente, el consumo de otros fármacos de este grupo es mucho más restringido y, por tanto, lo son sus rendimientos económicos. No obstante, una considerable cifra corresponde a la venta de los *agentes destinados al diagnóstico* vinculados con los glicoconjugados (véase más adelante).

3.5. La "Glicoproteína P" disminuye la eficacia de fármacos anticancerosos

En relación con aspectos terapéuticos, cabe señalar la peculiaridad de esta glicoproteína (de tamaño molecular cercano a 170.000, situada en la membrana de células cancerosas), que tiene la propiedad de actuar como una bomba energética capaz de expulsar de la célula ciertos agentes anticancerosos, ocasionando así resistencia multifarmacológica y el fracaso de la quimioterapia aplicada en la lucha contra este enfermedad.

4. MARCADORES TUMORALES GLICÁNICOS

4.1. Características y ejemplos

Marcadores tumorales pueden contener un componente glicánico o de naturaleza peptídica. Respecto a los primeros, debe advertirse que «estrictamente hablando, desde una base química, no hay "estructuras específicas de tumores" [sino] […] "estructuras no-específicas» (34). De ahí que su valor para este fin sea limitado. Aún mayores restricciones deben aplicarse a las enzimas aplicadas para estos ensayos.

Generalmente, se acepta que un marcador tumoral es una sustancia producida por las células tumorales o por el organismo hospedador, detectable y valorable en el suero o en otros materiales biológicos, que es indicador de la existencia o seguimiento de la enfermedad.

«El marcador tumoral ideal debería estar presente solamente, o incrementado, en pacientes con tumores malignos, debería correlacionarse con el tamaño del tumor, debería ser fácil de analizar, tener una semi-vida corta, y debería estar presente en todos los tumores de un órgano específico. […] Pocos marcadores tumorales tienen estas características» (35). Es decir, deberían poseer una elevada *sensibilidad* y una *especificidad* tal que garantizaran el poder distinguir a los pacientes de cáncer –incluso señalando el tipo de cáncer- respecto a los sujetos normales o a los pacientes de otras enfermedades. En general, estas condiciones suelen cumplirlas, aunque sea sólo parcialmente, la mayor parte de los marcadores usuales.

Concretamente, ciertos glicoconjugados satisfacen esencialmente tales exigencias, probablemente por tener las siguientes características: *a)* Ser moléculas producidas en exceso (respecto a las escasas concentraciones normales) o poseer estructuras peculiares (véase más adelante), ya sea por truncamiento (y por consiguiente menor tamaño) de las cadenas glicánicas, o por ramificación incrementada de las uniones β1-6, como consecuencia de la desregulación de la actividad de las glicosiltransferasas y las glicosidasas que catalizan su biosíntesis. *b)* Ser sustancias de alta polaridad (al contener residuos de ácidos siálicos), por lo

que entran rápidamente en circulación. *c)* Ser relativamente resistentes a la degradación metabólica, por lo que pueden liberarse en cantidades que permiten su detección y valoración por las modernas técnicas analíticas.

Unos marcadores son los *derivados del tumor*, que son moléculas producidas por las propias células tumorales, entre los que se distinguen los antígenos oncofetales (como el CEA) y los antígenos tumorales (CA 19.9, etc.); y otros son los marcadores *asociados al tumor*, que son moléculas producidas por células del organismo hospedador, cuyas moléculas existen normalmente pero a menor concentración (así la ferritina). Por tanto, algunas de estas sustancias pueden hallarse no sólo en células neoplásicas sino en las normales, sobre todo de embriones, pero incluso también de adultos. Esto explica el hecho de los "resultados falsamente positivos".

Por otro lado, un marcador glicánico puede serlo de diferentes tipos de cáncer, aunque lo sea con distinto grado de especificidad. En este sentido, se clasifican en: *los de elevada especificidad* (que escasean), *los de especificidad intermedia* (como el CEA, que suelen ser los más habituales), y *los de baja especificidad*. Asimismo, se deduce que, frecuentemente, un marcador puede ser más útil en el seguimiento que en el diagnóstico de un determinado tipo de cáncer. Otra faceta a considerar es su aplicación para el pronóstico en cuestión.

La *estructura química* de algunos marcadores tumorales, así como su relación con grupos sanguíneos, se indica en la Figura 5. En la Tabla 3 se muestran algunos ejemplos de marcadores glicánicos y su vinculación con el tipo de tumor.

Desde el punto de vista histórico, el *antígeno carcino-embrionario* ("*carcino embryonic antigen*", *CEA*) se utilizó para la detección, pronóstico y seguimiento del cáncer colo-rectal de modo empírico inicialmente, pues no se conocía exactamente su composición. Sólo a partir de 1987 se empezó a conocer la estructura de su porción glicánica, y hasta 1991 no se sabía que esta glicoproteína aparece expresada como dos formas (de masas moleculares 200.000 y 130.000) en tejidos normales, mientras que en células cancerosas aparece como una única glicoproteína de tamaño molecular variable, inferior a 170.000, a causa de las diferencias en el proceso de la *N*-glicosilación.

Otro antígeno importante, que es asimismo un glicconjugado (aunque no una glicoproteína sino un gangliósido), es el denominado *CA 19.9* (= "*carbohydrate antigen 19.9)* Su porción glicánica corresponde al antígeno Lewis^a sialilado (véase Figura 5); exactamente, dicho CA 19.9 es un sialosil-fucosil-lactotetraosil-ceramida. Usado ampliamente como marcador del cáncer colo-rectal, su sensibilidad es inferior a la del CEA, considerándosele como más valioso para el pronóstico que para el diagnóstico de dicha enfermedad.

Por otro lado, van adquiriendo cada vez mayor importancia los datos sobre *señales glucídicas* celulares (="*carbohydrate signals*") relacionadas con pronóstico y metástasis de carcinomas humanos. Se consideran como tales (para cáncer colo-rectal) los siguientes compuestos: *Sialosil-Tn, sialosil-dimérico-Lewis^x (EH6), antígenos de los grupos sanguíneos ABH* y ciertos *oligosacáridos con ramificación β1-6*. La composición de sus epitopos contiene moléculas de Ácido *N*-acetilneuramínico, *N*-acetilgalactosamina, β-galactosa o L-fucosa.

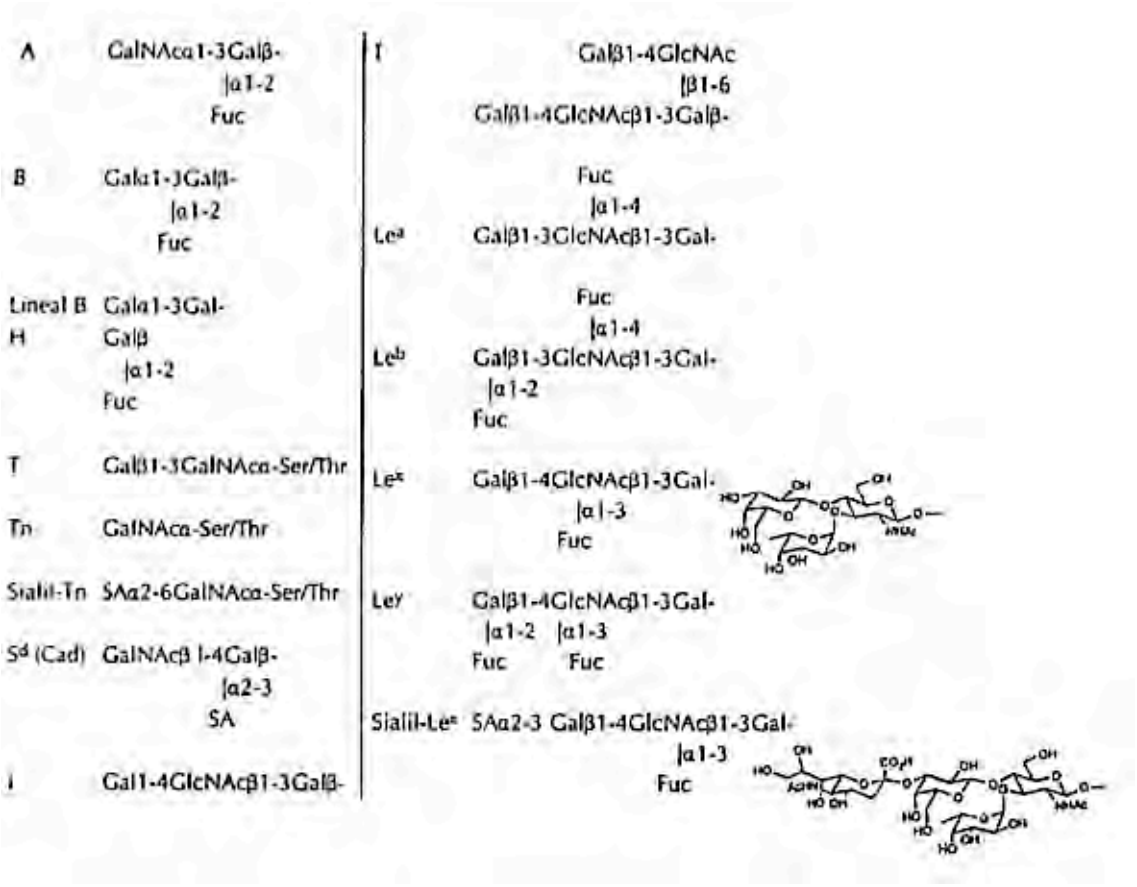


Figura 5.- Estructura de algunos antígenos relacionados con marcadores tumorales.

La investigación sobre marcadores glicánicos se ha dirigido últimamente al perfeccionamiento del conocimiento de sus peculiaridades (ventajas y limitaciones) y también a la búsqueda de otros nuevos. Ejemplos de éstos son los siguientes (36): *a) Glicanos incompletamente glicosilados*, en relación con pacientes de artritis reumatoidea. *b) Glicanos con glicosilación aberrante,* vinculados con desórdenes congénitos de glicosilación. *c) Glicoformas específicas (<70% Fuc, >sialil-Le^x)*, respecto a cáncer de próstata. *d) Hiperfucosilación (>α-1,6 Fuc)* en relación con carcinoma hépato-celular (en pacientes por virus de hepatitis B). *e) Gelatinasas B (alteración en los* O*-glicanos de esta metaloproteinasa de la matriz extracelular)*, en procesos de metástasis.

Tabla 3.- Marcadores glicánicos y localización del tumor.

Marcador glicánico	Tipo de tumor
Le^x Sialil-Tn Sialil-Le^x dimérico Ramificaciones β1-6 de los *N*-glicanos	Colo-rectal
Galβ1-4GlcNAcβ1-6Gal/GalNAc	Gástrico
H/Le^y/Le^b Le^a-Le^x	Pulmón
Sialil-Le^x dimérico Le^x	Vejiga
Le^b	Mama
Le^a, Le^x, Le^y	Esófago
GM_3/GD_3	Melanomas
Ácidos polisiálicos	Neuroendocrinos

4.2. Lectinas, ácido N-acetilneuramínico y hexosaminas séricos como potenciales marcadores/indicadores tumorales

Las lectinas (proteínas o glicoproteínas con alta capacidad de reconocimiento selectivo de estructuras glicánicas) pueden detectar los cambios que se producen en estas estructuras por truncamiento, ramificación β1-6, etc. de *N*-glicoproteínas, (fundamento del denominado "fenómeno de Warren-Glick"), coincidiendo con un proceso tumoral. Realmente lo que detectan es el resultado de la desregulación producida en el metabolizmo de dichos glicoconjugados. La especificidad de ciertas lectinas (generalmente de procedencia vegetal) está determinada por su capacidad de fijación selectiva, ya sea a monosacáridos (como el ácido *N*-acetilneuramínico, la α-L-fucosa, la α-manosa) o a diversos oligosacáridos (véase artículo de la referencia 37).

Trabajos de nuestro laboratorio (37) han hallado que determinaciones con las **lectinas** siguientes pueden ser útiles en el seguimiento del estado de salud de personas operadas de cáncer colo-rectal: **SNA**, de *Sambucus nigra*, cuya especificidad es para los oligosacáridos: Ácido *N*-acetilneuramínico (α2-6)-Galactosa, y Ácido *N*-acetilneuramínico (α2-6)-*N*-acetilgalactosamina; **LEL**, de *Licopersicon esceulentum*, específica para Ácido *N*-acetilneuramínico (α2-3)-Galactosa; y **LTL**, de *Lotus tetragonolobus*, específica para el monosacárido α-L-Fucosa.

Aun careciendo de esta especificidad, estudios anteriores (38) ya habían encontrado que las concentraciones en suero de **ácido *N*-acetilneuramínico** y de **hexosaminas**, procedentes de pacientes de diversos tipos de cáncer (mama, intestino, útero y pulmón), eran significativamente elevadas respecto a las normales. En este caso tal alteración es común a otras enfermedades; por lo que no pueden considerarse como determinaciones específicas, aunque probablemente sí como indicadores complementarios.

4.3. Glicosidasas en diversos tipos de cáncer

La determinación de **α-L-fucosidasa** y **β-*N*-acetilhexosaminidasa** en sueros de pacientes de cáncer gástrico muestra valores elevados significativamente en comparación con los normales (39, 40). Este resultado confirma el anterior (38) relativo a otros tipos de cáncer. A su vez, un incremento también significativo en la actividad de la **β-D-glucosidasa** se ha observado en pacientes de cáncer de pulmón (41).

Como antes se advirtió, tampoco estas valoraciones enzimáticas pueden considerarse como auténticos *marcadores* tumorales, pero sí cabe considerarlas como útiles *indicadores* de una situación (de carácter patológico) que afectaría al metabolismo de algunos glicoconjugados.

Finalmente, no una glicosidasa, sino una peptidasa, la **catepsina L** –cuyo comentario no procede hacer aquí- puede estimarse (por otros motivos) como enzima más valiosa en cuanto a esta especificidad (42). Análogamente, el marcador tumoral denominado **CA 125** no es un glicoconjugado, sino un péptido. Muy probablemene es el mejor marcador para efectuar el seguimiento de pacientes de cáncer de ovario.

5. REFERENCIAS

1. Cabezas, J.A. (1993) Glicobiología: Antecedentes y evolución de su contenido. Discurso de apertura del curso 1993-94. Universidad de Salamanca. 1-102.
2. Cabezas, J.A. (1995) Glicoconjugados: Algunos aspectos bioquímicos y farmacéuticos. *An. R. Acad. Farm.*61: 177-188.
3. Cabezas, J.A. (1995) Glicoconjugados: Su participación en funciones de los seres vivos. Mundo Científico. 159: 634-659.
4. Cabezas, J.A. (2000) Glicociencia: Glicobiología, Glicopatología, Glicoterapéutica, Glico(bio)tecnología. Instituto de España. Madrid. 1-54.
5. Cabezas, J.A. (2008) Influencia de la sialilación y de la «pegilación» de la molécula de ciertos medicamentos en su actividad. An. R. Acad. Farm. 74: 409-429.
6. Freeze, H.H. (2002) Human disorders in *N*-glycosylation and animal models. Biochim. Biophys. Acta. 1573: 388-393.
7. Cabezas, J.A. (2011) El ácido siálico *N*-glicolilneuramínico: Se relación con la biodiversidad y con procesos inmunitarios e infecciosos. An. R. Acad. Nac. Farm. 77: 72-86.
8. Varki, A. (2006) Nothing in Glycobiology Makes Sense, except in the Light of Evolution. Cell 126: 841-845.
9. Varki, A. & Schauer, R. (299) Sialic Acids. *In* A. Varki *et al.* (ed), Essentials of Glycobiology. (The Consort, La Jolla, Calif.). 1-13.

10. Cabezas, J.A. (2004) Datos actuales sobre virus de la gripe de patos salvajes y pollos, y virus de la gripe tipo C. Agentes antigripales. Monografía conjunta de las R. Acad. Nac. de Med y Farm. 49-74.
11. Cabezas, J.A. (2005) Nuevos datos acerca del virus causante de la pandemia de gripe de 1918-19 y su relación con los de la gripe aviar. Datos recientes relativos a éstos. An. R. Acad. Nac. Farm. 71: 83-110.
12. Cabezas, J.A. (2006) Gripe Aviar: Situación actual. An. R. Acad. Nac. Farm. 72: 301-315.
13. Cabezas, J.A. (2006) Inhibidores de la neuraminidasa y nuevas estrategias terapéuticas frente al virus de la gripe. R. Acad. Nac. Farm. Monografía XXI : 187-239.
14. Cabezas, J.A. (2009) El virus de la gripe aviar: Nuevos aspectos relativos a su patogenicidad y a estrategias para combatirlo. An. R. Acad. Nac. Farm. 75: 233-254.
15. Cabezas, J.A. (2009) La nueva gripe A/H1N1 o gripe A/H1N1(2009). An. R. Acad. Nac. Farm. 947-963.
16. Cabezas, J.A. (2010) La gripe A/H1N1(2009) y su tratamiento: Resumen de sus principales aspectos. An. R. Acad. Nac. Farm. 76: 241-258.
17. Feizi, T. & larkin, M. (1990) AIDS and glycosylation. Glicobiology. 1: 17-23.
18. Cumming, D.L. (1991) Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implications. Glycobiology *1: 115-130.*
19. Rademacher, T.W. (1992) Therapeutics challenges: does Glycobiology have a role? TIBTECH 10: 227-230.
20. Stiegler, G.; Kresse, G.-B. & Buckel, P. (1997) Biotecnología de fármacos. Inv. & Ciencia 254: 52-61.
21. Koeller, K.M. & Wong, C.–H. (2000) Emerging themes in medicinal glycoscience. Nature Biotech. 18: 835-841.
22. Rudd, P.M.; Elliot, T. […] & Dwek,, R.A. (2001) Glycosylation and the Immune System. Science. 291: 2370-2376.
23. Zopt, D. & Vergis, G. (2991) Glycosylation: a critical issue in protein development and manufacturing. Pharmaceutical Visions. *:10-14.*
24. Alper, J. (2003) Turning Sweet on Cancer. Science 301: 159-160.
25. Sinclair, A.M. & Elliott, S. (2005) Glycoengineering: The effect of Glycosylation on the Properties of Therapeutic Proteins. J. Pharm. Scien. 94: 1626-1635.
26. Ohtsubo, K. & Marth, J.D. (2006) Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. Cell. 126: 855-867.
27. Walsh, G & Jefferis, R. (2006) Post-traslational modifications in the context of therapeutic proteins. Nature Biotech. 24: 1241-1252.
28. Martin, O. (2007) Glycochimie et Thérapeutique. Les Iminosucres: applications thérapeutiques actuelles et futures. Ann. Pharm. *Fr.* 65: 5-13.
29. Schellekens, H. (2008) Why some proteins have sugars? Epoetins, from alfa to zeta. EJHP Practice. 14:29-35.
30. Laughlin, S.T. & Bertozzi, C.R. (2009) Imaging the glycome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 12-17.
31. Blow, N. (2009) A spoonful of sugar. Nature. 457: 617-621.
32. Beck, A.; Cocher, O. & Wurch, T. (2010) GlycoFi`stechnology to control the glycosylation of recombinant therapeutic proteins. Expert Opin. Drug Discov. 5: 95-111.
33. Strauss, S. (2010) BARDA funds vaccine makers aiming to phase out eggs. *Nature* Biotech. 28: 1227-1228.
34. Hakomori, S.-I. (1992) Tumor-associated carbohydrate markers. In: Serological cancer markers, Sell, S. (ed.) Totowa, N.J. (U.S.A.), 207-232.
35. Ørntoft, T. & Bech, E. (1995) Circulating blood group related carbohydrate antigens tumour markers. Glycoconjugate J. 12: 200-205.
36. Rudd, P.M. & Dweek, R.A. (2006) Glycobiology and Medicine. High-throughput glycan analysis and disease markers. The Biochemist. June: 18-21.
37. Cabezas, J.; Sánchez Martín, M.-M. […]; Gómez-Alonso, A. […]& Monsigny, M. (2011) Potential use of certain lectins for the follow-up of patients operated for colorectal cancer. An. R. Acad. Nac. Farm. (en prensa).
38. Cabezas, J.A. & Porto, E. (1970) Ácidos siálicos. XIII. Contenido en ácido *N*-acetilneuramínico, hexosaminas y ácido pirúvico, y actividad *N*-acetil-β-glucosaminidásica de sueros normales y cancerosos. Rev. Esp. Fisiol. 26: 339-346.

39. Reglero, A.; Carretero, M.-I. & Cabezas, J.A. (1980) Increased serum α-L-fucosidase and β-*N*-acetylglucosaminidase activities in diabetic, cirrhotic and gastric cancer patients. Clin. Chim. Acta. 103: 1455-158.
40. Reglero, A.; Carretero, M.-I. & Cabezas, J.A. (1980) Determinación de siete actividades glucidásicas en sueros normales y de pacientes con algunos trastornos metabólicos. An. R. Acad. Farm. 46: 55-68.
41. Calvo, P.; Barba, J.L. & Cabezas, J.A. (1982) Serum β-*N*-acetylglucosaminidase, β-D-Glucosidase, β-D-Fucosidase, α-L-Fucosidase and β-D-Galactosidase levels in acute viral hepatitis, pancreatitis, myocardial infarction and breast cancer. Clin. Chim. Acta. 199: 15-19.
42. Sánchez-Martín, M-M.; Cabezas, J.A. […] & Gómez-Alonso, A. (1999) Levels of cathepsin L and several glycosidases in patients operated for colorectal cancer. Cancer Let. 141: 73-77.

Vidrios mesoporosos bioactivos: implantes y sistemas de liberación de fármacos al servicio de las terapias regenerativas óseas

Daniel Arcos Navarrete

Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040 Madrid. España. Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN). Madrid. España.
Trabajo premiado con el Premio Abelló del Concurso Científico 2011 de la Real Academia Nacional de Farmacia.
e-mail: arcosd@farm.ucm.es

RESUMEN

El desarrollo de biocerámicas de tercera generación, diseñadas para la regeneración del tejido óseo, ha experimentado en los últimos diez años un importante avance con la irrupción de una nueva generación de materiales: los vidrios mesoporosos bioactivos. En este artículo se revisan y comentan críticamente sus métodos de preparación, sus aplicaciones como sistemas de liberación controlada de fármacos y el desarrollo de andamios para regeneración in situ del tejido óseo.

Palabras clave: Implantes óseos; Regeneración tisular; Liberación de fármacos; Andamios.

ABSTRACT

Mesoporous bioactive glasses: implants and drug delivery systems at the service of bone regenerative therapies

In the last decade, the development of third generation bioceramics designed for bone tissue regeneration, has undergone an outstanding enhancement with the appearance of a new generation of materials: mesoporous bioactive glasses. In this article, the preparation methods, drug delivery applications and the development of scaffolds for in situ bone regeneration are critically reviewed and commented.

Keywords: Bone implants; Tissue regeneration; Drug delivery; Scaffolds.

1. INTRODUCCIÓN

Las mejoras producidas en materia de salud pública en los últimos años han traído como consecuencia que, en la actualidad, tengamos un difícil reto ante la sociedad. El incremento en la esperanza de vida nos ha situado en el escenario de una población cada vez más envejecida, enfrentándonos al reto de aportar soluciones a decenas de millones de personas, con edades comprendidas entre 60 y 100 años, que desean una buena calidad de vida. Conseguirlo no es sencillo, teniendo en cuenta que a partir de los 30 años los tejidos inician un progresivo camino de deterioro hasta la muerte del individuo.

En el caso concreto de las patologías degenerativas del tejido óseo, el reto es si cabe aún mayor. El conjunto de desordenes músculo-esqueléticos debidos a fracturas (especialmente las de origen osteoporótico) o extirpación de tumores, traen como consecuencia que más de 2,2 millones de personas al año necesiten de implantes protésicos, para recuperar la estructura y función del hueso afectado (1). La sustitución de tejido óseo envejecido, enfermo o dañado se ha convertido en una actividad casi rutinaria como consecuencia del desarrollo y mejora de las técnicas quirúrgicas, de los biomateriales y de las estrategias de rehabilitación. Pero no es menos cierto que las limitaciones en el tiempo de vida útil de las prótesis continúa siendo un problema, cuya gravedad se incrementa en la medida que aumenta la esperanza de vida de los pacientes. Se estima que la tasa de fallo de las prótesis oscila entre el 15 el 50%, para aquellas con periodos de implantación transcurridos entre los 15 y los 30 años (2).

Esta situación ha impulsado un cambio de mentalidad en la comunidad científica sobre cómo afrontar la problemática de las enfermedades del tejido óseo. Las mejoras introducidas en los materiales diseñados para sustituir el hueso dañado no han conseguido solucionar el problema de la limitación del tiempo de vida útil. Es por ello por lo que, de un tiempo a esta parte, los esfuerzos se dirigen hacia materiales cuya actividad se enmarque en el terreno de las terapias regenerativas, en lugar de buscar soluciones de reemplazo del tejido natural por materiales artificiales permanentes (3). Se trata de desarrollar biomateriales que estimulen la respuesta osteogénica del organismo, iniciando y potenciando los mecanismos de autoreparación ósea. Este cambio de concepto se plasma en el desarrollo de materiales denominados biomateriales de 3ª generación, que son diseñados, sintetizados y procesados para estimular la regeneración del tejido óseo (4). Es en este marco, en el que se encuadran los vidrios mesoporosos bioactivos (VMB), objeto de estudio en este artículo de revisión.

Desde el descubrimiento por parte del Prof. L. L. Hench de la capacidad de ciertos vidrios basados en SiO_2 para unirse a los tejidos duros a través de un enlace mecánicamente fuerte (5), el desarrollo y aplicación clínica de los vidrios

bioactivos no ha dejado de crecer en los últimos 40 años. Compuestos como Bioglass 45S5, comercializado como diferentes productos sanitarios (Novamin Tech., Perioglass™, Novabone™, etc.) se emplean en la actualidad en cirugía ortopédica y periodontal, así como agentes regeneradores de dentina incluidos en pastas dentífricas. En 1991, la incorporación de la química sol-gel al terreno de las biocerámicas (6) dio lugar a una nueva generación de vidrios bioactivos, los cuales presentaban un enorme potencial para desarrollar mejores implantes con capacidades osteogénicas. Este hecho se basaba en las mejores propiedades de superficie y porosidad que lleva implícito el proceso sol-gel, respecto de la técnica de fusión y enfriamiento rápido con la que se preparan los vidrios convencionales. Desde entonces, los avances en esta línea de investigación han sido numerosos y de importante calado científico, como se recoge en numerosos trabajos de revisión publicados desde entones (7-11). Sin embargo, veinte años después la incorporación a la práctica clínica de estos vidrios no se ha producido, lo que de alguna manera puede explicarse porque su valor añadido no compensa el alto coste que implica incorporar el producto al mercado.

Muy recientemente, se ha desarrollado una nueva generación de vidrios mesoporosos bioactivos (VMB), que presentan características texturales y bioactivas no observadas en las generaciones anteriores. Estos materiales surgen gracias a la incorporación de la química supramolecular a los procesos sol-gel, dando como resultado materiales porosos altamente ordenados y con magnitudes de superficie y porosidad hasta cinco veces superiores a las obtenidas por el método sol-gel convencional (Figura 1).

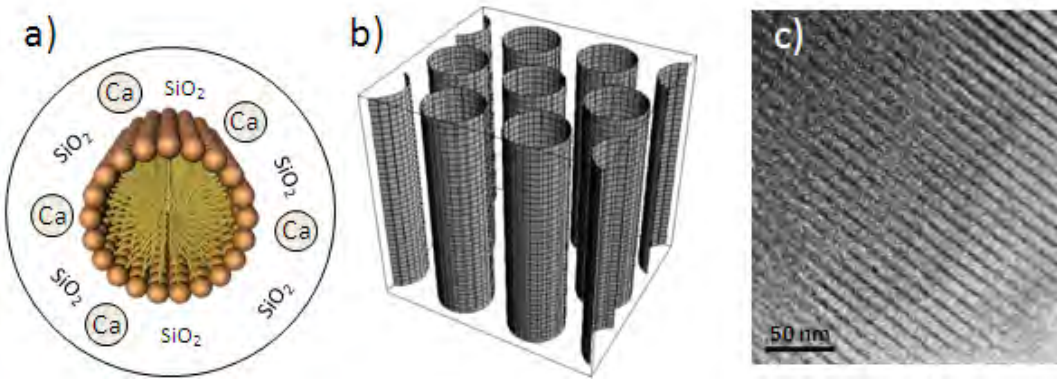


Figura 1.- (a) Representación esquemática, (b) reconstrucción estructural y (c) imagen de microscopia electrónica de transmisión de un VMB.

Como consecuencia de ello, nos encontramos ante materiales que presentan la mayor cinética de bioactividad *in vitro* observada hasta el momento. Sin embargo, el verdadero alcance clínico de estos materiales es aún desconocido, puesto que su estructura mesoporosa ordenada permite la incorporación de agentes osteogénicos, inhibidores osteoclásticos, etc. que dotan al sistema de un enorme potencial en el tratamiento de procesos degenerativos del tejido óseo.

En el presente artículo, se abordan los principios que rigen la preparación de estos materiales, así como los diferentes sistemas químicos y estructuras desarrolladas hasta el momento. Así mismo, los avances en la funcionalización de sus superficies y la incorporación de agentes terapéuticos para su liberación local también se detallan y discuten. Finalmente, se hace especial énfasis en la preparación de andamios tridimensionales con VMBs mediante técnicas de prototipado rápido. La preparación de implantes basados en estos materiales está llamada a jugar un papel fundamental en la nuevas técnicas de ingeniería tisular y terapias regenerativas del hueso.

2. MATERIALES MESOPOROSOS EN EL ÁMBITO BIOMÉDICO

En el año 2001, el grupo de investigación de la profesora Vallet-Regí (12) tuvo la idea de proponer el material mesoporoso MCM-41 para su aplicación en el ámbito biomédico, concretamente como sistema de liberación controlada de fármacos. MCM-41 forma parte de la familia de materiales M41S, que son el resultado de incorporar un agente director de estructura (en este caso bromuro de cetiltrimetilamonio) durante la síntesis vía sol-gel de SiO_2 (13). Las moléculas de surfactante, se auto organizan en micelas que co-ensamblan con los precursores solubles de SiO_2, dando lugar a estructuras ordenadas de SiO_2-surfactante. Al eliminar el surfactante por calcinación o extracción, se obtiene una estructura porosa de SiO_2 con excelentes propiedades texturales (14) que pueden resumirse en:

a) Red de mesoporos ordenados, con tamaños muy homogéneos que permiten un estrecho control de la cinética de liberación de los fármacos contenidos.

b) Elevada superficie específica y volumen de poro para adsorber las dosis necesarias de principio activo

c) Superficies densas en grupos silanol que pueden ser funcionalizados permitiendo un mejor control de la carga y liberación del fármaco.

En la actualidad, el desarrollo de esta línea ha conducido a la preparación de sofisticados sistemas estímulo-respuesta, también denominados sistemas inteligentes, que permiten la liberación del fármaco una vez alcanzado la célula o tejido diana (15-17), o bien por medio de un estímulo externo controlado a voluntad (18-21).

Fue el mismo grupo de Vallet-Regí el que pocos años más tarde planteó la hipótesis de que los materiales mesoporosos de SiO_2 podrían presentar comportamiento bioactivo (22, 23). Con el precedente de los trabajos del Prof. Kokubo (24, 25) y del Prof. Hench (26) sobre la posible bioactividad de geles de

SiO_2, llevaron a cabo ensayos de bioactividad *in vitro* en SBF de tres materiales mesoporosos de SiO_2: MCM-41, SBA-15 (ambos con estructura 2D-hexagonal) y MCM-48 (con estructura 3D-cúbica). Los resultados indicaron que las propiedades texturales de estos materiales permitían la nucleación de una fase apatita en superficie, a partir de los iones disueltos en la solución fisiológica simulada (SBF), según se muestra en la Figura 2. Sin embargo, el proceso se reducía a la formación de una pequeña fracción de hidroxiapatita tras más de 30 días de inmersión en SBF. Si bien estos resultados indicaban que la implantación in vivo de SiO_2 mesoporosa conducirían a la formación de una capa fibrosa antes que a la osteointegración, estos trabajos marcaron el camino para lo que sería un gran impulso en el terreno de las biocerámicas para regeneración ósea.

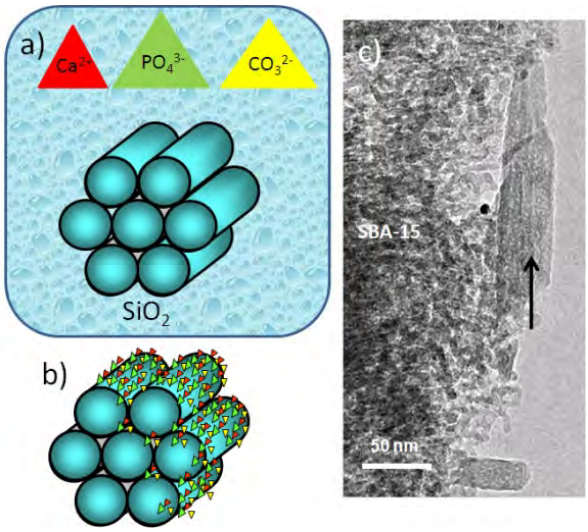


Figura 2.- (a y b) Precipitación de hidroxicarbonatoapatita sobre un material mesoporoso. (c) Imagen de MET de la fase apatita sobre un VMB (cortesía de la Dra Luisa Ruiz).

3. VIDRIOS MESOPOROSOSOS BIOACTIVOS

En el año 2004, el equipo de investigación del Prof. D.Y. Zhao (27) sintetizó los primeros vidrios mesoporosos bioactivos. Este grupo fue capaz de combinar la química sol-gel de sistemas multicomponente SiO_2-CaO-P_2O_5 con las bases de la química supramolecular de surfactantes. Como consecuencia, obtuvo por vez primera materiales mesoporosos con composiciones químicas análogas a los vidrios convencionales sol-gel de SiO_2-CaO-P_2O_5 (28-30), pero con las propiedades de porosidad y superficie propias de los materiales mesoporosos de SiO_2 conocidos hasta el momento. El mérito de este logro va más allá de añadir un surfactante como agente director de estructura a la síntesis sol-gel de un vidrio

bioactivo. Durante la síntesis de vidrios sol-gel SiO_2-CaO-P_2O_5, las etapas de envejecimiento y secado de los geles implican temperaturas de alrededor de 100ºC (31, 32). El grupo de Zhao entendió que estas etapas serían incompatibles con el establecimiento de una fase micelar ordenada. También comprendió que la clásica síntesis hidrotermal para la preparación de mesoporosos, sería incompatible con un sistema multicomponente donde la presencia de CaO dificultaría las interacciones entre la sílice y el surfactante. Por ello, recurrió a una estrategia propuesta años atrás por el Prof. C. J. Brinker, conocida como autoensamblaje inducido por evaporación (EISA en inglés) (33). Este método se basa en obtener disoluciones muy diluidas de los precursores y del surfactante en un medio volátil. A medida que se evapora el disolvente a temperatura ambiente se alcanza paulatinamente la concentración micelar crítica, dando lugar al autoensamblaje de las micelas en fases ordenadas más robustas desde el punto de vista de la estabilidad estructural.

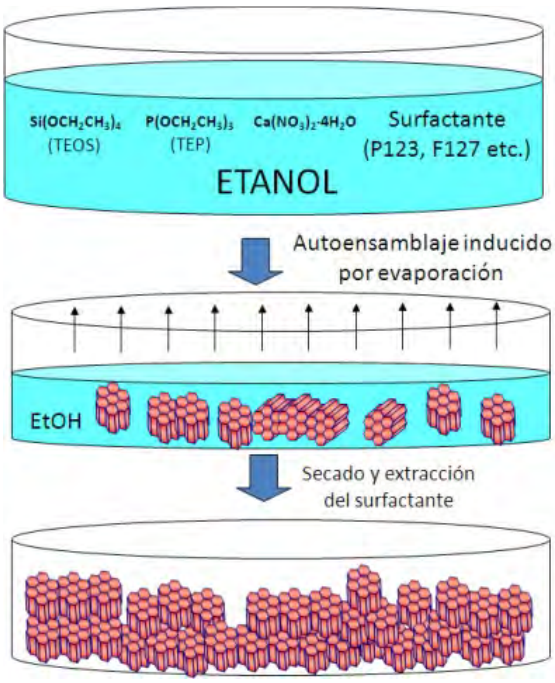


Figura 3.- Método EISA para la preparación de VMBs.

Las estructuras mesoporosas ordenadas obtenidas para los primeros VMBs se limitaron a fases hexagonales bidimensionales del tipo *p6m*, obtenidas a partir de Pluronic 123 como agente director de estructura y tetraetilortosilicato (TEOS), trietilfosfato (TEP) y nitrato de calcio como los correspondientes precursores solubles de SiO_2, P_2O_5 y CaO, respectivamente. Estudios posteriores del mismo grupo (34,35), les permitió establecer las principales diferencias entre los VMBs y los vidrios bioactivos sol-gel convencionales y que se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1.- Principales diferencias entre los vidrios sol-gel convencionales y los vidrios mesoporosos bioactivos en el sistema SiO_2-CaO-P_2O_5.

Vidrios sol-gel convencionales	Vidrios mesoporosos bioactivos
Propiedades texturales	**Propiedades texturales**
Superficie especifica (100-230 m^2/g)	Superficie especifica (200-450 m^2/g)
Volumen de poro (0,20- 0,35 cm^3/g)	Volumen de poro (0,45- 0,65 cm^3/g)
Estructuras porosas desordenadas	Estructuras porosas ordenadas
Heterogéneos (nanocristales de CaP)	Homogéneos (Ca y P dispersos en sílice)
Dependencia composición-porosidad	Independencia composición-porosidad
Contenido en CaO como factor determinante de la bioactividad	Superficie específica como factor determinante de la bioactividad

En el 2006, el grupo de Vallet-Regí y colaboradores (36) obtuvieron VMBs en el sistema SiO_2-CaO-P_2O_5 con estructuras porosas que presentaban ordenamientos diferentes a la estructura bidimensional *p6m*, utilizando el mismo agente director de estructura (Pluronic 123). Manteniendo constante la relación molar entre los formadores de red (SiO_2 y P_2O_5) y el surfactante, se demostró que la estructura porosa dependía del contenido en CaO. De este modo, para cantidades elevadas de CaO se obtenía la ya conocida fase hexagonal *p6m*. Sin embargo a medida que disminuía el contenido en CaO, se obtenían fases que eran propias de sistemas más hidrófobos, como la fase ortorrómbica *p2mm* y la fase cúbica *Ia-3d*. Estás últimas fases se obtenían más fácilmente, cuando la temperatura de evaporación del solvente se elevaba ligeramente (37). En estas circunstancias las interacciones tipo enlace de hidrógeno se debilitaban y el carácter hidrófilo del sistema disminuía, adquiriendo mayor importancia las interacciones de tipo hidrófobo ocasionadas por el componente apolar del surfactante. A modo de ejemplo, la composición 85 SiO_2- 10 CaO- 5 P_2O_5 (% mol) presenta una estructura *Ia-3d* cuando la evaporación se lleva a cabo a 40ºC, mientras que temperaturas de 20ºC durante el proceso EISA dan lugar a estructuras hexagonales *p6m*.

La confirmación de que podían obtenerse nuevas estructuras modificando el carácter hidrófilo del sistema, tuvo lugar cuando Yun y col. obtuvieron una fase cúbica de simetría *Im3m*, característica de entornos altamente hidrófilos (38, 39). Esta estructura se caracteriza por presentar poros en forma de cavidades. Dicha morfología de poro responde a la formación de micelas de forma esférica, con máxima curvatura, que se dan cuando el carácter hidrófilo del sistema (cabeza

polar del surfactante y precursor de sílice) predomina claramente sobre la parte hidrófoba (cola apolar del surfactante). Yun et al utilizaron como surfactante el F127, de carácter más hidrófilo, pues en su estructura de polímero tri-bloque presenta dos ramas de oxido de etileno de mayor longitud que las del Pluronic 123. De este modo, al favorecer el entorno hidrófilo se obtuvieron los primeros VMBs con poros en forma de cavidades en lugar de las estructuras en canales preparadas hasta entonces.

Estudios posteriores demostraron que, más allá del atractivo que presenta la preparación de diferentes fases mesoporosas ordenadas de sistemas multicomponente, las implicaciones biomédicas de este logro son de gran impacto. El proceso bioactivo, mediante el cual un material reacciona con los tejidos vivos, es un fenómeno que se inicia en la interfaz entre la superficie del implante y el hueso. La cantidad de materia que pueda difundirse e intercambiarse entre el implante y el hueso, determina la cinética y el tipo de reacción que tendrá lugar entre ambas superficies. Esta difusión de materia es superior en estructuras con sistemas de poros constituidas por redes 3D, que se extienden por todo el volumen del material, en comparación con las estructuras 2D de empaquetamientos hexagonales (40). Este hecho resultó ser una de las diferencias más notables entre los vidrios sol-gel convencionales y los VMBs. En los primeros, una mayor presencia de CaO determinaba un mejor comportamiento bioactivo. Por el contrario, en los VMBs, eran los valores texturales y el tipo de estructura, lo que determinaba que el proceso bioactivo tuviera lugar con mayor celeridad en condiciones *in vitro*.

Asimismo, la presencia o no de pequeñas agrupaciones de fosfato de calcio, determinan la velocidad de difusión de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-}, así como la cinética de cristalización de la fase hidroxicarbonatoapatita (HCA) requerida para el enlace bioactivo (41). Si bien la hipótesis inicial sobre la no existencia de nanocristales de CaP es cierta, posteriores estudios de RMN multinuclear de ^{31}P y ^{29}Si mostraron la presencia de *clusters* de ortofosfato de calcio a nivel local, que no son detectables por DRX (37,42) Estas pequeñas agrupaciones conjuntamente con la estructura porosa, determinan la cinética de formación de HCA en los VMBs. Otros factores como la inclusión de cationes adicionales de relevancia en procesos del desarrollo óseo (43), vidrios con elevadas proporciones de P_2O_5 (44), diferente tamaño de mesoporo (45) o incluso la incorporación de la química verde a estos procesos (46) también han sido recientemente considerados.

4. LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS DESDE VIDRIOS MESOPOROSOS BIOACTIVOS

El precedente del rápido desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos desde materiales mesoporosos de SiO_2, facilitó en gran medida la

incorporación de esta función a los VMB. Al conservarse las excelentes propiedades de superficie y porosidad, así como la capacidad de ser funcionalizados, diversos grupos de investigación entendieron el potencial que los VMB presentarían si, sumado a su excelente comportamiento bioactivo en el tejido óseo, pudieran actuar como sistemas liberadores de antibióticos y/o de agentes osteogénicos.

Uno de los problemas más comunes y complicados de resolver es la infección ósea en cirugía ortopédica. La incidencia de osteomielitis causada fundamentalmente por *S. aureous* y *S. epidermidis* es relativamente elevada. El problema se complica cuando estos microorganismos son capaces de desarrollar un *biofilm* sobre la superficie del implante. En ese momento, la administración sistémica de antibióticos es muy poco eficaz y la solución más común es la retirada del implante por septicemia. Es por ello por lo que la administración local y controlada de antibióticos desde el implante, se plantea como una excelente alternativa frente a la infección. Xia y Chang (47, 48) propusieron por primera vez la incorporación de antibióticos en el seno de la estructura porosa de los VMBs. Para ello, aplicaron una estrategia convencional de impregnación del fármaco, poniendo en contacto el VMB de composición 58S (58 SiO_2-37 CaO-5 P_2O_5 % mol) con una disolución concentrada de sulfato de gentamicina. Se observó, que el VMB podía incorporar hasta 3 veces más gentamicina que el mismo vidrio obtenido por el método sol-gel convencional. Asimismo, el perfil de la cinética liberación de gentamicina puede explicarse según el modelo mostrado en la Figura 4, en el cual las moléculas de antibiótico pueden ocupar diferentes posiciones en el poro (ventana de salida del poro ❶, interior del poro con interacciones material-gentamicina por enlace de hidrógeno ❷, interior del poro con interacción gentamicina-gentamicina ❸ y adsorción en la superficie externa del material ❹, estableciéndose diferentes cinéticas de liberación para cada una de estas posiciones.

La capacidad de carga y la cinética de liberación del fármaco son dependientes no solo de la porosidad, sino también de la composición química del VMB, como demostraron Zhao y colaboradores (49). Por ejemplo, la adsorción se tetraciclinas en VMBs es función del contenido en CaO, el cual actuaría a modo de agente quelante en la pared del poro. Por el mismo motivo, la cinética de liberación se ralentiza al incrementar el contenido en CaO en sistemas SiO_2-CaO-P_2O_5, pues la afinidad de la tetraciclina por el CaO controlaría su cesión al medio hídrico. Por otra parte, se ha realizado algún estudio de carga y liberación de fármacos variando el agente director de estructura, concretamente con P123 y F127, estableciéndose alguna distinción en relación a las diferencias de propiedades texturales que presentaba cada VBM (50).

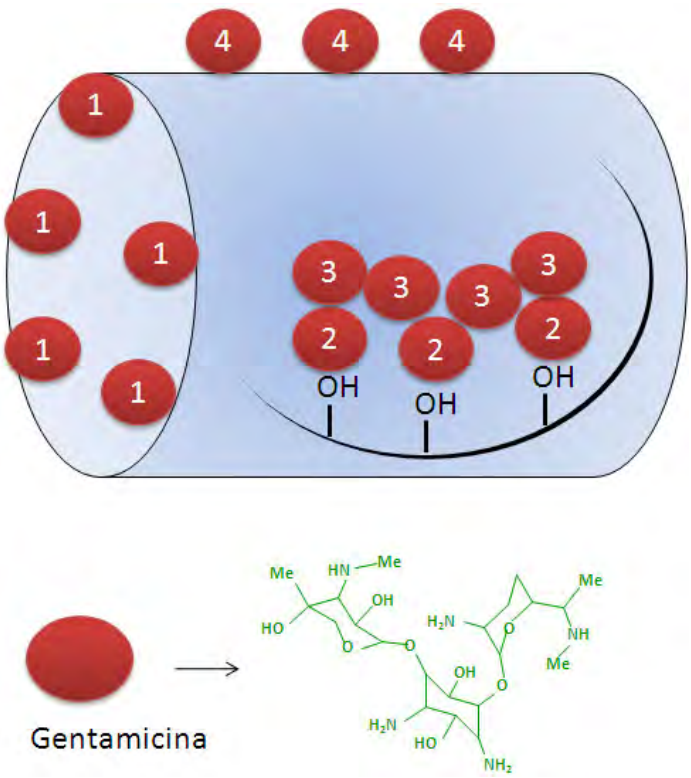


Figura 4.- Posibles localizaciones de la gentamicina respecto a los poros en un VMB.

Aun considerando la importancia de las características texturales para el control en la liberación de fármacos, la experiencia con los materiales mesoporosos de SiO_2 había demostrado que este control requería de funcionalizar las superficies de las matrices porosas. De otro modo, los efectos de liberación inmediata del fármaco y la imposibilidad de obtener cinéticas de liberación de orden cero, limitaba el uso de estas matrices. Sin embargo la funcionalización de los VMBs presenta una dificultad: la posible pérdida de bioactividad al modificar la superficie de los mismos (51). No ha sido hasta muy recientemente, cuando se ha llevado a cabo un estudio sistemático de cómo diferentes agentes funcionalizantes determinan el control en la liberación de ipriflavona, sin alterar significativamente el carácter bioactivo de estos materiales (52). Mediante la funcionalización con grupos tiol, amino, hidroxilo y fenilo, se pudieron obtener cinéticas de orden cero. Las constantes cinéticas podían controlarse en función de la fortaleza de los enlaces de hidrógeno que se establecían entre el fármaco y los diferentes grupos funcionales.

Más allá de la porosidad que presentan estos materiales, uno de los aspectos más importantes es la morfología y tamaño de las partículas del material. Han sido numerosos los investigadores que han considerado el control de estos parámetros, para poder diseñar sistemas de liberación de fármacos más eficaces. Entre ellos, la preparación de microesferas de tamaño controlado ha llamado la atención de diferentes grupos. Un sistema constituido por esferas de pequeño

tamaño ofrece posibilidades de reproducibilidad y control muy superiores a aquellos sistemas constituidos por partículas irregulares, angulosas y tamaños variables. El grupo del Prof. Galen Stucky (53) propuso la preparación de microesferas mesoporosas bioactivas, analizando sus propiedades hemostáticas. Estos materiales han sido propuestos como agentes de primeros auxilios en casos de hemorragias con pérdida masiva de sangre (54), que además no presentan el efecto térmico de otros sistemas que suelen necrosar tejidos sanos durante su aplicación. Estas esferas presentan tamaños comprendidos entre 100 nm y 1 micrometro y se obtienen en el sistema SiO_2-CaO-P_2O_5 utilizando el surfactante P123 como agente director de la estructura.

Los métodos para obtener microesferas mesoporosas bioactivas son variados. Entre ellos merecen ser destacados los métodos asistidos por la generación de aerosoles. Esta metodología combina el autoensamblaje inducido por evaporación con la formación de pequeñas gotículas, las cuales contienen todos los precursores que formarán la microesfera mesoporosa bioactiva. Estas gotículas forman en su seno la fase ordenada y son posteriormente pirolizadas para formar sistemas del tipo SiO_2-CaO-P_2O_5. Algunas de estas esferas han sido propuestas como injerto óseo y sistemas liberadores de fármacos (55). Los métodos asistidos por aerosol, permiten la obtención de microesferas con estructuras porosas ordenadas de sistemas multicomponente. Sin embargo, los tamaños de partícula obtenidos por este método limitan su uso a la implantación local directamente en hueso, y su aplicación se restringe al relleno y regeneración de pequeños defectos óseos, como son por ejemplo los defectos periodontales ocasionados por la extracción dental. De este modo, se puede lograr una sinergia terapéutica combinando su capacidad regenerativa y su efecto farmacológico cuando se cargan con principios activos de acción antiséptica.

Una segunda estrategia para la obtención de microesferas, es la precipitación en medio básico a partir de una disolución diluida del surfactante y los precursores. Este método da lugar a esferas de menor tamaño y monodispersas, si bien presenta los problemas de aglomeración característicos de los métodos de precipitación en vía húmeda (56,57). La obtención de partículas pequeñas y monodispersas, permiten su incorporación al sistema sanguíneo. La estabilidad hidrodinámica en el torrente circulatorio se consigue cuando el tamaño de partícula del vehículo se mantiene entre 50 y 300 nm. Partículas de tamaño superior quedan retenidas en pulmón e hígado, y aquellas otras con tamaños inferiores a 50 nm pueden atravesar el endotelio vascular y distribuirse en el organismo de forma inespecífica. En este sentido se han propuesto nanoesferas mesoporosas de SiO_2-CaO (58), donde el CaO juega un papel de favorecer la biodegradación, en lugar de favorecer un proceso de formación ósea. Finalmente, cabe mencionar la combinación de VMBs con polímeros biocompatibles como

sistemas bioactivos, capaces de presentar una liberación controlada de fármacos (59). En este tipo de sistemas, los VMBs no constituyen la microesfera en sí misma, sino que forman la fase discreta inmersa en la matriz polimérica. En estos sistemas, el principio activo puede ir incluido en la estructura porosa del VMB o dispersado en el seno de la matriz polimérica.

Recientemente se han preparado fibras huecas ultrafinas con VMBs (60). Aplicando técnicas de *electrohilado* y controlando la relación agua/etanol en la cual se disuelven los precursores y un agente separador de fases, se consigue que durante el proceso de fabricación de las fibras tenga lugar la descomposición espinoidal de la disolución. Esto trae como consecuencia la formación de fibras huecas con estructuras mesoporosas en las paredes. Su capacidad para cargar y liberar controladamente sulfato de gentamicina se relaciona directamente con la longitud de la fibra, además de presentar excelentes propiedades bioactivas.

Entre los sistemas de liberación de fármacos más interesantes, se encuentran aquellos denominados *estímulo-respuesta* o *sistemas inteligentes*. Estos sistemas han sido aplicados con éxito a materiales mesoporosos de sílice y consisten en diseñar un sistema de apertura y cierre en la entrada de los poros, cuyo control esté sujeto a un estímulo externo. En este sentido, se han diseñado sistemas basados en nanopartículas y compuertas moleculares. En los VMBs son muy pocos los trabajos realizados en este terreno. Recientemente Lin y colaboradores han preparado un sistema de compuertas moleculares basado en la fotodimerización de la molécula de cumarina (61). Estos sistemas se accionan de forma que la irradiación con luz UV de longitud de onda superior a 310 nm induce la dimerización de la cumarina, cerrando la apertura de los poros e impidiendo la difusión del fármaco, mientras que la irradiación con luz UV de 250 nm regenera el monómero de cumarina permitiendo la liberación del fármaco (Figura 5). Otros sistemas estímulo- respuesta de interés son aquellos que combinan las propiedades magnéticas con la liberación controlada de fármacos. La incorporación de nanopartículas magnéticas en el interior de sistemas mesoporosos dota de multifuncionalidad a estos materiales. Mediante la acción de un campo magnético externo, se puede lograr la vectorización de la partícula hacia regiones localizadas. Asimismo, la propiedad que algunos materiales magnéticos presentan para generar calor permite que los sistemas mesoporosos se comporten como termosemillas, para el tratamiento de tumores por hipertermia. Estos sistemas han sido objeto de estudio para materiales de SiO_2 (62-65) así como para sistemas VMBs del tipo SiO_2-CaO-P_2O_5 (66).

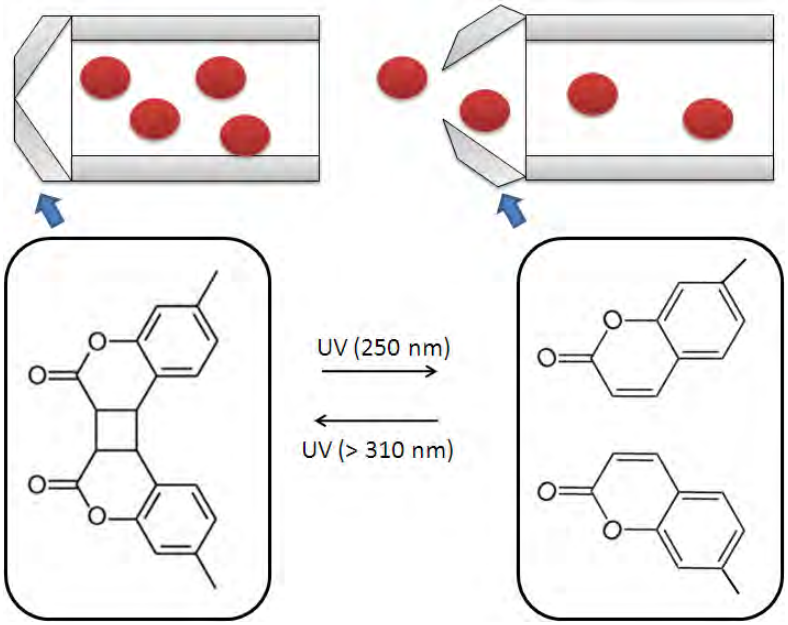


Figura 5.- Sistema de liberación de fármacos desde VMBs basados en compuertas fotosensibles de cumarina.

5. ANDAMIOS DE VMBS PARA TERAPIA REGENERATIVA ÓSEA

La regeneración de defectos óseos críticos es probablemente el reto más importante y complicado que abordan los biomateriales de 3ª generación. En el caso de pequeños defectos óseos, como suelen ser aquellos derivados de cirugía periodontal, el implante puede realizarse con el material en forma de gránulos, o bien formando una pasta con suero fisiológico o con la propia sangre del paciente. Sin embargo, la regeneración de un defecto crítico requiere de piezas que se ajusten al defecto. En muchos casos, la zona de implantación soporta importantes cargas mecánicas, lo que limita la utilización de materiales cerámicos. Si a esto último le añadimos que los implantes deben presentar poros lo suficientemente grades para permitir su colonización por los osteoblastos y permitir la angiogénesis (67, 68), es fácil de entender la magnitud del problema que abordan los VMBs en la terapia regenerativa ósea.

El primer intento por moldear VMBs en forma de piezas lo llevo a cabo el equipo del Prof. Stucky (69). Este grupo logró preparar una pasta inyectable mezclando VMBs del tipo SiO_2-CaO-P_2O_5 con una solución tamponada de fosfato de amonio. Dicha pasta fraguaba de forma similar a los cementos de fosfato de calcio, permitiendo la formación de piezas sólidas con cierta resistencia mecánica y elevado comportamiento bioactivo. Sin embargo, estos materiales no presentaban la arquitectura porosa requerida para un andamio destinado a la regeneración del defecto, es decir la presencia de macroporos con tamaños de centenares de

micrómetros e interconectados entre sí. El equipo pionero en incorporar los VMBs a los métodos de preparación de andamios mesoporosos es el grupo del Prof. Yun (70). Este grupo incorpora las técnicas de *prototipado rápido* a la preparación de andamios basados en VMBs con una arquitectura porosa ordenada, así como a la preparación de piezas con formas libres mediante el diseño asistido por ordenador (Figura 6). Estos andamios también pueden comportarse como sistemas de liberación de fármacos, puesto que en la nanoescala conservan su estructura mesoporosa ordenada. Los andamios obtenidos por el Prof. Yun presentan la particularidad de contener tres sistemas porosos diferentes en las escalas nanométrica, micrométrica y macroscópica, todos ellos con un estricto control de tamaño y ordenamiento poroso. Para ello, se requiere la combinación de un agente director de estructura que genere mesoporosidad ordenada, un polímero como la metilcelulosa que genera poros del orden de micrómetros al ser calcinado y, finalmente, una arquitectura macroporosa diseñada por técnicas de prototipado rápido. El principal problema de estos andamios cerámicos porosos es su extrema fragilidad, lo que limita su aplicación en cirugía ortopédica. Si bien ha sido posible demostrar que la formación de una fase tipo apatita refuerza las propiedades mecánicas de los andamios fabricados con VMBs, este incremento no satisface los requerimientos mecánicos para su aplicación en hueso (71). Para ello, se han propuesto combinaciones de VMBs con polímeros biocompatibles como la policaprolactona (PCL) (72). Estos andamios compuestos han dado excelentes resultados en cuanto a la mejora mecánica, manteniendo sus propiedades bioactivas en condiciones *in vitro*. Ensayos de biocompatibilidad *in vitro* utilizando líneas osteoblásticas, mostraron una mayor adhesión y proliferación celular sobre estos andamios compuestos, que sobre aquellos fabricados únicamente con PCL. La excelente biocompatibilidad celular ha sido posteriormente confirmada por el mismo grupo así como por diferentes autores y para distintos cultivos celulares (73-77).

La arquitectura macroporosa de estos andamios también puede ser diseñada a partir de polímeros que constituyen una plantilla fácilmente eliminable por calcinación (78). Esta metodología también ha sido ha sido empleada utilizando esponjas de poliuretano (79), que tras ser calcinadas dan lugar a piezas altamente porosas, con elevada interconectividad de poro y dando lugar a estructuras muy similares al hueso trabecular. Basándose en este tipo de estructuras y en la actividad antiosteoporótica del renalato de estroncio, Wu y colaboradores (80) prepararon andamios mesoporosos basándose en el sistema $SrO\text{-}SiO_2$, que si bien no presenta propiedades bioactivas, su capacidad para liberar Sr^{2+} ejerce una acción antiosteoporótica y favorece la degradación del andamio, facilitando la cesión de un segundo compuesto activo incluido en su estructura mesoporosa.

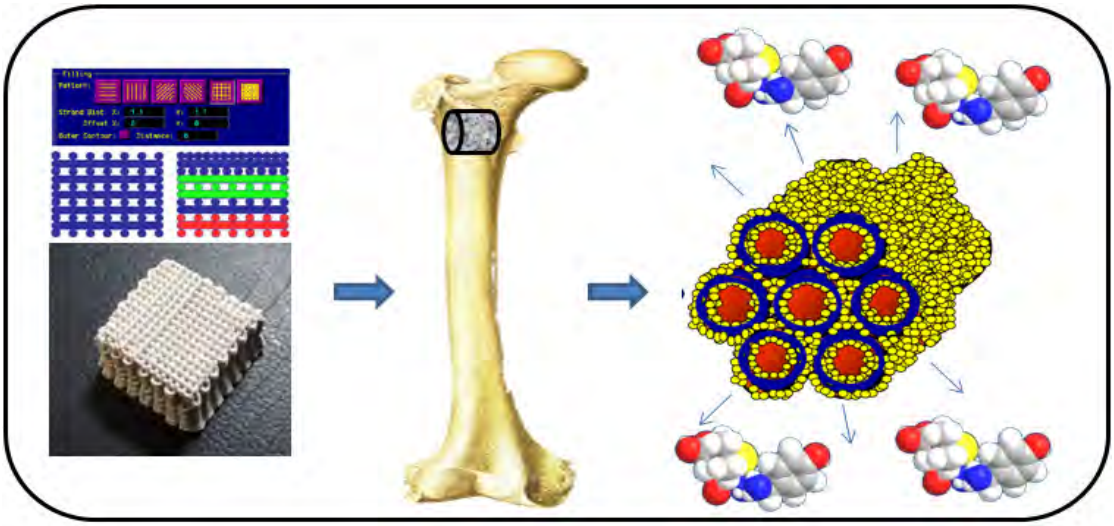


Figura 6.- Diseño de la porosidad y preparación por impresión 3D de un VMB (izquierda). Implante en defecto óseo y liberación de gentamicina (derecha).

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las nuevas terapias regenerativas en el ámbito de las patologías óseas requieren de la sinergia entre la ciencia de materiales y las ciencias farmacéuticas. En la última década se ha impuesto un cambio radical en la estrategia para diseñar biomateriales que aborden las patologías del tejido óseo. No se trata de sustituir las partes del hueso dañado, ni de buscar materiales que imiten las funciones fisiológicas del hueso. La primera opción conlleva importantes limitaciones en la vida útil del implante y la segunda implica objetivos que aun están lejos de ser alcanzados.

Un enfoque mucho más realista, pero no por ello menos ambicioso, es el de dotar al hueso de una plataforma que estimule sus mecanismos de autoregeneración. En este sentido los vidrios mesoporosos bioactivos están llamados a jugar un importante papel como sistemas de liberación de fármacos y como andamios porosos para la regeneración ósea. La sinergia entre las ciencias farmacéuticas y las biocerámicas requiere, por parte de estas últimas, características de superficie y porosidad muy determinadas. Con la incorporación de la química supramolecular a los métodos de síntesis a baja temperatura (como el proceso sol-gel) y el diseño de los implantes por técnicas de prototipado rápido, se ha conseguido preparar implantes de elevada porosidad. Estos se encuentran ordenados y aportan elevadas superficies que son funcionalizadas químicamente, dotándolas de excelentes propiedades para la carga y liberación de fármacos. Entre estos, los agentes antibióticos, inhibidores osteoclásticos y estimuladores osteoblásticos están llamados a liderar el componente farmacéutico de estos

sistemas, que suponen una ambiciosa estrategia para dar solución a los problemas derivados de la pérdida de tejido óseo.

7. ABREVIATURAS

DRX: Difracción de rayos-X

EISA: Autoensamblaje inducido por evaporación (del inglés Evaporation induced self-assembly)

MET: Microscopía electrónica de transmisión

PCL: Policaprolactona

RMN: Resonancia magnética nuclear

SBF: Fluido corporal simulado (del inglés simulated body fluid)

TEOS: Tetraetilortosilicato

TEP: Trietilfosfato

VMB: Vidrio mesoporoso biactivo

8. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los miembros del equipo de investigación "Biomateriales de 3ª generación y biomateriales inteligentes" de la UCM, quienes han contribuido con algunos resultados expuestos en el articulo y cuyos nombres se recogen en la bibliografía. Así mismo se agradece a la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) y a la Comunidad Autónoma de Madrid por la financiación a través de los proyectos MAT2008-00736 y S2009/MAT-1472, respectivamente.

9. REFERENCIAS

1. Gentleman, E., & Polak J. M. (2006) Historic and current strategies in bone tissue engineering: Do we have a hope in Hench?. *J. Mater. Sci. Mater. Med* , *17*, 1029-1035.
2. Hench, L. L. Genetic design of bioactive glass. (2009). *J. Eur. Ceram. Soc.*, *29*, 1257-1265.
3. Vallet-Regí, M (2006). M. Revisiting ceramics for medical application *Dalton Trans*, *44*, 5211-5220.
4. Hench, L. L., & Polak, J. M (2002). Third-generation biomedical materials. *Science*, *295*, 1014-1017.
5. Hench, L. L., Splinter, R. J., Greenlee, T. K., & Allen, W. C. (1971). Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J. Biomed. Mater. Res.*, *2*, 117-141.
6. Li, R., Clark, A. E., & Hench, L. L. (1991). An Investigation of Bioactive Glass Powders by Sol-Gel Processing. *J. Appl. Biomater.*, *2*, 231-239.
7. Arcos, D., & Vallet-Regí, M (2010). Sol-gel silica based biomaterials and bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, *6*, 2874-2888.

8. Mahony, O., & Jones, J. R. (2008). Porous bioactive nanostructured scaffolds for bone regeneration: a sol-gel solution. *Nanomedicine*, *3*, 233-245.

9. Coradin, T., Boissière, M., & Livage, J. (2006). Sol-gel Chemistry in Medicinal Science *Curr. Med. Chem*., *13*, 99-108.

10. Vallet-Regí, M. (2001). Ceramics for medical applications. *J. Chem. Soc. Dalton Trans*. 97-108.

11. Vallet-Regí, M., Ragel, C. V., & Salinas, A. J. (2003). Glasses with medical applications. *Eur. J. Inorg. Chem*. 1029-1042.

12. Vallet-Regí, M., Rámila, A., del Real, R. P., & Pérez-Pariente, J. (2001). A new property of MCM-41: Drug delivery system. *Chem. Mater*., *13*, 308-311.

13. Kresge, C. T., Leonowicz, M. E., Roth, W. J., Vartuli, J. C., & Beck, J. S. (1992). Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*, *359*, 710-712.

14. Vallet-Regí, M., Balas, F., & Arcos, D. (2007). Mesoporous materials for drug delivery. *Angew Chem Int Ed*, *46*(40), 7548–7558.

15. Tan, K., Cheang, P., Ho, I. A. W., Lam, P. Y. P., & Hui, K. M. (2007). Nanosized bioceramic particles could function as efficient gene delivery vehicles with target specificity for the spleen. *Gene Therapy*, *14*, 828-835.

16. Slowing, I. I., Trewyn, B. G., & Lin, V. S.-Y. (2006). Effect of surface functionalization of MCM-41-type mesoporous silica nanoparticles on the endocytosis by human cancer cells. *J. Am. Chem. Soc*., *128*, 14792-14793.

17. Slowing, I. I., Trewyn, B. G., & Lin, V. S.-Y. (2007). Mesoporous silica nanoparticles for intracellular delivery of membrane-impermeable proteins. *J. Am. Chem. Soc*., *129*, 8845-8849.

18. Hernandez, R., Tseng, H. R., Wong, J. W., Stoddart, J. F., & Zink, J. I. (2004). An operational supramolecular nanovalve. *J. Am. Chem. Soc*., *126*, 3370-3371.

19. Ferris, D. P., Zhao, Y. L., Khashab, N. M., Khatib, H. A., Stoddart, J. F., & Zink, J. I. (2009). Light-operated mechanized nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, *131*, 1686-1688.

20. Lai, C. Y., Trewyn, B. G., Jeftinija, D. M., Jeftinija, K., Xu, S., Jeftinija, S., & Lin, V. S.-Y. (2003). A mesoporous silica nanosphere-based carrier system with chemically removable CdS nanoparticle caps for stimuli-responsive controlled release of neurotransmitters and drug molecules *J. Am. Chem. Soc*., *125*, 4451-4459.

21. Ruiz-Hernández, E., Baeza, A., & Vallet-Regí, M. (2011). Smart drug delivery through DNA/magnetic nanoparticle gates. *ACSNano*, *5*, 1259-1266.

22. Horcajada, P., Rámila, A., Boulahya, K., González-Calbet, J., & Vallet-Regí, M. (2004). Bioactivity in ordered mesoporous silica materials. *Solid State Sci*., *6*, 1295-1300.

23. Izquierdo-Barba, I., Ruiz-González, L., Doadrio, J. C., González-Calbet, J. M., & Vallet-Regí, M. (2005). Tissue regeneration: a new property of mesoporous materials. *Solid State Sci*., *7*, 983-989.

24. Li, P., Ohtsuki, C., Kokubo, T., Nankanishi, K., Soga, N., Nakamura, T., & Yamamuro, T. (1992). Apatite formation induced by silica gel in a simulated body fluid. *J. Am. Ceram. Soc*., *75*, 2091-2097.

25. Li, P., Ohtsuki, C., Kokubo, T., Nankanishi, K., Soga, N., Nakamura, T., & Yamamuro, T. (1993). Effects of ions in aqueous media on hydroxyapatite induction by silica gel and its relevance to bioactivity of bioactive glass and glass-ceramics. *J. Appl. Biomat*., *4*, 221-229.

26. Pereira, M. M., Clark, A .E., & Hench. L. L. (1995). Effect of texture on the rate of hydroxyapatite formation on silica gel surface. *J. Am. Ceram. Soc*., *78*, 2463-2468.

27. Yan, X. X., Yu, C. Z. , Zhou, X. F., Tang, J. W., & Zhao, D. Y. (2004). Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone forming bioactivities. *Angew. Chem. Int. Ed*., *43*, 5980-5984.

28. Rámila, A., Balas, F., & Vallet-Regí, M. (2002). Synthesis routes for bioactive sol-gel glasses: alkoxides vs. nitrates. *Chem. Mater*., *14*, 542-548.

29. Pereira, M. M., Clark, A. E., & Hench, L. L. (1994). Calcium phosphate formation on sol-gel derived bioactive glasses in vitro. *J. Biomed. Mater. Res*., *28*, 693-698.

30. Vallet-Regí, M., Arcos, D., & Pérez-Pariente, J. (2000). Evolution of porosity during in vitro hydroxycarbonate apatite growth in sol-gel glasses. *J. Biomed. Mater. Res*., *51*, 23-28.

31. Zhong, J., & Greenspan, D. C. (1997). Poroues sol-gel bioglass from near-equilibrium drying. *Bioceramics*, 10, 265-268.

32. Zhong, J., & Greenspan, D. C. (2000). Processing and properties of sol-gel bioactive glasses. *J. Biomed Mater Res Appl Biomater*., *53*, 694-701.

33. Brinker, C. J., Lu, Y. F , Sellinger, A., & Fan, H. Y. (1999). Evaporation-induced self-assembly: nanostructures made easy. *Adv. Mater*., 11, 579.

34. Yan, X. X. , Deng, H. X. , Huang, X. H. , Lu, G. Q., Qiao, S. Z.,. Zhao, D. Y., & Yu, C. Z. (2005). Mesoporous bioactive glasses. I. Synthesis and structural characterization . *J. Non-Cryst. Solids*, *351*, 3209-3217.

35. Yan, X. X., Huang, X. H., Yu, C. Z., Deng, H. X., Wang, Y., Zhang, A. D., Qiao, S. Z., Lu, G. Q., & Zhao, D. Y. (2006). The in vitro bioactivity of mesoporous bioactive glasses. (2006). *Biomaterials*, *27*, 3396-3403.

36. López-Noriega, A., Arcos, D., Izquierdo-Barba, I., Sakamoto, Y., Terasaki, O., & Vallet-Regí, M. (2006). Ordered mesoporous bioactive glasses for bone tissue regeneration . *Chem. Mater*., *18*, 3137-3144.

37. García, A., Cicuéndez, M., Izquierdo-Barba, I., Arcos, D., & Vallet-Regí, M. (2009). Essential role of calcium phosphate heterogeneities in 2D-hexagonal and 3D-cubic SiO_2-CaO-P_2O_5 mesoporous bioactive glasses. *Chem. Mater*., *21*, 5474-5484.

38. Yun, H. S., Kim, S. E., & Hyeon, Y. T. (2007). Highly ordered mesoporous bioactive glasses with Im3m symmetry. *Matter Lett*., *61*, 4569-4572.

39. Yun, H. S., Kim, S. E., & Hyeon, Y. T. (2008). Preparation of 3 dimensional cubic ordered mesoporous bioactive glasses. *Solid State Sci*., *10*, 1083-1092.

40. Izquierdo-Barba, I., Arcos, D., Sakamoto, Y., Terasaki, O., López-Noriega, A., & Vallet-Regí, M. (2008). High performance mesoporous bioceramics mimicking bone mineralization. *Chem. Mater*., *20*, 3191-3198.

41. Gunawidjaja, P. N., Lo, A. Y. H., Izquierdo-Barba, I. , García, A., Arcos, D., Stevensson, B., Grins, J., Vallet-Regí, M., & Edén, M. (2010). Biomimetic apatite mineralization mechanisms of mesoporous bioactive glasses as probed by multinuclear (31P, 29Si, 23Na, 13C) solid state NMR. *J. Phys. Chem. C*, *114*, 19345-19356.

42. Leonova, E., Izquierdo-Barba, I., Arcos, D., López-Noriega, A., Hedin, N., Vallet-Regí, M., & Edén, M. (2008). Multinuclear Solid State NMR Studies of Ordered Mesoporous Bioactive Glasses. *J. Phys. Chem. C* , *112*, 5552-5562.

43. Li, X., Wang, X. P., He, D. N., & Shi, J. L. (2008). Synthesis and characterization of mesoporous CaO–MO–SiO_2–P_2O_5 (M = Mg, Zn, Cu) bioactive glasses/composites. *J. Mater. Chem*., *18*, 4103-4109.

44. Zhao, S., Li, Y. B., & Li. D. X. (2011). Synthesis of CaO-SiO_2-P_2O_5 mesoporous bioactive glasses with high P_2O_5 content by evaporation induced self assembly process. *J. Mater. Sci. Mater. Med*., 22, 201-208.

45. Yan, X. X., Wei, G. F., Zhao, L. Z., Yi, J., Deng, H. X., Wang, L. Z., Lu, G. Q., & Yu, C. Z. (2010). Synthesis and in vitro bioactivity of ordered mesostructured bioactive glasses with adjustable pore sizes. *Microporous Mesoporous Mater*., *132*, 282-289.

46. Yan, P. H., Wang, J. Q., Liu, S., Ou, J. F., Lei, Z. Q., & Yang. S. G. (2010). ``Green'' synthesis of highly ordered mesoporous bioactive glass using acetic anhydride as the catalyst. *J. Non-Cryst. Solids*, *356*, 1514-1518.

47. Xia, W., & Chang, J. (2006). Well-ordered mesoporous bioactive glasses (MBG): A promising bioactive drug delivery system. *J. Control Rel.*, *110*, 522-530.

48. Xia, W., & Chang, J. (2008). Preparation, in vitro bioactivity and drug release property of well-ordered mesoporous 58S bioactive glass. *J. Non-Cryst. Solids*, *354*, 1338-1341.

49. Zhao, L. Z., Yan, X. X., Zhou, X. F., Zhou, L., Wang, H. N., Tang, J. W., & Yu, C. Z. (2008). Mesoporous bioactive glasses for controlled drug release. *Microporous Mesoporous Mater*, *109*, 210-215.

50. Zhao, Y. F., Loo, S. C. J., Chen, Y. Z., Boey, F. Y. C., & Ma, J. (2008). *In situ* SAXRD study of sol–gel induced well-ordered mesoporous bioglasses for drug delivery. *J. Biomed. Mater. Res.*, *85A*, 1032-1042.

51. Sun, J., Li, Y. S., Li, L., Zhao, W. R., Li, L., Gao, J. H., Ruan, M. L., & Shi, J. L. (2008). Functionalization and bioactivity in vitro of mesoporous bioactive glasses. *J. Non-Cryst. Solids*, *354*, 3799-3805.

52. López-Noriega, A., Arcos, D., & Vallet-Regí, M. (2010). Functionalizing Mesoporous Bioglasses for Long-Term Anti-Osteoporotic Drug Delivery. *Chem. Eur. J.*, *16*, 10879-10886.

53. Ostomel, T. A., Shi, Q. H., Tsung, C. K., Liang, H. J., & Stucky, G. D. (2006). Spherical Bioactive Glass with Enhanced Rates of Hydroxyapatite Deposition and Hemostatic Activity. *Small*, *2*, 1261-1265.

54. Ostomel, T. A., Shi, Q., & Stucky, G.D. (2006). Oxide hemostatic activity. *J. Am. Chem. Soc.*, *128*, 8384-8385.

55. Arcos, D., López-Noriega, A., Ruiz-Hernández, E., Terasaki, O., & Vallet-Regí, M. (2009). Ordered mesoporous microspheres for bone grafting and drug delivery. *Chem. Mater.*, *21*, 1000-1009.

56. Yun, H-S., Kim, S-H., Lee, S. Y., & Song, I-H. (2010). Synthesis of high surface area mesoporous bioactive glass nanospheres. *Mater Lett.*, *64*, 1850-1853.

57. Zhao, S., Li, Y. B., & Li, D. X. (2010). Synthesis and *in vitro* bioactivity of $CaO–SiO_2–P_2O_5$ mesoporous microspheres. *Microporous Mesoporous Mater.*, *135*, 67-73.

58. Li, X., Zhang, L. X., Dong, X. P., Liang, J., & Shi, J. L. (2007). Preparation of mesoporous calcium doped silica spheres with narrow size dispersion and their drug loading and degradation behavior. *Microporous Mesoporous Mater.*, *102*, 151-158.

59. Li, X., Wang, X. P., Zhang, L. X., Chen, H. R., & Shi, J. L. (2009). MBG/PLGA Composite Microspheres with Prolonged Drug Release. *J Biomed Mater Res Appl Biomater.*, *89B*, 148-154.

60. Hong, Y. L., Chen, X. S., Jing, X. B., Fan, H. S., Gu, Z. W., & Zhang, X. D. (2010). Fabrication and Drug Delivery of Ultrathin Mesoporous Bioactive Glass Hollow Fibers. *Adv. Funct. Mater.*, *20*, 1503-1510.

61. Lin, H.-M., Wang, W.-K., Hsiung, P.-A., & Shyu, S.-G. (2010). Light-sensitive intelligent drug delivery systems of coumarin-modified mesoporous bioactive glass. *Acta Biomaterialia.*, *6*, 3265-3263.

62. Vivero-Escoto, J. L., Slowing, I. I., Trewyn, B. G., & Lin, V. S.-Y. (2010). Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Controlled Drug Delivery. *Small*, *6*, 1952-1967.

63. Martín-Saavedra, F., Ruíz-Hernández, E., Boré, A., Arcos, D., Vallet-Regí, M., & Vilaboa, N. (2010). Magnetic mesoporous silica spheres for hyperthermia therapy. *Acta Biomaterialia, 6*, 4522- 4561.

64. Julian-López, B., Boissiere, C., Chaneac, C., Grosso, D., Vasseur, S., Miraux, S., Duguet, E., & Sanchez, C. (2007). Mesoporous maghemite–organosilica microspheres: a promising route towards multifunctional platforms for smart diagnosis and therapy. *J. Mater. Chem.*, *17*, 1563-1569.

65. Ruiz-Hernández, E., López-Noriega, A., Arcos, D., Izquierdo-Barba, I., Terasaki, O., & Vallet-Regí, M. (2007). Aerosol-assisted synthesis of magnetic mesoporous silica spheres for drug targeting. *Chem. Mater.*, *19*, 3455-3463.

66. Li, X., Wang, X. P., Hua, Z., & Shi, J. L. (2008). One-pot synthesis of magnetic and mesoporous bioactive glass composites and their sustained drug release property. *Acta Materialia.*, *56*, 3260-3265.

67. Hutmacher, D. W. (2000). Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage. *Biomaterials*, *21*, 2529-2543.

68. Stevens, M. M., & George, J. (2005). Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. *Science.*, *310*, 1135-1138.

69. Shi, Q. H., Wang, J. F., Zhang, J. P., Fan, J., & Stucky, G. D. (2006). Rapid-setting, mesoporous, bioactive glass cements that induce accelerated in vitro apatite formation. *Adv. Mater.*, *18*, 1038-1042.

70. Yun, H.-S., Kim, S.-E., & Hyeon, Y.-T. (2007). Design and preparation of bioactive glasses with hierarchical pore networks. *Chem. Comm.*, 2139-2141.

71. Arcos, D., Vila, M., López-Noriega, A., Rossignol, F., Champion, E., Oliveira, F. J., & Vallet-Regí, M. Mesoporous bioactive glasses: mechanical reinforcement by means of a biomimetic process. (2011). *Acta Biomaterialia*, *7*, 2952-2959.

72. Yun, H.-S., Kim, S.-E, Hyun, Y.-T, Heo, S.-J, & Shin, J.-W. (2007). Three-Dimensional Mesoporous–Giantporous Inorganic/Organic Composite Scaffolds for Tissue Engineering. *Chem. Mater.*, *19*, 6363-6366.

73. Yun, H.-S., Kim, S.-E, Hyun, Y.-T, Heo, S.-J, Shin, J.-W. (2008). Hierarchically mesoporous-macroporous bioactive glasses scaffolds for bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, *87B*, 374-380.

74. Wang, X. P., Li, X., Onuma, K., Ito, A., Sogo, Y., Kosuge, K., & Oyane, A. (2010). Mesoporous bioactive glass coatings on stainless steel for enhanced cell activity, cytoskeletal organization and AsMg immobilization. *J Mater Chem*, *20*, 6437-6445.

75. Alcaide, M., Portolés, P., López-Noriega, A., Arcos, D., Vallet-Regí, M., & Portolés, M. T. (2010). Interaction of an ordered mesoporous bioactive glass with osteoblasts, fibroblasts and lymphocytes demonstrates its biocompatibility as a potential bone graft material. *Acta Biomaterialia*, *6*, 892-899.

76. Zhu, Y. F., Wu, C. T., Ramaswamy, Y., Kockrick, E., Simon, P., Kaskel, S., & Zreiqat, H. (2008). Preparation, characterization and in vitro bioactivity of mesoporous bioactive glasses (MBGs) scaffolds for bone tissue engineering. *Microporous Mesoporous Mater.*, *112*, 494-503.

77. Shih, C. J., Chen, H. T., Huang, L. F., Lu, P. S., Chang, H. F., & Chang, I. L. (2010). Synthesis andin vitro bioactivity of mesoporous bioactive glass scaffolds. *Mater. Sci Eng. C*, *30*, 657-663.

78. Wei, G. F., Yan, X. X., Yi, J., Zhao, L .Z., Zhou, L., Wang, Y. H., & Yu, C. Z. (2011). Synthesis and *in-vitro* bioactivity of mesoporous bioactive glasses with tunable macropores. *Microporous Mesoporous Mater.*, *143*, 157-165.

79. Zhu, Y. F., & Kaskel, S. (2009). Comparison of the *in vitro* bioactivity and drug release property of mesoporous bioactive glasses (MBGs) and bioactive glasses (BGs) scaffolds. *Microporous Mesoporous Mater*, *118*, 176-182.

80. Wu, C. T., Fan, W., Gelinsky, M., Xiao, Y., Simon, P., Schulze, R., Doert, T., Kuo, Y. X., & Cuniberti, G. (2011). Bioactive $SrO–SiO_2$ glass with well-ordered mesopores: Characterization, physiochemistry and biological properties. *Acta Biomaterialia*, *7*, 1797-1806.

REVISIÓN

Radiofármacos: Perspectivas actuales

José Luis Moreno Frigols

Departamento de Química Física. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. Spain.
Recibido el 14 de diciembre de 2011.
e-mail: jose.l.moreno@uv.es

RESUMEN

Desde hace cuatro décadas el ^{99m}Tc es el radionúclido de elección para la preparación de una amplia variedad de radiofármacos debido a sus favorables características químicas y radioquímicas. En la presente comunicación se pretende mostrar los avances realizados en los últimos años en la utilización de los radiofármacos tecneciados presentando a título de ejemplos algunas sustancias marcadas con este radionúclido estudiadas con objeto de mejorar las propiedades de los radiofármacos ya conocidos o bien posibilitar la realización de nuevas exploraciones.

Para completar la panorámica actual se mencionan algunos radiofármacos de reciente aplicación en PET, así como los avances en radiofármacos terapéuticos con especial atención a las aplicaciones de los radionúclidos emisores alfa.

Palabras clave: Radiofármacos; ^{99m}Tc; positrones; terapia; partículas beta; partículas alfa.

ABSTRACT

Radiopharmaceuticals: Current perspectives

For four decades ^{99m} Tc has been the radionuclide of choice for the preparation of a wide variety of radiopharmaceuticals, due to its favourable chemical and radiochemical profile. In the present communication, the aim is to show the progress made in recent years in the use of technetium radiopharmaceuticals, showing as examples some substances labelled with this radionuclide. Such substances were used to improve the properties of the known radiopharmaceuticals or for developing new explorations.

To complete the current overview, some recent radiopharmaceuticals with application to PET are mentioned, as well as advance in therapeutic

radiopharmaceuticals with special attention to the applications of alpha emitting radionuclides.

Keywords: Radiopharmaceuticals; positron; therapy; beta particles; alpha particles.

1. INTRODUCCIÓN

Es sabido que las propiedades químicas de un determinado elemento dependen de la corteza electrónica, siendo, por tanto, independientes de la composición nuclear. De ello se deduce que los distintos isótopos de un mismo elemento deben tener igual comportamiento químico. Las propiedades químicas de los compuestos vienen determinadas por su estructura molecular. Es posible introducir en la molécula algún átomo radiactivo sin alterar dichas propiedades, lo cual da como resultado la obtención de una sustancia cuyo comportamiento es análogo a la original, pero que resulta reconocible gracias a la radiación que emite: se dice que la sustancia se ha marcado. El átomo marcador puede ser un isótopo radiactivo de algún elemento constituyente de la molécula original (marcaje homólogo), o de un elemento distinto (marcaje heterólogo). Naturalmente, en este último caso, es indispensable que tal átomo ocupe en la molécula una posición que altere lo menos posible las propiedades de ésta.

Lo dicho anteriormente conduce al concepto de Radiofármaco. La definición de la Farmacopea Española (1) es:

"Cualquier producto medicinal que, cuando está preparado para su utilización, contenga uno o más radionucleidos (isótopos radiactivos) incluidos para un fin medicinal".

El comportamiento biológico de la sustancia marcada debe ser tal que, ajustando convenientemente la dosis, y de acuerdo con la actividad utilizada, sea posible obtener desde efectos despreciables hasta otros muy marcados, tales como la destrucción más o menos selectiva de células. Ello nos lleva a establecer una clasificación de tales fármacos en dos categorías: diagnósticos y terapéuticos.

Los radiofármacos diagnósticos tienen por finalidad la exploración de algún órgano o sistema. La radiación emitida por el núclido marcador debe ser detectada externamente, por lo que ha de ser capaz de atravesar los tejidos sin producir efectos locales, lo cual exige a su vez que posean un alto poder penetrante y un bajo poder ionizante. Con ellos se obtienen imágenes morfológicas llamadas gammagrafías, o bien curvas actividad-tiempo, en las que pueden determinarse parámetros cinéticos relacionados con el estado funcional del órgano. Por tanto, los núclidos marcadores deberán ser emisores gamma o bien emisores de positrones. Es de desear que el radionúclido marcador tenga una vida lo más corta

posible, con objeto de evitar la irradiación prolongada del paciente, lo cual trae como consecuencia que su "fecha de caducidad" sea, en muchos casos, la del día siguiente e incluso la de pocas horas después de su obtención. Se impone, por tanto, la preparación extemporánea de las dosis que se vayan a utilizar cada día, lo cual exige disponer de "recetas" prácticas, que son consecuencia de un estudio previo, en el que se ha valorado la incidencia de múltiples factores fisicoquímicos.

2. ^{99M}TC: ASPECTOS GENERALES

El Tecnecio 99 metastable (^{99m}Tc), es el radionúclido de elección para marcar una amplia variedad de sustancias, gracias a sus favorables propiedades químicas. Se produce naturalmente a partir del ^{99}Mo, de manera que los tiempos de semidesintegración de ambos son adecuados para que se establezca entre ellos un equilibrio transitorio. Tal situación se aprovecha en los generadores de Tecnecio, que básicamente consisten en una columna cromatográfica rellena de alúmina, sobre la cual se encuentran adsorbidos ambos radionúclidos, y de la que puede extraerse selectivamente el Tecnecio, por elución con disolución salina fisiológica. Como resultado se obtiene una disolución isotónica, apirógena y estéril de Pertecnetato sódico ($^{99m}TcO_4Na$). La fórmula de esta sustancia recuerda la del Permanganato (lo cual no es sorprendente, ya que el Tecnecio ocupa, en el sistema periódico, la casilla inmediatamente inferior al Manganeso) y ello nos indica que posee un elevado carácter oxidante con posibilidad de reducción del Tecnecio hasta diversos estados de oxidación, lo cual le hace apto para formar compuestos con sustancias muy diversas: HIDA, DMSA, DTPA, MAA, MAG3, ECD, etc.

3. ^{99M}TC: PERSPECTIVAS ACTUALES

El ^{99m}Tc sigue dando lugar a la aparición de nuevos radiofármacos. A título de ejemplo, podemos mencionar:

3.1. ^{99m}Tc-rBitistatina: Un posible agente de marcaje plaquetario para la obtención de imágenes en trombos y embolias (2)

La Bitistatina recombinante (r Bitistatina) marcada con ^{99m}Tc es un radioligando para el receptor plaquetario $\alpha_{IIb}\beta_3$ (glicoproteínas IIb/IIIa), y está siendo desarrollado como un radiofármaco diagnóstico gammagráfico de trombos y embolias agudos. Antes de la primera administración de ^{99m}Tc-rBitistatina a sujetos humanos, su biodistribución y efectos en plaquetas fueron evaluados en animales. El radiofármaco fue administrado a ratones, cobayas y perros para estudiar la dependencia con el tiempo de su distribución orgánica, y las velocidades de excreción urinaria y aclaramiento sanguíneo. Los órganos que acumularon mayor cantidad del radiofármaco fueron los riñones, hígado y bazo en todas las especies animales y en humanos. Los órganos más visualizados en

imágenes humanas fueron los riñones y el bazo. La captación hepática fue más débil, y el fondo de tejidos blandos fue bajo. La ^{99m}Tc-rBitistatina se unió a las plaquetas circulantes en sangre, con un porcentaje más alto de enlace en cobayas y perros que en humanos. El enlace a proteínas plasmáticas fue bajo. La ruta principal de eliminación fue a través de la orina. La ^{99m}Tc-rBitistatina no afectó a los recuentos plaquetarios en humanos ni en perros.

3.2. Obtención de imágenes de melanoma humano (3)

El propósito de este estudio fue determinar si el péptido híbrido ^{99m}Tc-Arg-Gly-Asp (RGD) conjugado a la hormona estimulante de alfa-melanocito (α-MSH) dirigido a los receptores melanocortin-1 (MC1) y $\alpha_v\beta_3$ integrina fue superior en la captación del melanoma a ^{99m}Tc-α-MSH o péptido RGD dirigidos solamente al receptor MC1 o $\alpha_v\beta_3$ integrina .

Los RGD-Lys-(Arg^{11})CCMSH, RAD-Lys-(Arg^{11})CCMSH y RGD-Lys (Arg^{11}) CCMSH scramble fueron diseñados para dirigirlos frente a MC1 y $\alpha_v\beta_3$ integrina receptores, MC1 receptor solo y $\alpha_v\beta_3$ integrina receptor solo, respectivamente.

La captación por el melanoma de ^{99m}Tc-RGD-Lys-(Arg^{11}) CCMSH fue 2,49 y 2,24 veces ($P < .05$) más grande que la de ^{99m}Tc-RAD-Lys-(Arg^{11}) CCMSH y ^{99m}Tc-RGD-Lys-(Arg^{11}) CCMSH scramble a las 2 h de post-injection, respectivamente.

La dirección para ambos receptores de integrina, MC1 y $\alpha_v\beta_3$ aumentó la captación del melanoma humano para el ^{99m}Tc-RGD-Lys-(Arg^{11})CCMSH. Los tumores de melanoma humano M21 fueron claramente visualizados por SPECT usando ^{99m}Tc-RGD-Lys-(Arg^{11})CCMSH como trazador, aumentando su potencial uso para la detección del melanoma humano.

3.3. Preparación y evaluación preliminar de un derivado de ^{99m}Tc(CO)3-11β-progesterona preparado mediante química "click" (4)

Los receptores de progesterona (PRs) sobreexpresados en los cánceres de mama sirven como potenciales dianas para desarrollar radiotrazadores utilizables en Medicina Nuclear. Por lo tanto, algunos derivados de la progesterona pueden ser vistos como potenciales vectores para señalar la sobreexpresión de receptores en el cáncer de mama. En el artículo, presentamos la preparation de un ^{99m}Tc(CO)$_3$-progesterona triazol usando una ruta de "química click" catalizada con Cu(I). Se realizó una evaluación preliminar del derivado radiomarcado mediante estudios con lineas celulares MCF 7.

La 11-Hydroxyprogesterona se transformó sintéticamente en 11-azidoprogesterona. Subsiguientemente, se llevó a cabo la reacción de cicloadición entre la azida de progesterona y propargil glicina para preparar un análogo de progesterona 1,4-bifuncionalizada triazol. Este derivado fue marcado con ^{99m}Tc y caracterizado por HPLC. La caracterización química del ^{99m}Tc(CO)$_3$-progesterona

triazol se realizó mediante la preparación de su correspondiente complejo con renio usando el precursor $[NEt_4]_2[Re(CO)_3Br_3]$. Mientras los estudios *in vitro* se realizaron en líneas celulares MCF7, la distribución *in vivo* se estudió en ratas hembras.

El complejo radiomarcado pudo prepararse con una pureza radioquímica superior al 95%, como se determinó por HPLC. Estudios *in vitro* del complejo $^{99m}Tc(CO)_3$-progesterona en líneas celulares MCF7 sobreexpresando receptores para el cáncer de mama demostraron un enlace superior al 30%. Los estudios de distribución *in vivo* en ratas hembras, mostraron una captación uterina de 0,41 (0,06) % ID/g a las 3 horas de postinyección (pi) y retención en él hasta las 24 h pi.

Este estudio señaló una nueva y fácil ruta para la preparación de complejos de ^{99m}Tc-progesterone usando la "química click". Esta estrategia se puede extender a la preparación de complejos radiomarcados de otros derivados esteroides.

3.4. ^{99m}Tc-metil-piperidinil cytectreno carboxylato en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (5)

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un desorden degenerativo neurológico que causa una progresiva e irreversible pérdida de conexiones entre las células cerebrales así como en las funciones mentales. Estudios clínicos y postmortem muestran que los cambios bioquímicos en cerebros de pacientes afectos de AD incluyen decrecimiento en la actividad acetilcolinesterasa (AchE).

Se estudió la actividad AChE usando piperidinil éster marcado con ^{99m}Tc. Los estudios *in vivo* e *in vitro* demostraron que el piperidinil ester marcado fue un sustrato para el AChE. Se midió la velocidad hidrolítica de este sustrato y la especificidad, que fue evaluada usando el inhibidor BW284c51. Los Renio análogos del sustrato marcado con tecnecio se usaron para determinar la constante de afinidad (Km) y la máxima velocidad de reacción (Vmax) a causa de la alta actividad específica del Tecnecio. La alta velocidad hidrolítica y buena especificidad del sustrato para AChE le hacen utilizable como un radiotrazador *in vivo* para estudiar la actividad AChE en el cerebro.

3.5. Investigación del marcaje de interleukina-2 recombinante humana con ^{99m}Tc mediante hidrazinonicotinamida (6)

Se ha demostrado que la Interleukina-2 (IL-2) marcada ^{99m}Tc se puede usar para obtener imágenes del lugar de infiltración linfocítica en pacientes con desórdenes autoinmunes y juega un significativo papel como agente de imagen para células T. Sin embargo, los procedimientos de marcaje usados hasta ahora parecen ser más bien complejos y laboriosos. El objetivo del presente estudio fue desarrollar un procedimiento eficiente de marcaje con ^{99m}Tc para la interleukina-2 recombinante humana (rhIL-2) mediante hidrazinonicotinamida (HYNIC) para desarrolar una formulación en kit seco.

Varias relaciones molares de rhIL-2/HYNIC (de 1:2 a 1:12) se utilizaron en la etapa de conjugación. Generalmente, los rendimientos de marcaje más altos se alcanzaron cuando se usaron relaciones de sustitución de HYNIC–rhIL-2 conjugados de aproximadamente 2–4. El pH óptimo del medio de reacción se encontró en el intervalo de 6,5 a 7,0. Los análisis por GF-HPLC indicaron que durante el radiomarcaje se formaron el monómero y agregados de ^{99m}Tc-HYNIC–rhIL-2. En condiciones óptimas de huemdad, el monómero ^{99m}Tc-HYNIC–rhIL-2 se obtuvo con una pureza radioquímica >99%, actividad específica de aproximadamente 4 GBq/mg rhIL-2 y rendimiento general de aproximadamente el 65%. El kit seco y refrigerado de dos viales se preparó como sigue: el primer vial con 30 µg HYNIC–rhIL-2, coligandos, tampón y antioxidante; el segundo vial con lo anterior y $SnCl_2$. El monómero de ^{99m}Tc-HYNIC–rhIL-2 se obtuvo por cromatografía en gel en una columna PD-10. No se observaron entre IL2 marcado y no marcado diferencias en términos de actividad biológica.

Nuestro estudio demostró que la rhIL-2 puede ser eficientemente marcada con ^{99m}Tc mediante HYNIC, con tricina y NA como coligandos, usando un kit de dos vials refrigerado y desecado. Esto facilita la preparación de ^{99m}Tc-HYNIC(tricine,NA)-rhIL-2 estéril y listo para su uso en 1 h.

3.6. ^{99m}Tc-N-sulfanilamida ferroceno carboxamida (7)

Sintetizamos un derivado de la sulfanilamida marcado con ^{99m}Tc (^{99m}Tc-N-SFC), dirigido a infecciones en animales de laboratorio. La N-sulfanilamida ferroceno carboxamida (N-SFC) fue sintetizada químicamente y luego marcada con ^{99m}Tc. Se ha confirmado que es estable y se obtuvo con un rendimiento de marcaje superior al 87%. El análisis radioquímico del ^{99m}Tc-N-SFC reveló que la molécula fue marcada rápida y efectivamente (en 2 minutos) con una pequeña cantidad de pertecnetato en las preparaciones que contenían el compuesto purificado. Además, se realizaron estudios *in vitro*, y la estabilidad de la sustancia marcada en suero fue superior a las 24 h. La captación del trazador en bacterias vivas y muertas por el calor se comparó en condiciones fisiológicas y fue de aproximadamente 69% y 61,9% para cepas de E*scherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Concluimos que la síntesis y marcaje del derivado de la sulfanilamida con ^{99m}Tc por este método es rápida, eficiente y segura. Estudios de biodistribución mostraron que nuestro compuesto radiactivo se acumula rápida y significativamente ($p<0.05$) en los sitios de infección. La comparación de la acumulación de ^{99m}Tc-N-SFC en los sitios de animales infectados por *S. aureus-infected*, que se expresa como relación diana/no diana (2,88±0.10) con otros radiotrazadores también fue discutida (ver trabajo referencia 7).

3.7. Formulación de un kit para marcaje con ^{99m}Tc Affibody-anti-HER3 (8)

La imagen molecular de la expresión de receptor de factor humano de crecimiento epidémico tipo 2 en tumores malignos provee potencialmente información importante para el tratamiento. Las moléculas de Affibody han mostrado ser trazadores utilizables para aplicaciones en imágenes usando tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) o tomografía por emisión de positrones (PET). Los resultados de una evaluación anterior de la aplicación del marcaje con ^{99m}Tc en un sitio específico de la molécula de Affibody $Z_{HER2:2395}$-C, fueron favorables.

Como preparación para la aplicación clínica de este trazador, se ha desarrollado y evaluado un robusto kit refrigerado y desecado en vial único para el marcaje con ^{99m}Tc de la molécula Affibody $Z_{HER2:2395}$-C .

La composición del kit que contiene EDTA glucoheptonato y $SnCl_2$, así como la cantidad de proteína y el volumen de pertecnetato fueron optimizados para un alto rendimiento de marcaje (>90%) y mínima presencia de coloides de tecnecio reducido hidrolizado (<1%). La especificidad por los HER2 receptores, la competición por el enlace y la estabilidad en tampón fosfato salino y suero murino fueron verificadas *in vitro*. La semivida fue también evaluada *in vitro*, sin que hubiera reducción en el rendimiento de marcaje o capacidad de enlace a las células expresantes de HER2, después de 400 días de almacenamiento del kit de vial único refrigerado y desecado.

El $Z_{HER2:2395}$-C marcado con ^{99m}Tc usando el kit liofilizado fue estable y tuvo una favorable biodistribución con una evaluación *in vivo* en ratones normales del Naval Medical Research Institute.

3.8. Síntesis y evaluación biológica de un conjugado de sulfonamida marcado con ^{99m}Tc para la visualización in vivo de la expresión de anhidrasa carbónica IX en hipoxia tumoral (9)

La Anhidrasa Carbónica (CA) IX es una proteína transmembranal sobrexpresada en la mayoría de los tumores que ocurren asociados con hipoxia tumoral. Se sabe que las sulfonamidas y sus bioisósteros inhiben la actividad de CA IX.

El ^{99m}Tc-benceno sulfonamida y su análogo de renio fueron sintetizados y caracterizados. Estudios *in vitro* demostraron que el compuesto de renio tiene una alta afinidad por la CA IX e inhibe efectivamente la actividad de CA IX.

Estudios *in vivo,* revelaron una acumulación limitada del trazador en un tumor expresante de CA IX pero con aumento de la relación de actividad en sangre en función del tiempo.

3.9. Síntesis y evaluación de un péptido citotóxico conjugado a la bombesina con ^{99m}Tc dirigido a tumores expresantes de receptores de bombesina (10)

La conjugación de los fármacos citotóxicos a péptidos receptor-enlazantes es una aproximación atractiva para la liberación dirigida de los péptidos citotóxicos conjugados en las células tumorales. En un intento de desarrollar un radiofármaco eficiente basado en péptidos y dirigido a tumores expresantes de receptores de bombesina (BN), (i.e. mama y próstata), hemos preparado por síntesis de péptidos en fase sólida, un nuevo análogo de BN derivado de la secuencia universal de BN y conjugado a un agente antineoplásico perfectamente caracterizado, el metrotexato (MTX). MTX-BN, después de radiomarcaje con ^{99m}Tc.

El radioconjugado mostró una significativa localización (valores comprendidos entre 19–35%) dentro de las células tumorales de cáncer de mama MDA-MB-231, MCF-7, T47-D y cáncer de próstata PC-3. La captación tumoral fue siempre mayor que en sangre y músculo, con buena retención en el tumor y buenas relaciones tumor/sangre y tumor/músculo.

Este estudio inicial hacia el desarrollo de un nuevo citotóxico BN conjugado sugiere que la combinación de propiedades favorables *in vitro* e *in vivo* puede convertir al ^{99m}Tc-MTX-BN en un candidato potencial como agente de imagen dirigida y eventualmente, como radionúclido terapia (cuando se marca con un apropriado radionúclido) de tumores BN receptor-positivos y merece posterior evaluación. Sin embargo, la captación/retención en los riñones fue más bien alta (más de 11,05±1,80% ID/g), lo cual es un inconveniente particularmente para radionúclido terapia.

3.10. Evaluación de ^{99m}Tc-glucarato en cácer de mama (11)

El uso de ^{99m}Tc-Glucarato ha sido relatado como un agente potencial para la detección muy precoz del infarto de miocardio. El ^{99m}Tc-Glucarato ha sido también postulado como un agente para detección no invasiva de tumores. El objetivo del estudio (11) fue desarrollar un kit de Glucarato y evaluar el ^{99m}Tc-Glucarato como un potencial agente de imagen en tumores de mama.

Los kits de Glucarato mostraron una vida útil de 6 meses. El ^{99m}-Tc-Glucarato fue obtenido con pureza radioquímica superior al 95%. Estudios de biodistribución, demostraron una moderada captación tumoral unida a un alto aclaramiento renal. Los cocientes tumor/músculo fueron 4,85 y 5,14 en 1 y 4 h de post inyección. La captación de ^{99m}Tc-Glucarato en los tumores primarios MDA-MB-435 y lesiones metastásicas fueron claramente visualizadas con micro-SPECT/CT imagen.

La captación selectiva por el tumor y el rápido aclaramiento desde los órganos no diana hacen del ^{99m}Tc-Glucarato un agente potential para imagen en cáncer de mama, que espera su validación en un estudio clínico.

3.11. Nanopartículas de oro marcadas con ^{99m}Tc para la detección del ganglio centinela (12)

Se define como ganglio centinela al primer ganglio de una cadena linfática que drena un territorio tisular determinado, de manera que, antes de proseguir su camino por la cadena, toda la linfa proveniente de dicho territorio debe pasar primero por el ganglio centinela.

Dicho concepto es de gran trascendencia en el campo de la oncología. De la misma manera que la linfa de un territorio determinado debe progresar escalonadamente por los ganglios de una cadena linfática, las células tumorales que pudieran desprenderse de este mismo territorio, cuando es neoplásico, deberán circular escalonadamente por los ganglios de la cadena, siendo el primero de ellos el centinela.

Así pues, se puede decir que el status del ganglio centinela en cuanto a su invasión o no por células neoplásicas, puede traducir con una elevada exactitud el status del resto de la cadena.

El objetivo del trabajo (12) fue preparar un sistema multifuncional de nanopartículas de oro conjugadas a HYNIC-GGC/manosa, marcadas con ^{99m}Tc y evaluar su comportamiento biológico como un potencial radiofármaco para detección del ganglio centinela (SLND).

Se sintetizaron el péptido Hidrazinonicotinamida-Gly-Gly-Cys-NH2 (HYNIC-GGC) y un derivado tiol-triazol-manosa, se caracterizaron y fueron conjugados a nanopartículas de oro (AuNP, 20 nm) para preparar un sistema multifuncional de HYNIC-GGC-AuNP-manosa. El marcaje con ^{99m}Tc fue realizado usando EDDA/tricina como coligandos y $SnCl_2$ como agente reductor, con posterior purificación por cromatografía de exclusión.

Los radiocromatogramas mostraron una pureza radioquímica superior al 95%. El ^{99m}Tc-AuNP-manosa mostró reconocimiento específico para los receptores de manosa en tejido de hígado de rata. Tras administración subcutánea de ^{99m}Tc-AuNP-manosa en ratas, se obtuvo el 99% de actividad por el primer ganglio. Estudios de biodistribución mostraron una evidente captación por el ganglio (11,58±1,98 %ID at 1 h) que fue retenida durante 24 h con mínima acumulación renal (0,98±0,10 %ID) y captación despreciable en todos los otros tejidos, lo que indica que la 99mTc-AuNP-manosa puede usarse como una diana-específica radionanoconjugada para el SLND, usando los protocolos convencionales de “1-día” o “2-días”.

3.12. Conjugados de Folato marcados con ^{99m}Tc para folato receptor imagen (13)

El Receptor de Folato (FR) es una potencial diana molecular para imagen por radionúclido puesto que es sobreexpresado en muchos tumores humanos de células epiteliales.

Nosotros, sintetizamos y caracterizamos un nuevo folato conjugado, HYNIC-NHHN-FA (13). Este conjugado fue radiomarcado con ^{99m}Tc usando tricina, tricin /difenilfosfinobenceno-3-sulfonico ácido sodio (TPPMS) y tricina /trisodio trifenilfosfina-3,3′,3″-trisulfonato (TPPTS) como coligandos, respectivamente. Los complejos fueron purificados por HPLC. Se realizaron evaluaciones *in vitro* e *in vivo* con FR células positivas KB, ratones normal Kunming y ratones atímicos portadores de tumores KB.

El marcaje con ^{99m}Tc usando diferentes coligandos, dio lugar a tres complejos: ^{99m}Tc (HYNIC-NHHN-FA)(tricina), **5**, ^{99m}Tc (HYNIC-NHHN-FA)(tricina/TPPMS), **6** y ^{99m}Tc (HYNIC-NHHN-FA)(tricina/TPPTS), **7**. El complejo **5,** mostró al menos dos isómeros y resultó inestable después de ser purificado por HPLC. Los complejos **6** y **7** mostraron alta estabilidad y similar afinidad para FR *in vitro*. Los resultados de biodistribución demostraron que el complejo **7** tiene una alta captación en tumores FR-positivos (9,79±1,66%ID/g a 4 h postinyección). Sin embargo, el complejo **6** mostró una baja captación tumoral debida a su lenta excreción por tracto gastrointestinal .

La modificación de los coligandos puede alterar significativamente las propiedades farmacocinéticas de los complejos ^{9m}Tc-HYNIC. ^{99m}Tc (HYNIC-NHHN-FA)(tricina/TPPTS), pero puede ser un prometedor radiotrazador para imagen de FR.

3.13. ^{99m}Tc-Derivado del Ácido Zoledrónico (14)

Para posibilitar la obtención de imágenes más precoces a un tiempo más temprano tras la inyección, se preparó un radiofármaco con más alta afinidad por el hueso, mayor cociente tejido óseo/tejidos blandos y más rápido aclaramiento sanguíneo. Obtuvimos un nuevo derivado del ácido Zoledrónico, el 1-hydroxi-3-(1H-imidazol-1-il)propano-1,1-diildifosfónico ácido (IPrDP), que fue marcado con ^{99m}Tc con un alto rendimiento de marcaje.

En los estudios de biodistribución, el ^{99m}Tc-IPrDP exhibe ventajas significativas en la resorción ósea y aclaramiento de tejidos blandos comparado con ^{99m}Tc-ZL. La cinética del aclaramiento sanguíneo en ratón mostró que t1/2 α y t1/ 2β de ^{99m}Tc-IPrDP fueron de 1,47 min y 46,47 min, mientras que los de ^{99m}Tc-ZL fueron de 2,28 y 52,63 min respectivamente. Se pueden obtener rápidamente excelentes imágenes del esqueleto del conejo por ^{99m}Tc-IPrDP, que fue más rápido

que el ^{99m}Tc-ZL y que el agente ^{99m}Tc-MDP (tecnecio-99m marcado con metilendifosfonato).

Por tanto, se puede concluir que el ^{99m}Tc-IPrDP posee excelentes características para potencial aplicación como un nuevo agente de exploración ósea.

4. TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES (PET)

El radiofármaco más utilizado en PET hasta la fecha es la ^{18}FDG (18-Flúor-Desoxi Glucosa). Entre los numerosos estudios actuales para la obtención de nuevos radiofármacos PET citaremos el siguiente:

^{77}Br-BAMT: Una alternativa a ^{18}F-FAMT (15)

En este estudio, el ^{76}Br-bromo-α-metil-tirosina (^{76}Br-BAMT) fue evaluado como un nuevo trazador para la obtención de imágenes de tumores malignos en PET.

Se prepararon ^{76}Br-BAMT y ^{77}Br-BAMT. La estabilidad *in vitro* del ^{77}Br-BAMTse evaluó por HPLC. La captación celular y retención de ambos se evaluaron usando células de adenocarcinoma de colon LS180. Los estudios de biodistribución fueron realizados en ratones normales y portadoras de tumores LS180.

La retención y las acumulaciones celular y tumoral del ^{77}Br-BAMT fueron más altas que las de ^{18}F-FAMT. Sin embargo, se observó algún nivel de desbromación que causó mayor retención de radiactividad en sangre y órganos que la observada con ^{18}F-FAMT.

5. RADIOFÁRMACOS TERAPÉUTICOS: EMISORES BETA

5.1.Tratamiento del linfoma no Hodkin con ^{90}Y ibritumomab tiuxetan (16)

Hace más de 20 años que fue introducido el término radioinmunoterapia (RIT) o terapia contra el cáncer utilizando anticuerpos radiomarcados, pero ha sido en los últimos años cuando ha experimentado el mayor interés, fundamentalmente en su aplicación en patologías malignas como el linfoma no Hodgkin.

La radioinmunoterapia está influida por tres factores principales interrelacionados: el anticuerpo, el radionúclido y el tumor diana. Básicamente, las estrategias que deben diseñarse para potenciar la radioinmunoterapia pueden agruparse en cuatro puntos:

1. Mejorar la captación y distribución de los anticuerpos radiomarcados mediante incremento del flujo y permeabilidad vascular en el tumor,

usando moléculas más pequeñas, y posiblemente potenciando estrategias "pretargeting".

2. Disminuyendo los anticuerpos no diana en el flujo sanguíneo mediante aclaramiento "in vivo" o por mecanismos de absorción "ex vivo".
3. Protegiendo los órganos normales de la radiotoxicidad, empleando factores de crecimiento hematopoyético, reponiendo las poblaciones celulares en sangre periférica y mediante bloqueo de la reabsorción de fragmentos de anticuerpos en los riñones con aminoácidos catiónicos, aminoazucares y sus polímeros.
4. Disminuyendo la inmunogenicidad de las inmunoglobulinas, utilizando anticuerpos humanos.

Los anticuerpos monoclonales anti-CD20 marcados con ^{90}Y son unos nuevos agentes radioinmunoterápicos que se están investigando para el tratamiento del linfoma no Hodkin (NHL) y otras enfermedades hematológicas. La Unidad de Radiofarmacia del Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Clínico Universitario de Valencia participa en un ensayo clínico prospectivo, multicéntrico, randomizado de fase III sobre el ^{90}Y ibritumomab tiuxetan, un nuevo agente radioinmunoterapético recientemente aprobado para el tratamiento de linfomas no Hodkin (NHL), consistente en un anticuerpo monoclonal de ratón unido covalentemente a un quelante de metales que produce complejos estables con ^{111}In para imagen e ^{90}Y para terapia. Usando los criterios de la International Workshop para NHL, el ^{90}Y ibritumomab tiuxetan ha producido respuestas del 74%-83% en pacientes con recidivas o resistentes de bajo grado, incluyendo una tasa de respuesta imprevista del 83% en un ensayo clínico realizado en pacientes para los que un tratamiento anterior con rituximab había fallado.

El ^{90}Y es un emisor beta puro con un período de semidesintegración de 64 horas que por desintegración se transforma en Zr. Tiene una alta energía beta y un recorrido efectivo de 5,3 mm^2 que corresponde a 100-200 diámetros celulares, dando un amplio efecto de “fuego cruzado” cuando se conjuga con un anticuerpo monoclonal tal como el ibritumomab. Se postula que este efecto aumenta la destrucción tumoral más que los anticuerpos no marcados por irradiación de las células tumorales no unidas al anticuerpo, y puede ser particularmente beneficioso en pacientes con tumores voluminosos o pobremente vascularizados.

Se determinó el índice terapéutico (cociente entre la radiación absorbida por las células cancerosas y las normales). Se usó una dosis trazadora de ibritumomab marcado con ^{111}In, que emite radiación gamma, como agente de imagen para medir la acumulación en órgano, específica en cada paciente.

La radioinmunoterapia con ^{90}Y combina las ventajas en cuanto a especificidad del anticuerpo monoclonal con la eficacia de la radiación en el tratamiento de NHL, una enfermedad hematológica altamente radiosensible. Puesto que el ^{90}Y es un emisor beta puro, las precauciones en cuanto a protección de los pacientes y el personal sanitario después de la administración son mínimas. Asimismo, el tratamiento puede ser aplicado sin perturbar los hábitos diarios de los pacientes.

5.2. ^{177}Lu-PR81 (17)

El PR81 es un anticuerpo monoclonal que enlaza con alta afinidad al antígeno MUC1, que está sobreexpresado en el 80% de los cánceres de mama.

Se desarrolló un método (17) para marcaje indirecto del PR81 con ^{177}Lu, obteniéndose un complejo con alta pureza radioquímica y estabilidad.

Resultaron satisfactorias la inmunoreactividad y citotoxicidad del complejo estudiadas en células MCF7. Los estudios de biodistribución y escintigrafía, mostraron la acumulación del complejo en el tumor con alta sensibilidad y especificidad.

Los resultados demuestran que el ^{177}Lu-PR81 es un potencial radiofármaco para la radioinmunoterapia del cáncer de mama.

5.3. ^{161}Tb: Una alternativa al ^{177}Lu (18)

El emisor de baja energía beta ^{161}Tb es muy similar al ^{177}Lu con respecto a la vida media, energía beta y propiedades químicas.

El ^{161}Tb emite una significativa cantidad de electrones de conversión y Auger. Por tanto, cabe esperar un efecto terapéutico mayor en comparación con el ^{177}Lu. También emite fotones de baja energía que son utilizables para obtención de imagen.

Se utilizó la ruta $^{160}Gd(n,\gamma)^{161}Gd \rightarrow ^{161}Tb$ para producir ^{161}Tb, que fue utilizado para marcar el DOTA-Tir-octreotato.

El ^{161}Tb libre de portador puede obtenerse por este método en la cantidad y calidad requeridas para la preparación de agentes terapéuticos marcados con ^{161}Tb.

5.4. ^{188}Re-DXR Liposomas (19)

El efecto antitumoral del ^{188}Re-DXR-liposoma fue seguido en ratones portadores de tumores C26 murinos por la inhibición del crecimiento tumoral, cociente de supervivencia y tinción histopatológica hematoxilina–eosina.

Los ratones tratados con ^{188}Re-DXR-liposomas mostraron mejor media de inhibición de crecimiento tumoral (MGI) y mayor tiempo de supervivencia

(MGI=0,048; 74 días) que los tratados con radioterapia de ^{188}Re-liposoma (MGI=0,134; 60 días) y quimioterapia de Lipo-Dox (MGI=0,413; 38 días). El efecto sinérgico de regresión tumoral fue observado con un índice de combinación (CI) mayor que 1 (CI=1.145) para la terapia de co-liberación de ^{188}Re-DXR-liposoma.

6. RADIOFÁRMACOS TERAPÉUTICOS: EMISORES ALFA

La radioinmunorerapia ha probado ser clínicamente efectiva en pacientes con linfoma no Hodgkin. Los ensayos radioinmunoterápicos realizados hasta la fecha se han realizado con isótopos emisores beta. En contraste con esto, la penetración más corta y la mayor transferencia lineal de energía (LET) de las partículas alfa permiten una destrucción de las células tumorales más eficiente y selectiva. Sin embargo, hay varios obstáculos para el uso de la inmunoterapia con partículas alfa, que incluyen problemas con la química de la quelación y toxicidad para los tejidos

6.1. Compuestos de ^{225}Ra y ^{225}Ac (20)

Los radionúclidos emisores alfa son potencialmente útiles para la terapia de enfermedades localizadas debido a su alto poder ionizante y su corta penetración. Los radiometales que se localizan naturalmente en el hueso pueden ser utilizados para este propósito, y el ^{223}Ra ($t_{1/2}$=11.4 días) ha sido estudiado para la terapia de tumores óseos en ratones y ratas. El ^{225}Ac ($t_{1/2}$=10 días) es también un radioisótopo atractivo para la endoradioterapia. En una simple desintegración del núcleo de ^{225}Ac y sus subsiguientes núclidos hijos, se liberan alrededor de 27 MeV (90% de la energía total) por emisión secuencial de cuatro partículas alfa de energías comprendidas entre 5,7 y 8,4 MeV. Aunque el Ac^{3+} no se une naturalmente al hueso, su núclido padre, el ^{225}Ra puede usarse como una fuente *in vivo* para el ^{225}Ac. Por tanto, la inyección de ^{225}Ra presenta ventajas en las propiedades de localización ósea relacionadas con la significativa cantidad de energía liberada en la cadena de desintegración del ^{225}Ac. Nuestros datos, confirman que una amplia fracción de citrato de radio inyectado intravenosamente en ratones se localiza rápidamente en hueso. Las dosis inyectadas por gramo (ID/g) para el ^{225}Ra varían desde el 25% en cráneo hasta aproximadamente el 10% en esternón. Una vez depositado, el ^{225}Ra permanece en el hueso con una vida media biológica superior a 40 días. Además, más del 95% del radioisótopo hijo, ^{225}Ac, es retenido en el hueso. Sin embargo, una fracción significativa de uno de los radioisótopos hijos, el ^{213}Bi, se ha encontrado en riñón. Los datos de biodistribución indican que la inyección de ^{225}Ra debe ser un poderoso agente para producir la muerte de células asociadas con el hueso; sin embargo, la toxicidad de este radioisótopo, que es similar a la de otros emisores alfa, limita la dosis que puede ser tolerada.

6.2. ^{213}Bi en adenocarcinoma pancreático (21)

Los estudios clínicos en terapéutica del cáncer en pacientes tratados con receptores de somatostatina DOTA0 - Tyr3 octreótido (DOTATOC) marcados con el emisor beta ^{177}Lu han mostrado tasas de respuesta en la gama de 15-33%. Con el fin de mejorar los resultados, se ha tratado de comparar su eficacia terapéutica con la de DOTATOC marcado con ^{213}Bi (emisor alfa) mediante la determinación de la eficacia biológica relativa (RBE) usando el emisor gamma ^{137}Cs como referencia para la detección de radiación.

Se utilizaron células de adenocarcinoma pancreático humano Capan-2 y células A549 como control para este estudio. Los efectos de diferentes dosis de radiación de ^{213}Bi y ^{177}Lu unidos a 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-ácido tetraacético y DOTATOC se investigaron en un ensayo de supervivencia celular. La apoptosis se midió usando el Cell Death Detection ELISA^{PLUS} 10× kit, mediante tratamiento equimolar con DOTATOC usando una fuente de ^{137}Cs como radiación de referencia; la RBE calculada de [^{213}Bi]DOTATOC fue de 3,4, frente a 1,0 para [^{177}Lu]DOTATOC. Como se midió en términos de unidades de absorbancia, se concluye que el [^{213}Bi]DOTATOC causó una liberación de mononucleosomas y oligonucleosomas específicos de apotosis 2,3 veces mayor que el [^{177}Lu]DOTATOC, al final del tiempo de tratamiento.

En conclusión, para la misma dosis absorbida, [^{213}Bi]DOTATOC es terapéuticamente más efectivo en el decrecimiento de la supervivencia que el [^{177}Lu]DOTATOC en células de adenocarcinoma pancreático humano, debido a su comparativamente más alta RBE.

6.3. Compuestos de ^{227}Th (22)

El radioinmunoconjugado marcado con el emisor alfa ^{227}Th-DOTA-*p*-bencil-rituximab es un nuevo agente potencialmente anti-linfoma que puede resolver algunas dificultades. El estudio (22) explora la inmunoreactividad, estabilidad *in vivo* y biodistribución, así como el efecto sobre el crecimiento celular *in vitro* de este nuevo radioinmunoconjugado. Para evaluar la estabilidad *in vivo* se comparó la captación en ratones del núclido emisor alfa ^{227}Th, su forma quelada, ^{227}Th-*p*-nitrobencil-DOTA y el radioimmunoconjugado ^{227}Th-DOTA-*p*-bencil-rituximab, en diferentes órganos a tiempos crecientes post inyección. La fracción inmunoreactiva de ^{227}Th-DOTA-*p*-bencil-rituximab fue del 56–65% Durante los 28 días siguientes a la inyección del radioinmunoconjugado solo muy pequeñas cantidades del ^{227}Th se habían separado del DOTA-*p*-bencil-rituximab, indicando una relevante estabilidad *in vivo*. La vida media del ^{227}Th-DOTA-*p*-bencil-rituximab en sangre fue de 7,4 días. La incubación de células de linfoma con ^{227}Th-DOTA-*p*-bencil-rituximab resultó en una significativa inhibición del crecimiento celular

antígeno-dependiente. Los datos presentados aquí requieren posteriores estudios del ^{227}Th-DOTA-*p*-bencil-rituximab.

6.4. ^{212}Bi en la radioinmunoterapia predirigida (23)

Predirección es el concepto que combina la óptima liberación del anticuerpo con la rápida captura y eliminación de la radiactividad. Se ha evaluado (23) el potencial del marcaje de anticuerpo *predirector* en la capacitación del marcador tumoral ^{212}Pb a fin de generar *in vivo* ^{212}Bi para radioterapia con partículas alfa.

El quelato ^{212}Pb/^{212}Bi DOTA-biotina, así como sus análogos emisores gamma ^{203}Pb and ^{205}Bi fue preparado y caracterizado. Los compuestos radiomarcados fueron inyectados en animales para evaluación del marcaje tumoral, captación y retención tisulares. En el protocolo de premarcaje, se administra una inyección de 400 µg de NR-LU-10 anticuerpo–estreptavidina conjugado a *t*=0 h; posteriormente 100 µg de agente aclarante *N*-acetil-galatosamina-biotina se inyecta a *t*=20–24 h y finalmente se inyecta 1 µg de ^{212}Pb/^{212}Bi-DOTA-biotina, 6 h más tarde.

Tanto el ^{203}Pb como la ^{205}Bi-DOTA-biotina fueron estables por lo menos 4 días, en las diferentes soluciones, incluyendo PBS, 10 mM DTPA y suero. Contrariamente a sus análogos emisores gamma, el ^{212}Pb-DOTA-biotina radiomarcado fue inestable. Hubo una liberación superior al 30% de ^{212}Bi libre a las 4 h después del ^{212}Pb-marcado DOTA-biotina. Los resultados de ^{203}Pb y ^{205}Bi-DOTA-biotina mostraron que el marcaje tumoral alcanzó el 20% de la dosis inyectada (ID)/g a las 4 h de postinyección y se mantuvo alta durante 5 días. El tanto por ciento de ID/g en la sangre total y otros órganos no marcados fue bajo después de la administración de ^{203}Pb marcado y ^{205}Bi-DOTA-biotina, similar a la biodistribución de DOTA-biotina marcado solo. En los animales a los que se administró ^{212}Pb-DOTA-biotina, la radiactividad en órganos no marcados fue baja excepto en los riñones. La %ID/g en el riñón para ^{212}Bi fue 14,5 a las 2 h, más alta que el ^{212}Pb, pero disminuyó a aproximadamente el 6% ID/g en 4 h. Sin embargo, la captación tumoral para ^{212}Pb y ^{212}Bi fue >25% ID/g 1 h después de la postinyección y permaneció así a lo largo de 24 h.

6.5.Compuestos de ^{211}At (24)

Se ha obtenido una mejora significativa en la estabilidad *in vivo* de los radioinmunoconjugados marcados con ^{211}At utilizando un nuevo compuesto, el succinimidil *N*-2-(4-[^{211}At]astatofenetil)succinamato (SAPS) (Compuesto 1). Se encontró que este compuesto se degradaba en 6 meses por almacenamiento a -15 ºC, por una reacción de ciclación formándose el *N*-2-(4-tributilestannilfenetil) succinimida (Compuesto 3) y se desarrolló un procedimiento modificado para la preparación de 1. El análogo estructural *N*-metil de 1, succinimidil *N*-2-(4-tributilestannilfenetil)-*N*-metil succinamato (SPEMS) fue sintetizado para

investigar la posibilidad de mejorar la estabilidad de 1. El marcaje de SPEMS con ^{211}At genera succinimidil *N*-2-(4-[^{211}At]astatofenetil)-*N*-metiyl succinamato (Methyl-SAPS), que es estable durante más de un año. El radiomarcaje de 1 y SPEMS con ^{125}I generó succinimidil *N*-2-(4-[^{125}I]iodofenetil)succinamato (SIPS) y succinimidil *N*-2-(4-[^{125}I] iodofenetil)-*N*-metil succinamato (Metil-SIPS), respectivamente, y mostró un rendimiento similar. El Metil-SAPS, SAPS, Metil-SIPS y SIPS fueron conjugados a Herceptina para un estudio comparativo en ratones. Los conjugados de Herceptina con Metil-SAPS o Metil-SIPS mostraron inmunoreactividad equivalente, si no superior, a los análogos SAPS y SIPS. Los estudios *in vivo* revelaron que la modificación *N*-metil dio como resultado un comportamiento superior del producto.

El sistema Anticuerpo predirigido con Mab-streptavidina, agente aclarante y DOTA-biotina provee el potencial de ^{212}Bi para radioterapia de tumores sólidos a pesar de la liberación de ^{212}Bi después de la desintegración del ^{212}Pb. Los cálculos dosimétricos dieron como resultado dosis tumorales de 93 rad/μCi y relaciones tumor/médula y riñón de 386:1 y 12:1, respectivamente.

7. REFERENCIAS

1. Farmacopea Española.
2. Knight, L.C., Romano, J.E., Bright, L.T., Agelan., Cantor, S., Maurer, A.H. (2007). Platelet binding and biodistribution of [^{99m}Tc] rBitistatin in animal species and humans. *Nuc Med Biol, 34*(7), 855-863.
3. Jianquan, Y., Haixun, G., Yubin, M (2010). Technetium-99m-labeled Arg-Gly- Asp-conjugated alpha melanocyte stimulating hormone hybrid peptides for human melanoma imaging. *Nuc Med Biol, 37*(8), 873-883.
4. Dhyani, M.V., Satpati, D., Korde, A., Sarma, H.D., Kumar, C., Banerjee, S. (2010) Preparation and preliminary bioevaluation of 99mTc(CO)3-11β-progesterone derivative prepared via click chemistry route. *Nuc Med Biol, 37*(8), 997-1004.
5. Mejri, N., Barhoumi, C., Trabelsi, M., Makni, A., Said, N.M. (2010) A 1-methyl-4-piperidinyl cytectrene carboxylate labeled by the technetium 99m, aradiotrace for rat brain. *Nuc Med Biol, 37*(2), 143-148.
6. Karczmarczyk, U., Garnuszek, P., Maurin, P.M., Di Gialleonardo, V., Galli, F. Signore, A., Mikołajczak, R.(2010). Investigation of 99mTc-labelling of recombinant human interleukin-2 via hydrazinonicotinamide. *Nuc Med Biol, 37*(7), 795-803.
7. Essouissi, I., Ghali, W., Saieda, N.M., Saidi, M. (2010). Synthesis and evaluation of 99mTc-*N*-sulfanilamide ferrocene carboxamide as bacterial infections detector. *Nuc Med Biol, 37*(7), 821-829.
8. Ahlgren, S., Andersson, K., Tolmachev, V.(2010). Kit formulation for 99mTc-labeling of recombinant anti-HER2 Affibody molecules with a C- terminally engineered cysteine. *Nuc Med Biol, 37*(5), 539-546.
9. Akurathi, V., Dubois, L., Lieuwes, N.G. Chitneni, S.K., Cleynhens, B.J., Vullo, D. et al (2010). Synthesis and biological evaluation of a ^{99m}Tc-labelled sulfonamide conjugate for in vivo visualization of carbonic anhydrase IX expression in tumor hypoxia. *Nuc Med Biol, 37*(5), 557-564.

10. Okarvi, s.M, Al Jammaza, I. (2010). Synthesis and evaluation of a technetium-99m labeled cytotoxic bombesin peptide conjugate for targeting bombesin receptor-expressing tumors. *Nuc Med Biol, 37*(3), 277-288.

11. Gambini, J.P., Cabral, P., Alonso, O., Savio, E., Figueroa, S.D., Zhang, X.et al. (2011). Evaluation of ^{99m}Tc-glucarate as a breast cancer imaging agent in a xenograft animal model. *Nuc Med Biol 38*(2) 255-60.

12. Ocampo-García, B.E., Ramirez F. de M., Ferro-Flores, G.et al. (2011). ^{99m}Tc-labelled gold nanoparticles capped with HYNIC-peptide/mannose for sentinel lymph node detection. *Nuc Med Biol, 38*(1), 1-11.

13. Lua, J., Panga, Y., Xie, F. et al.(2011). Synthesis and in vitro/in vivo evaluation of ^{99m}Tc-labeled folate conjugates for folate receptor imaging. *Nuc Med Biol, 38*(4), 557-565.

14. Jianguo, L., Ling, Q., Wen, Ch., Shiening, L., Wanzhong, Y.(2011). Preparation and in vivo biological investigations on a novel radioligand for bone scanning: technetium-99m-labeled zoledronic acid derivative. *Nuc Med Biol 38*(5), 619-629.

15. Ohshima, Y., Hanaoka, H., Watanabe, S., Sugo, Y., Watanabe, S., Tominaga, H. et al. (2011). Preparation and biological evaluation of 3-[^{76}Br]bromo-α-methyl-l- tyrosine, a novel tyrosine analog for positron emission tomography imaging of tumors. *Nuc Med Biol ,38*:(6), 857-865.

16. Wagner, H.N., Wiseman, G.A., Marcus, C.S. et al. (2002). Administration Guidelines for Radioinmunotherapy of Non-Hodkin's Lymphoma with 90Y-Labeled Anti- CD20 Monoclonal Antibody. *J. Nucl.Med 43*(2), 267-272.

17. Salouti, M., Babaei, M.H., Rajabi, H., Rasaee, M. (2011). Preparation and biological evaluation of ^{177}Lu conjugated PR81 for radioimmunotherapy of breast cancer. *Nuc Med Biol 38*(6), 849-855.

18. Lehenberger, S., Barkhausen, C., Cohrs, S., Fischer, E., Grünberg, J., Hohn, A. et al. (2011). The low-energy β− and electron emitter ^{161}Tb as an alternative to ^{177}Lu for targeted radionuclide therapy. *Nuc Med Biol , 38*(6), 917-924.

19. Ya-Jen Changa, 1, Chih-Hsien Changa, 1, Chia-Yu Yua, Tsui-Jung Changa, Liang-Cheng Chena, Min-Hua Chenb et al (2010). Therapeutic efficacy and microSPECT/CT imaging of 188Re-DXR-liposome in a C26 murine colon carcinoma solid tumor model. *Nuc Med Biol 37*(1), 95-104.

20. Kennel, S.J., Lankford, T., Garland, M., Sundberg, J.P., Mirzadeh, S. (2005). Biodistribution of ^{225}Ra citrate in mice: retention of daughter radioisotopes in bone. *Nuc Med Biol,32*(8), 859-867.

21. Nayak, T.K., Norenberg, J.P., Anderson, T.L., Prossnitz, E.R., Stabin, M.G., Atcher, R.W. (2007). Somatostatin-receptor-targeted α-emitting 213Bi is therapeutically more effective than β−-emitting 177Lu in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Nuc Med Biol 34*(2), 185-193.

22. 22. Dahle, J., Borrebæk, J., Melhus, K.B., Bruland, Ø. .S, Salberg, G., Olsen, D.R. et al. (2006). Initial evaluation of ^{227}Th-*p*-benzyl-DOTA-rituximab for low-dose rate α-particle radioimmunotherapy *Nuc Med Biol 33*(2), 271—279.

23. Su, F-M, Beaumier, P., Axworthy, D., Atcher, R., Fritzberg A. (2005). Pretargeted radioimmunotherapy in tumored mice using an in vivo ^{212}Pb/^{212}Bi generator. *Nuc Med Biol 32*(7), 741-747.

24. Talanov, V.S., Garmestani, K., Regino, C.A.S., Milenic, D.E., Plascjak, P.S., Waldmann, T.A. et al. (2006). Preparation and in vivo evaluation of a novel stabilized linker for ^{211}At labeling of protein. *Nuc Med Biol, 33*(4), 469-480.

ARTÍCULO

Silencing Beta2-Adrenergic Receptors Reduces Intraocular Pressure: A New Approach for Glaucoma Therapy

Jesús Pintor

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Escuela de Óptica. Universidad Complutense. 28037 Madrid. Spain.
Trabajo premiado con el Premio de la Real Academia Nacional de Farmacia de su Concurso Científico 2011.
e-mail: jpintor@vet.ucm.es

ABSTRACT

The search for new treatments for ocular hypertension and glaucoma, due to the side effects commercial products present, is inviting to look for new strategies apart from the available ones. In this sense the interference RNA technique (RNAi), also known as siRNA to selectively silence beta2 adrenergic receptors has been investigated. In this sense it has been obtained a reduction in intraocular pressure (IOP), the main factor triggering glaucoma, of 30 ± 5 %, compared to a control (scrambled siRNA). The results were in terms of IOP reduction similar to that obtained with commercial compounds but the duration of the siRNA for the beta2 adrenoceptor lasted for almost 5 days, compared to the average of 8 hours in the case of the other commercial compounds. No apparent side effects were observed in the ocular structures. In summary, the use of siRNA against the beta2 adrenergic receptors open a new perspective for the treatment of glaucoma.

Keywords: Glaucoma; Intraocular Pressure; Adrenergic Receptors; siR.

RESUMEN

Los Receptores con Silenciador Beta2-Adrenérgicos, reducen la presión intraocular: Un nuevo acercamiento a la terapia del Glaucoma

La búsqueda de nuevos tratamientos para la hipertensión ocular y el glaucoma, dado los efectos secundarios que presentan los fármacos actuales, sugieren el desarrollo de estrategias diferentes a las actualmente disponibles. En este sentido se ha puesto a punto la tecnología de los RNA de interferencia (RNAi) también llamados siRNA para silenciando selectivamente los receptores beta2 adrenérgicos tratar de obtener una reducción sustancial de la presión intraocular (PIO), principal

factor desencadenante del glaucoma. El empleo de un siRNA de origen comercial para el receptor beta2 ha producido una reducción sustancial de la PIO de 30 ± 5 %, comparado con el control, un siRNA sin sentido (scramble). Estos resultados fueron en magnitud semejantes al de los fármacos comerciales salvo que la duración del siRNA para el receptor beta2 adrenérgico duró casi 5 días en comparación de las 8 horas que suelen durar los fármacos comerciales. Los estudios en relación con los efectos secundarios no mostraron ninguna modificación en las estructuras oculares. En resumen, el empleo de los siRNA frente a los receptores beta2 adrenérgicos presenta muy buenas perspectivas como aproximación novedosa para el tratamiento del glaucoma.

Palabras clave: Glaucoma; Presión intraocular; Receptores adrenérgicos; siRNA.

1. INTRODUCTION

The aqueous humour is a transparent nutritional fluid that provides the nutrients to the inner avascular structures of the eye (1). This fluid also gives an internal pressure, termed intraocular pressure or IOP that grants the right shape of the ocular globe. The maintenance of an adequate balance between the formation and the drainage of the aqueous humour is a guarantee of ocular health (2). When changes in the aqueous humour dynamics occur concomitant alterations happen that may lead in pathological states. One problem derived from the accumulation of the aqueous humour in the eye is the degeneration of the optic nerve as a consequence of the increase in the intraocular pressure (3). This pathophysiological condition is generally termed as glaucoma and is in most of the cases due to problems in the drainage of the aqueous humour rather than a problem in its synthesis.

The control of the aqueous humour production occurs in the ciliary body and it is regulated by the sympathetic nervous system (4). Noradrenaline released from the sympathetic terminals stimulate adrenergic receptors that facilitate the production of the aqueous humour. This fact has been taken by the pharmaceutical companies to develop a series of antagonists of mainly β2-adrenoceptors although α1 agonists seem to help to reduce aqueous humour synthesis (4).

Recently, a new biochemical approach to avoid the expression of proteins has been discovered: Small interference RNA. These are double stranded RNA sequences that after being processed in the cytoplasm they destroy the mRNA to which it has been designed avoiding the synthesis of the corresponding protein (5).

In the present work, the use of siRNA, designed to silence β2-adrenoceptors has been used in order to reduce IOP and therefore consider it as a possible strategy for the treatment of ocular hypertension and glaucoma.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Animals

Male New Zealand rabbits were 6-8 weeks of age at the time of the experiment. The siRNAs were topically applied in one eye, the contralateral receiving the same volume of saline. Each of the treated eyes received an amount of 250 μg of the siRNA dissolved in 40 μL of 0.9 % NaCl. The instillation was performed in a blind fashion therefore no indication of the saline. The siRNA were applied in a blind fashion Rabbit eyes were treated with 1,1 mg HPLC-purified siRNAs, applied. The siRNAs were applied in one single eye in 265 μg 0.9% NaCl drops (40 μL volume) on four consecutive days; the contralateral eye was instilled with saline solution (0.9% NaCl). Experiments were performed using a single blind design: no visible indication was given to the experimenter as to the applied solution (agent or vehicle). IOP was measured on ten days and, afterwards, animals were killed and both eyes were collected.

2.2. Intraocular pressure (IOP) measurements in rabbits

IOP was measured by means of a Tono-Pen XL contact tonometer (Mentor Massachusetts Inc., Norwell, MA). Topical anesthesia (Colircusi, Laboratorios Cusi, Spain: 0.1 mg/ml tetracaine plus 0.4 mg/ml oxybuprocaine in 0.9% saline, diluted 1:3 in 0.9% saline) was applied (10 μL) to the cornea before each measurement to avoid animal discomfort.

All the siRNA experiments were performed and measured at the same time. In each series of experiments, IOP was measured, from the first day, three times a day every four hours and, once the IOP started to change the measurement pattern moved once every two hours. The siRNA assays carried out were purchased from Santa Cruz (USA) (n=8), and siRNA scramble was also from Santa Cruz (USA)(n=4).

In the experiments performed with commercially available drugs (40 μL of commercial Xalatan, Trusopt and Timoftol), IOP levels were measured every hour for a total of 8 hours, following the same protocol as described before.

2.3. Cell treatments and tissue sections and histology

Ciliary body non-pigmented epithelial cells were used in order to see the silencing of the beta2 adrenergic receptors. These cells were kindly provided by Dr. Coca-Prados (University of Yale), and were treated with an antibody against the beta2 adrenergic receptor (Ab40834 from abcam).

After several washes in PBS and pre-incubation in PBS with 3% blocking serum for 1 h, cells were incubated with the primary goat polyclonal anti-beta2 (Ab40834 from abcam) diluted 1:100. After this incubation, cells were washed with PBS and incubated in a dark chamber with the secondary antibody donkey anti-goat IgG-FITC at 1:150 (Jackson ImmunoResearch, PA, USA) for 1 h to 37ºC. Then, the samples were observed under a confocal microscope (Axiovert 200; Carl Zeiss Meditec GmbH, Jena, Germany), equipped with a PASCAL confocal module (LSM 5; Zeiss). All images were managed with the accompanying PASCAL software.

Eyes were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS 1X overnight at 4ºC. Eyes were washed twice in PBS 1X for 15 min, and immersed in 11% sucrose overnight at 4ºC. The following day the eyes were immersed in 33% sucrose prepared in PBS 1X. Finally, the eyes were embedded in OCT (Leica). 5-10 μm sections were made using a LEICA CM 1850 cryotome, in 3-aminopropiltrietoxisilane coated glasses.

Haematoxylin-eosin staining was performed using the following protocol: Sections were fixed and washed in water for 5 minutes. Haematoxylin (Carazzi´s Heamtoxylin, Panreac, Barcelona, Spain) was incubated for 1 minute and sections were washed in water for 10 minutes. Eosin (Eosin Bluish, Panreac) contrast was made and finally sections were washed serially with 96º and 100º ethanol. Finally, xilol treatment was performed to dehydrate the sections previous to their observation by means of the microscope.

Microscopy was performed with a confocal Zeiss Axiovert 200M microscope (Zeiss, Jena, Germany), equipped with a LSM 5 Pascal confocal module. All images were managed with the LSM 5 Pascal software.

2.4. Side effects

The assessment of the ocular tolerance of the RNAi sequences, were followed several aspects and parameters from the tear film, ocular anexa and ocular surface. The analysis were performed and graded before and after the topical application of siRNA with the Efron grading scales. A Topcon SL-8Z slit lamp and a Topcon SP-2000P specular microscope (Topcon Spain, Madrid, Spain), as well as a digital camera and a “de visu” exam, were used for every experiment. Slit-lamp images were captured under 10X augments, a diffuser filter and a medium degree of illumination. The images were recorded and analysed by IMAGEnet 2000 system software (Topcon).

2.5. Data analysis

All data are presented as the mean+s.e.m. Significant differences were determined by two-tailed Student's t-tests. The plotting and fitting of all the data was carried out with the computer programme Prism GraphPad v.4.0 (Prism, USA).

3. RESULTS

3.1. Effect of beta2 adrenergic receptor silencing

To see whether the silencing of beta2 adrenergic receptors produced changes in the IOP, the rabbits treated with the siRNA against the beta2 receptor were monitored in their IOP for 7 days. As presented in figure 1, there was a robust reduction in IOP which started to be measurable 24 hours after the instillation of the siRNA and which was statistically significant for 5 days. The maximal reduction obtained after silencing the beta2 receptor was 30 ± 5 % compared to control (n=6). This and similar values were maintained for 1-2 days, with the IOP remaining low for three more days (with a mean of 30 % of reduction) and then returning slowly towards control values (Figure 1).

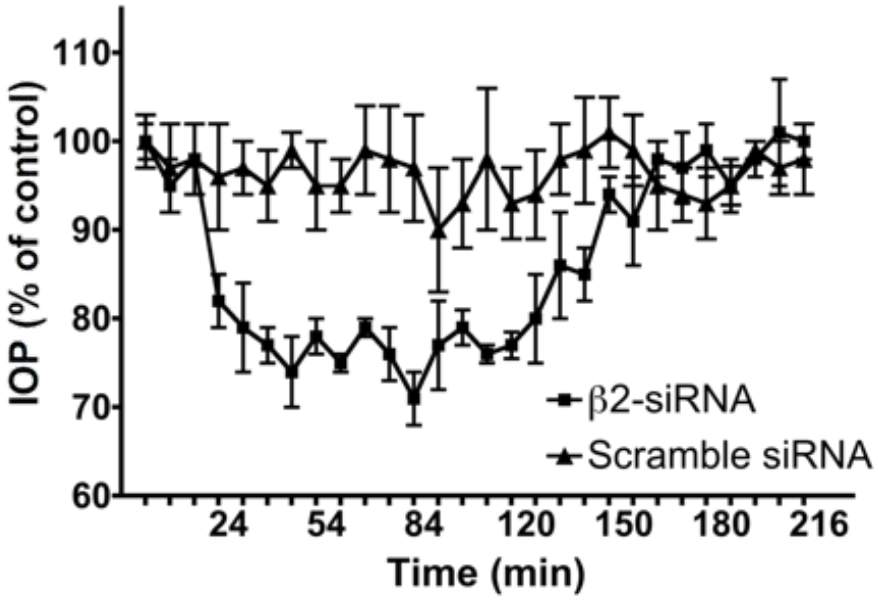


Figure 1.- Effect of a siRNA against the beta2 adrenergic receptor. Intraocular pressure was reduced 24 hours after the treatment started returning to normal values almost 5 days after the treatment started. The scrambled siRNA did not significantly modify intraocular pressure.

In order to further confirm the selectivity of the tested siRNA, a scramble siRNA was also assayed. As observed in Figure 1 after the treatment with the scramble siRNA, rabbit IOP did not significantly change during the time of the experiment.

3.2. Demonstration of the beta2 receptor silencing

When comparing the fluorescence level of non-treated cells with those treated with the siRNA designed for the beta2 adrenergic receptor, it was clear that the siRNA was able to significantly reduce the amount of receptors according to the clear fading of the fluorescence present in treated cells. As observed in Figure 2, there was a reduction in the presence of the beta2 receptors in the treated ciliary non-pigmented epithelial cells which reduction was 66.5 ± 7.2 % with respect to control (100 %; n=4).

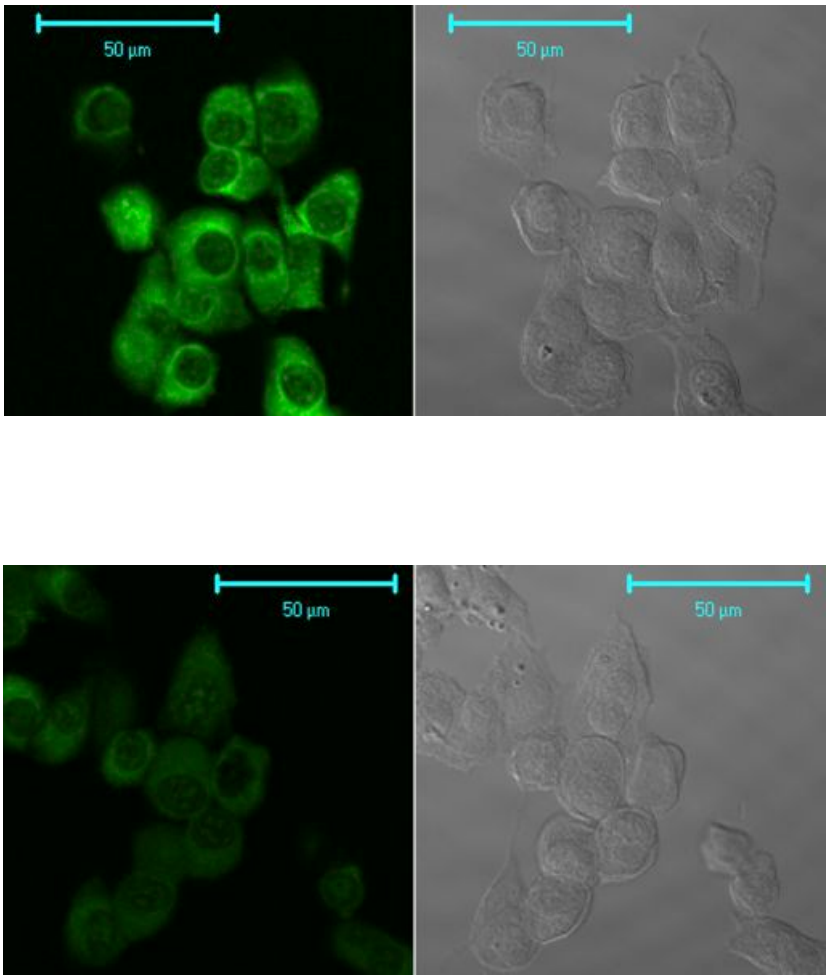


Figure 2.- Beta2 adrenergic immunostaining of ciliary non-pigmented epithelial cells before (upper panels) and after the treatment of the siRNA (lower panels). The receptor can be observed in green on the left panels while Nomarsky Interferencial Contrast can observe the same cells on the right.

3.3. Commercial drugs

The validation of our model was made using a battery of ophthalmic commercial drugs on New Zealand White rabbits. In these studies the activities on IOP of Trusopt (dorzolamide), Xalatan (latanoprost) and Timoftol (timolol) have

been assayed. A single drop (40 μL) has been instilled in rabbit eyes and IOP measures have been performed each hour for 8 hours.

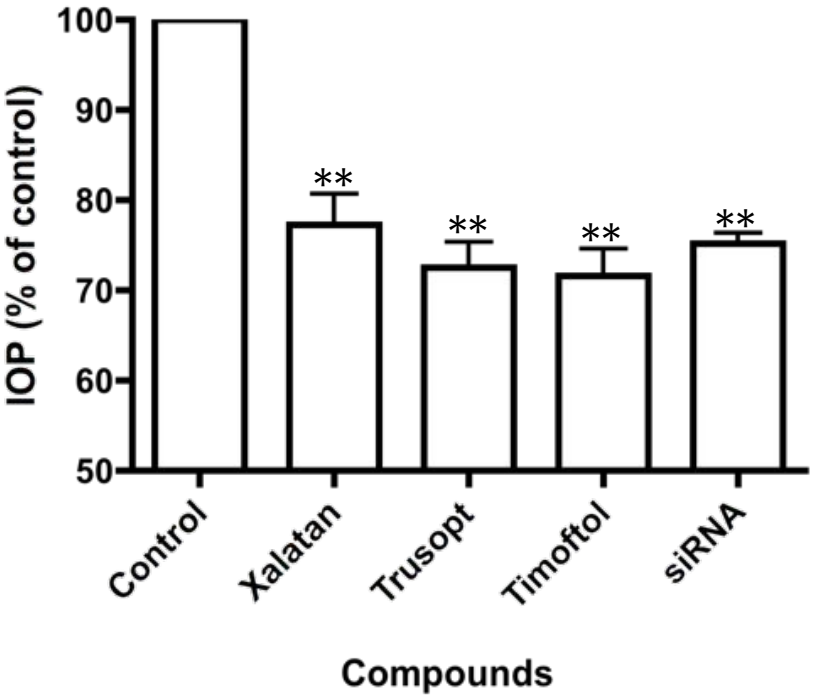


Figure 3.- Comparative effects of commercial compounds currently used for the treatment of glaucoma as well as the siRNA used along this research. (***p<0.001).

As described in Figure 3, any of those compounds produced a reduction in IOP of between 20-35% and the duration of this effect was about 6 hours. These experiments confirmed the suitability of this animal model, due to its ability and flexibility to regulate the IOP, to be used with RNAi applications.

3.4. Side effects

The integrity of the ocular structures after the siRNAs application was assessed observing the ciliary processes under microscopy by means of haematoxylin-eosin staining (Figure 4). No differences were observed between treated and non-treated animals.

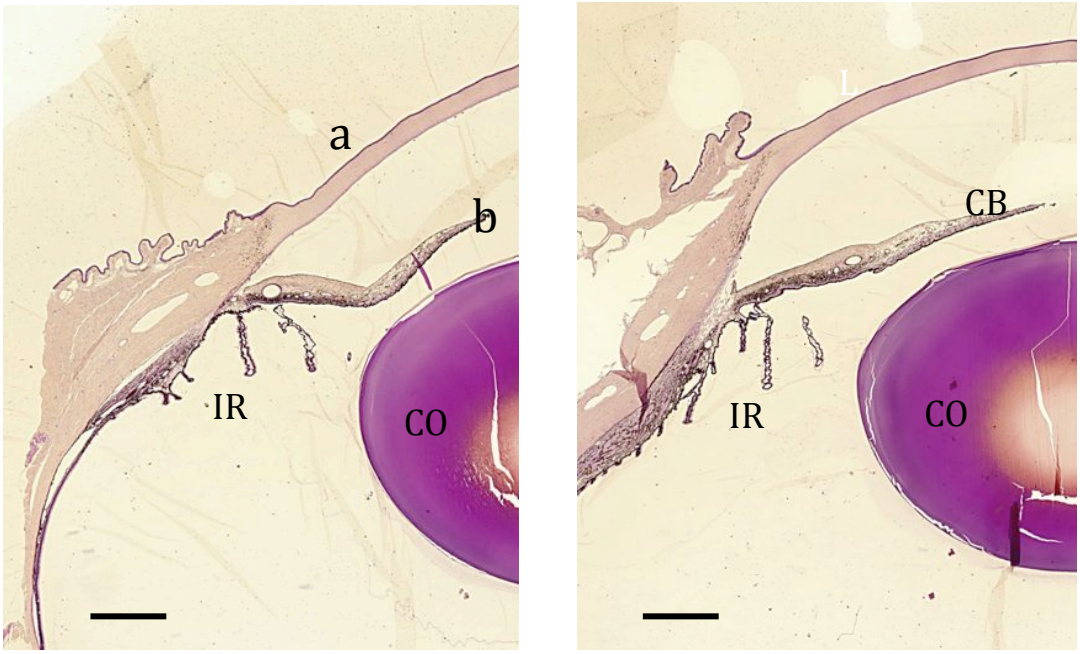


Figure 4.- Lack of changes in the ocular anatomy after the treatment with the siRNA against the beta2 adrenergic receptor. a) Control eye of an untreated animal showing the main parts of anterior and posterior chamber. b) siRNA treated eye obtained after completing the whole experimental time. CO: cornea, IR: iris, CB: ciliary body, L: lens.

4. DISCUSSION

There is an increasing interest in the use of RNAi therapeutics to treat a wide range of diseases; particularly those caused by the expression of mutant genes, including dominant-negative proteins, over-expressed genes leading to gain-of-functions effects or aberrant splicing isoforms. Gene silencing by RNA interference has been well demonstrated to efficiently knockdown targeted genes in vitro, but few reports describe similar effects in vivo (6). One of the first studies published that showed the downregulation of VEGF, a stimulatory factor in choroidal neovascularization (7), by a single intravitreal injection in the eye (8) is now being tested in patients with subfoveal choroidal neovacularization due to AMD in a Phase I Trial. siRNA (Sirna-027) injected into the vitreous cavity diffuses throughout the eye and is detectable for at least five days after administration (9).

The eye, as a relatively isolated compartment, seems as an ideal organ for RNAi treatment. RNAi mechanism of action allows targeting of specific sequences of single genes and local delivery should limit the exposure to the rest of the body, reducing the dose of siRNA to be used and minimizing side effects in other tissues. In this sense, treatment of eye diseases with this technology seems to present

some benefit with respect to other pathologies or strategies. In contrast, RNAi systemic delivery requires larger amounts of product and favours a broad delivery, sometimes affecting, non-specific tissues such as liver, lung and spleen.

In this way, one important point to be considered is to verify that the topical application of the siRNA effectively passes through the cornea to reach the targeted tissues. The eGFP mouse has been a useful model to validate the delivery of these oligonucleotides to the ciliary body. The siRNA silencing GFP are efficiently taken up by ocular tissues, reaching the ciliary body and other structures, and effectively silenced endogenous eGFP expression for at least four days, when consecutive administrations were applied. SiRNAs have been topically administered and it is presumed that it can be delivered by either transcellular transport across the corneal epithelium and stroma (9) or by the paracellular way (10). The corneal epithelium seems to be the barrier, which limits transcorneal diffusion although the existence of the paracellular way would be a mechanism that allows the transport of siRNA inside the eye. The spaces between cells, estimated to be about 60 Å, permit molecules to gain access to the anterior chamber (10). It is difficult to evaluate quantitatively how much of the applied siRNA reaches the ciliary processes, nevertheless and by means of the experiments performed with the eGFP mouse it has been possible to demonstrate that siRNA penetrates and that they can diminish the fluorescence of intracellular ocular structures. Therefore, these experiments allowed us to confirm a positive delivery in several ocular structures and to establish the proper protocol for each of them.

Once the in vivo ocular approach of RNAi technology was tried out, our main aim was to confirm this strategy as a new open angle glaucoma treatment. To this end, we focused our attention on beta2 adrenergic receptors, since their commercial inhibitors are effective in lowering IOP, the primary indication of glaucoma (11). These receptors are mainly located in the trabecular meshwork in the ciliary body.

The principal finding of this paper is the development of therapeutic siRNAs targeting the beta2 adrenergic receptors, which are involved in intraocular pressure. The use of siRNA may offer advantages and may be preferable to DNA-based strategies for in vivo applications, although the instability and the poor uptake into target tissues remain the most important handicaps. A commercial sequence was tested in vivo in rabbits with very interesting results.

According to the in vivo data obtained in the eGFP mouse model, optimal delivery time, application pattern and effective RNAi sequence dose was estimated for the normotensive New Zealand white rabbit model. For these experiments, targeting the ciliary body, 0.265 mg of beta2 adrenergic receptor siRNA were administered daily in a single dose on four consecutive days. The results confirmed the reduction of the IOP in rabbits, in a marked and sustained way.

It is inevitable to compare the results presented here with the ones obtained with commercial antiglaucomatous drugs. Commercial compounds such as Xalatan, Trusopt or Timoftol were capable of reducing IOP in our experimental models although their effects were significantly shorter in terms of time-effect than the ones obtained with the siRNA tested here. While the commercial compounds reduced IOP for a few hours, the carbonic anhydrase siRNA effect lasted for several days. This is a clear demonstration of the differences in the molecular mechanism of action of RNAi silencing sequences compared to existing drugs. When RNAi sequences are topically applied there is a delay until the effect is observed in comparison with to the commercially available drugs, but in terms of duration RNAi sequences were more effective both in time and magnitude in keeping IOP low. When dorzolamide (Trusopt) has access to the ciliary processes it can effectively inhibit carbonic anhydrases, but to keep a sustained effect it relies on the continuous application of this compound (12). On the contrary the topical application of siRNA against beta2 adrenergic receptors enabled us to obtain a significant reduction in IOP with a long-term effect. This may be one of the most interesting features of this new approach for the treatment of ocular hypertension and glaucoma. Moreover, RNAi sequence has been designed to specifically silence particular subtype of adrenergic receptor with successful results. These results confirm that the eye as an ideal target for a RNAi therapeutic approach, since they also imply that it will be possible to diminish the final RNAi sequence dose. This is a relevant point in order to minimize side-effects, both off-target effects, those non-specific RNAi-induced gene silencing ones due to cross-reactions with other targets of limited sequence similarity (13), and the activation of the interferon system (14). In this report we do not describe the analysis of either off-target effects or inflammatory response, on which we will probably provide interesting information in the near future. However, if we examine the corneal epithelium or the ocular structures, RNAi sequence treated animals have not shown any structural issue, to suggest that this technology could be an interesting new approach for the treatment of glaucoma.

In a remarkably short time since RNAi natural phenomenon was discovered in model organisms (15), this technology has emerged as a powerful tool for the study the function of the gene. However, in the last few years the therapeutic use of RNAi is taking a rising path with interesting results, the most promising being the phase I clinical trials in patients with neovascular AMD. Our results support a new generation of drugs for open angle glaucoma treatment and also provide insights into the treatment of other ocular diseases.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación [SAF2010-16024]; RETIC Red de Patología ocular del envejecimiento, calidad visual y calidad de vida [RD07/0062/0004]; NEUROTRANS CM [S-SAL 0253-2006]; and BSCHUCM [GR58/08].

6. REFERENCES

1. Sears M., & Mead A. (1983). A major pathway for the regulation of intraocular pressure. *Internat Ophthalmol* 6, 201-212.

2. Davson H. (1993). The aqueous humour and the intraocular pressure. In: Davson H (ed). Physiology of the eye. Pergamon Press: New York, pp 34-95.

3. Rohde B.H., McLaughlin M.A., & Chiou L.Y. (1985) Existence and role of endogenous ocular melatonin. *J Ocul Pharmacol* 1, 235–243.

4. Pintor J. (2009) Autonomic Nervous System: Ophthalmic Control. In: Squire LR (ed.) Encyclopedia of Neuroscience. Academic Press: Oxford, pp. 967-974.

5. Behlke M.A. (2006). Progress towards in vivo use of siRNAs. *Mol Ther* 13, 644-670.

6.- Bumcrot D., Manoharan M., Koteliansky V., & Sah D.W. (2006). RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol.*;2(12),711-719.

7. Reich S.J. (2003). Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol. Vis.* 9, 210-216.

8. Tolentino M.J., Brucker A.J., Fosnot J., Ying G.S., Wu I.H., Malik G., Wan S., & Reich S.J. (2004) Intravitreal injection of vascular endothelial growth factor small interfering RNA inhibits growth and leakage in a nonhuman primate, laser-induced model of choroidal neovascularization. *Retina* 24(1),132-138.

9. Macha S., Mitra A.K., & Hughes, P.M. (2003). Overview of ocular drug delivery. In: Ophthalmic drug delivery systems. Ed. A.K. Mitra. Pp 1-12, Marcel Dekker (USA).

10. Lee, V.H.L. (1990). Mechanism and facilitation of corneal drug penetration. *J. Control. Rel.* 11, 79-86.

11. Sugrue M.F. (2000). Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Prog. Ret. Eye Res.* 19(1), 87-112.

12. Pfeiffer N. (1997). Dorzolamide: Development and clinical application of a topical carbonic anhydrase inhibitor. *Survey Ophthalmol.* 42(2), 137-151.

13. Jackson A.L. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* 21(6), 635-637.

14. Hornung V. (2005). Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* 11(3), 263-70.

15. Fire A. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391(6669), 806-811.

SESIONES CIENTÍFICAS

Sesión científica conmemorativa del Premio Nobel 2011 de Fisiología o Medicina

Juan Ramón Lacadena Calero

Coordinador de la sesión.
Sesión celebrada el 24 de noviembre de 2011
e-mail: edicion@ranf.com

ORDEN DEL DÍA

Presentación:

"La Institución Nobel premia por décima vez las investigaciones sobre Inmunogenética"

Excmo. Sr. D. Juan-Ramón Lacadena Calero

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Ponente:

"Avizores del sistema inmunitario"

Prof. Dr. Francisco Sánchez-Madrid

Catedrático de Inmunología, Facultad de Medicina, UAM. Director Científico, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa. Hospital Universitario de la Princesa

La Institución Nobel premia por décima vez las investigaciones sobre Inmunogenética

Juan-Ramón Lacadena Calero

Desde que Karl Landsteiner recibiera en 1930 el premio Nobel "por sus descubrimientos de los grupos sanguíneos en la especie humana", hasta un total de diez veces se ha concedido el Premio Nobel de Fisiología o Medicina o de Química a investigaciones relacionadas con la Inmunogenética:

- en 1960, a Peter Medawar y Frank Macfarlane Burnet "por su descubrimiento de la tolerancia inmunológica adquirida";
- en 1972, a Rodney R. Porter y Gerald M. Edelman "por sus descubrimientos de la estructura química de los anticuerpos" (Química);
- en 1980, a George Snell, Baruj Benacerraf y Jean Dausset "por sus descubrimientos sobre las estructuras de las superficies celulares genéticamente determinadas que rigen las reacciones inmunológicas";
- en 1984, a Niels K. Jerne "por sus teorías sobre la especificidad en el desarrollo y control de los sistemas de inmunidad";
- en 1984, a George J.F. Köhler y César Milstein "por su descubrimiento del principio que rige la producción de anticuerpos monoclonales";
- en 1987, a Susumo Tonegawa "por su descubrimiento del fundamento genético de la formación de un rica variedad de anticuerpos";
- en 1996, a Peter C. Doherty y Rolf M. Zinkernagel "por sus descubrimientos en relación con la especificidad de la respuesta inmune mediatizada por células";
- en 2011, a Bruce A. Beutler y Jules A. Hoffmann "por sus descubrimientos en relación con la activación de la inmunidad innata"; y
- en 2011, a Ralph M. Steinman "por su descubrimiento de la célula dendrítica y su papel en la inmunidad adaptativa".

Estos diez galardones superan a los concedidos en otras áreas de investigación genética como son la "Genética y el cáncer" o la "Genética del desarrollo".

Frente al ataque de microorganismos patógenos (virus, bacterias, hongos, protozoos) el organismo presenta dos líneas de defensa: la primera –la inmunidad innata– puede destruir a los organismos invasores y desencadenar una inflamación que contribuye a detener el ataque externo; sin embargo, si los

microorganismos atacantes salvan esta primera barrea defensiva es cuando entra en acción la segunda línea de defensa –la inmunidad adaptativa– con la actividad de las células T que destruyen las células infectadas. Así como la inmunidad innata "no tiene memoria", el sistema inmune adaptativo mantiene una memoria inmunológica que actúa rápidamente en caso de que el organismo vuelva a ser atacado por el mismo agente patógeno.

Como señalaba el comunicado de prensa de la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska, aunque durante el pasado siglo se habían identificado los componentes del sistema inmune mediante investigaciones que habían sido galardonadas en su momento con el premio Nobel, sin embargo han sido las investigaciones de Beutler, Hoffmann y Steinman galardonadas en 2011 las que han permitido conocer los mecanismos que activan la inmunidad innata y establecen la comunicación entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa.

INMUNIDAD INNATA

En mi opinión, podría decirse que el descubrimiento de los sensores de la inmunidad innata tuvo algo de azar. En efecto, Jules A. Hoffmann y colaboradores, que investigaban cómo la mosca del vinagre, Drosophila, combatía las infecciones de bacterias y hongos, utilizaron distintas cepas observando que los mutantes para el gen Toll descubierto por Christiane Nüsslein-Volhard morían por ataque de los microorganismos, concluyendo que el producto del gen Toll estaba implicado en la detección de los organismos patógenos, siendo necesaria su activación para lograr una defensa eficaz frente al ataque externo. Nüsslein-Volhard –que compartió con Erick F. Wieschaus y Edward B. Lewis en 1995 el Premio Nobel "por sus descubrimientos sobre el control genético del desarrollo temprano del embrión"– descubrió en 1985 el gen Toll como responsable del desarrollo embrionario, controlando la polaridad dorsal-ventral del embrión (2,3) y comportándose como un gen de efecto materno; es decir, es un caso de efecto del genotipo materno vía citoplasma a través del ARN mensajero en la expresión del fenotipo (4).

Por otro lado, Bruce A. Beutler trataba de encontrar un receptor capaz de unirse al lipopolisacárido (LPS) bacteriano que puede producir un choque séptico que lleva aparejada la sobreestimulación del sistema inmune. En 1998, Beutler y colaboradores (5) encontraron que ratones resistentes a LPS eran mutantes para un gen análogo al gen Toll de Drosophila, demostrándose que este receptor análogo a Toll (TLR, por Toll-like receptor) era el buscado receptor para LPS. Cuando TLR se une a LPS se activan las señales que producen inflamación, pero si las dosis de LPS son excesivas se produce el choque séptico.

Ambos tipos de investigaciones llevaron a la conclusión de que tanto un insecto (la mosca del vinagre, Drosophila) como un mamífero (el ratón) utilizan moléculas similares para activar la inmunidad innata frente a microorganismos

patógenos. Hoy día se han identificado en ratón y en humanos una docena de receptores TLR diferentes. Individuos mutantes para algunos de los genes correspondientes resultan ser más susceptibles a infecciones mientras que otras variantes genéticas pueden aumentar el riesgo de padecer enfermedades inflamatorias crónicas.

INMUNIDAD ADAPTATIVA

El nexo de unión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa se descubrió gracias a las investigaciones de Ralph M. Steinman y colaboradores a partir de su descubrimiento en 1973 de las células dendríticas en órganos linfoides periféricos del ratón (6) y la demostración de que tienen la capacidad única de activar las células T (7) que juegan un papel clave en la inmunidad adaptativa. Posteriormente se demostró que señales procedentes de la respuesta de inmunidad innata son reconocidas por las células dendríticas, controlando la activación de las células T (8).

En el caso del Dr. Steinman se han producido dos circunstancias especiales:

La primera circunstancia es que él falleció el 30 de septiembre de 2011, tres días antes de que se hiciera público que se le había concedido el Premio Nobel, creándose un situación un tanto complicada porque los estatutos de la Institución Nobel exigen que la persona galardonada esté viva aunque se mantendría el premio si el galardonado falleciera en el lapso de tiempo que media entre cuando se hace pública la concesión y la ceremonia oficial de entrega de los premios el 10 de diciembre de cada año. Por tanto, habría un problema si realmente la deliberación final de la Asamblea Nobel formada por 50 profesores del Instituto Karolinska tuvo lugar el 3 de octubre como parece deducirse de la nota oficial pública. Otra solución podría darse si realmente el Comité Nobel, formado por 5 miembros más el secretario que evalúa las nominaciones, hubiera decidido hacer la propuesta del Premio Nobel antes del 30 de septiembre cuando el Dr. Steinman aún estaba vivo. No obstante, finalmente, el Comité Nobel decidió mantener el premio a título póstumo. Según recogía algún medio de comunicación (M. Ramírez, Crónica, El Mundo, 9/10/2011), Steinman luchaba por alargar su vida porque tenía la esperanza de ser galardonado con el Premio Nobel y le decía a su hija Alexis que "tengo que aguantar hasta el lunes. Si me muero, no os van a dar el Nobel a vosotros". Decía su viuda, Claudia, que sólo le había comunicado su fallecimiento a dos personas de la Universidad de manera que la mayoría de su equipo celebró al amanecer del lunes 3 de octubre la concesión del Premio Nobel y media hora más tarde les llegó el duelo con la noticia de que había fallecido el viernes anterior 30 de septiembre.

Aunque en los medios de comunicación se ha extendido la idea de que Steinman ha sido el primer caso excepcional de premio Nobel póstumo, en realidad

no es así porque en 1961 se le concedió el Premio Nobel de la Paz a título póstumo a Dag Hammarskjöld, Secretario General de Naciones Unidas, que había fallecido el 18 de septiembre de 1961 en un accidente de aviación en África.

La segunda circunstancia, se refiere al hecho de que, estando padeciendo un cáncer de páncreas desde hacía cuatro años, el Dr. Steinman se sometió a una nueva terapia diseñada por él mismo con sus propias células dendríticas en coherencia con sus investigaciones. Algo así como si fuera su propia cobaya humana. En este contexto, se puede mencionar también que el premio Nobel Barry J. Marshall, galardonado en 2005 "por su descubrimiento de la bacteria Helicobacter pylori y su papel en la gastritis y en la úlcera péptica", se autoinoculó con la bacteria para confirmar su hipótesis de trabajo, haciendo también de cobaya humana.

Como señalaba la nota de prensa de la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska, los descubrimientos básicos galardonados con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2011 han permitido desarrollar en Medicina nuevos métodos para la obtención de vacunas contra infecciones o intentar estimular el sistema inmune para atacar tumores, así como avanzar en el conocimiento de las enfermedades autoinmunes.

GENÉTICA Y PREMIOS NOBEL: UNA CONSIDERACIÓN GENERAL

Las circunstancias me obligan a reiterar aquí y ahora lo que he dicho en años anteriores en este mismo acto: como profesional de la Genética me siento orgulloso de que, un año más, investigaciones de esta área científica hayan sido galardonadas con el Premio Nobel. Así pues, repitiendo y actualizando lo que he venido diciendo en otras ocasiones, hoy, en 2011, podemos estar orgullosos los amantes de la Genética porque ya son 39 las veces en que el galardón Nobel ha correspondido a 87 científicos del campo de la Genética o ciencias afines. De los 39 premios considerados, 30 pertenecen al ámbito de la Fisiología o Medicina, 8 a la Química y 1 de la Paz y, a su vez, de los 87 científicos galardonados, 68 corresponden a premios de Fisiología o Medicina, 18 de Química y 1 de la Paz. Por cierto que, de estos 87 científicos, ¡solamente 7 de ellos son mujeres!: Barbara McClintock (1983), Christiane Nüsslein-Volhard (1995), Linda S. Buck (2004), Françoise Barré-Sinoussi (2008), Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider y Ada E. Yonath (2009), lo cual supone un 8 %.

Finalmente, me gustaría destacar que en estos once últimos años (2001-2011) se ha premiado la investigación genética en once ocasiones: así en 2001 (Hartwell, Hunt y Nurse, "por sus descubrimientos de los reguladores clave del ciclo celular"), 2002 (Brenner, Horvitz y Sulston, "por sus descubrimientos sobre la regulación genética del desarrollo de los órganos y la muerte celular programada"), 2004 (Axel y Buck, "por sus descubrimientos de receptores

olorosos y la organización del sistema olfativo"), 2006 (Fire y Mello, "por su descubrimiento de la interferencia por ARN: silenciamiento de genes por ARN de doble cadena"), 2006 (Kornberg, "por sus estudios de la base molecular de la trancripción eucariótica"), 2007 (Capecchi, Evans y Smithies, "por sus descubrimientos de los principios para introducir modificaciones génicas específicas en ratones mediante el uso de células troncales embrionarias"), 2008 (zur Hausen, "por su descubrimiento de los virus del papiloma humano causantes del cáncer cervical"; Barré-Sinoussi y Montagnier, "por su descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia humana"), 2008 (Shimomura, Chalfie y Tsien, "por el descubrimiento y desarrollo de la proteína fluorescente verde, GFP"), 2009 (Blackburn, Greider y Szostack, "por el descubrimiento de cómo los cromosomas son protegidos por los telómeros y la enzima telomerasa"), 2009 (Ramakrishnan, Steitz y Yonath, "por los estudios de la estructura y función del ribosoma") y, finalmente, en 2011 (Beutler y Hoffmann, "por sus descubrimientos en relación con la inmunidad innata" y Steinman, "por su descubrimiento de la célula dendrítica y su papel en la inmunidad adaptativa"). Sin duda, es una década prodigiosa para la Genética como una Alicia en el "País de las maravillas moleculares".

En 1995 inicié con mi discurso de ingreso en esta Real Academia una Historia "nobelada" de la Genética (9) que tuve la oportunidad de actualizar doce años después, en 2007 (10), y que he puesto al día en 2011. No obstante, al paso que vamos, es posible que pronto se vuelva a quedar vieja y me veré gustosamente obligado a hacer otra reedición actualizada.

Teniendo en cuenta el concepto de Genética como "la Ciencia que estudia el material hereditario –los genes– bajo cualquier nivel o dimensión", el contenido formal de la Genética tiene que dar respuesta a las siguientes preguntas en torno a los genes: ¿qué son? ¿cómo se organizan y transmiten? ¿cómo y cuándo se expresan? ¿cómo cambian? ¿cuál es su destino en el espacio y en el tiempo?

A continuación, se indica la aportación que han hecho a los diversos aspectos en el campo de la Genética los diferentes premios Nobel, aunque en ocasiones la cuestión científica en consideración no corresponda exactamente a la investigación premiada (basado en 10). En los cuadros que siguen, las fechas indicadas en primer lugar corresponden a las de publicación de los trabajos originales fundamentales que dieron lugar al premio, mientras que las que aparecen detrás de los nombres hacen referencia a las fechas de concesión del premio Nobel correspondiente.

PREGUNTAS EN TORNO A LOS GENES

¿Qué son los genes?

- Química de los ácidos nucleicos (1893-1894): Kossel (1910)
- Síntesis de nucleótidos (1952): Todd (1957)
- Los genes son ADN. Fagos radiactivos (1952): Hershey (1969)
- Modelo estructural del ADN (1953): Watson, Crick y Wilkins (1962)

¿Cómo se organizan y transmiten los genes?

- Estructura de la cromatina (1974, 1977): Kornberg, R.D. (2006), Klug (1982)
- Estructura del cromosoma eucariótico: telómeros y telomerasa (1982, 1985, 1989): Blackburn, Greider y Szostak (2009)
- Transmisión molecular:
- Replicación semiconservativa (1953) (propuesta por Watson y Crick, 1962)
- Síntesis enzimática del ADN (1956): Kornberg, A. (1959)
- Síntesis enzimática del ARN (1955): Ochoa (1959)
- Transmisión celular: teoría cromosómica de la herencia.
- Los genes están en los cromosomas (1910): Morgan (1933)
- Control genético del ciclo celular (1970, 1981) y ciclinas (1983): Hartwell, Hunt y Nurse (2001)
- Sobrecruzamiento y recombinación (1931): McClintock (1983)

¿Cómo y cuándo se expresan los genes?

- Hipótesis un gen-una enzima (1941): Beadle y Tatum (1958)
- Hipótesis de la secuencia (1958): Crick (1962)
- Desciframiento de la clave del código genético (1961): Ochoa (1959), Nirenberg y Khorana (1968)
- El ARN mensajero (1961): Jacob (1965) y Brenner (2002)
- Análisis molecular de la transcripción en eucariontes (2001): Kornberg, R.D. (2006)
- Análisis molecular de la traducción: estructura molecular y función del ribosoma (1980s, 1998, 2000): Ramakrishnan, Steitz y Yonath (2009)
- El ARN transferente (1965): Holley (1968)
- Genes discontinuos (1977): Sharp y Roberts (1993)
- Procesamiento y actividad catalítica del ARN (1981, 1983): Altman y Cech (1989)

- Regulación de la expresión génica. Modelo del operón (1961): Jacob y Monod (1965)
- Regulación de la expresión génica mediante interferencia del ARN (1998): Fire y Mello (2006)
- Control genético del desarrollo embrionario temprano en Drosophila (1978, 1980): Lewis, Nüsslein-Volhard y Wieschaus (1995)
- Control genético de la organogénesis y de la muerte celular programada en Caenorhabditis elegans (1974, 1977, 1986): Brenner, Horvitz y Sulston (2002)
- Utilización de los ratones knockout (tecnología knockout) en estudios de genética del desarrollo (1981, 1986, 1987): Capecchi, Evans y Smithies (2007)
- Utilización del gen de la proteína fluorescente verde (GFP) para detectar la expresión de los genes (1994): Chalfie (2008)

¿Cómo cambian los genes?

- Inducción de mutaciones con rayos X (1927): Muller (1946)
- Mutagénesis dirigida (1978): Smith (1993)
- Elementos genéticos móviles (1951): McClintock (1983)

¿Cuál es el destino de los genes en el espacio y en el tiempo?

- Ningún premio Nobel, hasta ahora

TÉCNICAS

- Tecnología de ácidos nucleicos
- Endonucleasas de restricción (1973): Arber, Smith y Nathans (1978)
- Secuenciación del ADN (1975, 1977): Gilbert y Sanger (1980)
- Moléculas de ADN recombinante (1972): Berg (1980)
- Reacción en cadena de la polimerasa, PCR (1985): Mullis (1993)
- Mutagénesis dirigida (1979): Smith (1993)
- Tecnología knock-out (1981, 1986, 1987): Capecchi, Evans y Smithies (2007)
- Proteína fluorescente verde, GFP (1962, 1994): Shimomura, Chalfie y Tsien (2008)
- Técnicas de apoyo
- Anticuerpos monoclonales (1975): Köhler y Milstein (1984)
- Fecundación *in vitro* (1970): Edwards (2010)
- Ultracentrífuga: Svedberg (1926)
- Electroforesis: Tiselius (1948)

- Microscopio electrónico: Ruska (1986)
- Microscopio electrónico de barrido: Binning y Rohrer (1986)

ÁREAS DE INVESTIGACIÓN

El material hereditario: Los genes (ver cuadro anterior)

- qué son
- cómo se organizan y transmiten
- cómo y cuándo se expresan
- cómo cambian
- cuál es su destino en el espacio y en el tiempo

Inmunogenética

- Inmunología de los grupos sanguíneos humanos (1900, 1901): Landsteiner (1930)
- Tolerancia inmunológica y teoría de la selección clonal (1959): Medawar y Burnet (1960)
- Estructura química de los anticuerpos (1969): Porter y Edelman (1972)
- Sistemas de histoincompatibilidad (1948, 1958): Snell, Benacerraf y Dausset (1980)
- Control de sistemas de inmunidad: Jerne (1984)
- Anticuerpos monoclonales (1975): Köhler y Milstein (1984)
- Base genética de la diversidad de los anticuerpos (1976): Tonegawa (1987)
- Especificidad de la respuesta inmune mediatizada por células (1973, 1975): Doherty y Zinkernagel (1996)
- El virus de inmunodeficiencia humana, HIV (1983): Barré-Sinoussi y Montagnier (2008)
- Inmunidad innata (1996, 1998): Hoffmann y Beutler (2011)
- Células dendríticas y su papel en la inmunidad adaptativa (1973): Steinman (2011)

Genética y cáncer

- Interacción entre los virus tumorales y el material genético de las células (1964, 1970): Dulbecco, Baltimore y Temin (1975)
- Origen celular de los oncogenes retrovirales (1976): Bishop y Varmus (1989)
- Control genético del ciclo celular (1970, 1981) y las ciclinas (1983): Hartwell, Hunt y Nurse (2001)
- Papel de la telomerasa en el envejecimiento y el cáncer (1997): Greider (2009)

Genética del desarrollo

- Regulación de la expresión génica. Modelo del operón (1961): Jacob y Monod (1965)
- Regulación de la expresión génica por ARN de interferencia (1998): Fire y Mello (2006)
- El efecto organizador en el desarrollo embrionario de anfibios: Spemann (1935)
- Control genético del desarrollo embrionario temprano en Drosophila (1978, 1980): Lewis, Nüsslein-Volhard y Wieschaus (1995)
- Control genético de la organogénesis y de la muerte celular programada en Caenorhabditis elegans (1974, 1977, 1986): Brenner, Horvitz y Sulston (2002)
- Tecnología knock-out (1981, 1986, 1987): Capecchi, Evans y Smithies (2007)
- Fecundación *in vitro* (1970, 1971, 1978): Edwards (2010)
- Control genético y organización del sistema olfativo (1991): Axel y Buck (2004)

Genética aplicada a la mejora de plantas

- La revolución verde: Borlaug (1970)

Para finalizar, permítaseme hacer alguna profecía, repitiendo la que hice el año pasado en las presentes circunstancias: que, antes o después, los grandes pioneros de la Genómica (¿Venter, Collins?) y la Reprogramación celular (¿Wilmut, Yamanaka, Thomson?) serán galardonados con el Premio Nobel. Por de pronto, Yamanaka ha recibido junto con Gurdon el premio Albert Lasker, que para muchos es la antesala del Premio Nobel, premiando su aportación fundamental al tema de la reprogramación nuclear.

REFERENCIAS

1. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in drosophila adult. Cell, 86, 973-983.

2. Anderson, K.V., Jurgens, G., Nüsslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: Genetic studies on the role of the Toll gene product. Cell, 42, 779-789.

3. Anderson, K.V., Bokla, L.; Nüsslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. Cell, 42, 791-798.

4. Anderson, K.V., Nüsslein-Volhard, C. (1984). Information for the dorsal-ventral pattern od the Drosophila embryo is stored as maternal mRNA. Nature, 311, 223-227.

5. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X.; Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B. (1998). Defective LPS signalling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. Science, 282:2085-2088.

6. Steinman, R.M., Cohn, Z.A. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. J. Exp. Med., 137, 1142-1162.

7. Steinman, R.M., Witmer, M.D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 5132-5136.

8. Schuler, G., Steinman, R.M. (1985). Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. J. Exp. Med., 161, 526:546.

9. Lacadena, J.R. (1995). Historia "nobelada" de la Genética: Concepto y método. Discurso de Ingreso como Académico de Número en la Real Academia de Farmacia del Instituto de España, leído el 14 diciembre de 1995.

10. Lacadena, J.R. (2007). Conmemorando los 100 años del término "Genética" (1905-2005): Una historia "nobelada" de la Genética. Conferencia Plenaria pronunciada en el Congreso de la Sociedad Española de Genética, Almería 2005, Secretariado de Publicaciones, Universidad de León.

Avizores del sistema inmunitario

Francisco Sánchez Madrid

INTRODUCCIÓN: RESPUESTA INMUNE INNATA

Los linfocitos poseen componentes moleculares de reconocimiento de antígenos extraordinariamente complejos y sofisticados: el receptor de antígeno de los linfocitos T y los anticuerpos de los linfocitos B. Este mecanismo hace posible que nuestro organismo se defienda de forma específica de determinados patógenos con los que ha entrado en contacto con anterioridad. Esto es lo que denominamos la inmunidad adaptativa. Otros componentes, de menor complejidad y diversidad, pero dotados de una gran eficiencia, conforman la llamada inmunidad innata o natural. La inmunidad innata tiene como primer objetivo ser la línea de contención inmediata frente a una infección, controlando y eliminando los agentes patógenos. Su segundo objetivo consiste en advertir y activar a la respuesta inmune adaptativa.

Entre las propiedades de la respuesta inmune innata se incluyen la actuación inmediata, que no requiere una sensibilización previa, y su amplia especificidad frente a sustancias ajenas al organismo que se lleva a cabo gracias al reconocimiento de patrones moleculares microbianos (PAMPs), que tienen en común determinados grupos de microorganismos. De esta forma, la respuesta innata contiene solo un número limitado de receptores para PAMPs (del orden de 103). Este aspecto contrasta con la respuesta inmune adaptativa, que reconoce detalles estructurales de componentes tanto microbianos como no microbianos, siendo la potencialidad de su repertorio de reconocimiento mucho mayor (del orden de 109).

El grupo del Prof. C. Janeway, postuló que las estructuras y patrones microbianos que pueden ser reconocidas por la inmunidad innata, además de desempeñar un papel crítico en la inducción de la respuesta adaptativa posterior, deben cumplir las siguientes propiedades: i) estar ausentes en el organismo huésped; ii) estar conservadas en un gran número de microorganismos, de modo que puedan ser reconocidas por un número limitado de receptores; y iii) ser componentes esenciales de los microorganismos para así evitar su posible evasión del sistema inmune mediante mutación (1). Ejemplos de estos patrones microbianos son: el lipopolisacárido de la membrana exterior de las bacterias gram-negativas, los peptidoglicanos, los lipopéptidos, las secuencias CpG no

metiladas de ADN bacteriano o el ARN vírico de doble cadena. Curiosamente, se conocía con anterioridad que todos esos tipos de moléculas eran capaces de inducir la cascada de señalización que conduce a la activación del factor de transcripción nuclear–kB (NF-kB) y así como de la respuesta inflamatoria. En ausencia del conocimiento detallado de los receptores para dichas estructuras microbianas, también se enunciaron hipótesis alternativas, donde se sustituyen las estructuras microbianas extrañas al organismo, por las señales de peligro que pueden surgir tanto del exterior como del interior celular (2).

Las células que componen el sistema inmune innato, son esencialmente los fagocitos (neutrófilos, monocitos y macrófagos) y las Células Dendríticas (DCs). Además, forman parte de la respuesta innata, las células citotóxicas naturales o NK y el sistema de complemento, que se ocupan de reconocer células dañadas o infectadas y eliminarlas.

Debido al hecho de que algunos de estos tipos celulares poseen un sistema de receptores que reconoce patrones moleculares invariables, comunes para muchos microbios, su activación es considerablemente más rápida que la observada en la respuesta adaptativa. Esto las convierte en la primera barrera de la respuesta inmune, que permite el inicio de la respuesta inmunitaria. Aún así, la comunicación entre los dos tipos de inmunidad, innata y adaptativa, es necesaria para una respuesta inmune completa. El eslabón entre ambas ramas lo constituyen, precisamente, las DCs.

El Nobel de Fisiología y Medicina 2011 premia tanto las investigaciones que asentaron las bases del reconocimiento de patógenos por parte del sistema inmune innato como el descubrimiento de las Células Dendríticas y su papel en la inmunidad adquirida. Los Profesores Jules Hoffman (Instituto de Biología Celular y Molecular, Universidad Estrasburgo, Francia), y Bruce A Beutler (Instituto de Investigación Scripps, La Jolla, CA) han sido galardonados por el descubrimiento de los sensores moleculares de las células del sistema inmune innato (macrófagos y Células Dendríticas), con los que detectan a los microbios patógenos, así como la ruta de activación intracelular que desencadena la respuesta inflamatoria. El Prof. Ralph M Steinman (Universidad Rockefeller, New York) comparte con ellos el Premio por su descubrimiento de las Células Dendríticas y por las investigaciones posteriores, de enorme trascendencia en medicina, que sitúan a este tipo celular como nexo entre las dos ramas de la respuesta inmune.

El descubrimiento del sistema de reconocimiento de los TLRs (toll y los Toll-Like Receptors).

La inmunidad innata, primera línea de defensa, opera tanto en animales invertebrados como vertebrados para contener agentes infecciosos, hallándose conservados los sensores para patógenos en ellos. Los estudios del grupo de Prof. J

Hoffman en la mosca Drosophila melanogaster, parten de los estudios de la Dra C. Nusslein-Volhard, al comienzo de la década de los 80, sobre genes implicados en el desarrollo de la mosca, que organizan su simetría y polaridad, entre los que identificó el gen toll (del alemán: Súper, Fantástico), que controla el establecimiento de su eje dorso-ventral (3).

Siguiendo la estela del trabajo del Prof. H Boman, que identificó en la hemolinfa del insecto una serie de potentes péptidos catiónicos antimicrobianos (4), el grupo del Dr. Hoffman identificó una nueva función para el gen toll; la defensa de invertebrados frente a infecciones fúngicas (5). Concretamente, mediante el estudio de la regulación del péptido anti-fúngico drosomicina, observó que los mutantes en el gen Toll no eran capaces de expresar la drosomicina, y por tanto, eran muy susceptibles a las infecciones por el hongo Aspergillus fumigatus. Otro hallazgo de gran interés del grupo del Prof. Hoffman consistió en la identificación de motivos estucturales para NF-kB en la drosomicina (6). Conjuntamente con el grupo del Dr. Charles Janeway propusieron así la existencia de mecanismos y receptores conservados evolutivamente en invertebrados y mamíferos, responsables del control de la respuesta inmune innata (7, 8). Poco después, se revelaría la homología de las regiones citoplásmicas del receptor de IL-1 con la proteina Toll (9).

De forma independiente, el grupo del Dr. Beutler, mediante el análisis del proceso molecular de la sepsis durante la respuesta a infecciones por bacterias gram-negativas en ratones, descubrió el gen responsable de su reconocimiento por parte de los macrófagos. El receptor codificado por dicho gen, denominado tlr4 (Toll-like receptor, "receptor parecido a toll"), por su gran homología con el gen toll de Drosophila, reconoce el lipopolisacárido o endotoxina, componente patogénico de las bacterias. A la vez, Beutler y otros describieron la serie de procesos intracelulares que se desencadena después de la activación de este receptor TLR-4, que culmina en la producción de proteínas y citocinas pro-inflamatorias, como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF-alfa). Desde entonces se consideraría a éste como indicador paradigmático de la inducción de la respuesta inflamatoria (10, 11).

ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y LIGANDOS DE LOS TLRS

Gracias a estos primeros estudios, se conocen actualmente al menos 11 genes TLRs, implicados en la defensa frente a agentes bacterianos, fúngicos y víricos. Se pueden agrupar en dos categorías, dependiendo de si su expresión es en la membrana plasmática o bien en compartimentos endosomales. Entre los TLRs expuestos en membrana celular, están TLR2, que puede asociarse a TLR1 o TLR6 para reconocer lipopéptidos di- o tri-acilados; TLR 5 y TLR 11, que detectan respectivamente las proteínas bacterianas flagelina, un componente esencial de la estructura del flagelo, o profilina del protozoo Toxoplasma. TLR4 a su vez, se

encuentra en la membrana formando un complejo ternario con CD14, una molécula anclada por un enlace GPI, y la proteína de unión a lípidos MD2. La formación del complejo es necesaria para la transmisión de la señal intracelular (12). Los TLRs endosomales comprenden a TLR3, que reconoce ADN viral de doble cadena, TLR7 y 8, que reconocen ADN de cadena simple, y TLR9 para secuencias CpG no metiladas en ADN bacterianos. Estos TLRs son importantes como sistema sensor de infecciones intracelulares tanto víricas como bacterianas.

Aún no se conocen los detalles precisos de cómo los TLRs pueden unir un abanico de ligandos estructuralmente tan diferentes como los ácidos nucleicos, y los lípidos. Los TLRs son proteínas integrales de membrana tipo I, que poseen secuencias repetidas ricas en leucina en sus regiones extracelulares y una corta secuencia de cisteínas. Los análisis estructurales de la interacción de algunos TLRs con sus ligandos a través de sus dominios de leucina (estructura en "herradura") han revelado una gran versatilidad y flexibilidad para acomodar estructuras muy variadas, y transmitir en todos los casos la señal de unión al ligando a su región C-terminal intracelular. Pero quizás lo más característico de los TLRs sea su dominio intra-citoplásmico (dominio TIR), que tiene gran homología al del receptor de IL-1 (13).

TLRs y señales pro-inflamatorias

La disposición de un dominio TIR permite a los receptores TLRs transmitir señales intracelulares que conectan con la activación génica en el núcleo. La cascada de señalización que desencadena la activación del dominio TIR se estableció en el marco del Receptor para IL-1 (14,15). Mediante este dominio, los TLRs conectan con las proteínas adaptadoras MyD88, MAL/TYRAP, TRIF o TRAM. Los diferentes TLRs, utilizan diversas combinaciones de estas proteínas que van a reclutar a su vez los complejos señalizadores interaccionando con IRAK (Kinasa asociada al Receptor de IL-1) y activando a TRAF6 (Factor Asociado al Receptor de TNF 6). Este factor estimula entonces a las proteínas NIK y TAK-1, que confluyen en la activación de las kinasas MAP e IkB. Finalmente, se translocan al núcleo los Factores de transcripción AP-1 y NF-kB, dando lugar a la activación de la transcripción de genes de citocinas pro-inflamatorias, como TNF alfa, IL-1, IL-6; quimiocinas y moléculas de adhesión.

Por tanto, los TLRs actúan como auténticos receptores para patrones estructurales microbianos y como elementos señalizadores desencadenantes del proceso inflamatorio.

Otras familias de receptores para componentes microbianos

Las líneas de investigación mencionadas anteriormente han dado pie a ampliar el concepto de la inmunidad innata como defensa frente a señales de peligro, tanto extracelulares como intracelulares, a otras familias de receptores

estructuralmente diferentes de los TLRs, como las lectinas animales de tipo C, las proteínas de reconocimiento de peptidoglicanos y beta-glucanos, los receptores RIG-like o los NLR (receptores tipo Nod) (16). Junto a los TLRs, su proyección y relevancia se ha mostrado extraordinaria en enfermedades crónicas no infecciosas de gran prevalencia en la población, como son los trastornos autoinmunes y cardiovasculares. Así, se ha observado que los TLRs también pueden unir moléculas endógenas como LDLox, componentes de la matriz extracelular, o proteínas de choque térmico o estrés (17, 18). El conocimiento generado por estos estudios sobre los mecanismos de señalización de los TLRs, abren nuevas perspectivas en los tratamientos tanto para enfermedades inflamatorias crónicas como las cardiovasculares.

EL DESCUBRIMIENTO DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Tras identificar y definir por primera vez este nuevo tipo de células inmunes en el año 1973 (19), el Prof. Ralph Steinman hubo de demostrar inequívocamente que se trataba de un linaje celular distinto al de los macrófagos mostrando, por tanto, características de diferenciación y función propias. La lucha del Prof. Steinman para que la relevancia de las Células Dendríticas, en la encrucijada de la respuesta innata con la respuesta adaptativa, fuera reconocida por la comunidad científica fue a la vez titánica y elegante. Abrió así un nuevo área de investigación, demostrando que las Células Dendríticas representan el eslabón perdido entre respuesta inmune innata y adaptativa, siendo esenciales para el inicio de la respuesta inmune adaptativa y por tanto para una completa y eficiente defensa del organismo.

Las Células Dendríticas capturan microbios, mediante su repertorio de receptores para patrones moleculares microbianos, como los TLRs, maduran como respuesta al patógeno detectado y se dirigen a los órganos linfoides, donde presentan los antígenos a los linfocitos, células del sistema inmune adaptativo. De esta manera, las Células Dendríticas informan de la presencia de patógenos, iniciándose así la activación y diferenciación celular que dará lugar a los diferentes tipos de linfocitos efectores.

ONTOGENIA DE LOS MACRÓFAGOS Y LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Los monocitos, macrófagos y Células Dendríticas (DCs) son componentes esenciales en la regulación de la respuesta innata frente a infecciones por microorganismos. Los monocitos que circulan en la corriente sanguínea proceden de un precursor de la médula ósea común para monocito/Macrófago/DC (MDP), con un fenotipo característico Lin- cKit+ CD115+ CX3CR1+ Flt3+. Este precursor puede originar tanto macrófagos como DCs plasmacitoides (pDCs) y DCs convencionales (cDCs); estas células juegan un papel esencial en el desarrollo del proceso inflamatorio.

Los monocitos Ly6C- generan los macrófagos residentes de tejido que se encuentran en el bazo, hígado, pulmón, o intestino, y que realizan un papel de centinelas en dichos tejidos, mientras que los monocitos Ly6C+ se diferencian a macrófagos inflamatorios en respuesta a infecciones o estímulos inflamatorios. Estos últimos pueden ser de dos tipos: los macrófagos Activados Clásicos (M1) o pro-inflamatorios, con propiedades anti-microbianas, y los Activados Alternativos (M2) o anti-inflamatorios, que ejercen un papel muy importante en los procesos de cicatrización y generación de fibrosis (20). Aunque el origen de los macrófagos asociados a los tumores (TAMs) no está claro aún, ambos tipos de macrófagos residentes o inflamatorios pueden diferenciarse a TAMs, adquiriendo propiedades inmunosupresoras (21).

Se han descrito además otras subpoblaciones de monocitos como los Ly6C+ Gr-1+ que migran a las mucosas y participan en la inmunidad frente a protozoos, o la subpoblación Ly6C- CD115+ Gr1+ que patrulla los vasos sanguíneos (22-24). Los procesos de diferenciación mieloide poseen gran plasticidad; así, se ha observado en situaciones de infección e inflamación, la migración de los monocitos a los sitios de inflamación y su diferenciación a DCs (25). Sin embargo, en otras situaciones como en respuestas de daño isquémico miocárdico, los monocitos pueden ejercer un efecto anti-inflamatorio. [Los monocitos Ly6C+ pueden ser movilizados desde la médula ósea hacia los tejidos inflamados por un mecanismo dependiente de CCR2, y una vez allí, pueden diferenciarse a DCs productoras de TNF(Tip DCs), macrófagos M1 o DCs inflamatorias.

La ontogenia, desarrollo y homeostasis de las DCs está controlado por el receptor Flt3, de la familia de receptores tirosina quinasa fms-like, que es responsable de la diferenciación de DCs a partir de un precursor CX3CR1+ CD115+ común (CDP) para pDCs y cDCS (26-28). La expresión diferencial de moléculas de adhesión y receptores de migración es esencial para el reclutamiento de los precursores mieloides de macrófagos y DCs a los diferentes tejidos, afín de ejercer allí sus funciones (29).

SUBTIPOS Y FUNCIONES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

El papel de las Células Dendríticas es crítico en el equilibrio inmunogenicidad-tolerancia. Las DCs pueden clasificarse en dos grandes categorías; convencionales (cDCs) y plasmacitoides (pDCs) (30). En primer lugar, las cDCs se han caracterizado por ser, esencialmente, células con gran capacidad presentadora de antígeno y de estimulación de la respuesta de los linfocitos T, con fenotipo CD11c+ CD11b+. La migración de cDCs inmaduras a los tejidos inflamados es dependiente de la expresión de los receptores de quimiocinas CCR2, CCR5 y CCR6. Tras la captura de antígeno en tejidos inflamados o en los sitios de infección, las cDCs maduran, disminuyendo la expresión de estos receptores de quimiocinas y aumentando la de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase

II (MHC-II) y ligandos co-estimuladores CD80 y CD86. Así, aumentan su capacidad presentadora de antígeno. Además, tras su maduración, las cDCs comienzan a expresar el receptor de quimiocinas CCR7, que les permite migrar a los ganglios linfáticos para presentar allí el antígeno a los linfocitos T y así activarlos (29, 31).

Por otra parte, las pDCs, identificadas en ratón como CD11cint B220+ (32), se encuentran en médula ósea, sangre, timo y ganglios, formando parte del mecanismo de defensa inicial frente a las infecciones virales ya que son capaces de producir grandes cantidades de Interferon-alfa tras reconocimiento de ácidos nucleicos virales por sus TLR7 y 9. Además, las pDCs pueden también activar a linfocitos T induciendo respuestas T antígeno específicas, así como a otros componentes del sistema inmune como las células NKs. Existen, sin embargo, evidencias de que las pDCs pueden desempeñar una función importante no sólo en la inmunidad viral, sino también durante la inducción de tolerancia en las enfermedades autoinmunes. Debido a su menor expresión de MHC-II y de moléculas co-estimuladoras que las cDCs, se ha postulado un papel muy relevante para las pDCs en el mantenimiento de la tolerancia frente a antígenos propios. En este sentido, las pDCs inmaduras promueven la diferenciación de los linfocitos T reguladores, integrantes de la respuesta tolerogénica, tanto in vitro como in vivo en modelos de tolerancia de asma alérgica o de trasplantes cardiacos (32, 33)

INTERACCIONES DC-LINFOCITOS T. LA SINAPSIS INMUNE

El intercambio de información entre células, homólogas o heterólogas, es uno de los ejemplos más importantes de la sofisticación de los sistemas nervioso e inmune en vertebrados. La formación de la sinapsis inmunológica, a diferencia de la sinapsis neuronal, es un proceso transitorio. La formación de la sinapsis inmunológica incluye varias etapas secuenciales. En primer lugar, se produce la exploración por parte del linfocito T de la membrana de la célula presentadora de antígeno (APC) que implica a determinadas moléculas de adhesión como la integrina LFA-1 y sus ligandos ICAM-1, e ICAM-3; esta etapa es independiente de antígeno. En segundo lugar, cuando el receptor de los linfocitos T (TCR) reconoce al antígeno presentado por las moléculas MHC de la APC, se inducen señales activadoras y se produce la segregación de los SMACs (Complejos Supra-moleculares de Activación). Por último, se lleva a cabo la secreción polarizada guiada por la translocación del centro organizador de microtúbulos (MTOC) (34-37).

Las moléculas implicadas en la formación de la sinapsis inmunológica se reorganizan espacial y temporalmente en la célula T formando una plataforma especializada en la zona de la célula T que está en contacto estrecho con la APC y que permite el diálogo celular. Este reconocimiento específico conlleva que se establezcan de múltiples interacciones concertadas entre parejas de receptores de superficie en ambas células. Una observación detallada al microscopio de la

sinapsis inmune revela la distribución de las moléculas implicadas en el lado del linfocito T en dos anillos concéntricos: un anillo central (cSMAC), donde se agrupan el receptor de las células T (TCR) unido al complejo antígeno-MHC de la célula presentadora; y un anillo periférico de adhesión denominado pSMAC (complejo supra-molecular de activación periférico) donde se concentran los receptores de adhesión celular, entre ellos LFA-1 y su ligando ICAM-1. Esta distribución diferencial es necesaria para la completa activación de la célula T ya que permite la regulación y amplificación espacio-temporal de las rutas de señalización intracelular provenientes del TCR. Este proceso de distribución de receptores es posible gracias a su integración en pequeñas islas en la membrana plasmática que favorecen la formación de agregados así como su interacción con el citoesqueleto celular, que proporciona la plataforma física que sustenta toda la estructura de la sinapsis (38-40). Por otra parte, en la APC, en la zona de contacto con el linfocito T, las moléculas de MHC que presentan el Antígeno y las moléculas de adhesión ICAM-1 y -3 también se disponen congregadas y organizadas, facilitando así su interacción con los receptores en la parte simétrica de la célula T (41). Se ha descrito además, que existen estrictas jerarquías temporales en el reclutamiento de moléculas de señalización a la sinapsis, de forma que se produce una ordenación temporal de las señales. Tanto las cDCs como las pDCs poseen la capacidad de formar sinapsis productivas y completas con los linfocitos T de forma antígeno-específica (42).

Una vez efectuado el reconocimiento entre la célula T y la APC y establecidos los contactos adherentes y antígeno-dependientes, la célula T se activa y pasa a diferenciarse hacia uno de los subtipos de células T, ya sean efectoras o colaboradoras (T-helper, Th), que son fundamentales para el desarrollo de la respuesta inmune adquirida (43, 44). Dependiendo del microambiente de citocinas y el tipo de célula APC que los activa, los linfocitos T CD4 pueden dar lugar a: i) Células Th1: que producen grandes cantidades de IFN gamma con el que activan propiedades microbicidas en los macrófagos para así resistir infecciones intracelulares de patógenos facultativos u obligados (ej: bacterias intracelulares). ii) Células Th2: Productoras de citocinas IL-4, -5 y -13 que permiten reclutar otros leucocitos para resistir infecciones por helmintos así como cooperar con los linfocitos B para producir diferentes isotipos de inmunoglobulinas. iii) Células Th17: Productoras de IL-17, que movilizan a fagocitos, neutrófilos, para resistir infecciones por bacilos extracelulares. iv) Células T reguladoras (Treg): algunas células T CD4+ son inducidas a producir IL-10, diferenciándose a células Foxp3+ con capacidad de suprimir la función de las demás Th1, Th2 y Th17.

La interfase de contacto entre una célula T y una APC se forma para facilitar la comunicación entre ambas células. Sin embargo, se desconoce por qué las moléculas se reordenan formando los SMACs característicos de la Sinapsis

Inmunológica madura. Una posibilidad es que la formación y maduración de los SMACs faciliten la activación secuencial del linfocito T mediante el agrupamiento selectivo de moléculas de superficie, así como el cese y la terminación adecuada de la señal de activación. Además, este reagrupamiento de moléculas de la célula T en SMACs supone la formación de un área especializada para que vesículas cargadas de mediadores se anclen y sean secretadas a la zona de contacto con la célula presentadora de antígeno. Existen numerosas evidencias que apuntan a que la secreción polarizada es una de las funciones principales de la Sinapsis Inmune (45, 46).

Los mensajes que se transmiten las células inmunes mediante la sinapsis inmunológica pueden ser mensajes de vida o mensajes de muerte. Así, las señales que recibe, desde un linfocito T colaborador, una APC, tipo Célula Dendrítica o linfocito B, favorecen su supervivencia y permiten que una célula específica, que está transmitiendo mensajes sobre antígenos presentes en el organismo permanezca más tiempo activa, de modo que cumpla su función comunicadora con mayor eficiencia. Estas señales implican tanto la proliferación y activación como la secreción y transferencia de citocinas y factores de crecimiento y supervivencia (45-48). Por el contrario, las señales que emite un linfocito T citotóxico a una célula infectada por un virus o bacteria o a una célula tumoral, son inductoras de muerte, que ponen en marcha programas de muerte celular, como la apoptosis (46).

TERAPIAS BASADAS EN LA INMUNOMODULACIÓN POR CÉLULAS DENDRÍTICAS DE LA RESPUESTA INMUNE

El potencial de las DCs es indudable en protocolos de vacunación, así como en nuevas terapias de inmunopotenciación frente a tumores. El uso de Células Dendríticas, estimuladas y expandidas in vitro, o bien combinadas con otras terapias más convencionales, es un área emergente y en expansión en medicina.

Actualmente, se está intentado desarrollar nuevas terapias para producir vacunas contra el cáncer que permitan mejorar los tratamientos actuales. Por ejemplo, existen ensayos con distintos adyuvantes que son inyectados en la zona lesionada por el tumor para aumentar su inmunogenicidad. Además se están poniendo a punto sistemas que incluyen la administración sistémica o local de células dendríticas que reaccionan frente al tumor, o agentes que causan la depleción o eliminación de células T reguladoras. También se ha estudiado el efecto de fármacos que eliminan células mieloides supresoras en el área del tumor. Estos tipos de inmunoterapias intentan coordinar la comunicación entre células del sistema inmune, de modo que sean capaces de reconocer y hacer desaparecer el tumor, igual que ocurre frente a determinados virus o bacterias para los que existen vacunas efectivas (49).

Conseguir vacunas efectivas frente a determinados procesos como el cáncer, implica poder modular el sistema inmune adaptativo de modo que sea más inmunogénico y menos tolerogénico. Igualmente, se está estudiando el posible uso de poblaciones de Células Dendríticas con potencial tolerogénico, es decir, capaces de mantener inactivo al sistema inmune, para combatir procesos donde el sistema inmune se activa de forma no deseada, dando lugar a una patología como es el caso de las enfermedades autoinmunes, alergias y trasplantes de órganos (50, 51).

REFERENCIAS

1. Janeway, C.; Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol. 1989, 54, 1-13.

2. Matzinger, P.; Tolerance, danger and the extended family. Annu Rev Immunol. 1994, 12, 991-1045.

3. Anderson, K.V.; Bokla, L.; Nüsslein-Volhard, C.; Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. Cell. 1985, 42, 791-798.

4. Steiner, H.; Hultmark, D.; Engström, A.; Bennich, H.; Boman, H.G.; Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. Nature. 1981, 292, 246-248.

5. Lemaitre, B.; Nicolas, E.; Michaut, L.; Reichhart, J.M.; Hoffmann, J.A.; The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell. 1996, 86; 973-983.

6. Hoffmann, J.A.; Reichhart, J.M. Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. Nat Immunol. 2002, 3, 121-126.

7. Medzhitov, R.; Preston-Hurlburt, P.; Janeway, C.A. Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature. 1997, 388, 394-397.

8. Hoffmann, J,A; Kafatos, F.C.; Janeway, C.A.; Ezekowitz, R.A.; Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science. 1999, 284, 1313-1318.

9. Gay, N.J.; Keith, F.J.; Drosophila Toll and IL-1 receptor. Nature. 1991, 351, 355-356.

10. Poltorak, A.; He, X.; Smirnova, I.; Liu, M.Y.; Van Huffel, C.; Du, X.; Birdwell, D.; Alejos, E.; Silva, M.; Galanos, C.; Freudenberg, M.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Layton, B.; Beutler, B.;. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science, 1998, 282, 2085-2088.

11. Beutler, B.A.; TLRs and innate immunity. Blood. 2009, 13, 1399-1407.

12. da Silva Correia, J.; Soldau, K.; Christen, U.; Tobias, P.S.; Ulevitch, R.J.; Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. J Biol Chem. 2001, 276, 21129-21135.

13 Heguy, A.; Baldari, C.T.; Macchia, G.; Telford, J.L.; Melli, M.; Amino acids conserved in interleukin-1 receptors (IL-1Rs) and the Drosophila toll protein are essential for IL-1R signal transduction. J Biol Chem. 1992, 267, 2605-2609.

14. Muzio, M.; Ni, J.; Feng, P.; Dixit, V.M.; IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. Science. 1997, 278, 1612-1615.

15. Muzio, M.; Natoli, G.; Saccani, S.; Levrero, M.; Mantovani, A.; The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). J Exp Med. 1998, 187, 2097-2101.

16. Takeuchi, O.; Akira, S.; Pattern recognition receptors and inflammation. Cell. 2010, 140, 805-820.

17. Seimon, T.A.; Nadolski, M.J.; Liao, X.; Magallon, J.; Nguyen, M.; Feric, N.T.; Koschinsky, M.L.; Harkewicz, R.; Witztum, J.L.; Tsimikas, S.; Golenbock, D.; Moore, K.J.; Tabas, I.; Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress. Cell Metab. 2010, 12, 467-482.

18. Cole, J.E.; Navin, T.J.; Cross, A.J.; Goddard, M.E.; Alexopoulou, L.; Mitra, A.T.; Davies, A.H.; Flavell, R.A.; Feldmann, M.; Monaco, C.; Unexpected protective role for Toll-like receptor 3 in the arterial wall. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011, 108, 2372-2377.

19. Steinman, R.M.; Cohn, Z.A.; Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J. Exp. Med. 1973, 137, 1142-1162.

20. Geissmann, F.; Gordon, S.; Hume, D.A.; Mowat, A.M.; Randolph, G.J.; Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. Nat Rev Immunol. 2010, 10, 453-460.

21. Auffray, C., Sieweke, M.H.; Geissmann, F.; Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2009, 27, 669–692.

22. Swirski, F.K.; Nahrendorf, M.; Etzrodt, M.; Wildgruber, M.; Cortez-Retamozo, V.; Panizzi, P.; et al.; Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. Science. 2009, 325, 612–616.

23. Dunay, I.R.; Damatta, R.A.; Fux, B.; Presti, R.; Greco, S.; Colonna, M.; et al. Gr1(þ) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen Toxoplasma gondii. Immunity. 2008, 29, 306–317.

24. Auffray, C.; Fogg, D.; Garfa, M.; Elain, G.; Join-Lambert, O.; Kayal, S.; et al.; Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. Science. 2007, 317, 666–670.

25. Shi, C.; Pamer , E.G.; Monocyte recruitment during infection and inflammation. Nat. Rev. Immunol. 2011, 11, 762-774.

26. Liu, K.; Victora, G.D.; Schwickert, T.A.; Guermonprez, P.; Meredith, M.M.; Yao, K. et al.; In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. Science. 2009, 324, 392–397.

27. Auffray, C. ; Fogg, D.K. ; Narni-Mancinelli, E. ; Senechal, B. ; Trouillet, C.; Saederup, N. et al. ; CX3CR1þ CD115þ CD135þ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. J Exp Med. 2009, 206, 595–606.

28. Darrasse-Jeze, G.; Deroubaix, S.; Mouquet, H., Victora, G.D.; Eisenreich, T.; Yao, K.H. et al.; Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. J Exp Med. 2009, 206:1853–1862.

29. Alvarez, D.; Vollmann, E.H.; von Andrian, U.H.; Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. Immunity. 2008, 29, 325–342.

30. Steinman, R.M.; Banchereau, J.; Taking dendritic cells into medicine. Nature. 2007, 449, 419-426.

31. Barreiro, O.; Martín, P.; González-Amaro, R.; Sánchez-Madrid, F.; Molecular cues guiding inflammatory responses. Cardiovasc Res. 2010, 86, 174-182.

32. Martín, P.; Del Hoyo, G.M.; Anjuère, F.; Arias, C.F.; Vargas, H.H.; Fernández-L, A.; Parrillas, V.; Ardavín, C.; Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. Blood. 2002, 100, 383-390.

32. Lambrecht, B.N.; Hammad, H.; Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. Immunity, 2009, 31, 412–424.

33. Ochando, J.C.; Homma, C.; Yang, Y.; Hidalgo, A.; Garin, A.; Tacke, F.; et al.; Alloantigenpresenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. Nat Immunol. 2006, 7, 652–662.

34. Monks, C.R.; Freiberg, B.A.; Kupfer, H.; Sciaky, N.; Kupfer, A.; Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. Nature. 1998, 39582-39586.

35. Fooksman ,D.R.; Vardhana, S.; Vasiliver-Shamis, G.; Liese, J.; Blair, D.A.; Waite, J.; Sacristán, C.; Victora, G.D.; Zanin-Zhorov, A.; Dustin, M.L.; Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. Annu Rev Immunol. 2010, 28, 79-105.

36. Montoya, M.C.; Sancho, D.; Vicente-Manzanares, M.; Sánchez-Madrid, F.; Cell adhesion and polarity during immune interactions. Immunol. Rev. 2002, 186, 68-82.

37. Martín-Cófreces, N.B.; Robles-Valero, J.; Cabrero, J.R.; Mittelbrunn, M.; Gordón-Alonso, M.; Sung, C.H.; Alarcón, B.; Vázquez ,J.; Sánchez-Madrid, F.; MTOC translocation modulates IS formation and controls sustained T cell signaling. J Cell Biol. 2008, 182, 951-962.

38. Sánchez-Madrid, F.; del Pozo, M.A.; Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. EMBO J. 1999, 18, 501-511.

39. Billadeau, D.D.; Nolz, J.C.; Gomez, T.S.; Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. Nat Rev Immunol. 2007, 7, 131-143.

40. Vicente-Manzanares, M.; Sánchez-Madrid, F.; Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. Nature Rev. Immunol. 2004, 4, 110-122.

41. de la Fuente, H.; Mittelbrunn, M.; Sánchez-Martín, L.; Vicente-Manzanares, M.; Lamana, A.; Pardi, R.; Cabañas, C.; Sánchez-Madrid, F.; Synaptic clusters of MHC class II molecules induced on DCs by adhesion molecule-mediated initial T-cell scanning. Mol Biol Cell. 2005, 16, 3314-3322.

42. Mittelbrunn, M.; Martínez del Hoyo, G.; López-Bravo, M.; Martín-Cofreces, N.B.; Scholer, A.; Hugues, S.; Fetler, L.; Amigorena, S.; Ardavín, C.; Sánchez-Madrid, F.; Imaging of plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells. Blood. 2009, 113, 75-84.

43. Zhu, J.; Paul, W.E.; CD4 T cells: fates, functions, and faults. Blood. 2008, 112, 1557-1569.

44. O'Shea, J.J.; Paul, W.E.; Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. Science. 2010, 327, 1098-1102.

45. Huse, M.; Quann, E.J.; Davis, M.M.; Shouts, whispers and the kiss of death: directional secretion in T cells. Nat Immunol. 2008, 9, 1105-11.

46. Stinchcombe, J.C.; Griffiths, G.M.; Secretory mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. Annu Rev Cell Dev Biol. 2007, 23, 495-517.

47. Mittelbrunn, M.; Gutierrez-Vazquez, C.; Villarroya-Beltri, C.; Gonzalez, S.; Sanchez-Cabo, F.; Gonzalez, M.A.; Bernad, A.; Sanchez-Madrid, F.; Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. Nat Commun. 2011, 2, 282.

48. Riol-Blanco, L.; Delgado-Martin, C.; Sanchez-Sanchez, N.; Alonso, C.L.; Gutierrez-Lopez, M.D.; Del Hoyo, G.M.; Navarro, J.; Sanchez-Madrid, F.; Cabanas, C.; Sanchez-Mateos, P.; Rodriguez-Fernandez, J.L.; Immunological synapse formation inhibits, via NF-kappaB and FOXO1, the apoptosis of dendritic cells. Nat Immunol. 2009, 10, 753-760.

49. Perez-Gracia, J.L.; Berraondo, P.; Martínez-Forero, J.; Alfaro, C.; Suarez, N.; Gurpide, A.; Sangro, B.; Hervas-Stubbs, S.; Ochoa, C.; Melero, J.A.; Melero, I. Clinical development of combination strategies in immunotherapy: are we ready for more than one investigational product in an early clinical trial? Immunotherapy. 2009, 1, 845-853.

50. Maldonado, R.A.; von Andrian, U.H.; How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. Adv Immunol. 2010, 108, 111-65.

51. Manicassamy, S.; Pulendran, B.; Dendritic cell control of tolerogenic responses. Immunol Rev. 2011, 241, 206-227.

MEDICAMENTA NON MELLA