



Sesión científica conmemorativa de los Premio Nobel 2015 en Fisiología o Medicina y en Química



Juan Ramón Lacadena Calero
Coordinador de la sesión
Sesión celebrada el 26 de noviembre de 2015
e-mail: jrlgbucm@bio.ucm.es

ORDEN DEL DÍA

Presentación:

“El Premio Nobel 2015 en Fisiología o Medicina”

“El Premio Nobel 2015 en Química. Reparación del daño genético: retorno a los primeros tiempos de la genética en la era genómica”

Excmo. Sr. D. Juan-Ramón Lacadena Calero
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Ponentes:

“Premio Nobel 2015 de Fisiología o Medicina. Jaque al dolor y muerte por parasitismos: homenaje a dos iniciativas formidables de salud”

Excmo. Sr. Antonio R. Martínez Fernández
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

“Premio Nobel de Química 2015. Genes reparadores del ADN”

Excmo. Sr. Manuel R. Benito de las Heras
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid

El Premio Nobel 2015 en Fisiología o Medicina

Juan-Ramón Lacadena Calero

El 5 de octubre pasado, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska decidió conceder el Premio Nobel 2015 en Fisiología o Medicina en una mitad conjuntamente a los doctores William C. Campbell y Satoshi Omura “por sus descubrimientos relativos a una nueva terapia contra las infecciones causadas por nematodos parásitos” y en la otra mitad a la Dra. Youyou Tu “por sus descubrimientos relativos a una nueva terapia contra la Malaria”.

Al día siguiente de la concesión del premio, recibí un correo del Profesor Antonio Martínez que me permito transcribir parcialmente. Decía así:

“Ha sido una grata sorpresa leer hoy que el Nobel de Fisiología o Medicina le ha sido concedida a los doctores W.C. Campbell y S. Omura artífices de los dos antiparasitarios, las avermectinas –derivados del antibiótico de *Streptomyces avermectilis*– Ivermectina, Doramectina, etc. activas frente a nematodos y artrópodos y a la doctora. china Youyou Tu en reconocimiento del aislamiento del último y más eficaz antipalúdico

procedente del extracto de *Artemisia annua*, la artemisina y derivados. Puedes suponer mi sorpresa y al tiempo mi alegría. Aunque han esperado mucho para semejante reconocimiento, el número de vidas y especialmente el número de años de vida sin salud liberados por estos fármacos, merecían este reconocimiento.”

Continuaba su escrito el profesor Antonio Martínez diciendo:

“Conozco personalmente a Williams C. Campbell, me ayudó en 1964 a realizar mi tesis doctoral (me envió separatas, técnicas y muestras gratuitas de tiabendazol...que había aislado e identificado como antihelmíntico... Coincidió más tarde en varios de los congresos organizados por la ICT (International Conference on Trichinellosis)... Vino a Alicante en 1988, con ocasión de la 8th ICT, etc....” En definitiva, está más que justificada la presencia como ponente del profesor Martínez para glosar las investigaciones galardonadas con el Premio Nobel 2015 en Fisiología o Medicina.

Premio Nobel 2015 de Fisiología o Medicina. Jaque al dolor y muerte por parasitismos: homenaje a dos iniciativas formidables de salud

Antonio R. Martínez Fernández

Corresponding Author: amf@ucm.es

An Real Acad Farm Vol. 81, N° 4 (2015), pp. 359-379

INTRODUCCIÓN

Pocas veces se ha concedido el premio Nobel a parasitólogos y no siempre con gran acierto. El primero en 1902 a Ronald Ross “por sus trabajos sobre la malaria, por como el agente entra en el organismo”... – no le acompañó en el galardón Giovanni Battista Grassi, el verdadero descubridor, el que experimentalmente demostró que mosquitos anofeles de los pantanos, transmitían el paludismo. Sí lo recibió en 1907 Charles Louis Alphonse Laveran que había descubierto previamente que era un protozoo el agente causante de la Malaria.

El tercer premio Nobel a un parasitólogo se concedió en 1926. Lo recibió el danés Johannes Andres Grib Fibiger por su hipótesis inflamatoria de la etiopatología del cáncer gástrico provocado por un nematodo espirúrido.

Otro Nobel con motivo parasitológico indirectos es el concedidos en 1927 a Julius Wagner-Jantegg por el tratamiento de la parálisis general e idiocia ocasionada por sífilis mediante la infección experimental con *Plasmodium vivax*. El parasitismo inducido y la hipertermia de los primeros abscesos palúdicos producían el efecto terapéutico. La infección parasitaria se trataba posteriormente con quinina. No había recidivas puesto que la infección se hacía a partir de sangre de un donante naturalmente infectado, es decir, con sólo esquistosomas y merozoitos hemáticos.

Justamente el año siguiente, 1928 se concede a Charles Jules Henry Nicolle, oficialmente por su descubrimiento de la transmisión del tifus exantemático por el piojo corporal (*Pediculus corporis*), pero también por su fructífera vida como microbiólogo práctico y parasitólogo, creador del medio de cultivo de *Leishmania* y descubridor del protozoo *Toxoplasma gondii* Nicolle et Manceaux 1909, en el roedor de laboratorio *Ctenodactylus gondi*; en los pobres gundís que posiblemente se infectaron con los gatos del animalario del Instituto Pasteur de Tunes, dirigido por Charles Nicoll, ya que libres en el desierto muy raramente se infectan con toxoplasma de modo natural.

En 1951, la concesión recayó en el gran investigador en parasitología tropical Max Theiler ” por sus iniciativas en el combate de la fiebre amarilla”. Con la perspectiva del tiempo, en este premio vemos también el homenaje al trabajo extraordinario de su padre Sir Arnold Thailer eminente microbiólogo y parasitólogo veterinario, emigrado desde Suiza a Sudáfrica, en honor del cual se

denominó el género *Theileria*, un apicomplejo parásito hemático de rumiantes, cuyo ciclo y transmisión estudió; gran limitante junto con *Trypanosoma brucei* de las producciones pecuarias en el Este africano.

Antes de la ocasión que ahora celebramos, sólo otros galardonados como el de Paul Herman Müller 1942 por el descubrimiento del insecticida DDT, rozan el campo general de la parasitología (1). Es de destacar que a pesar de las resistencias, el DDT, prohibido como pesticida por su impacto ambiental, sigue siendo válido como insecticida de contacto aplicado en el interior de las viviendas. Su eficacia es tan notoria que incluso selecciona las poblaciones de anofeles trasmisores de la malaria que no descansan tras la toma de sangre en el interior de las viviendas donde duermen las personas; vuelan al exterior liberándose así de la muerte que supone posar sus almohadillas plantares sobre las paredes y techos de las viviendas pintadas con DDT u otros preparados insecticidas como el de la empresa española Inesflay (2).

Es curioso resaltar, que también esta vez que el Nobel recae en parasitólogos sea también el paludismo y su terapia uno de los logros reconocidos.

Es curioso también que en 1997 uno de los galardonados en esta ocasión, el Dr. Campbell (3) sugiriera a los parasitólogos más estudios sobre la relación entre parasitismos y cáncer, al tiempo que salía en defensa del único Nobel 1926 a un helmintólogo. Hacia 1907, el Dr. Fibiger había observado la relación entre la infección de la rata por un nematodo que denominó *Gongylonema neoplasticum* Fibiger et Ditlevsen, 1914 (Nematoda, Spirurida) y un cáncer gástrico, lo que reprodujo experimentalmente, hazaña sin duda para su tiempo. El trabajo premiado fue duramente criticado posteriormente ya que en condiciones de alimentación correcta, con suficiente aporte de vitamina A, el nematodo no causaba más que transformaciones celulares precancerosas. Con la elegancia que le caracteriza indica Campbell que merece la pena volver sobre el tema pues hay nuevas evidencias relacionadas con parasitismos y cáncer como el sarcoma canino mortal ocasionado por *Spirocerca lupi*, un nematodo de la misma clase que el estudiado por Fibiger. Pedía con ello limpiar el honor mancillado de Fibiger; lejos estaba en su proverbial modestia de reclamar para sí el galardón que ahora le otorgan. Aunque no sea de momento el trastorno más evidente causado por los parasitismos, sí es cierto que otros helmintos como *Opisthorchis viverrini* y otros opistórcidos parásitos hepáticos, intervienen activamente en la alta prevalencia

de colangiocarcinomas en las áreas endémicas del sudeste asiático (4). Además, mientras redactaba esta revisión/homenaje al nobel de los parasitólogos, aparece en *New England Journal of Medicine* un trabajo inquietante, que cambia conceptos, al asociar parasitismo con cáncer: describe la diseminación metastática de un cáncer de células no humanas; de un cáncer del cestodo *Hymenolepis nana* en un paciente inmunocomprometido con SIDA (5).

En esta ocasión el Nobel de Fisiología o Medicina premia a dos iniciativas terapéuticas antiparasitarias, la del antihelmíntico ivermectina (6), un ecdisocida (7), y la del antimalárico artemisinina.

PRIMERA PARTE DEL NOBEL 2015. IVERMECTINA

La primera mitad a “W.C. CAMPBELL y S. Ōmura for discovering avermectin, *“the derivatives of which have radically lowered the incidence of river blindness and lymphatic filariasis, as well as showing efficacy against an expanding number of other parasitic diseases”*”.

Ivermectina 1. Descubrimiento

El descubrimiento de este grupo de antibióticos antihelmínticos se realizó en 1975 en el Instituto Merck para Investigaciones Terapéuticas MSDRL (Merck, Sharp & Dohm Research Laboratory), Rahway, New Jersey, USA, en el Departamento de “Descubrimiento de Nuevos Fármacos”, dentro del programa liderado por el Dr. W.C. Campbell de cribado de nuevos compuestos para uso veterinario. Gracias a la eficacia del modelo experimental de infección controlada de ratones con el nematodo *Heligmosomoides polygyrus* (sin. *Nematospiroides dubius*) se detectó la actividad del caldo de cultivo de uno de los *Streptomyces* aislados y enviados a Merck por el Instituto Kitasato dirigido por el Prof. Sitoshi Ōmura, dentro de un programa de colaboración financiado por Merck. Entre 50 aislamientos crecidos, el caldo donde se había cultivado la cepa OS-3153, aunque muy tóxico en el primer ensayo para los ratones hospedadores, poseía una actividad nematocida radical. Repetido el ensayo tanto con el medio de cultivo como con el micelio lavado no se observó toxicidad alguna conservándose la actividad. Había nacido la droga que denominaron C-076, una mezcla de antibióticos con actividad antihelmíntica. La bacteria productora de esta droga había sido aislada de una tierra recogida en el campo de Golf Kawana, a la orilla del mar, cerca de la ciudad turística de Ito en la prefectura Shizoka, situada frente al Pacífico en el sureste de Honsū.

El programa de búsqueda de nuevos principios de origen natural procedentes de fermentaciones de microorganismos, bacterias y hongos principalmente, contaba con los modelos parasitológicos de terapéutica experimental. Este laboratorio creado entre otros por el eminente parasitólogo Ashton C. Cuckler (1910-2000) (8) y seguido por W.C. Campbell tenía en su haber el desarrollo de coccidiostáticos tan útiles como

sulfaquinoxalina, nicarbacina, amprolium, etopavato, etc. y muy particularmente los antihelmínticos Thiabendazol y Cambendazol los primeros bencimidazoles, así como el fasciolicida rafoxanida. Pero además, de la fermentación de microorganismos procedían los antibióticos ionóforos de tanto éxito frente a coccidios que por este tiempo se desarrollaban. Un laboratorio con el bagaje histórico, los conocimientos y las herramientas adecuadas para detectar moléculas antiparasitarias activas.

A partir de la gran actividad manifestada por la cepa C-076 frente a nematodos se formó en el centro de investigación de Merck un extenso equipo de químicos, biólogos, parasitólogos, microbiólogos y veterinarios que aislaron e identificaron, guiados por el ensayo *in vivo* del laboratorio de Campbell, los componentes activos frente a nematodos parásitos, excretados por la cepa. Casualmente, se observó también la actividad de estos antibióticos frente a artrópodos: primero frente a ácaros, los que espontáneamente infectaban a uno de los conejos utilizados en los ensayos farmacológicos, sobre insectos, más tarde, ya que al ensayar la actividad nematocida en caballos naturalmente infectados con pequeños estréngilos, el tratamiento, ocasionó primero la expulsión masiva de las larvas parásitas de un múscido (gasterófilus, rednos) que infectaban también a los caballos utilizados como modelo. La droga del cultivo de la cepa C-076 era activa frente a nematodos y artrópodos. Por esta causa, en el primer trabajo en que se denuncia el descubrimiento del nuevo antiparasitario (9) denominaron a estos antibióticos como avermectinas (**a**, sin -anti, **verm** de la raíz latina *vermis-is*, vermes, más **ect** de *ecto*, externo, diminutivo de ectoparásito y el sufijo **in**, sustancia; es decir, avermectin, sustancia anti endo y ectoparásitos, endectocida, neologismo que se acuña para significar la actividad frente a endo y ectoparásitos). Se describe en este trabajo pionero, mediante ensayos controlados de actividad realizados en ovejas, vacas, perros, gallinas y ratones experimentalmente infectados, que las avermectinas extendían su actividad al menos a ocho familias de nematodos: *Filariidae*, *Oxyuridae*, *Trichinellidae*, *Trichuridae*, *Heterakidae*, *Metastrongylidae*, *Trichostrongylidae* y *Strongylidae*, tanto frente a adultos como frente a estados larvarios, intra y extra-intestinales hipobióticas o activas, de especies tanto susceptibles como resistentes a bencimidazoles. Había nacido una nueva y formidable herramienta antiparasitaria. A esta primera publicación del equipo liderado por WC Campbell sobre actividad antiparasitaria se sucederán otras varias (10), (11), (12) y especialmente el libro editado en 1989 (13), donde a través de 21 capítulos firmados por investigadores de MSDLR se desgranar los diversos aspectos del descubrimiento, producción, actividad, farmacología y el uso en medicina veterinaria y humana, así como pesticida de estos antibióticos. El relato del descubrimiento del fármaco lo describe entre otros el propio autor William C. Campbell (14) y (15). El laboratorio del Dr. Campbell que había desarrollado los primeros grandes antihelmínticos después de las piperazinas, contaba con los modelos

parasitarios de terapéutica experimental adecuados, tenía la capacidad previa de búsqueda de un antiparasitario y lo encontró.

En la publicación conjunta de investigadores de Merck y Kitasato (16) se denominó la especie productora de estos antibióticos antiparasitarios como *Streptomyces avermitilis* Burg et al 1979. El epíteto *avermitilis* no gustó demasiado a alguno de los firmantes de la primera publicación por lo que posteriormente, en un trabajo (17), por otra parte meritorio, en el que por técnicas de taxonomía molecular sitúan a la nueva especie dentro del contexto de los estreptomicos conocidos, proponen re-denominar a la especie como *S. avermectinius* Takahashi et al 2002 ya que *avermectinius* significa perteneciente a, procedente de avermectina. El nombre es efectivamente más correcto, pero si se respeta la Ley de la Prioridad de los códigos de nomenclatura, se convierte en un sinónimo tardío. El nombre válido es el primero, *S. avermitilis*.

Ivermectina 2. ¿Dudas interesadas?

La concesión del Nobel 2015 vino a zanjar la disputa larvada entre el potente grupo japonés y el Dr. W.C. Campbell indefenso jubilado hace 25 años de Merck & Co. A raíz de la concesión en 2014 a Satoshi Ōmura del premio Gairdner (*Gairdner Global Health Award*) “por el descubrimiento del microorganismo *Streptomyces avermitilis* y su actividad biológica extraordinaria que, en colaboración con Merck, condujo a la identificación de avermectinas y el desarrollo de ivermectina, un tratamiento altamente eficaz para muchas enfermedades parasitarias, así como al consorcio global dirigido a eliminar la ceguera de los ríos”, parecía que todo el mérito de la existencia de este “fármaco maravilloso” se debía al laboratorio japonés (18), (19), (20). Al paso salieron los parasitólogos Molyneux y Taylor 2015 (21) reivindicando la real autoría del descubrimiento por William C. Campbell y lo hicieron a tiempo. El Nobel 2015 de Fisiología o Medicina vino a terminar satisfactoriamente esta cuestión.

El trabajo del aislamiento de los principios activos, pautado en el tiempo por el ritmo biológico de la infección experimental con *H. polygyrus*, ya que cada molécula aislada se pasaba por el modelo *in vivo*, condujo a la identificación de un conjunto de lactonas macrocíclicas

con un residuo disacárido, las avermectinas naturales A₁, A₂, B₁ y B₂. Los compuestos A tienen un **CH₃** en posición 5 y los B un **H** con un doble enlace entre los carbonos 22-23. Los cuatro compuestos principales se dividen a su vez en ocho componentes, véase Figura 1, adaptada a partir de la original de Fisher y Merozik 1989 Capítulo 1:2¹³. Los compuestos mayoritarios A_{1a}, A_{2a} y B_{1a} y B_{2a} cuentan con un butil secundario en el **C25**. Los restantes, minoritarios, están en proporciones entre 1 y 20 %.

La selección genética tras un programa de mutación y modificaciones en el medio de cultivo, optimizó la producción de la molécula **nativa B_{1a}** con mayor actividad frente a nematodos y artrópodos (ácaros e insectos). A partir de esta molécula un proceso químico que tiene por objetivo modificar el doble enlace entre los carbonos 22-23, produce una mezcla de dos dihidroanálogos con mejores características toxicológicas que la molécula nativa. Esta mezcla semisintética de dos moléculas homólogas es Ivermectina, (22,23- dihidroavermectina: con > 80% de **B_{1a}** y < 20 % de **B_{1b}**). También la molécula nativa cuenta con cualidades suficientes para su comercialización directa como endectocida bajo la denominación significativa de Abamectina (¿del arameo *abba*, padre?).

Así nació una nueva familia de fármacos antiparasitarios, con diferente mecanismo de acción que los hasta entonces conocidos, con amplísimo margen de seguridad, aplicables por vía oral, parenteral y cutánea que desde 1981 en que salieron al mercado como medicamentos de uso veterinario, se convirtieron en el específico más empleado en este campo, con ventas anuales de alrededor de 1000 millones de dólares. Salvo los trematodos y cestodos, que son los otros dos grupos que cuentan con abundantes parásitos de los vertebrados, la práctica totalidad de los macroparásitos, son susceptibles de eliminación o control con estos antibióticos. Las milbemicinas, otras lactonas macrocíclicas de estructura similar, descubierta independientemente, sin el disacárido en el carbono 13 (22), fueron identificadas primero como acaricidas y como nematodocidas más tarde una vez visto el éxito en el mercado veterinario de la Ivermectina (IVM).

Ivermectina 4. Otras aplicaciones

Se exploran además otras capacidades ya conocidas o potenciales. Por ejemplo, su contribución al control del paludismo a través de las campañas de control de la oncocercosis – véase más adelante - ya que hasta dos semanas después del tratamiento estándar con IVM los mosquitos transmisores de la malaria (*Anopheles gambiae* en el área de la observación) mueren tras picar a la persona tratada (26), (27). Lo propio ha sido observado entre los flebotomos transmisores de *Leishmania*, lo que podía tener importancia para aquellas áreas geográficas que por padecer Oncocercosis y estar sometidas al tratamiento masivo periódico de la población con IVM padecen también alguna de las leishmaniosis, Sudan del Sur, Etiopía, etc. Los Phlebotomos que pican durante un tiempo de alrededor de una semana tras el tratamiento con IVM no mueren de inmediato sino que se acorta significativamente su vida; el efecto parasiticida directo es poco significativo y sólo sobre los promastigotes (28). Esta actividad indirecta del tratamiento con IVM adquiere mayor significado en el control de la enfermedad del sueño ya que las vacas tratadas con IVM, prescrita para controlar sus parasitismos gastrointestinales, disminuye significativamente la supervivencia de las glosinas (moscas tsetse) (29), lo que desafortunadamente aun no es significativo hasta que no se seleccionen más razas bovinas tripanorresistentes. Esta actividad antivectorial es más difícil que se extienda a la lucha contra *Fasciola hepática* o *Schistosoma spp.*, pues aunque la IVM tiene capacidad molusquicida, afortunadamente por otra parte, tiene escasa solubilidad en el agua, fijándose al sedimento. La baja solubilidad en el agua y la fuerte fijación al suelo limitan sus efectos letales sobre los artrópodos (larvas de coleópteros y múscidos) que contribuyen a disponer y eliminar las heces de los animales en el campo, vía por la que se elimina íntegra la mayoría del fármaco en los animales tratados. Afortunadamente no actúa sobre hongos ni es bactericida, salvo para rickettsiales – bacterias parásitos endocelulares que no están en el suelo- por lo que la transformación ecológica de las heces, especialmente las boñigas de vaca, aunque más lentamente, dependiendo de la temperatura ambiente, también se produce (30), deshaciéndose con ello la alarma de “un mundo aboñigado” con el que se llamó en principio la atención (31).

Se sugiere que la IVM puede, sola o asociada a otros antimaláricos, jugar un importante papel futuro en el control de la malaria ya que inhibe, a concentraciones submicromolares, el transporte desde el citoplasma al núcleo de proteínas esenciales para la supervivencia del parásito dentro del eritrocito. Este transporte está mediado por las carioferinas α/β (importinas α/β) dímeros que cargan con proteínas etiquetadas con las SRPs (partículas-señal de reconocimiento) y las pasan a través de los poros nucleares al interior del núcleo, reciclándose al citoplasma a continuación. La IVM bloquea este proceso, bien impidiendo la dimerización de las carioferinas o bien la entrada de las SRPs a través de los poros nucleares (32). En

otro plano, este mismo mecanismo, en este caso en la célula hospedadora, puede afectar al ciclo endocelular de virus tales como VHI-1 y virus del Dengue y otros flavivirus. En el virus VIH-1 a través de las VHI-integrasa y en los cuatro serotipos de Dengue a través de la polimerasa NS5 (proteína no estructural 5) (33).

Otro capítulo importante de las futuras aplicaciones de IVM es su capacidad antitumoral primeramente observada en leucemias (34), atribuida a la hiperpolarización de la membrana celular de la célula tumoral ocasionada por la entrada de iones cloro con aumento de la actividad de especies reactivas de oxígeno (ROS). Asimismo parece que sinergiza la acción de fármacos antitumorales activos por incremento de ROS. Este trabajo pionero está siendo seguido por numerosa aportaciones de otros grupos estudiando la actividad antitumoral experimental en cáncer de cuello de útero y leucemia crónica.

Algunas de las aplicaciones promisorias para controlar, paliar o tratar enfermedades neurológicas: epilepsia, Parkinson, drogodependencias, incontinencia, depresión, etc., etc. como las que describe la patente de Costa y Diazgranados en 1993 (35), no han sido llevadas, en lo que conozco, a la práctica clínica. Asumen que IVM en el sistema nervioso humano actúa más como antagonista que agonista del GABA; si así fuese, el campo de aplicaciones del fármaco y sus aliados se expandiría. En relación con esta hipótesis, sí es cierto que en la profilaxis de los SIDA avanzados se recomendó en ocasiones la inclusión de IVM (0,2 mg/kg semanal) como profilaxis de escabiosis, estrongiloidosis y contribuir al control del estrés, ansiedad y depresión. En sentido contrario, en la exquisita prevención de la intoxicación por ingreso masivo de IVM al SNC hay sólida incompatibilidad medicamentosa con los inhibidores de proteasas de VIH, así como con las estatinas, varios de los bloqueadores de los canales de calcio, glucocorticoides, lidocaína y benzodiacepinas. La razón básica de estas incompatibilidades estriba en que los inhibidores de la oxidasa hepática de xenobióticos CYP3A4 inhiben frecuentemente también la glicoproteína de transporte (glicoproteína-P) que en los endotelios de la barrera hemato-encefálica impide el paso a la IVM.

Ivermectina 6. Desarrollo farmacéutico y mercado

Su campo, fructífero por otra parte, se sigue ciñendo al control de los parasitismos por nematodos y artrópodos, con excepciones, tanto de los animales domésticos, su mayor mercado, como del hombre.

Lo que ha sido extraordinario, ante las perspectivas de mercado, es el escalado farmacéutico industrial de estos antibióticos antiparasitarios. La fusión endémica entre empresas farmacéuticas deja el mercado de estas lactonas macrocíclicas, en los momentos actuales, en tres únicas compañías: Merck & Co., Zoetis (recientemente separada de Pfizer) y Novartis. A la primera empresa pertenecen los medicamentos en sus diversas presentaciones por vía de administración y especie, cuyos principios activos son *ivermectina* para uso veterinario y humano, *abamectina* para uso veterinario o como pesticida y *emamectina*

benzoato como pesticida. Zoetis, por su parte, comercializa moléculas derivadas de avermectina tales como *doramectina* para uso veterinario como endectocida y *selamectina*, molécula puente entre avermectinas y milbemicinas, también para uso veterinario. Por otra parte, lo hace también con la milbemicina B molécula semisintética de la nemadectina antibiótico producido por *Streptomyces cyano-griseus* (originariamente por American Cyanamid, 1980) como *moxidectina* para uso veterinario. Una tercera empresa, en este caso europea, Novartis- fruto de la fusión de Ciba Geigy y Sandoz -, produce, procedente de la fermentación de otra especie de *Streptomyces hygroscopicus var areolacrimosus*, *milbemicina-oxima* también de uso veterinario.

Ivermicina 7. El uso en la especie humana

7.1 *Oncocercosis* (ceguera de los ríos)

En otro lugar y ocasión revisaremos el amplísimo campo del uso de ivermectina, derivados y competidores en las especies animales, especialmente en el control de la tricostrongilosis, strongilosis, metastrongilidosis, etc., así como sarnas, hipodermosis y otras miasis, etc., etc.

El uso humano surgió como idea de W.C. Campbell al ver los resultados de los ensayos de evaluación de actividad de IVM sobre équidos en la granja de investigación de Merck en Sprindale, AR (36). Además de la extraordinaria actividad frente a las larvas emigrantes y los adultos de los grandes estróngilos, pequeños estróngilos y oxiúrido, así como frente a gasterófilos (*Gastrophilus intestinalis* y *G.nasalis*), comprobaron que dosis tan pequeñas como 0,1 mg/kg disminuía hasta la eliminación la presencia de las microfilarias de *O. cervicalis*, una filaria específica de los équidos, con la particularidad añadida de que no se producían reacciones inflamatorias violentas como podía ocurrir con otros microfilaricidas como la dietil-carbamazina. Otras filarias: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* y *B.timori*, *Onchocerca volvulus*, entre las más importantes, parasitan al hombre causando enfermedades debilitantes y deformantes: elefantiasis y ceguera de los ríos. Campbell redactó un informe sugiriendo el empleo de la nueva droga para combatir y controlar las filariosis humanas. La dirección de la empresa aceptó la idea y dispuso la financiación adecuada.

El médico Mohammed A. Aziz director de investigaciones clínicas de Merck fue encargado de dirigir la evaluación clínica humana del uso de IVM frente a *Onchocerca volvulus*, el agente causal de la oncocercosis o ceguera de los ríos, una enfermedad extendida por toda África intertropical, Yemen y Centro y Suramérica. No había en el tiempo estadísticas fiables de la prevalencia del proceso pero sí el conocimiento de la escandalosa proporción de adultos ciegos por esta enfermedad en áreas infectadas, pobres y empobrecidas también por la expulsión que la enfermedad causaba de las tierras de regadío más fértiles y productivas. Los recursos terapéuticos contaban con grandes dificultades, pues, aunque la dietilcarbamazina (Hetrazan, una piperazina) es

un microfilaricida eficazísimo, su aplicación ocasiona fuertes respuestas inflamatorias - reacción de Mazzoti -, que agravan las lesiones oculares. El mejor recurso válido por entonces era la lucha con insecticidas frente al vector, las especies antropófilas de *Simulium* conocidas como moscas negras. Así se hizo usando DDT hasta su prohibición y fosforados más tarde, con los que se logró cortar la transmisión en Kenia y disminuirla en áreas de África occidental subsahariana, pero que resultó harto difícil e inoperante en otras áreas. Una idea de la prevalencia, en los datos de OMS de 2010 (37) para el año 1995 era de unos 42 millones de personas infectadas, con 385.000 ciegos, 944.000 con visión limitada, 29,7 millones de personas con prurito grave.

Tras las primeras aplicaciones positivas de ensayo clínico Fase I realizados por el Dr. Aziz, él mismo dirigió y estimuló una serie de ensayos repetidos de Fase II y III (38) en colaboración con la OMS gracia al convenio OMS/Merck de 1982, realizados en años sucesivos en: Ghana, Guatemala, Costa de Marfil, Liberia, Malí, Senegal y Togo. Estos ensayos demostraron que una dosis anual única de 150 a 200 µg/kg de IVM lleva a cero, pasado el primer mes, la densidad de microfilarias y mantiene niveles bajos de microfilaremia dérmica durante los 12 meses post-tratamiento. La IVM no es macrofilaricida, las hembras adultas del nematodo continúan vivas aunque con capacidad reproductiva disminuida.

Muchos otros grupos y en diferentes áreas endémicas de la enfermedad confirmaron la eficacia y seguridad del uso de la IVM frente a las microfilarias de *Oncocerca* y sus consecuencias. Estaba claro que el ciclo biológico de este parásito se podía cortar definitivamente a través de tratamientos anuales con una sola dosis de IVM. Consecuentemente, para la aplicación segura registró en Francia, en 1987 IVM para uso humano bajo el nombre de Mectizan®. El registro en USA, como Stromectol® lo autoriza la FDA nueve años más tarde para el tratamiento de la strongiloidosis y oncocercosis.

7.2. *Oncocercosis*. El altruismo imprevisto de Merck & Co.

Estaba claro que IVM era la herramienta adecuada para combatir y erradicar la ceguera de los ríos pero alguien tenía que proveer los fondos para producirla y distribuirla a precio mínimo, o gratis y responsabilizarse de las consecuencias de los efectos adversos que pudiera ocasionar. Merck solicitó financiación a diversos organismos: OMS, USAID (Agencia de Estados Unidos para el Desarrollo Internacional), el Departamento de Estado y el Congreso de los Estados Unidos, con el apoyo de los más influyentes senadores del momento, pero nadie respondió positivamente. Por todo esto, en un gesto de extraordinaria repercusión mundial, el CEO (Presidente y ejecutivo en jefe) de Merck & Co. Dr. Pindaros Roy Vagelos decretó en este mismo año 1987 que Merck “regalará a quien la necesitare, tanta ivermectina como sea necesaria, durante el tiempo que sea necesario” (39), (40).

Poner en práctica este gesto, es decir llevar hasta el

paciente del lugar más remoto de África y América los pequeños comprimidos de Mectizan, para aplicarlos a la dosis adecuada del modo más sencillo, evaluando el número de comprimidos a ingerir de acuerdo con la altura, medida con una colección de varas estándar, sin intervención médica, por un vecino de la comunidad, instruido al efecto como colaborador de la lucha contra la enfermedad, supuso concertar muchas organizaciones: OMS, Ministerios de Salud estatales, Banco Mundial, Grandes fundaciones, ONGs... y especialmente las organizaciones locales y los voluntarios colaboradores. Relatémoslo, merece la pena.

Merck y la OMS afrontaron el reto que significó fabricar, llevar y distribuir Mectizan a millones de personas en los 35 países del área de dispersión de la enfermedad. A este fin, en 1988, Merck creó un Comité de Expertos para Mectizan, un grupo independiente de expertos en medicina tropical y salud pública. Este grupo analizaba y juzgaba las solicitudes y programas concretos, con duración mínima de tres años, ampliado más tarde a cinco, de las ONGs, Ministerios Nacionales de Salud y agencias locales encargados del suministro gratuito de la medicina. Hasta la fecha ha dado el visto bueno a proyectos terapéuticos sobre los focos endémicos de 35 países de África central, Yemen e Iberoamérica.

En 1974 la OMS había creado el programa de control de la oncocercosis (OCP) financiado por las agencias de Naciones Unidas UNDP (para el desarrollo) y FAO (para la agricultura y alimentos), así como el Banco Mundial, destinado a los 11 países del África occidental: Benín, Burkina Faso, Costa de Marfil, Ghana, Guinea Bissau, Guinea, Mali, Níger, Senegal, Sierra Leona y Togo. La lucha inicial fue exclusivamente frente al vector, con insecticidas. Desde 1987 en que se implantó la aplicación de IVM, se hizo combinando ambas medidas o sólo con IVM. Su éxito lo demuestra el hecho que para el 2002 se había cortado el ciclo de infección vector/hombre (*Simulium damnosum* s.lat./ *Oncochercha volvulus*/hombre), salvo en Sierra Leona, por la guerra endémica que padecía.

En 1988, Merck estableció un convenio de colaboración con la organización político-benéfica Centro Carter en Atlanta, transfiriendo a ésta una parte del soporte administrativo y el seguimiento, evaluación, progreso y dificultades de los programas en ejecución para las américas y la elaboración de nuevos programas.

En 1990 se creó la estructura regulatoria MDP (Merck MECTIZAN® Donation Program) encargada de aprobar la entrega de ivermectina a las ONGs, órdenes religiosas y demás servicios sanitarios oficiales o benéficos. El Secretariado del programa de donación MEC / MECTIZAN aprueba los proyectos de aquellas ONGs que demuestren su establecimiento en el terreno, sus medios adecuados de trabajo y se comprometan en proyectos de al menos cinco años de duración. Aprobado el proyecto Merck a través de su Office of Contributions, se encarga de los trámites logísticos desde la fábrica en Europa al lugar de aplicación.

En los 19 países del Centro y Este africano, con oncocercosis en principio menos patógena, la llamada forma selvática, y aquellos con baja endemicidad, excluidos de la OCP, sólo las ONGs mediante convenios particulares con Merck fueron realizando programas locales de control. Las ONGs, y órdenes religiosas fundamentalmente de la Iglesia Católica, continuaron con esta labor humanitaria a pesar de las guerras y rivalidades en los países afectados. Su labor fue y es encomiable; allanaron el camino, enseñaron como diagnosticar y prevenir, y poco a poco, en el transcurrir del tiempo lograron que su actividad fuera asumida por las organizaciones locales permanentes. Y continúan en labores de educación sanitaria, difusión de información, amén de supervisión y crítica de la gestión incompleta o incorrecta.

En 1994 el Programa de Desarrollo de Naciones Unidas (UNDP) el Banco Mundial y el TDR (programa especial de investigación y formación en Enfermedades Tropicales de la OMS) modificaron la ejecución final el Programa de Control de Oncocercosis, instaurando el sistema CDTI (tratamiento con IVM realizado directamente por la comunidad, por la aldea y en la aldea). Los propios afectados organizan el tratamiento dirigido por un monitor local adiestrado al efecto. No se lo impone un médico, un extranjero de lengua extraña, es un igual que conoce y realiza el modo de aplicación, el tiempo y la dosis adecuada y a las personas. Su éxito ha sido rotundo ya que así se ha llegado a los lugares más apartados, con peores accesos, sin alterar la cotidianidad de su vida y costumbres. Al éxito del programa contribuyó también el boca a boca favorable al tratamiento bianual o trimestral – según el grado de prevalencia – ya que las pastillas hacen que la gente se sienta mejor, expulse sus parásitos, -- los áscaris, ancilostomas y tricúridos se observan perfectamente en las heces --, y los varones ven incrementada su libido, lo que no se sabe si es real o leyenda. Por otra parte, especialmente en la población escolar, la desparasitación que supone el tratamiento preventivo activo también frente a infecciones con *Trichuris trichiura* y/o ancilostómidos, revierte el retraso en el crecimiento físico e intelectual producido por el parasitismo; aumenta la asistencia al colegio y el rendimiento escolar. Además de estas mejoras indirectas, la población aprecia las directamente atribuibles a la falta de microfilarias emigrando en la dermis: la reducción drástica del prurito, de las erupciones cutáneas, inicio de oscurecimiento de las manchas blanquecinas de las áreas de piel reiteradamente rascadas hasta ocasionar rozaduras y cicatrices despigmentadas, del aumento de la elasticidad de la piel y el subsiguiente mejor aspecto, como de rejuvenecimiento y lo que es más importante, la mejora en la agudeza visual. Además, un sencillo diagnóstico de inmunocromatografía que detecta la presencia de antígeno circulante sirve de control, sin biopsia dérmica, de la eficacia. Al tiempo, permite la elaboración del mapa real, tanto del avance del control como de circunstancias adversas tales como: la incompatibilidad con las

infecciones altas por *Loa loa*, el establecimiento de resistencias o el retroceso en el control.

A partir de 1995 se extendió a los 19 países (41) fuera del OCP el sistema CDTI y se englobaron todas las actividades de control bajo un único programa, APOC (1995-2015) (programa africano para el control de la oncocercosis, hasta 2015). De este modo el programa se extendió a alrededor de 120 millones de personas, suministrando los beneficios relatados y alrededor de 40.000 cegueras menos por año. El objetivo principal del programa es establecer el tratamiento con IVM de toda la población, al menos una vez al año. El programa además de geolocalizar los focos endémicos dispersos de 20 países con prevalencia menor, ha realizado las campañas de tratamiento en los 16 países con mayor incidencia – alrededor de 71,5 millones de personas bajo riesgo-.

El éxito del sistema CDTI ha servido para ampliarlo a otras actuaciones sanitarias integrales como la filariosis linfática, esquistosomosis, y la prevención del paludismo con mosquiteros impregnados de insecticidas o la aplicación preventiva, estacional de un complemento de hierro, vitamina A y un antipalúdico.

La IVM actúa lentamente y en colaboración con el sistema inmune con lo que la liberación del simbiote bacteriano *Wolbachia* a la sangre después del tratamiento es también paulatino y mejor tolerado. Al parecer es *Wolbachia* la causante de la hiper-respuesta inflamatoria que agrava las lesiones oculares y dérmicas. Esta bacteria es sensible a las tetraciclinas y la doxiciclina, excelente antipalúdico también, puede prevenir las respuestas indeseadas postratamiento (42).

A través de los años de tratamiento masivo de la población, nuevas zonas donde se interrumpió el ciclo quedan libre de infección, se recuperan tierras fértiles que habían sido abandonadas, se cambia la estructura social de las comunidades. Hacia el 2002 en todos los países bajo el programa APOC, salvo Guineas Bissau y Sierra Leona con guerra casi continua y Ghana, se logró interrumpir la transmisión, con lo que más de 40 millones de personas quedaron libres de infección, 600.000 ciegos menos, 18 millones de niños nacieron en una tierra donde ya no van a ser infectados de *Onchocerca* y ciegos o discapacitados de mayores. Además sus padres tienen más medios de vida al recuperar para el cultivo miles de hectáreas fértiles abandonadas.

Hoy más de 1000 millones de gentes han sido tratadas desde el comienzo del programa, produciéndose todavía la aplicación a 80 millones de personas en África, Hispanoamérica y Yemen, gracias a lo cual la ceguera por oncocercosis ha desaparecido y grandes regiones de América y África se han declarado ya libres de la enfermedad (43), (44).

El programa APOC se diseñó para concluir en el 2015, lo que ya no es posible por lo que se ha ampliado hasta el 2025, es decir se necesita continuar con el esfuerzo. Se erradicó en dos de los grandes países con desierto y sabana, Mali y Senegal, en el resto la lucha continúa y su éxito dependerá de la continuidad del programa, de la

financiación que lo permita y del avance en los métodos de diagnóstico, de la educación sanitaria y del progreso económico

7.4 *Ivermectin y filariosis linfáticas*

Desde 2008, en colaboración con GSK (Glaxo Smith-Kline Beechan) el objetivo se amplió al control simultáneo de la Filariosis linfática, tratándose unos 80 millones de personas/año y acumulándose ya por encima de 304 millones de tratados con ivermectina y albendazol, a través también del MDP. El ejemplo de la asociación para el tratamiento gratuito de las enfermedades tropicales desatendidas, incita a otras compañías, formándose una red cooperativa que está reduciendo el azote de los parasitismos en los países más pobres de la tierra.

7.5 *Ivermectina en Iberoamérica*

En Iberoamérica, la erradicación de la oncocercosis se abordó de modo diferente, dirigido de modo eficaz por la más antigua de las organizaciones internacionales de salud, la Organización Panamericana de salud (OPS, PAHO en idioma inglés) fundada en 1902, que es el representante regional de la OMS. Los programas de control y eliminación de la oncocercosis en América (OEPA), planificaron la interrupción del ciclo de transmisión de *Oncocerca* para el 2015, objetivo logrado en todo el territorio, salvo en el área Sur de Venezuela/Norte de Brasil. La estrategia seguida, como en África, fue el tratamiento masivo con IVM al menos dos veces por año a todas las comunidades con oncocercosis endémica, cubriendo aproximadamente el 85 % de la población señalada. El agente ejecutivo de los proyectos fue el Centro Carter y el donante Merck a través del MDP (*Mectizan donation program*) más una serie de entidades colaboradoras: USAID (*US Agency for International Development*), *Lions Club*, los CDCs (*USA Centers for Disease Control and Prevention*), Fundación Bill & Melinda Gates, etc.)

Colombia y Ecuador fueron los primeros en cortar la transmisión en 2007 y 2009 respectivamente, certificándose la eliminación en el 2013 y 2014. México y Guatemala lograron cortar la transmisión en 2011. En este 2015 se acaba de certificar la eliminación total en México (45). La transmisión se detuvo primero en 11 focos de los 13 detectados. Persiste sólo en dos focos, en Venezuela y Brasil, con los semi-nómadas Yanomani, habitantes en la selva a uno y otro lado de la frontera, lo que es una dificultad añadida. Hay un acuerdo diplomático suscrito entre ambos países para forzar el tratamiento en masa de los Yanomani (46). Es realmente difícil: las poblaciones son muy pequeñas, cambian de lugar cuando agotan los recursos renovables, el área es muy extensa y sólo asequible mediante canoas. Además, el tratamiento no cuenta con la buena aceptación que tiene en África. De nuevo, el esfuerzo de Merck merece un cálido aplauso: desde su inicio en 1989 se ha suministrado a la población bajo riesgo americana más de 13 millones de tratamientos.

Ivermectina 8. Limitaciones

La IVM ha sido un gran regalo en todos los sentidos y sólo la oscurecen un par de circunstancias. Por una parte el temor a que surjan resistencias, por otra, los raros pero graves casos aislados de efectos secundarios graves y mortales cuando se tratan personas simultáneamente infectadas con *Loa loa*. La resistencia ha comenzado a observarse y se manifiesta por la selección genética de respuesta consistente en el aumento de frecuencia del gen de la tubulina que confiere también resistencia a otros antihelmínticos (47). *Loa loa* es una antigua filaria patrimonial del hombre, su área geográfica es exclusivamente del trópico boscoso centroafricano, coincidiendo con el área del tábano hospedador intermediario y transmisor. No hay de momento una hipótesis sólida sobre el mecanismo de esta incompatibilidad, sí únicamente que se produce en individuos con carga alta de microfilarias de *Loa* – 10-15.000 microfilarias/mL de sangre -. Ésta circunstancia se da solo en los super-portadores típicos de muchos parasitismos - piojos, tricuris ... - en los que la toda la población tiene una carga parasitaria leve, salvo unos pocos, emparentados, genéticamente adecuados, que soportan la mayoría de la carga. La detección de estas personas es fundamental para evitar los efectos colaterales, tanto a estas personas como a la campaña de control y erradicación de la oncocercosis (48).

Breve curriculum de los protagonistas de la ivermectina premiados

William Cecil Campbell

William Cecil Campbell, firma Bill, nació en Derry, y creció en Donegal en el noroeste de Irlanda, en 1930, tercer hijo de R.J. Campbell comerciante, proveedor de productos para granja, suministrador de electricidad a la localidad. Asistió al colegio Campbell al otro lado de la frontera, en Belfast y a la Universidad de Dublín, Trinity College, donde a los 22 años de edad se graduó con *suma cum laude* en Zoología, 1952. Ganó una beca de la fundación Fulbright para la Universidad de Wisconsin, USA donde realizó los trabajos sobre fasciolosis de su PhD, 1957, ingresando este mismo año en el Instituto Merck de Terapéutica experimental donde va a permanecer los 33 años siguientes hasta su jubilación de la empresa en 1990. Durante los seis últimos años ejerce como Científico superior y Director de Investigación y Desarrollo. Durante su tiempo de trabajo en Merck es asimismo profesor de parasitología en el N.Y. Medical College. Jubilado de la empresa se incorpora a tiempo completo como Asociado de Parasitología (Fellow) de la Universidad privada Drew, Madison, New Jersey, a cuyo profesorado pertenece durante los siguientes 20 años (1990-2010). Continúa vinculado a esta universidad como miembro del programa RISE (Instituto de Investigación para científicos eméritos). En 2002 es elegido miembro de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos, en el 2008 recibe el premio a los Servicios Distinguidos de la Sociedad Americana de Parasitología y en 2012 su *Alma Mater*, el *Trinity College* de la Universidad de Dublín, le

nombra Doctor en Ciencias *honoris causa*. Le recibe su Canciller Mary Robinson, la que fue primera mujer presidente de la República de Irlanda.

Este el currículo formal, impersonal y descriptivo de la cadena de sucesos oficiales de su vida científica, nada dice o poco del científico, un parasitólogo brillante dedicado durante más de 30 años a la búsqueda de antiparasitarios, creando para ello un amplísimo abanico de modelos parasitarios de terapéutica experimental; algo así como una serie de cedazos por los que cerner los miles de moléculas, caldos de cultivo y extractos que los químicos y biólogos de la empresa ponen a su disposición. El cultivo de los nematodos parásitos es factible, se logró enteramente, desde huevo a huevo en los 60 del pasado siglo, pero es muy costoso e inoperante para el ensayo antihelmíntico. En los nematodos que utilizan el suelo como paso intermediario entre sus hospedadores la embriogénesis, la eclosión de las larvas de primer estado y éste y los siguientes dos estados larvarios suministran espacio para técnicas de ensayo antiparasitario, como lo son también, aunque más alejados de los nematodos parásitos aquellos de vida libre consumidores de bacterias, como el socorrido *Coenorhabditis elegans*. Cuando el ciclo exige el paso previo por un hospedador intermediario, un molusco, un artrópodo, el sistema se complica. Lo más sencillo, dentro de la complejidad, es disponer del ciclo completo, en condiciones de laboratorio, -- con animalario incluido y granja experimental provista de sistemas de aislamiento certificados--, donde mantener las especies representativas de las diferentes familias de nematodos, de los principales trematodos (*Fasciola*, *Schistosoma*, etc) y cestodos (*Hymenolepis*, *Echinococcus*, *Taenia*).

El trabajo para una Industria farmacéutica conlleva lógicas limitaciones para la publicación de resultados sensibles, no obstante, los trabajos originales y revisiones en solitario o en colaboración del Dr. Campbell son numerosos, y en particular, los libros en los que como editor reúne a los más destacados en los campos concomitantes de su interés prioritario: antihelmínticos bencimidazólicos, no en vano es el autor principal del proceso y difusión de estos fármacos, iniciado con el registro de Thiabendazole (tiabendazol en español), avermectinas y Trichinella. A este nematodo, un excelente modelo experimental por reunir en un mismo ciclo cuatro condiciones diferentes y consecutivas, que son individualmente, para otros nematodos, el núcleo vital al que hay que dirigir el antiparasitario, dedicó muchos de sus publicaciones y especialmente la que conocemos los parasitólogos como segunda biblia sobre Trichinella (49). La mayoría de sus publicaciones (55) son catalogables como de medicina veterinaria, versan sobre diferentes aspectos de la terapéutica antihelmíntica experimental de los animales domésticos. Es realmente un parasitólogo veterinario. Los trabajos dedicados a parasitismos animales superan en mucho a los dedicados a helmintosis humanas (19): uno más que los 18 de la oveja o los 12 del perro. Sus helmintos modelo más utilizados, además de *Heligmosomoides polygyrus* – el real descubridor, a su

pesar, de las avermectinas -, son: *Trichinella spiralis*, el más plástico de los modelos, *Dirofilaria immitis*, *Trichostrongylus axei*, *Ascaris suum*, los trichostrongídeos gastro-intestinales de rumiantes, estrongídeos de los equinos, ancilostómidos, filarias... etc.. Entre los antihelmínticos, protagonista fundamental de su desarrollo y/o descubrimiento: Tiabendazol (19 publicaciones) e Ivermectina (19 publicaciones). El descubrimiento y desarrollo de los bencimidazoles, surgido dentro de un programa de búsqueda de antivirales, se halló, en el cribado sistemático en los modelos experimentales – los estados libres preparasitarios de larvas de nematodos–, al observar la actividad de heterociclos aromáticos sintetizadas, como el ligando al cobalto (N-ribosil dimetil-bencimidazol) de la molécula de vitamina B12 (50), así nació el tiabendazol que aún se sigue usando como antifúngico y su descendiente el cambendazol de vida media más amplia, también desarrollado en su laboratorio y centro Merck de investigación; amen de los que, estimulados por estos trabajos, sintetizaron otras empresas farmacéuticas como Janssen (mebendazol y otros), SKF (albendazol), Hoechst (fenbendazol), etc., fármacos antihelmínticos únicos hasta el advenimiento de la ivermectina y derivados. Como parasitólogo es de destacar su continua participación en la ICT (*International Commission on Trichinellosis*). Seis veces a través de las sucesivas conferencias de la ICT desde 1968 hasta el 2000, incluida la celebrada en 1988 en Alicante que organicé junto con el Prof. Bolás, he coincidido con el Dr. Campbell en estas reuniones internacionales de expertos. Debo personalmente la Dr. Campbell su inestimable ayuda durante la elaboración en 1964 de mi tesis doctoral: el Dr. Campbell me mandó gratuitamente tiabendazol y las técnicas básicas de mantenimiento y experimentación con *Trichinella spiralis* (51).

Además de sus virtudes como investigador cuenta con grandes dotes de comunicador, de profesor que atrapa a sus alumnos con contenidos y humor salpicado. Es un irlandés, ciudadano USA desde 1962, que no ha renunciado a sus raíces, de amplísima cultura, pintor de motivos parasitológico y fino poeta. Sus breves poemas sobre parásitos formaron también el motivo de captura de atención y estímulo al aprendizaje; el ciclo de *Onchocerca* se recuerda siempre si como complemento al contenido denso, el profesor te recitó también un pequeño poema de su cosecha (primera cuarteta): *I don't need your goddem eye! all I need is a bit of skin/ big enough for me to scatter/ a few larvae in* (52).

Satoshi Ōmura

Satoshi Ōmura, 1935, es originario de la Prefectura de Yamanashi, región Honshu en la isla principal Chubu (al oeste de Tokio). Tras la habitual formación infantil y secundaria ingresa en la Universidad de Yamanashi, graduándose en ciencias en 1958, a los 23 años de edad. Prosigue sus estudios y obtiene el Máster en Ciencias en 1963. Por su destacada capacidad, al terminar su magisterio, es contratado como Investigador Asociado de

su propia universidad, puesto que desempeña hasta 1965 en que es contratado por el Instituto Kitasato de Ciencias Biológicas, centro de investigación perteneciente a la universidad homónima, en el que permanecerá los siguientes 43 años y en el que continúa como Profesor Emérito Distinguido y Coordinador especial del programa de descubrimiento de fármacos procedentes de productos naturales.

Completa su carrera desde el propio Instituto obteniendo en la Universidad de Tokio su PhD en Ciencias Farmacéuticas. Dos años más tarde obtiene su segundo grado de doctor, en este caso en la Química, PhD Universidad de Ciencias. Culmina así, a los 35 años de edad, su sólida formación biológica, farmacéutica y química. Además de su amplísima carrera investigadora es sucesivamente Profesor Asociado de la Universidad Kitasato (1968 a 1975), Profesor de la Escuela de Farmacia (1975 a 1984), Profesor del Instituto Kitasato de Ciencias de la Vida (2001-2007) y de la Escuela de Grado en Control de Infecciones (2002-2007); además es Profesor Visitante de la Universidad de Tokio (1991-2001) y en su estancia sabática durante dos años en USA, Profesor Visitante (*Tishler Professor of Chemistry*, nombramiento aún vigente y activo) de la Universidad Wesleyan (Connecticut). Como investigador en el Instituto Kitasato pasa por todos los niveles: Investigador, Jefe de Investigación del Centro de Funciones Biológicas del Instituto (1971-2001), Inspector (1981- 1984), Director (1990-2003) y Director y Presidente hasta el 2008 en el que alcanza su jubilación administrativa; 43 años de dedicación al centro, ahora emérito.

Su aportación científica es amplísima, con un extraordinario grado de difusión, alcanzando, si se consideran todas las aportaciones escritas de las diversas clases, desde libros a comunicaciones a congresos y reuniones profesionales, los aproximadamente 1.155 escritos. De la calidad de su obra, valga como ejemplo dos de sus tres primeras publicaciones en lengua inglesa: en la segunda Burg, et al (16), se describen las avermectinas y las características y denominación de la nueva especie de bacteria productora de estos antibióticos antihelmínticos, la tercera es un Nature sobre hibridación de *Streptomyces* y la producción de antibióticos híbridos, abriendo un campo pionero ; y así sucesivamente. Entre estos trabajos destacan las 140 conferencias invitadas donde resumía, a lo largo del tiempo de investigación personal, el estado actual y progreso de las líneas de investigación que dirigía, así como 42 libros, entre ellos, uno de obligada referencia “*Macrolide antibiotics: Chemistry, Biology and Practics*”, 1984; segunda edición 2012, Academic Press, NY. El profesor Ōmura es mundialmente reconocido como experto en química biorgánica, particularmente por el descubrimiento, desarrollo, biosíntesis y manejo de moléculas bioactivas producidas por microorganismos ambientales. Él mismo relata cómo su vocación nació siguiendo una clase en la universidad donde el profesor afirmaba con ejemplos, que los microorganismos que nos rodean, son capaces de sintetizar moléculas con estructuras

que nunca podíamos imaginar e incluso reproducir. Así lo persiguió y ha demostrado a lo largo de su amplísimo currículo: los microorganismos producen compuestos, muchos de ellos capaces de mejorar el bienestar, prosperidad y salud del hombre y animales útiles; ahí están, esperando ser descubiertos. Los microorganismos son los más justamente merecedores del premio que ahora se me otorga, dice con fina ironía. Este fue el motivo principal de su trabajo desde los primeros años de posgraduado investigando en fermentaciones vitivinícolas y posteriormente en antibióticos diversos en el Instituto Kitasato. También desde el principio entendió y puso en práctica nuevos métodos: protocolos de aislamiento nuevos, nuevos sistemas de cultivo, nuevos métodos de ensayo de detección y evaluación de la actividad biológica de los metabolitos. Fruto de este trabajo son los 13 géneros nuevos de microorganismos descubiertos, entre ellos *Kitasatosporia*, *Longispora* y *Arbophoma* con 42 nuevas especies. Procedentes de todo este abanico de nuevas especies, descubre, aísla e identifica molecularmente 470 compuestos orgánicos con bioactividad de algún tipo, con estructuras químicas novedosas, sin precedentes, muchas de ellas con capacidad antibiótica: 26 de uso directo o por derivados semisintéticos de los mismos, en medicina humana y animal o como promotores de crecimiento, herbicidas, además de reactivos para el estudio de funciones bioquímicas celulares.

Antes de su participación en el descubrimiento de las avermectinas había descubierto un antibiótico inhibidor de la biosíntesis de los ácidos grasos, estructura básica que condujo a otros al descubrimiento de las estatinas; continúa usándose como reactivo en estudios de la bioquímica de los lípidos. Dentro de una línea inicial de aislamiento de alcaloides procedentes de fermentaciones bacterianas, descubre Staurosporina, que posteriormente se reconoció inhibidor de proteína-quinasa C, abriéndose así la posibilidad de aislamiento de antibióticos anticancerosos. De este antibiótico se derivan fármacos antitumorales como Imatinib y Gefitinib.

Como se comentó con anterioridad, la colaboración con Merck originó el desarrollo por los investigadores de esta empresa de las avermectinas. El Prof. Ōmura es un excelente golfista y fue del margen de la calle del campo de Golf de donde tomó la muestra de tierra de donde aisló y cultivó la bacteria que enviada a Merck sirvió, como antes se describió, para descubrir las avermectinas, los antibióticos activos frente a nematodos y artrópodos. Posteriormente ha realizado numerosas investigaciones sobre el genoma de *Streptomyces avermitilis* identificando los genes responsables de los numerosos metabolitos secundarios que produce esta bacteria, además de los 17 genes responsables de la producción de las avermectinas. Muchos de los conocimientos y desarrollo de la relación entre estructura y actividad de macrólidos tales como leucomicina, tilosina, espiramicina, eritromicina, se deben también a Ōmura y su grupo. Derivados de la leukomicina, como la rokatamicina y de tilosina, tilmicosin llegaron a la medicina humana; Tilosina se sigue empleando en

medicina veterinaria. Otros antibióticos descubiertos actúan como inhibidores enzimáticos con actividad antitumoral: herbicidina inhibidor de Hsp-90; lactacistin del proteosoma. Otros, como los derivados de piripropeno son insecticidas. Varios de estos productos se desarrollan gracias a proyectos conjuntos entre el Instituto Kitasato con sus investigadores liderados por el Profesor Ōmura e industrias farmacéuticas de Japón, Estados Unidos, Alemania, etc.

Su amplísima carrera científica ha sido reconocida en el mundo entero siendo admitido como Doctor *honoris causa* en varias universidades: Lajos Kossuth de Hungría, 1991; Westleyan (Connecticut), su otra alma mater, en 1994. Así como académico de número o correspondiente en un gran número de corporaciones: Academia Alemana de Ciencias (Leopoldina), 1992; Academia Americana de Microbiología; Academia de Ciencias (Instituto de Francia), 2002; Academia Rusa de Ciencias, 2004; Academia Europea de Ciencias (Bélgica), 2005; Academia USA de Ciencias, entre otras y más destacadas. El premio Nobel que recibe en 2015 no es más que la cima de un conjunto de reconocimientos previos: Medalla de oro Robert Koch (Alemania); Premio Charles Thom (Sociedad de Microbiología Industrial, USA); Premio Príncipe Mahidol (Tailandia); premio Nakanishi de la Sociedad japonesa de Química, ídem de la Sociedad Americana, de la Sociedad americana de Productos Naturales (Ernest Guenther) y de la Sociedad Internacional de Quimioterapia; Premio Arima; de la Academia del Japón y Al Mérito Personal en Japón; Premio Gairdner canadiense de Salud Global (53), (54), (55).

SEGUNDA PARTE DEL NOBEL 2015

... and the other half to Youyou Tu “for her discoveries concerning a novel therapy against Malaria”

Introducción 1. Esbozo del paludismo

El paludismo o malaria es la enfermedad parasitaria más importante de las que afligen al hombre. Aunque no la más abundante, sí es la que más años estimados de vida saludable arrebatada a la especie humana, es decir, la que más dolor, incapacidad y muerte ocasiona entre las enfermedades infecciosas. La causan cuatro especies de protozoos parásitos patrimoniales – antroponóticas – del hombre: *Plasmodium malariae* (fiebres cuartanas), *Plasmodium vivax* y *P. ovale* (tercianas) y *P. falciparum* (terciana maligna, cotidiana), además de una especie zoonótica, *P. nowlesi* compartida con simios. Asociada esta enfermedad a las condiciones climáticas que permiten el desarrollo de sus hospedadores y vectores intermediarios, especies de mosquitos hematófagos del género *Anopheles*, su prevalencia fue sólo estacional en los climas fríos y templados y continúa siendo permanente, dependiendo de la pluviosidad, en la gran faja terrestre intertropical.

Cuando éramos, hace unos pocos años, 6000 millones de personas las estimaciones de prevalencia/demografía de la malaria se cuantificaban así: unos 1690 millones (el 28%) viven en áreas donde nunca hubo malaria endémica;

unos 960 millones (16%) vivimos en zonas donde se erradicó la malaria hacia la mitad del siglo XX; un 66% de la población mundial vive en áreas bajo riesgo de contraer malaria, entre las cuales un 48 % (2880 millones) viven en países donde se está controlando con mayor o menor fortuna el proceso y aún resta un 8% de población poco o deficientemente atendida.

Por primera vez en la historia, un poderoso tridente sanitario sujeta el paludismo: mosquiteros de camas e interior de las viviendas tratados con insecticidas persistentes y de contacto, sistemas sencillos de diagnóstico rápido y tratamientos eficaces fáciles de aplicar. Gracias a todo ello, junto con la educación sanitaria y el esfuerzo económico altruista de entidades públicas y privadas, fundaciones, ONG, etc. se avanza, por segunda vez, hacia el control universal y la erradicación, área a área, de la enfermedad. Así, la tasa mundial estimada de incidencia de casos de paludismo disminuyó en un 30% entre 2000 y 2013, y la de mortalidad en un 47%. La OMS (56) calcula que en este 2015 habrá unos 214 millones de casos de paludismo en todo el mundo (intervalo de incertidumbre: entre 149 y 303 millones) con 438 000 fallecimientos a causa de la enfermedad (entre 236 y 635 000), la mayoría niños menores de cinco años y en África subsahariana principalmente.

De 106 países en los que seguía habiendo transmisión del paludismo en el año 2000, 64 han alcanzado la meta de los Objetivos de Desarrollo del Milenio, consistentes en empezar a reducir la incidencia de la enfermedad. De esos 64 países, 55 están en camino de alcanzar la meta para el 2015 de la Asamblea Mundial de la Salud y de la Iniciativa para Hacer Retroceder el Paludismo (RBM, *roll back malaria*) consistente en reducir la tasa de incidencia del paludismo en el 75% de la población de las áreas endémicas (57).

Pese a estos enormes progresos, aún queda mucho por hacer. En 2013, se lograron fondos sólo para financiar el 53% de los 5100 millones de US\$ anuales que se consideran necesarios para alcanzar las metas mundiales. Millones de personas en riesgo de padecer la enfermedad siguen sin tener acceso a las tres intervenciones antes citadas. En consecuencia, cada año hay 198 millones de casos (intervalo de incertidumbre: 124-283 millones) y 584 000 muertes (intervalo: 367 000-755 000). Es un proceso que no se puede detener, el esfuerzo debe continuar con la misma o renovada intensidad. Es este un problema solucionable, un paso atrás y todo el esfuerzo de años se vendrá abajo.

El recurso terapéutico sencillo, eficaz y único en la práctica es artemisinina (TCA) combinada en un solo comprimido con un antimalárico de vida media prolongada. La mitad del Premio Nobel de Fisiología o Medicina se concede en este 2015 a los numerosos investigadores, personalizados en Youyou Tu descubridores de este nuevo fármaco procedente de un viejo remedio, de una planta medicinal.

La malaria ostenta bajo el punto de vista terapéutico varios record, es la primera enfermedad infecciosa que se

trató eficazmente siglos antes de conocerse los agentes causales, con sustancias naturales químicamente definidas (los alcaloides quinina y quinidina) y con la primera molécula de síntesis, azul de metileno. También es la primera enfermedad infecciosa, que tras un relativamente corto periodo de tratamiento mediante fármacos de síntesis, inutilizados por la resistencia inducida en los protozoos causantes, vuelve, como empezó, a tratarse con un producto natural, artemisinina, aislada de una planta medicinal.

Introducción 2. Los antimaláricos y las guerras

El tratamiento de las fiebres intermitentes (tercianas y cuartanas) lo descubren médicos españoles en Perú hacia 1632. La quina primero y la quinina posteriormente son el remedio imprescindible durante los siguientes 380 años (al menos 250 de los mismos en exclusiva) hasta la primera fase de la guerra civil europea del siglo XX (1ª Guerra Mundial), salvando millones de vidas y permitiendo la colonización del trópico. Lo que es más importante, sin que se hayan producido resistencias radicales, pues cuando en lugares como el Sudeste asiático – la cuna de toda las resistencias – disminuye un tanto su eficacia, basta asociarla a una tetraciclina (doxiciclina) para resolver paludismos clínicamente graves (57). La quinina además tiene dos méritos añadidos, los primeros intentos de síntesis, fallidos como el del inglés William H. Perkins dieron lugar al descubrimiento de las primeras anilinas en Inglaterra y en Alemania, las anilinas permitieron también el desarrollo de la microbiología y protozoología y la intuición de Paul Ehrlich: si el azul de metileno teñía tan bien a los protozoos de la malaria, si esta capacidad se mantuviera en vivo, la anilina mataría al parásito y, efectivamente, en 1891 Ehrlich y Guttman curan a dos maláricos con azul de metileno (58). Había nacido la quimioterapia de los procesos infecciosos.

La quina fue siempre una droga estratégica, transportada hacia Europa y Norteamérica desde sus lugares de extracción, América del Sur hasta finales del XVIII y cultivo, islas de Indonesia durante el Siglo XIX y el primer tercio del XX (monopolio holandés del *Duch Kina Institute*) (59). Como consecuencia de la 1ª Guerra Mundial, el corte marítimo de suministros, empujó hacia la búsqueda de moléculas de síntesis con actividad antimalárica y ante la incertidumbre de disponer en caso de guerra de suficiente quina se crea en Alemania en 1925 la IG Farben (comunidad de intereses de fabricantes de colorantes) asociando a las industrias Bayer, BASF, la que más tarde se denominó Hoechst, AGFA y otras varias, que instauran el Centro de Investigación de Elberfeld, anejo a Bayer. Este centro, hasta 1950 en que se disuelve en la postguerra de la 2ª Guerra Mundial, realiza en relación con el paludismo una obra titánica cribando y sintetizando moléculas (hasta 10.000 probablemente, no se conoce) (60) que sustituyeron a la quinina: mepacrina, 1932 (registrada como Atebrina® en Alemania), quinacrina, 8-aminoquinolinas y las 4-aminoquinolinas, entre las cuales resochin, renombrado como cloroquina, sirvió como el

remedio definitivo para la prevención y el tratamiento del paludismo los siguientes veinte años⁵⁴. No es objeto esta revisión del análisis de las causas de la rapidísima extensión de la resistencia establecida a la cloroquina a partir del centro americano – valle del río Magdalena en Colombia – y del sudeste asiático, sí sin embargo hacer énfasis en la relación entre las guerras y el desarrollo de los antimaláricos: la guerra de secesión americana no hubiera tenido ni vencedores ni vencidos a no ser por la quinina, en la 2ª guerra mundial la mepacrina en sus diversas denominaciones, a pesar de sus efectos secundarios, protegió contra la malaria en uno y otro bando europeo y asiático; la sucesiva guerra de Corea contó ya con la cloroquina, con protección casi total pero el problema volvió a surgir en la larga guerra de Vietnam 1955-75.

Introducción 3. “No hay mal que por bien no venga”

Así reza el refrán castellano. Veamos. Hacia 1960 había en la península indochina dos contendientes: ejército de Vietnam del Sur, apoyado por el de los USA, y el Vietcom de Vietnam del Norte, apoyado por China y la URSS, dos ejércitos enfrentados y un enemigo común, *Plasmodium falciparum*, resistente a cloroquina. No conocemos datos citables de las bajas entre el ejército comunista y la población civil durante la guerra, sí alguno más del ejército americano. En el momento álgido de la guerra el 1% de los soldados USA causaban baja diariamente del servicio por malaria; en 1965, en la primera división de caballería en el Altiplano Central, el 35 % de los soldados adquirieron malaria. En 1967 el 50 % de los soldados que participaban en operaciones en los valles Drang y Vinh Thanh (61). En la marina, 24.606 casos de malaria y unos 391.256 días de baja médica por la enfermedad, aunque con un número pequeño de fallecimientos, menos de 100 soldados (62). En el ejército entre 1965 y 1970 se produjeron unos 40.000 casos, con unas 78 muertes; la malaria causaba más morbilidad que las balas (63). Ante esta situación reaccionaron ambos contendientes. Los americanos emprendieron a través del WRAIR (Instituto Walter Reed de investigación del ejército) un programa de búsqueda de nuevas moléculas activas utilizando como medio de cribado primario el método Peters de pervivencia al 4º día del ratón infectado con una cepa patógena de *Plasmodium berghei* (64). El programa se inició en 1960 y cribó unas 250.000 moléculas. La selección fue aparentemente escasa, sólo dos moléculas, un fenantreno-metanol posteriormente denominado halofantrina, seleccionada en la prueba 177.669 y una entre 300 quinolinmetanol con cierta actividad, la 142.490 del protocolo de cribado. Como el instituto no puede por ley comercializar directamente ningún producto, además de realizar los ensayos clínicos hasta llegar a su empleo en las fuerzas armadas, para difundirlos como alternativa necesaria a los demás antipalúdicos ya obsoletos, el WRARI concertó convenios con Hoffman- LaRoche y SKF-Beecham que los llevaron al mercado. La halofantrina llegó al mercado con el

nombre de Halfan® y su tiempo activo fue muy corto. Es un buen tratamiento vía oral, eficaz, pero pronto demostró en su empleo masivo efectos secundarios incontrolables, con biodisponibilidad errática y cardiotoxicidad potencialmente fatal, además de incompatibilidad grave con mefloquina. Dejó de ser recomendada por la OMS y se retiró del mercado. La quinolinmetanol, mefloquina, con el nombre de Larian® se empleó en las fuerzas armadas de modo permanente. Presenta también de modo esporádico efectos secundarios de comportamiento: suicidios, trastornos neuropsiquiátricos (65). Es un buen preventivo, un único comprimido semanal. Se mantiene entre la escasa oferta terapéutica.

El proyecto 523

El otro grupo de contendientes, el gobierno comunista del Vietnam del Norte acudió a su aliado China solicitando ayuda, lo que fue atendido. No hay demasiados datos porque en principio el trabajo estaba sometido al sigilo militar y sus resultados fueron largamente secretos. Además, las pocas publicaciones iniciales no tenían autor y se escribieron en lengua china mandarín, dificultad añadida al clásico poco aprecio a lo que hasta entonces procedía de estas fuentes. Pero los resultados de este esfuerzo, informan la lucha y el control antipalúdico actual en el mundo entero. Estas tres iniciativas son: a) tratamiento combinado, b) forma farmacéutica como comprimido con todos los componentes integrados, c) el uso de una droga (artemisinina, extraída de una planta medicinal) o sus moléculas semisintéticas.

Para atender la lamentable situación ante el paludismo de las tropas Vietcom, el Jefe Supremo Mao Zedon (Mao Tsé-tung) y el Primer ministro Zhou Enlai, convocaron una amplia reunión de científico el 23 de mayo de 1967 para definir los objetivos a cubrir frente a la malaria. De esta primera reunión surge el Proyecto secreto 523 (por el mes y día en que inicia su trabajo) que va a contar con dos tipos de objetivos: a) objetivos a corto encaminados a resolver del modo mejor posible el problema actual del paludismo entre los combatientes aliados; b) objetivo a largo plazo, dirigidos a buscar o crear nuevos principios activos con los que prevenir o curar la malaria (66).

El objetivo a corto plazo es disponer de los métodos y medios más sencillos para prevenir la infección entre los soldados. Se deciden por seguir tres normas: combinar fármacos sinérgicos, en un solo comprimido, en una sola toma, semanal al menos.

Conocen bien el estado de resistencia de *P. falciparum* y *P. vivax* y deciden explotar los sinergismos probados de los antifolatos, inhibidores del ácido tetrahidrofólico. Esta molécula juega un papel insalvable en la biosíntesis de los nucleótidos de timina y purina – formadores de ADN y ARN -- y varios aminoácidos: histidina metionina, serina, glicina. Mientras que en el hombre tiene que proceder del alimento, los parásitos de la malaria lo sintetizan, tomando además la del propio hospedador. La inhibición de dos enzimas clave de la ruta de la biosíntesis del folato, DHFR (reductasa de dihidrofolato) y DHPS (sintasa de

dihidropteroato) habían sido usadas largamente por su acción antiapicomplejos – el mismo grupo al que pertenecen los causantes de la malaria- así como contra bacterias y había sinergismo útil probado para la prevención y tratamiento de la malaria en África entre sulfamidas que inhiben DHPS e inhibidores de DHFR como pirimetamina⁵⁴. Por otra parte, conocían la poca utilidad que le restaba a la cloroquina por lo que habían sintetizado moléculas variantes de cloroquina capaces de evitar la resistencia adquirida a la misma. Con estas bases diseñan, para según el tipo de misión militar tres tratamientos profilácticos: 1. Profilaxis para 7 días (comprimido con pirimetamina mas dapsona), 2. Profilaxis para 10 días (pirimetamina mas sulfadoxina), 3. Profilaxis para 30 días (sulfadoxina mas piperarquina) – la piperarquina es una 4-aminoquinolina dimérica, activa frente a plasmidios cloroquin-resistentes –. Todos los métodos se ensayaron sobre el terreno, con los soldados y guerrilleros como sujetos. Tuvieron un éxito fundamental librándose los combatientes, que al final se alzaron con la victoria, de la lacra del paludismo.

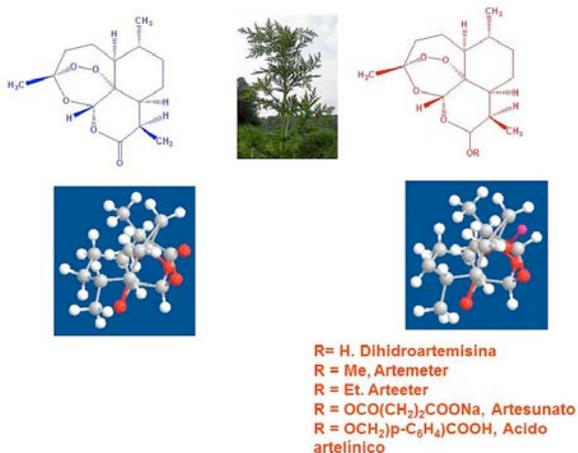
El objetivo a largo plazo tuvo desde el principio dos metas diferentes: a) análisis crítico de los métodos tradicionales; b) proseguir bajo la dirección de la Academia de Ciencias Militares de Pekin, y departamentos universitarios a lo largo del país, la síntesis y evaluación de nuevas moléculas de síntesis.

Poyecto 523. Análisis crítico de los métodos tradicionales

En la Academia de Medicina Tradicional, en los sucesivos proyectos posiblemente dirigidos por la Dra. Youyou Tu se centró el esfuerzo de numerosos equipos a lo largo del país formados por la asociación de expertos en medicina tradicional con médicos, químicos, analistas, farmacólogos, parasitólogos con formación occidental. Sometieron sistemáticamente a un análisis crítico que finalizaba en el modelo parasitario de terapéutica antimalárica ratón/*Plasmodium berghei*, a todas las recetas de productos naturales prescritas en la literatura china contra las fiebres, así como los remedios que empleaban los médicos tradicionales chinos, humildes y renombrados, del Sur y Suroeste de China e islas adyacentes con malaria endémica. Un trabajo sistemático que condujo a la selección prioritaria de dos especies vegetales muy empleadas contra las fiebres en general denominadas yingzhao (*Artabrotys hexapetalus*) y qinghao (*Artemisia annua*)⁶⁰. La raíz de la primera de estas plantas era usada en la medicina popular como antipalúdico y otras partes de la planta para el tratamiento de otros procesos. La segunda, un ajenjo, pertenece a un géneros conocido en el mundo entero como remedio para varias dolencias, no en vano se le denominó Artemisia, como la reina Artemisia II de Caria (67), 350 a JC, experta en las virtudes de las plantas. “Madre de las hierbas” se denomina a una de las especies (*Artemisia absinthium*) (68), así como otras especies empleadas en múltiples usos, como antihemético desde Dioscórides, como tónico, febrífugo, antihelmíntico. Qinghao (*A.annua*) era usada de modos diversos por la

medicina popular, incluyendo la ingestión directa de las hojas verdes junto con azúcar moreno para tratar paludismos y diversas preparaciones como infusión en agua hirviendo de hojas secas de la planta, lo que se incluía en la farmacopea china, aunque de modo impreciso ya que indistintamente se refería a dos especies, *A.annua* y *A. apiacea* :” infusión en agua hirviendo de 4,5 a 9 g de planta seca, diarios, para el tratamiento de la fiebre y el paludismo”. Figuraba además en viejos documentos como el apartado médico del escrito sobre tela de seda rescatado en 1973 de una de las tumbas del yacimiento arqueológico Mawangdui de la dinastía Han anterior u Occidental, titulado “Cincuenta y dos recetas” (69), fechado en el 168 a.C. en el que se cita a la planta como remedio antihemorroidal – como en el Dioscórides del Siglo I (70) en Occidente -- y específicamente como tratamiento de las fiebres en obras posteriores como el tratado para automedicarse de Ge Hong (283-343) *Manual de recetas para tratamientos de urgencia*, en el tiempo de la dinastía Jin (265-420) y en el más reciente de Li Shizhen (1518-1593) *Compendio de Materia Médica* escrito durante la dinastía Ming.

En el laboratorio de Youyou Tu encuentran resultados esperanzadores – descenso del parasitismo hemático de hasta el 68 % a veces, pero inconstantes (12 a 40% en muchos casos) lo que no se debía a la concentración dado la escasa reproductibilidad del efecto dentro del mismo lote de planta, en ocasiones la extracción perdía toda su actividad antipalúdica. Narra la propia autora ahora premiada (71), que ante estos hechos comenzó a revisar cuidadosamente los antecedentes escritos en los tratados de materia médica y sus datos recopilados durante su estancia en la provincia de Yunnan, durante la primera fase del proyecto 523, sobre el uso de la planta en la medicina popular y por los curanderos de las zonas palúdicas. La solución vino de la lectura del manual de Ge Hong. En la página que se refiere a las fiebres, en la versión de 1574 en una línea vertical, dice al parecer: “ toma un puñado de qinghao macerado en dos sheng de agua (un sheng equivale a unos 400 mL), colar y beber todo el jugo” – para combatir las fiebres intermitentes. Aquí podía estar la clave: la extracción de la droga activa era mediante maceración en frío, justamente lo contrario a lo habitual, extracción en agua en ebullición. Tras ensayos con solventes apolares, descartando la extracción hidroalcohólica inicial, y comprobando la toxicidad y actividad de las fracciones en el modelo experimental, aísla una porción neutra y atóxica, extracto 191, que resulta 100% activa frente a *Plasmodium berghei* en ratones y *P. cynomolgi* en monos. El 4 de octubre de 1971 es, indica Youyou, la fecha de partida del descubrimiento de la droga. Todo el trabajo se centró en el aislamiento de los principios activos en el extracto, así en 1972 aislaron de modo reproducible una sustancia químicamente definida de 282 Da con punto de fusión 156-157 °C y fórmula C15H22O5 como principio activo, que denominaron qinghaosu (una palabra compuesta de *qing*+*hao*, designa la planta medicinal artemisia verde o las hojas de la planta



y el sufijo *su*, la propiedad de o el componente de), o artemisinina, posteriormente. Otros equipos, aunque siempre después de este tiempo, la denominaron también “huanghuahao” (flor amarilla de la planta medicinal), cuando lo que se utilizaba era el extracto activo de la planta en flor.

Youyou Tu presentó sus resultados en el Encuentro del proyecto 523 que tuvo lugar en Nanjing el 8 de marzo de 1972, explicando la metodología precisa de la extracción y la cristalización del producto activo del extracto 191. A consecuencia de esta comunicación, dos equipos, el del Instituto Yunnan dirigido por el Dr Zeyuan Luo y el Shandong dirigido por el Dr. Zhangxing Wei, usando la información comunicada por Youyou Tu, procedieron a extraer y cristalizar la droga, demostrando su gran actividad a dosis muy bajas.

Al parecer, en estas fechas, en plena Revolución Cultural (1966-76) en la que hasta los científicos podían ser mal vistos, lo eran de hecho cuando se les catalogó como en la época mongol como los penúltimos, después de las prostitutas y justamente antes de los mendigos en la escala social - no era posible iniciar un Ensayo Clínico normal por lo que lo sustituyeron por un sucedáneo de urgencia. Comprobaron en ellos mismos - Tu y su equipo - la no toxicidad para el hombre del extracto y realizaron en el otoño de 1972 un ensayo corto sobre 30 enfermos palúdicos: 20 positivos a *P.vivax* y 9 a *P.falciparum* y uno más con infección mixta. El resultado del ensayo fue alentador, los enfermos de tercianas cesaron en sus síntomas a las 19 horas, los infectado con la terciana maligna a las 36 horas. El éxito de los ensayos sobre pacientes condujo a que otros laboratorios como los mencionados: Instituto Yunnan de Materia Médica China, en la provincia limítrofe con Vietnam y el de Shandong de Medicina Tradicional y Materia Médica (China)- Centro-Este costero - realizaran extractos y aislamientos del principio activo con las variedades de *A.annua* de sus lugares. Los resultados de los tratamientos de pacientes palúdicos fueron diferentes, mientras que prácticamente fracasaron los elaborados en Pekín con unos comprimidos llamados qinghaosu II, tuvieron un rotundo éxito los elaborados en los otros territorios. Concluyó el año 1973

en medio de una cierta confusión por lo que en el siguiente año, tras dos reuniones de los institutos implicados llegaron a dos conclusiones fundamentales: que no todas las *A.annua* eran iguales, las había con pobre contenido en principio activo como la que se cultivaba en el entorno de Pekín o mucho muy ricas como las de la provincia sureña de Yunnan; que en todos los laboratorios se había aislado el mismo principio activo, y, que la forma galénica era importante, así, los comprimidos hechos con la vieja maquinaria en Pekín, no eran adecuados por su mala disgregabilidad y sí sin embargo la aplicación de qinghaosu en cápsulas. En el siguiente año, con la colaboración del Instituto de Biofísica de la Academia China de Ciencias se determinó la configuración molecular cristalina por rayos X (1975) y la configuración absoluta mediante rayos X difracción anómala (1976). Publicándose en sendos trabajos en chino en 1977 y 1979 (72). En este mismo año 1976 el Comité Nacional Chino de Ciencia y Tecnología reconoció a la Dra. Tu como descubridora de la artemisinina y su eficacia antipalúdica⁷¹. Realizan la farmacología, farmacocinética y toxicología del producto y obtienen por semisíntesis sus derivados. Demuestran asimismo que la única especie que tiene artemisinina en sus hojas, con máxima concentración al comienzo de la floración, es *A.annua* entre las múltiples especies del género y comienzan la selección de variedades de acuerdo con su rendimiento, así como la estandarización del cultivo, suelo, abonos, etc.; en años posteriores crean híbridos interespecíficos, estériles, de alta producción, para cultivos industriales y exportación de semillas.

La salida real desde China del nuevo antimalárico lo propicia la celebración en Pekin, 1981 en la sede de la Academia de Medicina Tradicional China, del 4th Meeting del Grupo Científico de Quimioterapia de la Malaria bajo los auspicios de la OMS con la colaboración de UNDP (programas de desarrollo de las NU) y el Banco Mundial, en el que diversos autores locales relataron los resultados del tratamiento del paludismo con artemisinina y la Dra Tu las características químicas de la molécula y alguno de sus derivados.

Artemisinina

Es la denominación oficial adoptada, que sustituye a las dos iniciales qinghaosu y huanghuahao. Frecuentemente el nombre artemisinina se abrevia como artemisina, lo que es incorrescto ya que artemisina es el nombre del antihelmíntico derivado de otras especies de artemisia (73). Las artemisininas son una familia de trioxano lactonas sesquiterpenas, dotadas de un raro puente endoperóxido esencial para su actividad antimalárica y de otros usos (figura 2). La molécula básica tiene escasa solubilidad tanto en agua como en aceite por lo que conservando la estructura se diseñaron una serie de derivados: la reducción de la lactona produce el hemiacetal *dihidroartemisinina* (H), la alquilación del hemiacetal da lugar a *arteeter* (CH₂) y *artemeter* (CH₂-CH₃); por acilación del hemiacetal OH con ácido succínico se

produce una molécula soluble en agua, con mejor perfil farmacológico, oral y parenteral, artesunato ($\text{OCO}(\text{CH}_2)_2\text{COONa}$), etc. La artemisinina y sus derivados son poderosamente activos frente a la esquizogonia hemática, incluso frente a la fase inicial de anillos, lo que no sucede con otros antipalúdicos, y son también moderadamente activos frente a los gamontes (pre-gametos hemáticos). Su acción produce una disminución de diez mil veces menos merozoitos hemáticos en cada ciclo esquizogónico, por lo que la remisión de los síntomas es más rápida que la producida cuando se empleaban otros fármacos. Su vida media es muy corta, de horas, de ahí que si no se reitera el tratamiento (durante 5 a 7 días) son frecuentes las recrudescencias, razón por la que, además de perseguir retrasar o impedir la aparición rápida de resistencias, se asocia simultáneamente a otros antipalúdicos de más larga vida media, actuantes por lo tanto después de la eliminación de la artemisinina. El metabolismo hepático del fármaco a través del citocromo P450 (CYP2B6) es muy rápido, pasando a dihidroartemisinina, molécula con varias veces mayor actividad, pero efímera pues rápidamente por hidroxilación y glucoronización se transforma en una molécula altamente soluble y eliminable en menos de una hora postratamiento, principalmente por la orina. La artemisinina induce la actividad del citocromo de tal modo que el catabolismo de la siguiente dosis del fármaco es más rápido todavía y su vida media sérica menor, razón también para asociar este fármaco a otros antipalúdicos preferentemente con dianas farmacológicas distintas. Si se utilizara sola cabe siempre la posibilidad de recrudescencia a partir de las poblaciones originadas por la suelta desde el hígado infectado con *P. falciparum* de nuevos merozoitos cargados con merozoitos hepáticos recreadores de nuevas esquizogonias hemáticas (recrudescencias).

Bajo el punto de vista farmacéutico, aunque existen registros de medicamentos éticos con arteeter, poco numerosos y muchos con artemeter, la tendencia es a la manufactura de tratamientos combinados dispuestos en un solo comprimido de fácil ingestión. El problema básico de la asociación es que debería ser con un fármaco para el que no se hubieran producido resistencias previas, pues se anula el doble efecto buscado: impedir las recrudescencias y retrasar la aparición de resistencias. Así ocurre que el combinado Coarten® o Riamet® ambos formados por artemeter mas lumefantrina, cuenta con alargamiento en el tiempo de cura de paludismos, sino fracasos por resistencia, en el foco de todas las resistencias, la frontera entre Tailandia y Laos. En este lugar había antes de la introducción de Coarten una alta resistencia a mefloquina y la lumefantrina es un fármaco del mismo grupo, estructuralmente similar. Por esta causa el resultado de estos TCA (tratamiento combinado de artemisinina) como Coartem son más eficaces en África. Por ello PYRAMAX (pironaridina + artesunato) del lab. coreano Shin Poong, puede ser una buena alternativa. Por esta razón, entre otras, el TCA de artesunato y mefloquina (ASMQ desarrollado

en Brasil; Instituto Oswaldo Cruz/Farmaguignos y apoyado por DMDi – iniciativa de fármacos contra enfermedades desatendidas) está siendo muy útil en Iberoamérica donde la mefloquina había sido menos utilizada. Otras combinaciones registradas son con amodiaquine (ASAQ), piperazine (Duo-Cotecxin).

Como monofármaco, para el paludismo, sólo se emplea artesunato por su solubilidad y las posibilidades de uso por vía endovenosa o rectal, las únicas posibles en los paludismos agudos con implicación cerebral, compitiendo con quinina.

Artemisinina 2. Modo de acción

Brevemente, a pesar del enorme trabajo experimental realizado, creándose modelos de ensayo en levaduras y en otros apicomplejos, aún no hay acuerdo total en la diana morfológica y bioquímica de artemisinina sobre la esquizogonia hemática de *Plasmodium*. Sí que hay muy buenas revisiones de las que se extraen lo que a continuación se menciona (74),(75),(76),(77),(78), (79).

Si existen algunos hechos demostrados de modo indubitable, tales como: a) que el puente endoperoxido es el elemento esencial de la molécula; b) que las dianas morfológicas del fármaco son múltiples: vacuola digestiva, retículo endoplásmico y mitocondria – los apicomplejos sólo tienen una mitocondria por célula (merozoito) y sólo tantas mitocondrias como merozoitos va a formar el esquizonte – con alteración estructural de sus membranas – arrugamiento - apreciable mediante microscopía electrónica de transmisión; c) que se produce una parálisis del ciclo celular del parásito que estaba iniciando o realizando una división múltiple por exogemación, llamada esquizogonia, entrando en apoptosis.

Las dudas surgen en los resultados a veces contradictorios o difíciles de extender cuando se compara la actividad en plasmodios con la que se produce frente a otros apicomplejos, también hemáticos no consumidores de hemoglobina como *Babesia* spp. o parásitos de cualquier célula del organismo salvo, entre otras, los glóbulos rojos, como es el caso de *Toxoplasma gondii*; asimismo cuando se trata de explicar su potente actividad antitumoral.

Bajo el punto de vista bioquímico y funcional, hay discrepancias interpretando cual es el comienzo del fenómeno, si la vacuola, si el retículo y la mitocondria a continuación y como consecuencia de la acción sobre la vacuola digestiva. Parece que hay consenso en considerar que el hierro como Fe^{++} , juega un papel importante en su activación. Los merozoitos que penetran activamente en los eritrocitos, quedan instalados en el interior de una vacuola parasitófora eritrocítica y comienzan, tras la fase inicial de anillo, a ingerir hemoglobina, creando así espacio para crecer mientras se nutren. La hemoglobina ingresa por fagocitosis y queda envuelta en su caminar hacia la vacuola disgestiva en una doble membrana – interna de la pared de la vacuola parasitófora del eritrocito y externa de la membrana citoplásmica del propio parásito –. La disolución de la membrana interna proporciona el ambiente fisicoquímico que propicia la separación de la

hemoglobina en sus dos componentes, el hemo y la globina. La globina es la fuente de los aminoácidos que necesita el parásito, pero el hemo (feriprotoporfirina IX Fe^{++}) es un poderoso tóxico por lo que es polimerizado y cristalizado formando hemozoina –el pigmento negro malárico-. La polimerización, fisicoquímicamente entendible, no se conoce bien y se supone que debe de ser mediada por proteínas que hacen el papel de hemopolimerasas como la HRP-2 (proteína rica en histidina, conocida inicialmente por su utilidad en el diagnóstico de la malaria). Por esta causa hay hierro ferroso (Fe^{++}) en la vacuola digestiva y el citoplasma fuera de la vacuola. Se piensa que este hierro se asocia a la artemisinina y por transferencia electrónica corta por reducción el puente endoperóxido produciendo radicales de oxígeno que se acomodan a radicales de carbono. Se sugiere que este proceso puede producirse por dos vías diferentes, que no son entre sí excluyentes, dada la naturaleza asimétrica del puente endoperóxido de la artemisinina. En un caso atacando el Fe^{++} al O_1 ocasionando un radical centrado en carbono primario Fe^{+++} , en el otro atacando el Fe^{++} al O_2 y dando lugar al radical centrado en carbono secundario Fe^{+++} ; se ha comprobado analíticamente la presencia de ambos. Además de esta interpretación también se ha sugerido que el puente endoperóxido puede abrirse por protonización o complejación por el Fe^{++} . Alternativamente otras hipótesis sugieren que el puente endoperóxido puede abrirse por otras vías y tras tomar agua formar un hidroperóxido insaturado capaz de oxidar ya directamente de modo irreversiblemente a proteínas. Además su degradación da lugar al radical hidroxilo que también puede oxidar residuos aminoácidos de otras proteínas. En todo caso parece que el hierro es esencial para el proceso y que es en la vacuola digestiva donde se encuentra Fe^{++} en mayor proporción por lo que es en este lugar donde se inicia el proceso. La actividad de los radicales formados se ejerce sobre la dimerización de las moléculas de FPP IX bloqueando la formación de hemozoina y sobre otras varias proteínas lo que se ha comprobado experimentalmente entre las que destaca la PfTCTP (proteína tumoral traslacionalmente controlada de *P.falciparum*) que debe jugar un papel fundamental en el ciclo celular y crecimiento, es decir en la esquizogonia, así como sobre las falcipainas, cistin proteasas de la digestión de la globina. La implicación de la vacuola digestiva se demuestra además por las modificaciones observadas tras el tratamiento con artemisinina en dos canales esenciales en la pared de la vacuola, de función divergente, la PfMDR1 (proteína de resistencia múltiple) que ingresa moléculas y la PfCTP (canal de expulsión de cloroquina) que evacua moléculas desde la vacuola al citoplasma. Una actuación múltiple desde la vacuola digestiva que podría ser suficiente para explicar su acción antipalúdica.

Como se mencionó antes, otros apicomplejos como babesias y toxoplasma son sensibles a la artemisinina, sin que sean consumidores de hemoglobina y liberadores de hierro ferroso, por lo que la artemisinina cuenta con otras

dianas: el retículo endoplásmico y la mitocondria. Sobre el retículo inhibe los enzimas responsables de la disposición del calcio encerrándolo en vesículas de depósito en el retículo, transportadoras de Ca^{++} ATPasas, llamadas SERCA (por retículo sarco-endoplásmico). *P. falciparum* tiene sólo un enzima ortólogo de las SERCAs de los vertebrados, es la PfATP6 que curiosamente sólo es inhibida por la artemisinina previamente modificada por hierro ferroso, lo que sugiere que la actividad que paraliza la bomba citoplasmática de **Ca** es posterior a la activación por el hierro y que también el hierro citoplásmico juega este papel. Frente a esta actividad sí que se han comprobado modificaciones moleculares en los enzimas: PfATPasa6 y en la UBU-1 (del sistema ubiquitin-proteosoma, a la que se atribuye función des-ubiquitinizante), así como en la G7 de la pared del apicoplasto a la que se asignan funciones de transporte. Todas éstas tienden a aminorar la acción de la artemisinina en experiencias laborales de inducción de resistencia. También parece que la artemisinina puede disparar una situación de quiescencia que evita su acción sobre el parásito. La última diana descrita es la mitocondria. Parece que la cadena de transporte de electrones activa la artemisinina produciendo un acúmulo de ROS - radicales de oxígeno – que a su vez despolarizan la membrana mitocondrial contribuyendo así activamente a la muerte del parásito.

Profesora Dra. Youyou Tu, breve apunte biográfico (80), (81), (82)

Nace en el distrito de la ciudad de Ningbo, en la provincia centro oriental de Zhejiang el 30 de diciembre de 1930, en el seno de una familia culta. **Tu** es el apellido o nombre familiar y Youyou el propio -relata que se lo puso su padre inspirado en un verso del Libro de las Odas, que dice: “los ciervos balan “youyou” mientras pastan”- y se pregunta si esta onomatopeya sería una alegoría anticipada de su vida dedicada al estudio de las plantas medicinales. Asistió hasta los 18 años al Colegio Xiaoshi donde realizó los estudios iniciales y de primaria superior, además del primer año de enseñanza media, pasando a cursar los siguientes tres años de ésta en el Centro Ningbo de Enseñanza Media. (1948-1951).

A los 21 años ingresó en el Departamento de Farmacia del Colegio Médico/ Escuela Médica de la Universidad de Pekín graduándose en farmacia en 1955. Incorporándose a tareas de investigación en la Academia de Medicina China (ahora llamada Academia China de Ciencias Médicas). Cuatro años más tarde fue seleccionada para realizar durante los siguientes dos y medio años, liberada del trabajo, un curso de Medicina tradicional China, especialmente diseñado para profesionales con formación tipo occidental, completando así su formación. Con estos estudios, a modo de especialidad de postgrado, completó sus conocimientos farmacognósticos al tiempo que entendió la belleza de la concepción holística del hombre en el universo, característica de la cultura milenaria china. Toda su carrera científica se desarrolló en este centro de

investigación y docencia del que es actualmente Investigador jefe. Alcanzó el nombramiento de Investigador (equivalente a Profesor titular o catedrático) en 1980, dos años después del comienzo de la occidentalización económica de la China formalmente comunista, en 1978. En 1981 fue nombrada Consejera académica del doctorado.

El motivo principal de su investigación inicial fue la búsqueda de fármacos contra la esquistosomiasis producida por *Schistosoma japonicum*, zoonosis endémica en gran parte del Este y Sur de China. Estudió los principios activos de *Lobelia chinensis* y su actividad frente a este trematodo. Con posterioridad, al ponerse en marcha el programa 523 de antimaláricos en el que se integró su instituto en Pequín, fue nombrada responsable del equipo dedicado a la evaluación farmacológica y parasitológica experimental de las plantas medicinales y fórmulas usadas en la medicina tradicional china.

Trasladada temporalmente a Yunnan estudió y anotó los métodos tradicionales contra las fiebres intermitentes seguidos por el pueblo, así como los que empleaban los curanderos y médicos rurales de este área endémica. Casada ya con Li Tingzhao, ingeniero metalúrgico y compañero de estudios en el Instituto Xiaoshi, tenía a su primer hija que tuvo que ingresar en un hospicio ya que su marido fue “enviado al campo”, dentro de aquellos programas de la Revolución Cultural que obligaban a los intelectuales urbanitas a integrarse temporalmente en el campesinado del medio rural y sus trabajos de subsistencia.

De vuelta a su Centro en Pekín organiza un grupo multidisciplinario de jóvenes investigadores que recopilan primero todos los datos posibles sobre plantas medicinales y fórmulas elaboradas sobre ellas, así como los métodos seguidos en la medicina tradicional frente a la fiebre en general y las fiebres palúdicas en particular. Un trabajo riguroso que conduce a *Artemisia annua* (*qinghao*, la verde buena). El desarrollo posterior transformó el grupo *qinghao*, que realizó junto con otros a lo largo del país (se citan más de 600 científicos), el aislamiento, la identificación y las semisíntesis de la artemisinina y sus derivados; dirigiendo además los primeros ensayos de actividad en los modelos experimentales y en la clínica. Aunque también en su país, cuando reconocida por el premio Lasker, se levantaron críticas que trataron de restar importancia a su trabajo, diciendo que se incorporó al desarrollo de la artemisinina (1969) cuando ya estaba empezado, cuando por la falta de medios, la adversidad política reinante en aquella alocada revolución cultural, destructora de reliquias históricas y de hombre destacados, muchos habían dejado los prometedoros trabajos iniciales sobre la actividad de *Artemisia annua*. No importan demasiado estas críticas, lo que sí es cierto es que la Dra. Tu y su grupo hicieron el trabajo correcto. Todos los avances se sustentan en precedentes sólidos y todos son el fruto de una voluntad directora y el esfuerzo de muchos en su apoyo. Dicen sus biógrafos que la Dra. Tu es la

triunfadora de los tres noes: no trabajo o estudió fuera de China, no hizo un postgrado, no lo había en su tiempo, aunque sí una segunda carrera, no pertenecía a ninguna de las Academias de prestigio. Parece que este mal tan típico de nuestro entorno que consiste en minusvalorar lo propio, mientras que se admira, sin más crítica lo de fuera, también lo padece China. Espero que este Nobel, el primero a un científico chino formado en China y el primero a una mujer china, les cure para siempre de este defecto hijo de la envidia.

La Profesora Tu y su marido de toda la vida viven en Pekín donde también reside su segunda hija. La mayor trabaja en la Universidad de Cambridge. Ha sido galardonada con los siguientes premios: 1978, Premio del Congreso Nacional de Ciencia. R. P. China; 1979, Premio nacional de inventores. R. P. China; 1992, Comisión Científica estatal china. Reconocimiento como uno entre los diez notables en Ciencia y Tecnología; 1997, Reconocimiento como uno de los 10 grandes logros en Salud Pública en la Nueva China. R. P. China; Septiembre del 2011, Premio GlaxoSmithKline, al logro sobresaliente en Ciencias de la Vida; Septiembre del 2011, Premio Lasker-DeBaKey de investigación en Medicina Clínica; Noviembre del 2011, Premio a la contribución sobresaliente, Academia China de las Ciencias médicas chinas; Febrero del 2012, Reconocimiento como una de las 10 mujeres más destacadas de la nación R. P. China; Junio del 2015, Premio compartido de la Fundación Warren Alpert. Todo este cúmulo de reconocimientos culminan con el compartido Nobel 2015 de Fisiología o Medicina.

Una vida fructífera, alejada, hasta el despertar ocasionado por la concesión del anticipativo Premio Lasker y el Nobel que ahora celebramos. Un ejemplo de servicio a su país y a la humanidad. Con ella y con el trabajo de William Cecil Campbell y Sitoshi Omura, una vez más, evitamos por un tiempo, lo inevitable y una buena parte del dolor y muerte por los parásitos se ve aminorado o suprimido. Gracias por su trabajo.

REFERENCIAS

1. Nobel Lectures Physiology or Medicine 1922-1941. Amsterdam: Elsevier Publishing Co., 1965.
2. <http://www.inesfly.com/index.php>
3. Campbell W C. Parasites and Cancer. *Parasitology Today*. 1997; 15(5): 202.
4. International Agency for Research on Cancer (IARC). Summaries and Evaluations. 1994; 61: 121. <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol61/m61-2.html>
5. Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Agudelo CA, Hidron A, Eberhard ML, Mathison BA, Frace MA, Ito A, Metcalfe MG, Rollin DC, Visvesvara GS, Jones TL, Greer PV, Vélez Hoyos A, Olson PD, Diazgranados LR, Zaki MD. Malignant Transformation of *Hymenolepis nana* in a Human Host. *N. Engl J Med*. 2015; 373,19: 1845-52.

6. Nombre propuesto, entre otros, por W.C. Campbell. Resume la doble actividad del producto: sobre vermes endoparásitos – la porción *verm* del nombre y sobre ectoparásitos, *ect* y el subfijo *ina*, del latín *ína*, sustancia en el lenguaje químico/farmacológico. La vocal inicial es una licencia. La 22-23 dihidroavermectina se debía llama *hyvermectina* – es decir *hy*, hidro avermectina pero el nombre sonaba a frío, a invierno en francés antiguo, por lo que cambiaron *hy* por *i* latina resultando un nombre de más fácil pronunciación: ivermectin, ivermectina en español.
7. Aguinaldo AM, Turbeville JM, Linford LS, Rivera MC, Garey JR, Raff RA, Lake JA. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature*. 1997; 387, 6632: 489-93.
Los ecdisozos (ecdysozoa) son un grupo (clado) de invertebrados que reúne a todos aquellos que para crecer tienen que mudar ya que poseen esqueleto quitinosos externo, principalmente nematodos y artrópodos.
8. Campbell WC, Ashtom C. Cuckler, in memoriam. *J Parasitol*. 2001; 87(2): 466-467.
9. Egerton JR, Ostlind DA, Blair LS, IL Eary C, Suhayda D, Cifelli S, Riek RF, Campbell, WC. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: efficacy of the B15 component. *Antimicrob Agents Chemother*. 1976; 15: 372-378.
10. Campbell WC. Progress and prospects in the chemotherapy of nematode infections of man and other animals. *J Nematol*. 1983; 15: 608-615.
11. Campbell WC, Fischer MH, Stapley EO, Albers-Schomber G, Jacob CA. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science*. 1983; 221: 823-828.
12. Campbell WC, Burg RW, Fisher MH, Dybas RA. The discovery of ivermectin and other avermectins. In: Magee PS et al. Eds. *Pesticide synthesis through Rational Approaches*. Washington DC: American Chemical Society, 1984; pp 5-20.
13. Campbell WC. Ed. *Ivermectin and Abamectin*. New York: Springer-Verlag, 1989.
14. Campbell WC, Benz GW. Ivermectin: a review of efficacy and safety. *J Vet Pharmacol Therap*. 1984M 7, 1-16.
15. Campbell WC. The genesis of the antiparasitic drug, ivermectin. In: Weber RJ, Perkins DN, Eds. *Inventive Minds: Creativity in Technology*. Oxford: Oxford University Press, 1992; pp. 194-214.
16. Burg RW, Miller BM, Baker EE, Birnbaum J, Currie SA, Hartman R, Kong I-L, Monaghan RL, Olson G, Putter I, Tunac JB, Wallick H, Stapley EO, Oiwa R, Ōmura S. Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents: Producing Organism and Fermentation. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 1979; 15: 361-367.
17. Takahashi Y, Matsumoto A, Seino A, Ueno J, Iwai Y, Omura S. *Streptomyces avermectinius* sp. nov., an avermectin-producing strain. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002; 52 (6): 2163-2168.
18. Crump A. The advent of ivermectin: people, partnerships, and principles. *Parasitology Today*. 2014; 30 (9): 423-425.
19. Kita K, Shiomi K, Ōmura S. Advances in drug discovery and biochemical studies. *Trends in Parasitology*. 2007; 23 (5): 223-229.
20. Ōmura S, Crump A. Ivermectin: panacea for resource-poor communities? *Trends in Parasitology*. 2014; 30 (9): 445-455.
21. Molynoux D, Taylor HR. The Discovery of Ivermectin. *Trends in Parasitology*. 2015; 31 (1): 1.
22. Takiguchi Y, Mishima H, Okuda M, et al. Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics: Fermentation, isolation and physico-chemical properties. *J Antibiot*. 1980; 33: 1120-1127.
23. Turner MJ, Schaeffer JM. Mode of action of ivermectin. Chapter 5. In: Campbell, W.C. Ed. *Ivermectin and abamectins*. New York: Springer-Verlag, 1989; pp.73-88.
24. Ivermectin fact sheet: www.dar.emory.edu/pi/ivermectin.pdf
25. Stein L, Kircik L, Fowler J, Tan J, Draelos Z, Fleischer A, Appell M, Steinhoff M, Lynde C, Liu H, Jacovella J. Efficacy and safety of ivermectin 1% cream in treatment of papulopustular rosacea: results of two randomized, double-blind, vehicle-controlled pivotal studies. *Journal of Drugs in Dermatology*. 2014; 13 (3): 316-323.
26. Kobylinski CK, Sylla M, Chapman PL, Sarr MD, Foy BD. Ivermectin Mass Drug Administration to Humans Disrupts Malaria Parasite Transmission in Senegalese Villages. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 85: 3-5.
27. Foy BD, Kevin C, Kobylinski KC, Marques da Silva, I. Endectocides for malaria control. *Trends Parasitol*. 2011; 27: 423-428.
28. Hanafi HA, Szumlas DE, Fryauff DJ, El-Hossary SS, Singer GA, Osman SG, Watany N, Furman BD, Hoel DF. Effects of Ivermectin on Blood-Feeding *Phlebotomus papatasi*, and the Promastigote Stage of *Leishmania major*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2011; 11(1): 43-52.
29. Pooda SH, Mouline K, De Meeûs T, Bengaly Z, Solano P. Decrease in survival and fecundity of *Glossina palpalis gambiensis* vanderplank 1949 (Diptera: Glossinidae) fed on cattle treated with single doses of ivermectin. *Parasit Vectors*. 2013; 6: 165.
30. *Ibid* 13. Capítulos 11 y 12.
31. Cherfas J. Ivermectin and faecal degradation. *Parasitology Today*. 1988; 4 (1): 21.
32. Panchal M, Rawat K, Kumar G, Kibria KM, Singh S, Kalamuddin Md, Al Mohammed A, Malhotra P, Tuteja R. Plasmodium falciparum signal recognition particle components and anti-parasitic effect of ivermectin in blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of SRP. *Cell Death Dis*. 5, e994

33. Wagstaff KM, Sivakumaran H, Heaton SM, Harrich D, Jans DA. Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochem J.* 2012; 443 (Pt 3): 851–856.
34. Sharmeen S, Skrtic M, Sukhai MA, Hurren R, Gronda M, Wang X, Fonseca SB, Sun H, Wood TE, Ward R, Minden MD, Batey RA, Datti A, Wrana J, Kelley SO, Schimmer AD. The anti-parasitic agent ivermectin induces chloride dependent membrane hyperpolarization and cell death in leukemia cells. *Blood.* 2010; 116: 3593-3603.
35. Costa JL, Diazgranados JA. 1993. Treatment of human diseases involving dysregulation or dysfunction of the nervous system. US 5189026 A; <http://www.google.com/patents/US5189026>
36. Egerton JR, Brokken ES, Suhayda S, Eary CH, Wooden JV, Kilgore RL. The antiparasitic activity of ivermectin in horses. *Vet Parasitol.* 1981; 8: 83-88.
37. WHO 2010. First WHO Report on Neglected Diseases: http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/
38. Ibid 13. Capítulo 21. Greene BM, Brown KR, Taylor R. Use of Ivermectin in Humans.
39. Elgart GW, Meinking TL. Ivermectin. *Dermatol Clin.* 2003; 21 (2): 277-82.
40. El orgullo de regalar: la historia de la lucha contra la “ceguera de los ríos”. <http://www.compromisoempresarial.com/entradas/2008/01/el-orgullo-de-regalar-la-historia-de-la-lucha-contra-la-ceguera-del-rio/>.
41. Benin, Burkina Faso, Burundi, Camerún, Chad, Congo, Costa de Marfil, República Democrática del Congo, Etiopía, Guinea Ecuatorial, Ghana, Guinea, Guinea Bissau, Liberia, Malawi, Mali, Nigeria, Senegal, Sierra Leone, Sudan, Sudán del Sur, Togo, Uganda y Tanzania (ibid 38).
42. Halliday A, Gentil K, Hoerauf A, Pearlman E, Taylor MJ, Tamarozzi F. Onchocerciasis: the Role of Wolbachia Bacterial Endosymbionts in Parasite Biology, Disease Pathogenesis, and Treatment. *Clin. Microbiol Rev.* 2011; 24(3): 459-468.
43. OMS/African Program for Onchocerciasis Control: Progress Report 2011 y OMS African Program for Onchocerciasis Control: Meeting of National Task Forces. *Wkly. Epidemiol Rec.* 2011; 48-86: 541-549.
44. OMS (2012) Integrated Preventive Chemotherapy for Neglected Tropical Diseases: Estimation of the Number of Interventions Required and Delivered, 2009–2010, WHO Mectizan Donation Program (2012) Annual Highlights 2011: Celebrating 25 years of the Mectizan Donation Program in 2012: <http://www.mectizan.org/sites/default/files/Annual%20Highlights%202011%20English.pdf>
45. Mectizan Donation Program: <http://www.mectizan.org/news/international-coalition-urges-final-push-to-eliminate-river-blindness-from-the-americas>.
46. OMS, 2014. Prevention, control and elimination of onchocerciasis. <http://www.who.int/onchocerciasis/control/en/>
47. Lustigman S, McCarter J. Ivermectin resistance in *Onchocerca volvulus*: Toward a genetic basis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2007; 1 (1): e76.
48. Boussinesq M, Kamgno J, Pion SD, Gardon J. What are the mechanisms associated with post-ivermectin serious adverse events? *Trends in Parasitology.* 2006; 22 (6): 244-246.
49. Campbell, W.C. Ed. *Trichinella and Trichinosis.* New York: Springer-Verlag, 1983.
50. Brown D, Matzuk AR, Ilves IR, Peterson LH, Harris SA, Sarett LH, Egerton JR, Yakstis JJ, Campbell WC, Cuckler J AC. Antiparasitic Drugs. Iv. 2-(4'-Thiazolyl)-Benzimidazole, A New Anthelmintic. *Am Chem Soc.* 1961; 83 (7): 1764-5.
51. Martínez Fernández, A.R. Investigaciones sobre la eficacia de la methiridina y del thiabendazol frente a *Trichinella spiralis* (Owen 1835) Railliet, 1895. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo. An Fac Vet León. 1966; 11: 127-216.
52. Campbell, W.C. Poem, Paint and Pathogen. *Prospectives in Biology and Medicine.* 1989; 32: 3.
53. Satoshi Ōmura/Curriculum vitae/2014: http://www.satoshi-omura.info/biography/omura_cv.pdf.
54. Ōmura S. Microbial metabolites: 45 years of wandering, wondering and discovering. *Tetrahedron.* 2011; 67: 6420-e6459.
55. Kita K, Shiomi K, Omura S. Advances in drug discovery and biochemical studies. *Trends in Parasitology.* 2007; 23 (5): 223-9.
56. OMS, http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/
57. Watt G, Loesuttivibool L, Shanks GD, Boudreau EF, Brown AE, Pavanand K, Webster HK, Wechgritaya S. Quinine with tetracycline for the treatment of drug-resistant falciparum malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 1992; 47 (1): 108-11.
58. Schlitzer M. Malaria chemotherapeutics Part I. History of antimalarial drugs development, currently used therapeutics, and drug in clinical development. *Chem Med Chem.* 2007; 2: 944-86.
59. Raviña E. Medicamentos. Un viaje a lo largo de la evolución histórica del descubrimiento de los fármacos. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela, 2008; vol. I, pp. 255-219
60. Meshnick SR, Dobson MJ. The history of antimalarial drugs. In: Rosenthal PJ. Ed. *Antimalarial Chemotherapy: Mechanisms of Action, Resistance, and New Directions in Drug Discovery.* Totowa: Humana Press Inc.; pp. 1-25.
61. Ognibene AJ, Conte, NF. History of the Office of Medical History. Chapte 14. Malaria Chemotherapy. US Army Medical Departmen: 1960-65.

62. Beadle C, Hoffman SL. History of malaria in the United States Naval Forces at war: World War I through the Vietnam conflict. *Clin Infect Dis.* 1993; 16 (2): 320-9.
- NOTA: Las bajas en la Marina USA fueron creciendo en las sucesivas guerras del siglo XX, durante la 1ª Guerra mundial hubo 4.746 nuevos casos con 68.373 días de baja y siete fallecimientos; Durante la 2ª los casos se elevaron a 113.256 con 3.310.800 días de baja por enfermedad con 90 fallecimientos. En la guerra de Corea los nuevos casos bajaron a 4.542 con 50.924 días de baja, lo que se explica por la menor duración del conflicto (1950-53) y la presencia sólo de *P. vivax*.
63. Srinivas. Malaria in Wars and Victims. February 25, 2015. History: <http://www.malariasite.com/tag/vietnam-war/>
64. Knight DJ, Peters W. The antimalarial activity of N-benzyloxydihydrotriazines. I. The activity of clociguanil (BRL 50216) against rodent malaria, and studies on its mode of action. *Ann Trop Med Parasitol.* 1980; 74 (4): 393-404.
65. Croft AM. A lesson learnt: the rise and fall of Lariam and Halfan. *J R Soc Med.* 2007; 100: 170-4.
66. Cui L, Su X-z. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of malaria. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2008; 7 (8): 999-1013.
67. <http://themaskeedlady.blogspot.com.es/2010/12/artemisia-ii-y-el-mausoleo-de.html>
68. Julián o Juliano, Maestro Pedro (Petrus Hispanus o Papa Juan XXI): *Thesaurus Pauperum...* Lugduni: Antonio Blachard, 1530. *Thesoro de los pobres. Comiença vn libro muy provechoso para toda persona: llamado Thesoro de pobres en romance... El qual mandó hazer el papa Juan a vn medico suyo llamado maestre Juliano, Toledo, s.i., s.a. y Burgos, 1524; Madrid, 1644; Sevilla, 1655. Y 1727- Cita tomada de Actas IV (1996). Lina Rodríguez Cacho. Tesoros de frailes y tesoros laicos: cvc.cervantes.es/literatura/aiso/pdf/04/aiso_4_2_052.pdf*
69. OMS, TDR/CHEMAL/ART/86.3. The development of artemisinin and its derivatives. Report of the meeting of the scientific working group on artemisinin.: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/61147?locale=es>
70. Laguna A. *Pedacio Dioscorides anazarbeo. Acerca de la materia medicinal...* traducido, ilustrado y anotado por el Dr. Andrés Laguna. Edición 1570 por Matias Graft, Salamanca.
71. Tu YY. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature Medicine.* 2011; 17 (10): 1216-20.
72. Collaboration Research Group for Qinghaosu. A new sesquiterpene lactone—qinghaosu [in Chinese]. *Kexue Tongbao* 1977,3, 142; Gu, Y.C. & Tu, Y.Y. Studies on chemical constituents of *Artemisia japonica* Thunb [in Chinese]. *Chin Tradit Herbal Drugs.* 1993; 24: 122–4. Ambos trabajos en lengua china citados por Tu, YouYou⁷¹.
73. Muchas de las especies de *Artemisia*: *A. vulgaris*, *A. absinthium*, *A. herba-alba*, tienen actividad antihelmíntica. La especie más utilizada a este fin fue *A. cina*, las cabezuelas florales amarillas cosechadas justamente antes de la floración era lo conocido como *semen-contra vermis*. De la planta *A. marítima* var *stechmanniana*, sinónimo de : *A. cina*, *A. chamaemelifolia*; se empleaba la droga santónico y se extraía el fármaco santonina, una lactona químicamente definida. La santonina fue utilizada hasta la llegada hacia la mitad del siglo XX de la fenotiacina y la sucesión de antihelmínticos de síntesis: piperazina, tiabendazol, carbamatos de bencimidazol.
74. O'Neill P, Barton V E, Ward SA. The molecular Mechanism of action of Artemisinin. The debate continues. *Molecules.* 2010; 15: 1705-21.
75. Ding XC, Beck, H-P, Raso G. Plasmodium sensitivity to artemisinins: magic bullets hit elusive targets. *Trends in Parasitology.* 2011; 27 (2): 73-81.
76. Ho WE, Peh HY, Chan TK, Wong WSF. Artemisinins: Pharmacological action beyond anti-malaria. *Pharmacology & Therapeutics.* 2014; 142: 126-39.
77. Wang J, Huang L, Li J, Fan Q, Long Y, Li, Y, Zhou B. Artemisinin directly targets malarial mitochondria through its specific mitochondrial activation, PLoS ONE. 2010; 25 (3), e982: 1-12.
78. Crespo MP, Avery TD, Hanssen E, Fox E, Robinson TV, Valente P, Taylor DK, Tilley L. Artemisinin and series of novel endoperoxide antimalarials exert early effects on digestive vacuole morphology. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52 (1): 98-109.
79. Hastings I. How artemisinin-containing combinations therapies slow the spread of antimalarial drug resistance. *Trends in Parasitology.* 2011; 27 (2): 67-72.
80. https://en.wikipedia.org/wiki/Tu_Youyou
81. <http://www.edubilla.com/inventor/tu-youyou/>
82. Ortiz Melón JM. El premio Lasker, la medicina tradicional china y el descubrimiento de la artemisina. *An R Acad Nac de Farmacia.* 2011; 77 (4): 13-6.

El Premio Nobel 2015 en Química. Reparación del daño genético: retorno a los primeros tiempos de la genética en la era genómica

Juan-Ramón Lacadena Calero

La Genética se puede definir como la “ciencia que estudia el material hereditario –los genes– bajo cualquier nivel o dimensión” (1, 2). En otras palabras, el contenido formal de la Genética trata de responder a cinco preguntas fundamentales respecto 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? (3).

El ADN, como material hereditario, tiene tres propiedades genéticas esenciales: es capaz de conservarse a sí mismo (*replicación*), es susceptible de cambiar (*mutación*) y es portador de información (*código genético*). Cualquier molécula química que constituyera el material hereditario en otro planeta de esta u otra galaxia tendría que tener forzosamente estas mismas tres propiedades. En efecto, el mecanismo de replicación del ADN asegura la conservación idéntica de la información genética de manera que al producirse la división celular en los organismos pluricelulares las células hijas conservan la misma información y el desarrollo no se convierte en un caos genético que haría inviable al organismo. No obstante, el proceso molecular de la replicación puede tener algún error. Por otro lado, la mutación es una propiedad genética esencial porque si no hubiera variabilidad genética no se podría haber producido el fenómeno de la evolución biológica, en cuyo caso no estaríamos nosotros aquí y ahora celebrando esta sesión científica. Esto quiere decir que el ADN es una molécula química inestable y que la existencia de cambios o mutaciones en el ADN es bueno para que la selección actúe en el proceso evolutivo. Sin embargo, sí sería muy perjudicial para la vida de los organismos que la frecuencia de cambios en la secuencia de bases del ADN fuera excesivamente elevada; de ahí la importancia de que en las células existan mecanismos que corrijan los daños genéticos producidos en el ADN ya sea por la propia inestabilidad química de la molécula en el ambiente celular normal ya sea por acción de agentes externos de naturaleza física (por ejemplo, los rayos X y rayos UV) o de naturaleza química (agentes alquilantes, pesticidas, derivados industriales, aditivos de la alimentación, etc.).

Puesto que estamos celebrando esta sesión científica en ocasión de la concesión del premio Nobel 2015 en Química en un tema que atañe al material hereditario (el ADN), me parece oportuno señalar que antes de ahora numerosas investigaciones en torno a las tres propiedades genéticas esenciales del ADN antes mencionadas han sido motivo de concesión de varios premios Nobel, tal como se indica a continuación (4):

- Replicación del ADN

Replicación semiconservativa: propuesta por Watson y

Crick (1962).

Síntesis enzimática del ADN: A. Kornberg (1959).

- Mutación

Inducción de mutaciones con rayos X: Muller (1946).

Mutagénesis dirigida: Smith (1993).

Elementos genéticos móviles: McClintock (1983).

- El ADN como portador de información: cómo y cuándo se expresan los genes

Hipótesis un gen-una enzima: Beadle y Tatum (1958).

Hipótesis de la secuencia: Crick (1962).

Desciframiento de la clave del código genético: Ochoa (1959), Nirenberg y Khorana (1968).

El ARN mensajero: Jacob (1965) y Brenner (2002).

Análisis molecular de la transcripción en eucariontes: R.D. Kornberg (2006).

Análisis molecular de la traducción: estructura molecular y función del ribosoma: Ramakrishnan, Steitz y Yonath (2009).

El ARN transferente: Holley (1968).

Genes discontinuos: Sharp y Roberts (1993).

Procesamiento y actividad catalítica del ARN: Altman y Cech (1989).

Regulación de la expresión génica. Modelo del operón: Jacob y Monod (1965).

Regulación de la expresión génica mediante interferencia del ARN: Fire y Mello (2006).

Control genético del desarrollo embrionario temprano en *Drosophila*: Lewis, Nüsslein-Volhard y Wieschaus (1995).

Control genético de la organogénesis y de la muerte celular programada en *Caenorhabditis elegans*: Brenner, Horvitz y Sulston (2002).

Utilización de los ratones knockout (tecnología knockout) en estudios de genética del desarrollo: Capecchi, Evans y Smithies (2007).

Utilización del gen de la proteína fluorescente verde (GFP) para detectar la expresión de los genes: Chalfie (2008).

Reprogramación celular. transferencia nuclear e inducción de células troncales pluripotentes: Gurdon y Yamanaka (2012).

La importancia del estudio de los mecanismos de reparación del daño genético ha llevado a la Real Academia de Ciencias de Suecia, con sede en Estocolmo, a otorgar el 7 de octubre pasado el Premio Nobel en Química 2015 a los doctores Tomas Lindahl, Paul Modrich y Aziz Sancar por sus “estudios sobre los mecanismos de reparación del ADN”. Casi me atrevería a decir que se trata de un retorno a los primeros tiempos de

la Genética en la era de la Genómica porque, ciertamente, las investigaciones sobre la mutación en la historia de la Genética puede decirse que se iniciaron hace casi noventa años cuando Muller, en 1927, demostró que los rayos X producían mutaciones (5), aunque en aquella época ni siquiera se conocía la base molecular de la herencia; es decir, no se sabía que los genes son ADN. En 1946, Muller recibió el Premio Nobel en Fisiología o Medicina “por su descubrimiento de la inducción de mutaciones mediante radiación con rayos X”.

Siguiendo el informe hecho público por la Real Academia Sueca de Ciencias (6) se puede resumir que, “Lindahl demostró que el ADN es una molécula inherentemente inestable sujeta a degradación incluso bajo condiciones fisiológicas, identificando después un grupo totalmente nuevo de ADN glicosidasas y describiendo su papel en la *reparación por escisión de bases*. Por su parte, Sancar transformó el campo de la *reparación por escisión de nucleótidos* desde la genética y los fenómenos en extractos celulares a una detallada descripción molecular de los mecanismos implicados en bacterias y en células eucarióticas. Además, Sancar también explicó los mecanismos moleculares que subyacen en el proceso de la *fotorreactivación*, que fue la primera forma descrita de reparación del ADN. Finalmente, Modrich transformó el campo de la *reparación del apareamiento erróneo (mismatch repair)* desde las observaciones genéticas a una detallada comprensión bioquímica, primero en bacterias y más tarde en células eucarióticas.

Pasamos pues a comentar brevemente los cuatro mecanismos de reparación implicados en la concesión del Premio Nobel en Química 2015: fotorreactivación, reparación por escisión de bases, reparación por escisión de nucleótidos y reparación del apareamiento erróneo.

1. Fotorreactivación

Aunque desde hacía muchos años antes se sabía que la luz ultravioleta (UV) inducía mutaciones y afectaba a la viabilidad de las células, no fue hasta 1949 cuando Kelner demostró que la luz visible podía estimular el crecimiento de las células bacterianas que había sido detenido tras la exposición a la luz UV (7). El fenómeno, que fue denominado *fotorreactivación*, suponía la existencia de algún mecanismo celular dependiente de la luz visible que podía corregir el daño celular ocasionado por la luz UV. Más tarde, en los años 1958 y 1960, Rupert demostró la existencia de una actividad enzimática -denominada *fotoliasa*- que estaba presente en extractos acelulares de *Sacharomyces cerevisiae* y de *Escherichia coli* (8). Dieciocho más tarde, en 1978, el galardonado Aziz Sancar, haciendo la tesis doctoral bajo la dirección de Rupert, logró clonar el gen de la fotoliasa de *Escherichia coli*, amplificando el producto génico *in vivo* (9). Tras unos años de interrupción, Sancar retomó la investigación sobre la fotoliasa y su mecanismo de reacción, demostrando en 1987 que la enzima puede convertir la energía de un fotón absorbido en energía química que produce un radical libre localizado que inicia la rotura del dímero de timina

inducido por la luz UV. El mecanismo de fotorreactivación no existe en células de mamífero que, sin embargo, disponen de un mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (*reparación oscura* que será descrito en otro apartado) que corrige el daño producido por la radiación UV.

2. Reparación por escisión de bases

En la década de los setenta del siglo pasado, Tomas Lindahl (10) demostró que, aún en condiciones fisiológicas normales, el ADN está sometido a una serie de reacciones químicas tales como la desaminación, la oxidación y la metilación no enzimática que degradan el ADN (*ADN decay*) modificando las bases nitrogenadas y dando lugar a mutaciones. Lindahl demostró que ocurre con elevada frecuencia la desaminación de la citosina, transformándose en uracilo que, al ser capaz de aparearse con la adenina, da lugar tras la replicación del ADN a la sustitución de pares de bases citosina-guanina por adenina-timina en las cadenas complementarias (11).

Ante la frecuencia con que ocurre este proceso en condiciones fisiológicas normales, Lindahl pensó que tenían que existir mecanismos enzimáticos que corrigieran los posibles errores, demostrando la existencia en *Escherichia coli* de una uracil-ADN glicosidasa que resultó ser la primera proteína de reparación del ADN conocida (12). Puede decirse que esta enzima fue el miembro fundador de una gran familia de proteínas que actúan en el proceso conocido como *reparación por escisión de bases (BER)*. Lindahl demostró también que el armazón estructural del ADN permanecía intacto durante el proceso de reparación lo cual implicaba la existencia de otra clase de enzimas: las apurin/apirimidin nucleasas. Finalmente, varios años más tarde, Lindahl pudo reconstituir el proceso BER, tanto en *Escherichia coli* (13) como en células humanas (14).

3. Reparación por escisión de nucleótidos

La radiación UV produce la dimerización de dos pirimidinas consecutivas en la misma cadena del ADN. De las tres combinaciones posibles C-C, C-T y T-T, la dimerización de las timinas (T-T) es la más frecuente. Esta anomalía estructural del ADN afecta a los procesos normales de replicación y de transcripción, dando lugar a mutaciones deletéreas (15).

Además del mecanismo de fotorreactivación antes descrito, se demostró que había otros mecanismos de reparación del ADN que eran independientes de la luz visible, denominándose *reparación oscura*. En 1964, Setlow y Carrier demostraron que los dímeros de timina originados por la luz UV desaparecían poco después de las grandes moléculas de ADN, apareciendo, en cambio, en fracciones de ADN de bajo peso molecular, lo cual les permitió postular que los dímeros de timina habían sido escindidos de la molécula original de ADN gracias a un mecanismo de escisión (16). De ahí el nombre de *reparación por escisión de nucleótidos (NER)*.

La investigación de las enzimas implicadas en la NER

empezó por la identificación en 1966 de los genes *uvrA*, *uvrB* y *uvrC* cuyas mutaciones impedían la reparación del daño genético producido por la radiación UV (17). La identificación de las correspondientes proteínas fue posible gracias a la técnica “maxicell” puesta a punto en 1979 por el galardonado Aziz Sancar (18). Posteriormente, en 1983, Sancar utilizó las proteínas purificadas UvrA, UvrB y UvrC para describir las fases esenciales de la NER (19): las proteínas hidrolizan dos enlaces fosfodiéster en la hélice dañada del ADN. Las incisiones se producen en lugares precisos: una, en el octavo enlace fosfodiéster en el extremo 5' y, otra, en el cuarto o quinto enlace fosfodiéster en el extremo 3', dando lugar a un fragmento escindido de unos 12 o 13 nucleótidos. Posteriormente, el segmento escindido es reemplazado por una nueva síntesis de ADN: es el mecanismo denominado *cortar y parchear*.

Las células de mamíferos tienen también un sistema de cortar y parchear análogo al de las bacterias con la diferencia de que intervienen en el proceso más de quince proteínas en lugar de las tres del sistema bacteriano.

4. Reparación del apareamiento erróneo (*mismatch repair*)

Decíamos antes que la replicación del ADN debe conservar con exactitud la secuencia de bases en las moléculas hijas. Por ello la propia ADN polimerasa tiene, además de la función polimerizante 5'→3', una función exonucleasa 3'→5' -llamada función “correctora de pruebas”-descrita en 1972 por Arthur Kornberg (20) (premio Nobel 1959 en Fisiología o Medicina junto a Severo Ochoa “por su descubrimiento de los mecanismos en la síntesis biológica de los ácidos ribonucleico y desorribonucleico”) que repara cualquier apareamiento erróneo (*mismatch repair*) que pueda producirse durante la replicación al incorporar alguna base nitrogenada no complementaria (recordemos la complementariedad adenina-timina y guanina-citosina). Sin embargo, se ha estimado que, a pesar de la función “correctora de pruebas”, los errores de apareamiento durante la replicación ocurren con una frecuencia de 5×10^{-5} por cada par de bases. Gracias a la existencia de otros mecanismos de reparación se ha estimado que, por ejemplo en células germinales humanas, la tasa de mutación por cada par de bases nitrogenadas desciende hasta un 1×10^{-8} . Como señala el informe de la academia sueca, el doctor Paul Modrich “transformó el campo de la reparación del apareamiento equivocado (*mismatch repair*) desde las observaciones genéticas a una comprensión bioquímica detallada, primero en bacterias y más tarde en células eucarióticas”.

La historia genética de la “reparación del apareamiento erróneo (*mismatch*)” se remonta a los años cincuenta cuando Lindegren (21) observó en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que la segregación meiótica de un núcleo *Aa* no segregaba en la proporción 2A:2a sino en la proporción 3A:1a, dándole el nombre de *conversión génica* que había sido propuesto por Winkler en 1930 para explicar el cambio de un estatus alélico a otro en el

heterocigoto *Aa*; es decir, *A* se transforma en *a* o bien *a* se transforma en *A* (22), contraviniendo el *principio mendeliano de segregación* (2ª ley de Mendel) que dice que “los miembros de una pareja alélica se separan (segregan) uno de otro sin sufrir modificación alguna cuando un individuo heterocigoto (*Aa*) forma las células germinales o gametos”. Posteriormente el fenómeno de la conversión génica se relacionó con el proceso molecular de la recombinación, concluyendo finalmente en el modelo propuesto en 1964 por Holliday (23) que incluye la formación de “ADN híbrido” o heterodúplex (apareamiento erróneo, *mismatch*) que puede ser corregido enzimáticamente. Para mí, como profesor universitario, me llena de satisfacción comprobar que en mis libros de texto escritos hace ya muchos años se trataban con profundidad estos temas que la concesión del Premio Nobel 2015 en Química ha traído a la actualidad (24, 25).

Investigaciones previas llevadas a cabo por diversos autores habían puesto en evidencia en la década de los setenta del siglo pasado que

- la reparación de dos o más apareamientos incorrectos de bases en el heterodúplex se producen normalmente en la misma cadena de la doble hélice, permitiendo así la reparación de tramos largos del ADN (26);
- la maquinaria de reparación era guiada de alguna manera a la nueva hélice sintetizada por la propia maquinaria replicativa o bien por la no metilación durante un cierto tiempo de la nueva hélice en determinadas sedes (metilación de la adenina en la secuencia GATC) (27);
- la pérdida de la metilasa de ADN aumenta la frecuencia de mutación en *Escherichia coli* (28);
- se identificaron los genes (*mutH*, *mutL*, *mutS*, y *uvrD*) necesarios para que se realice la corrección del apareamiento de bases incorrecto dependiente de la metilación del ADN (29).

Con estos antecedentes, Paul Modrich presentó en 1983 la evidencia directa del mecanismo de reparación dirigido por la metilación del ADN, demostrando que la actividad reparadora depende del ATP y del estado de metilación del heterodúplex y que la mutaciones de los genes *mutH*, *mutL*, *mutS* y *uvrD* impiden la reparación del apareamiento de bases incorrecto en extractos acelulares de *Escherichia coli*. Posteriormente, aisló los productos de los genes implicados en la reparación, identificando las proteínas correspondientes y analizando sus propiedades en un sistema *in vitro*. Finalmente, en 1989 publicó un trabajo fundamental en el que explica el funcionamiento del sistema de reparación en un sistema *in vitro* (30). En primer lugar demostró el requerimiento de las enzimas ADNpol III, exonucleasa I y ADN ligasa, combinándolas con las proteínas MutH, MutL, MutS, UvrD y una proteína de unión al ADN monocatenario. Todos estos factores juntos pueden procesar *in vivo* los errores de apareamiento de bases actuando sobre la hélice adecuada de ADN dirigidos por la secuencia GATC hemimetilada (sólo está metilada la adenina de la hélice molde) que está localizada a cierta distancia del apareamiento erróneo. El papel de las

distintas proteínas es el siguiente: MutS reconoce y se une al par de bases no complementarias; MutH confiere la especificidad de la hélice de ADN uniéndose a la sede hemimetilada GATC de la hélice naciente. MutL actúa como mediador interactuando con MutH y MutS, transduciendo señales desde MutS que originan la activación de la actividad endonucleasa de MutH produciendo una rotura en la hélice naciente de ADN cerca del la sede GATC hemimetilada. A continuación la helicasa UvrD separa las dos hélices de ADN hacia el lugar donde está el apareamiento erróneo, deteniéndose una vez pasado el par de bases equivocado. La hélice sintetizada es reemplazada mediante una reacción de relleno del hueco en la que la ADNpol III usa la hélice parental como molde.

Posteriormente, Modrich demostró que el sistema de reparación también funciona en células eucarióticas y humanas aunque con ciertas variaciones.

Reparación del ADN y cáncer

Un comportamiento defectuoso de los sistemas de reparación del daño genético (reparación por escisión de bases o de nucleótidos o de apareamiento erróneo de bases u otros) cambia la información genética de las células y puede aumentar el riesgo de cáncer. Es bien conocido el caso de la enfermedad humana conocida como *xeroderma pigmentosum* que produce alteraciones en la pigmentación de la piel debido a un fallo en el sistema de reparación por escisión de nucleótidos; pues bien, las personas con esta enfermedad son extraordinariamente sensibles a la radiación ultravioleta y pueden desarrollar cánceres de piel con una alta probabilidad. También se ha demostrado que la actuación defectuosa del sistema de reparación del apareamiento incorrecto de bases aumenta el riesgo del cáncer de colon y puede ser hereditario. Por otro lado, dado que las células cancerosas tienen su ADN más inestable se está tratando de atacarlas disminuyendo su capacidad de reparar el ADN mediante fármacos que inhiben los sistemas de reparación como es el caso del medicamento *olaparib*.

Epílogo

Como ha ocurrido en ocasiones anteriores, es el momento de mostrar mi satisfacción como profesor universitario de Genética porque, una vez más, investigaciones del campo de la Genética han sido galardonadas con el premio Nobel, máximo reconocimiento de la comunidad científica. En efecto, teniendo en cuenta que la institución de los premios Nobel en 1901 coincide prácticamente con el nacimiento de la Genética con el redescubrimiento de las leyes de Mendel en 1900, es perfectamente posible seguir la historia de la Genética como una historia “nobelada” (con “b” de Nobel), que fue precisamente el título de mi discurso de ingreso en esta Real Academia Nacional de Farmacia en 1995 (31).

En efecto hoy, en 2015, podemos estar orgullosos los amantes de la Genética porque ya son 42 las veces en que el galardón Nobel ha correspondido a 93 científicos del

campo de la Genética o ciencias afines. De los 42 premios considerados, 32 pertenecen al ámbito de la Fisiología o Medicina, 9 a la Química y 1 de la Paz y, a su vez, de los 93 científicos galardonados, 71 corresponden a premios de Fisiología o Medicina, 21 de Química y 1 de la Paz. Finalmente, me gustaría destacar que en los quince años que va de siglo XXI se ha premiado la investigación genética en catorce ocasiones: 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 olfatorios 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 transcripción 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”), 2011 (Bruce A. Beutler y Jules A. Hoffmann “por sus descubrimientos en relación con la activación de la inmunidad innata”; y a Ralph M. Steinman “por su descubrimiento de la célula dendrítica y su papel en la inmunidad adaptativa”), 2012 a John B. Gurdon y Shinya Yamanaka “por el descubrimiento de que las células diferenciadas pueden ser reprogramadas para convertirse en pluripotentes”, 2013 a Randy W. Schekman que compartió el premio con James E. Rothman y Thomas C. Südhof “por sus descubrimientos de la maquinaria que regula el tráfico de vesículas, un sistema principal de transporte en nuestras células” y, finalmente, en 2015 a Tomas Lindahl, Paul Modrich y Aziz Sanchar “por sus estudios de los mecanismos de reparación del ADN”.

Finalmente, para terminar y en este contexto en relación con las investigaciones sobre los mecanismos de reparación del ADN premiadas el presente año, no resisto la tentación de profetizar para un próximo futuro el galardón Nobel para las investigadoras Jennifer Doudna y Emmanuel Charpentier (ambas han sido galardonadas con el Premio Princesa de Asturias 2015) que patentaron en 2012 la técnica denominada CRISPR-Cas9 (CRISPR por *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*; Cas, por *CRISPR-associated*) que está revolucionando la biotecnología por su aplicación a la “edición genómica” (*genome editing*), entendiéndose por “edición genómica” la

modificación o eliminación de secuencias precisas del ADN para corregir una mutación causante de una enfermedad. Esta técnica, conocida coloquialmente como “corta y pega”, se podría considerar en cierto modo como una versión nueva y sofisticada de un mecanismo de “cortar y parchear” de alguno de los procesos de reparación del ADN anteriormente descritos. Las aplicaciones en investigación básica y en su utilización clínica pueden ser fantásticas. Pero no podemos olvidar aquello de que “a nuevos avances técnicos, nuevos retos éticos” porque, de hecho, ya se han producido situaciones no deseadas como, por ejemplo, la modificación genómica de embriones humanos.

Para hacer una glosa más detallada de las investigaciones galardonadas con el Premio Nobel 2015 en Química, cedo la palabra al Prof. Dr. Manuel R. Benito de la Heras, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense y Académico Correspondiente de esta Real Academia Nacional de Farmacia.

REFERENCIAS

- Rubio J. Genética. Su posición entre las ciencias biológicas. Boletín Est Exp Aula Dei. 1973; 12: 80 pp.
- Lacadena JR. Introducción a la Genética: Una perspectiva histórica. Ser Monograf Dpto Genética, Fac. Biología. Madrid: Universidad Complutense, 1974; vol.1, 39 pp.
- Lacadena JR. Historia “nobelada” de la Genética: Concepto y método. Discurso de Ingreso como Académico de Número en la Real Academia Nacional de Farmacia (leído el 14 de diciembre de 1995): Madrid 1995.
- Lacadena JR. Conmemorando los 100 años del término “Genética” (1905-2005): Una historia “nobelada” de la Genética. Universidad de León, Secretariado de Publicaciones 2007.
- Muller HJ. Artificial transmutation of the gene. Science 1927; 66:84-7.
- Gustafsson CM. Mechanistic studies of DNA repair. The Royal Swedish Academy of Sciences 2015.
- Kelner A. Photoreactivation of Ultraviolet-Irradiated *Escherichia Coli*, with Special reference to the Dose-Reduction Principle and to Ultraviolet-Induced Mutation. J Bacteriol 1949; 58:511-22.
- Rupert CS. Photoreactivation of transforming DNA by an enzyme from bakers` yeast. J Gen Physiol 1960; 43:573-95.
- Sancar A, Rupert CS. Cloning of the phr gene and amplification of photolyase in *Escherichia coli*. Gene 1978; 4:295-308.
- Lindahl T, Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. Biochemistry 1972; 11:3610-8.
- Lindahl T, Nyberg, B. Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. Biochemistry 1974; 13:3405-10.
- Lindahl, T. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. Proc Nat Acad Sci 1974; 71:3649-53.
- Dianov G, Lindahl T. Reconstitution of the DNA base excision-repair pathway. Curr.Biol 1994; 4:1069-76.
- Kubota Y. et al. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. EMBO J 1996; 15:6662-70.
- Setlow RB, Setlow JK. Evidence that ultraviolet-induced thymine dimers in DNA cause biological damage. Proc Nat Acad Sci 1962; 48:1250-7.
- Setlow RB, Carrier WL. The Disappearance of Thymine Dimers from DNA: An Error-Correcting Mechanism. Proc Nat Acad Sci. 1964; 51:226-31.
- Howard-Flanders P, Boyce RP, Theriot L. Three loci in *Escherichia coli* K-12 that control the excision of pyrimidine dimers and certain other mutagen products from DNA. Genetics 1966; 53:1119-36.
- Sancar A, Hackl AM, Rupp WD. Simple method for identification of plasmid-coded proteins. J Bacteriol 1979; 137:692-3.
- Sancar A, Rupp WD. A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both side of the damaged region. Cell 1983; 33:249-260.
- Brutlag D, Kornberg A. 1972. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. 36. A proofreading function for the 3' leads to 5' exonuclease activity in deoxyribonucleic acid polymerases. J Biol Chem 1972; 247:241-8.
- Lindgren CC. 1953 Gene conversion in *Saccharomyces*. J Genet 1953; 51:625-637.
- Winkler, H. Die Konversion der Gene. Jena: Gustav Fischer 1930.
- Holliday R. A mechanism for gene conversion in fungi. Genet Res 1964; 5:282-304.
- Lacadena JR. Genética (Capítulo VI). 3ª edición. Madrid: A.G.E.S.A. 1981. 25. Lacadena, J.R. Citogenética (cap. 9). Madrid: Universidad Complutense 1996.
- Wagner R. Jr, Meselson M. Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes. Proc Nat Acad Sci 1976; 73:4135-9.
- Marinus MG. Adenine methylation of Okazaki fragments in *Escherichia coli*. J Bacteriol 1976; 128:853-4.
- Marinus MG, Morris NR. Pleiotropic effects of a DNA adenine methylation on mutation (dam-3) in *Escherichia coli* K12. Mutation Res 1975; 28:15-26.
- Glickman BW, Radman M. *Escherichia coli* mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch corrections. Proc Nat Acad Sci 1980; 77:1063-7.

30. Laue RS, Au KG, Modrich P. DNA mismatch correction in a defined system. *Science* 1989; 245:160-4.
31. Lacadena JR. (Ver nota 3).

Premio Nobel 2015 de Química. Genes reparadores del ADN

Manuel R. Benito de las Heras

Corresponding Author: benito@farm.ucm.es

An Real Acad Farm Vol. 81, Nº 4 (2015), pp. 386-397

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer o desarrollo tumoral se caracteriza por un crecimiento excesivo y descontrolado de un grupo de células que invaden y dañan tejidos y órganos. Es una de las causas más frecuentes de mortalidad ocupando un segundo puesto en los países desarrollados detrás de las enfermedades cardiovasculares o coronarias. La incidencia del cáncer ha aumentado en las últimas décadas; si bien es notorio que en aquellos países donde el control sanitario es mayor ha habido una disminución de los casos de mortalidad, en los últimos años, debido a los grandes avances en los tratamientos terapéuticos y en el diagnóstico precoz. El cáncer es el resultado de dos procesos sucesivos: el aumento de la proliferación de un grupo de células formando un tumor o neoplasia y la posterior adquisición por parte de estas células de capacidad invasiva permitiéndoles migrar desde su lugar de origen a otros tejidos u órganos, proceso conocido como metástasis. Para entender o estudiar la carcinogénesis hay que tener en cuenta su alta complejidad, la cual que se refleja en la gran heterogeneidad y variabilidad morfológica y pronóstica de los tumores y el gran número de alteraciones moleculares oncogénicas descritas. Estas seguirán aumentando conforme se avance en el conocimiento de nuevas moléculas o nuevas funciones de moléculas ya conocidas, cuya activación o inactivación puedan afectar a los procesos de proliferación y diferenciación celular, ya sea a nivel del ciclo celular, a nivel de apoptosis etc.

El cáncer se considera una enfermedad genética esporádica, excepcionalmente hereditaria. El proceso de formación de un tumor consiste en la acumulación de múltiples alteraciones en el genoma de las células que forman dicho tumor. Existen dos posibles conjuntos de alteraciones genéticas: cambios en la secuencia del ADN y cambios epigenéticos que afectan a la expresión de genes. Las alteraciones a nivel de secuencia pueden ser deleciones de regiones cromosómicas, que implican pérdida de genes que pueden estar relacionados con la regulación negativa del ciclo celular, como es el caso de los genes supresores de tumores; mutaciones génicas que pueden activar o inactivar distintas proteínas; amplificaciones génicas que conllevan la sobreexpresión de genes específicos; e incluso, pérdidas y ganancias de cromosomas enteros. En cuanto a alteraciones epigenéticas nos encontramos con el silenciamiento de genes causado por hipermetilación de las islas CpG localizadas en sus promotores, como es caso de p16INK4a, el gen MLH1 o el gen BRCA1. Cuando estas alteraciones se encuentran en las células de la línea germinal se transmiten a la

descendencia. Este es el caso del cáncer de mama, patología en la que aproximadamente un 5-10% de los afectados son consecuencia de la herencia por vía germinal de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2. También en este grupo encontramos alteraciones genéticas que transmiten una predisposición a desarrollar un tipo o varios tipos de tumores, como es el caso de la ataxia telangiectasia, cuya mutación afecta al gen ATM que está implicado en los procesos de reparación del ADN, y sus pacientes desarrollan linfomas de tipo no Hodgkin, leucemias linfocíticas agudas, carcinoma de estómago y, además, poseen una alta predisposición para el cáncer de mama. Estas alteraciones genéticas en el cáncer hereditario pueden afectar a genes supresores y a genes de reparación del ADN. Ejemplos de mutaciones en genes reparadores del ADN aparecen en algunos casos como el cáncer colorrectal hereditario de tipo no polipósico (HNPCC) con mutaciones fundamentalmente en los genes MSH2 y MLH1. En cuanto a mutaciones en genes supresores de tumores, encontramos un tipo de cáncer muy conocido como es el retinoblastoma, donde el gen alterado es el gen supresor de tumores Rb; la poliposis familiar adenomatosa, donde el gen afectado es APC; el tumor de Wilms, con el gen Wt1 mutado; las neurofibromatosis de tipo 1 y 2 con alteraciones en los genes NF1 y NF2.

Las causas del cáncer residen en: a) fallos endógenos en procesos celulares y b) agentes externos que pueden alterar nuestros genes. Estos agentes externos se pueden dividir en tres grupos: agentes químicos, algunos naturales, pero la mayoría producidos por la actividad industrial que causan entre un 80-90% de los casos; agentes físicos como radiaciones ionizantes, luz ultravioleta y fibras minerales (asbestos) que constituyen el 5% de los casos; y los virus responsables de un 5-10% de los cánceres (tales como HPV-16, HPV-18 y otros).

Hay muy pocos casos de tumores que posean alteraciones constantes, solamente en algunos procesos linfoproliferativos y algunas leucemias que tienen translocaciones características, como es el caso de los linfomas foliculares con la translocación t(14,18), linfomas del manto t(11;14), leucemia mieloide crónica t(9;22) etc. Entre los mecanismos implicados en la carcinogénesis humana, dos de ellos serán objeto de atención en este capítulo, a saber:

- 1) Mecanismos de reparación del ADN y sus alteraciones en cáncer.
- 2) Integridad de los extremos teloméricos y su implicación en cáncer.

2. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN Y CÁNCER

2.1. Mecanismos de reparación del ADN

El ADN genómico de todos los organismos está constantemente sometido a la acción de agentes exógenos y endógenos que provocan modificaciones en el mismo. Además, algunas vías del metabolismo del ADN, como es el proceso de replicación, también provocan alteraciones en su estructura debido a la introducción de errores durante la síntesis de las nuevas cadenas. Por otro lado, resulta esencial el mantenimiento de la integridad del genoma, con objeto de que éste se transmita sin alteraciones entre las distintas generaciones. Por ello, las células superiores disponen de distintos sistemas de reparación, cuya actuación está encaminada básicamente al mantenimiento de la integridad del ADN. Entre estos sistemas de

reparación cabe citar los siguientes: mecanismos de reparación por escisión de bases (Base Escisión Repair o BER), mecanismos de reparación por escisión de nucleótidos (Nucleotide Escision Repair o NER), mecanismos de reparación de errores de replicación (Mismatch Repair System o MMR), y mecanismos de reparación por recombinación homóloga.

2.2. Sistema MMR y Cáncer

El correcto funcionamiento del sistema de reparación de errores de replicación, o de apareamientos incorrectos, es crítico para el mantenimiento de la integridad del genoma. En mamíferos las proteínas del sistema MMR mejor conocidas son las que se citan en la Tabla 1.

Tabla 1. Proteínas “MMR” en mamíferos.

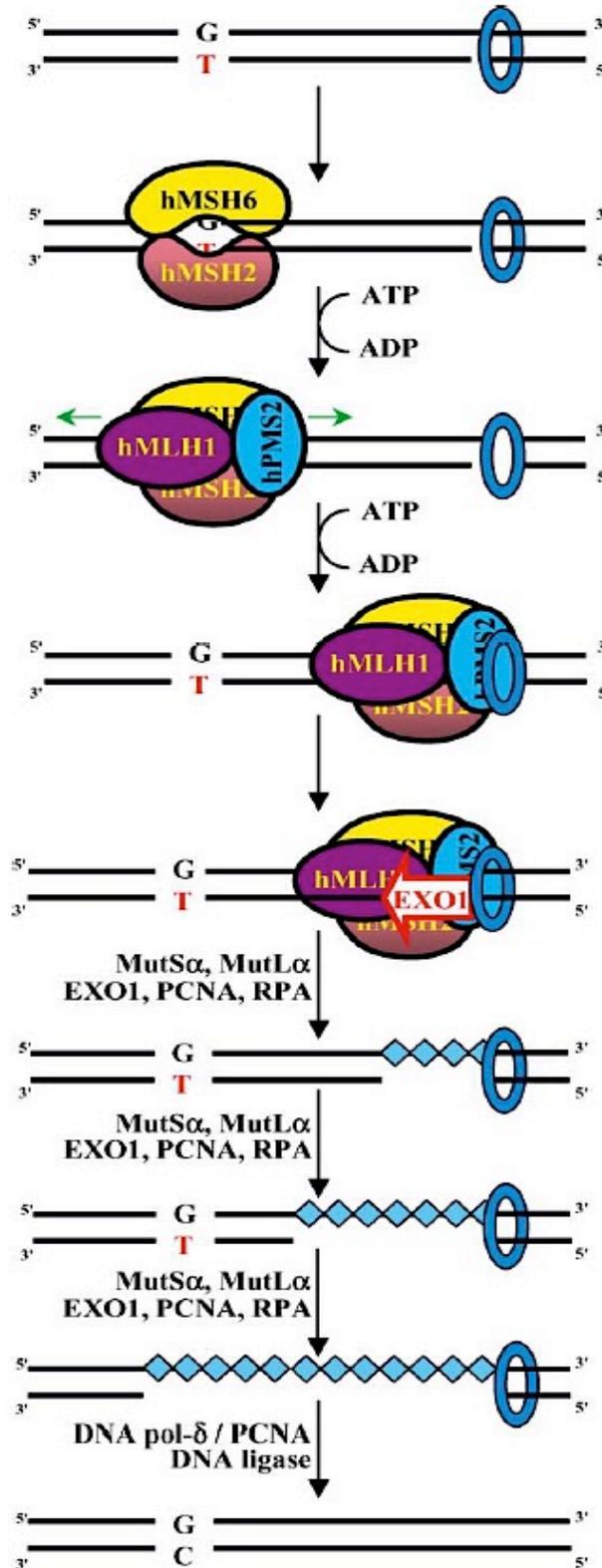
| Proteína | Función |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MSH2 | Forma heterodímeros con MSH3 y MSH6 para: Reparar errores de replicación Reparar apareamientos incorrectos en intermediarios de recombinación Impedir recombinación entre secuencias no idénticas Mediar respuesta a daño en el ADN |
| MSH3 | Forma heterodímeros con MSH2 |
| MSH4 | Forma heterodímeros con MSH5 |
| MSH5 | Forma heterodímeros con MSH4 |
| MSH6 | Forma heterodímeros con MSH2 |
| PMS2 | Forma heterodímeros con MLH1 para: Reparar errores de replicación Reparar apareamientos incorrectos en intermediarios de recombinación Impedir recombinación entre secuencias no idénticas Respuesta a daño en el ADN |
| MLH1 | Forma heterodímeros con PMS1, MLH2 y MLH3 |
| PMS1 | Forma heterodímeros con MLH1 para: Reparar errores de replicación Reparar apareamientos incorrectos en intermediarios de recombinación |
| MLH3 | Forma heterodímeros con MLH1 para reparar errores de replicación |

Este sistema actúa a través de proteínas que, en un primer paso, se encargan de reconocer las distorsiones originadas en la estructura del ADN como consecuencia de la existencia de apareamientos incorrectos de bases. El modelo actual de funcionamiento del sistema post-replicativo MMR, sugiere que el proceso en Mamíferos comienza por el reconocimiento de las bases desapareadas. En células humanas, este proceso es mediado predominantemente por el complejo heterodimérico hMSH2/hMSH6. Dicho complejo unido al par de bases desapareadas sufre un cambio conformacional dependiente de ATP, convirtiéndose en una especie de pinza deslizante susceptible de deslizarse a lo largo del esqueleto de DNA. Al complejo hMSH2/hMSH6·ATP·DNA se le une un segundo heterodímero formado por la unión hMLH1/hPMS2, proceso igualmente dependiente de ATP.

Este complejo puede translocarse en ambas direcciones en busca de una cadena discontinua. Para que la base errónea pueda ser eliminada se necesita que exista una mella en la cadena alterada y, además, que la cadena molde antiparalela permanezca intácta. Además, en Eucariotas no parece existir una actividad endonucleásica asociada a las bases desapareadas. In vitro, se ha descrito que el complejo hMSH2/hMSH6·ATP·DNA asocia a una exonucleasa 5'-3', EXO-1, la cual elimina varios cientos de nucleótidos a partir de una mella situada hacia 5' de la base desapareada, avanzando hacia la base desapareada, la cual resulta eliminada. Mientras tanto la cadena sencilla de DNA molde permanece protegida por las proteínas RPA. La exonucleasa EXO-1 se mantiene activa según se van incorporando nuevas moléculas del complejo hMSH2/hMSH6·ATP·DNA, interrumpiéndose su

actividad cuando debido a la eliminación de la base desapareada se dejan de incorporar nuevas moléculas de hMSH2/hMSH6 al DNA. Entonces, se inicia la fase de relleno de la cadena mellada, interviniendo el sistema

enzimático replicativo DNA-polimerasa δ -PCNA. Finalmente, la DNA-ligasa sella la cadena reparada (ver Figura anexa, tomada de DNA Repair 2004; 3: 1091-1101).



Parece lógico pensar que cualquier alteración en las

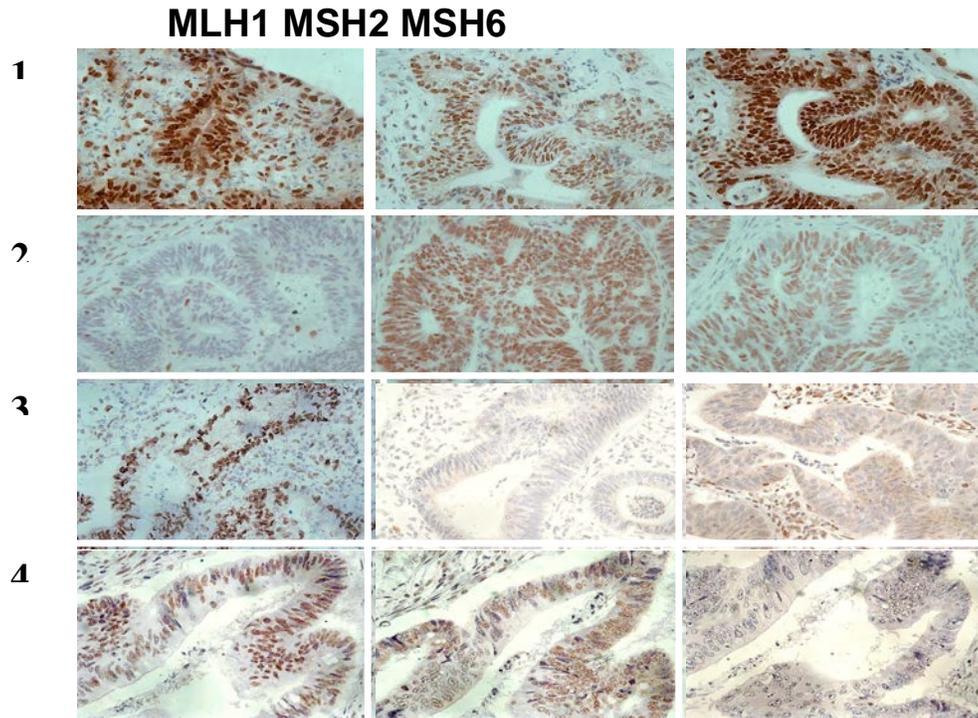
proteínas que intervienen en el correcto funcionamiento de

los sistemas de reparación citados, tendría que conducir a un incremento en la frecuencia de mutaciones en el ADN y, por tanto, estaría íntimamente relacionada con el cáncer. Sin embargo, únicamente algunos genes codificantes de proteínas reparadoras del ADN se han encontrado mutados en el cáncer. Entre estos destacan aquellos que codifican para las proteínas del sistema MMR.

Las alteraciones que afectan a las proteínas del sistema MMR (proteínas “Mut”) conducen a un acumulo de mutaciones en el ADN. Este hecho ocasiona lo que ha dado en denominarse “Fenotipo Mutador”. En humanos, las alteraciones en el sistema MMR se detectaron por primera vez en 1993, en tumores de colon, endometrio, ovario y otros órganos relacionados con el Síndrome del Cáncer de colon hereditario sin poliposis (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer o HNPCC). El estudio de estos tumores reveló que sus células tienen un elevado número de mutaciones y presentan, además, una gran inestabilidad en los microsatélites o secuencias cortas repetidas que se localizan a lo largo de todo el genoma. Si bien los microsatélites son secuencias pequeñas, sus alteraciones implican que los genes en los que se encuentran están sufriendo mutaciones. Sin embargo, se ha observado que la inestabilidad de microsatélites en células de cánceres humanos se asocia a alteraciones en ciertos genes codificantes para las proteínas que reparan los errores ocurridos durante la replicación del ADN. Son los genes MMR y se ha calculado que estos genes proporcionan al genoma humano un nivel de protección de 100 a 1000 veces frente a la aparición de mutaciones durante la replicación del ADN. Además del ya mencionado síndrome HNPCC, el modelo tumorigénico del fenotipo mutador se ha demostrado en otros tipos de cánceres humanos, entre los que cabe destacar el cáncer de colon esporádico. Aproximadamente entre 12-15% de estos últimos cursan por la vía carcinogénica del fenotipo mutador y también en estos la inestabilidad en microsatélites puede considerarse un indicador de alta tasa de mutación génica. Entre los genes del sistema MMR implicados, hasta la fecha, en el desarrollo de tumores humanos a través de la vía del fenotipo mutador cabe

destacar a hMSH2, hMSH3, hMSH6, hMLH1, hPMS1 y hPMS2. A pesar de que no hay certeza de que todos los casos con fenotipo mutador sean consecuencia de mutaciones en los genes MMR, lo cierto es que la presencia de estas alteraciones incrementa la tasa de mutaciones en todo el genoma y, serían responsables del desarrollo tumoral cuando estas alteraciones afectan a secuencias directamente relacionadas con la proliferación celular. Por tanto, el proceso puede iniciarse con la mutación de algún gen MMR, lo cual aumentaría enormemente la frecuencia de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores, favoreciéndose la adquisición del fenotipo canceroso. La mayoría de las mutaciones en familias HNPCC se han encontrado en los genes hMLH1 y hMSH2. Estas mutaciones pueden ser puntuales (“missense mutations”) o cambiar el sentido de la lectura del mismo (“frameship mutations”). Estas últimas son más prevalentes y, habitualmente, introducen un codon de parada en la secuencia génica, con el resultado del truncamiento de la síntesis de la proteína correspondiente. Ello, ha permitido desarrollar un estudio inmunohistoquímico de las proteínas reparadoras MMR en pacientes de riesgo, con el consiguiente valor diagnóstico (ver Figura adjunta, tomada de *Oncology Reports* 2004; 12: 621-629).

En la misma, se recogen una serie de inmunohistoquímicas (IHC) de tumores precedentes de familias HNPCC. Como puede observarse en el caso 1, dicho tumor expresa las tres proteínas objeto de estudio, a saber: MLH1, MSH2 y MSH6. Por el contrario, en el caso 2, el más frecuente en población española, se ha perdido la expresión de la proteína MLH1 debido al truncamiento de la misma, siendo positiva para las proteínas MSH2 y MSH6. En el caso 3, se ha perdido la expresión de la proteína MSH2 debido al truncamiento de la misma, siendo positiva para las proteínas MLH1 y MSH6. Finalmente, en el caso 4, el más infrecuente, se ha perdido la expresión de la proteína MSH6 debido al truncamiento de la misma, siendo positiva para las proteínas MLH1 y MSH2.



En población española, de los dos genes más alterados, es decir, los genes MLH1 y MSH2, el gen más alterado es el MLH1. Ambos genes presentan una gran penetrancia, de modo que un alto porcentaje de los miembros familiares que presenta la mutación en DNA sanguíneo llegan a desarrollar un cáncer colorrectal temprano. Algunas de las mutaciones descritas en dicha población en MLH1, lo han sido por primera vez en la literatura, en familias que fueron seleccionadas de acuerdo con los criterios de Amsterdam (ver Tabla 2, tomada de Human Mutation

2001; 18: 549). Sin embargo, no se han descrito dichas mutaciones en tumores colorrectales esporádicos con inestabilidad a microsatélites (RER+). Por el contrario, si se han descrito alteraciones epigenéticas en genes reparadores de los errores de replicación. En concreto, el gen MLH1 presenta una alta incidencia de inactivación del mismo por hipermetilación de su promotor. Sin embargo, no se ha descrito dicha hipermetilación en el gen MSH2, o en el MSH6.

TABLA 2: MUTACIONES EN LOS GENES MLH1 Y MSH2 EN FAMILIAS ESPAÑOLAS HNPCC

Table 2 Pathogenic mutations at the hMLH1 and hMSH2 genes in Spanish HNPCC families

| Family | Clinical criteria | N° of Tumors | Median age at onset (y) | Earliest age at onset (y) | Gen | Exon/ Intron | Nucleotide Mutation | Amino acid change | Predicted consequence | MSI |
|--------|-------------------|----------------|-------------------------|---------------------------|------|--------------|---------------------|-------------------|-----------------------|-----|
| 48 | Amsterdam | 5C,1E,1Ov | 42 | 23 | MLH1 | 17 | IVS 1990-1 G→A* | NA | Splice site loss | Yes |
| 22 | Amsterdam | 5C,1Ov | 44 | 26 | MLH1 | 13 | 1420 del C* | Stop 490 | Truncation | Yes |
| 29 | Amsterdam | 4C | 45 | 35 | MLH1 | 13 | 1459 C→T | Stop 487 | Truncation | Yes |
| 7 | Amsterdam | 3C,1G,1Bld | 60 | 42 | MLH1 | 5 | IVS 453 +2 T→C* | NA | Splice site loss | Yes |
| 42 | Amsterdam | 3C,1G | 36 | 27 | MLH1 | 11 | 955 G→T* | Stop 319 | Truncation | Yes |
| 13 | Amsterdam | 5C,1E,1Ov,1GBs | 42 | 34 | MSH2 | 14 | 2239 del AT* | Stop 747 | Truncation | Yes |
| 53 | Amsterdam | 3C,1G,1Ut1Ure | 41 | 27 | MSH2 | 7 | 1165 C→T | Stop 389 | Truncation | Yes |
| 12 | Bethesda 4 | 1C | 45 | 45 | MLH1 | 16 | 1852 AA→GC | K618A | Missense♦ | Yes |
| 30 | Bethesda 3 | 1C,1G | 57 | 37 | MLH1 | 16 | 1852 AA→GC | K618A | Missense♦ | Yes |
| 30 | Bethesda 3 | 1C,1G | 57 | 37 | MLH1 | 19 | 2146 G→A | V716M | Missense♦ | Yes |
| 3 | Bethesda 2 | 1C,1Gs,1Mg,1F | 47 | 42 | MLH1 | 19 | 2146 G→A | V716M | Missense♦ | Yes |
| 44 | Amsterdam | 4C,2E | 49 | 38 | MLH1 | 16 | 1865 T→A* | L622H | Missense | ND |

C: colon, G: gastric, Bld: bladder, Ov: ovarian, E: endometrial, GBs: glioblastoma, Gs: glioma, Mg: meningioma, F: fibrosarcoma, Ut: urotelial and Ure: ureter cancer; NA: not applicable; ND: not done; y: years; MSI: microsatellite instability; del: deletion ; * new mutation not previously reported; ♦Loss of Function in the yeast functional assay (36)

Estas alteraciones primarias descritas en familias HNPCC, dan pie a alteraciones secundarias de otros genes, los cuales contienen secuencias microsatélites en su marco de lectura. Dichas secuencias microsatélites presentan inestabilidad, lo cual es típico del fenotipo mutador. Así, se han descrito alteraciones en genes tales como el receptor de TGF-beta tipo II, el cual media una señal inhibitoria esencial en la inhibición de la proliferación celular en células epiteliales, el gen Bax y el gen de la Apaf-1, estos dos últimos implicados en el proceso de muerte celular programada o apoptosis. Los datos existentes en la bibliografía indican que los adenocarcinomas colorrectales de naturaleza esporádica que presentan fenotipo RER+ se correlacionan con una menor agresividad que el grupo perteneciente al fenotipo RER-. Si bien el mecanismo molecular aún no ha sido esclarecido por completo, lo cierto es que estos tumores confieren una menor agresividad y los pacientes afectados presentan un pronóstico claramente más favorable. Datos recientemente publicados indican que los tumores RER+ podrían no desencadenar la activación de determinadas metaloproteasas necesarias para propiciar la invasión tumoral. Así, se han descrito en dichos tumores mutaciones en el promotor de la MMP3, las cuales inactivan su actividad transcripcional. Dichas mutaciones no se han encontrado en los tumores RER-. Esta menor expresión de MMP3 podría explicar la menor activación de la metaloproteasa MMP9 descrita en los tumores RER+ en comparación con los RER-, la cual es un indicador de mal pronóstico en cáncer colorrectal esporádico.

Los errores de apareamiento celular surgidos durante el proceso celular de la replicación del DNA en el transcurso

del ciclo celular, pueden producirse igualmente durante la recombinación homóloga o como resultado del daño del DNA. El resultado es que las células deficientes en el sistema MMR de reparación del DNA aumentan su frecuencia de recombinación, dado que el sistema MMR supone una barrera a las recombinaciones entre secuencias divergentes, jugando, por tanto, un papel crucial en la salvaguardia del genoma.

2.3. Recombinación homóloga y Cáncer

El daño en la doble cadena del DNA (DSB) es el de más riesgo para la integridad del genoma humano, ya que puede desencadenar una pérdida extrema del mismo. De hecho, dicho daño es muy frecuente y se estima su incidencia en 10 errores por célula y día en Mamíferos. Ello es debido, a que dichos errores de doble cadena (DSBs) se deben tanto a factores exógenos de tipo medio ambiental tales como las radiaciones ionizantes, o la exposición a agentes genotóxicos, como a factores endógenos tales como el colapso de la horquilla de replicación durante la replicación del ADN, o durante la reparación del DNA, o a mecanismos oxidativos mediados por los radicales libres (ROS). De hecho, la rotura por endonucleasas de la doble cadena del DNA forma parte del proceso de meiosis, así como del reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas. La persistencia de dichas roturas puede resultar en una parada del ciclo celular y apoptosis. La incorrecta reparación de los DSBs puede provocar una inestabilidad cromosómica en forma de pérdida cromosomal, amplificación génica o reordenamientos genéticos que pueden desencadenar un proceso canceroso. En consonancia con la magnitud del

daño del genoma, los mecanismos de reparación del daño de cadena doble son más complejos que los de cadena sencilla. De hecho, existen tres mecanismos de reparación del daño de cadena doble en Eucariotas, a saber: 1.- El mecanismo de unión de terminaciones no homólogas (NHEJ); 2.- El mecanismo de anillamiento de cadenas sencillas (SSA); 3.- La recombinación homóloga (HR). Mientras el mecanismo de NHEJ predomina en la reparación de los DSBs en las células en Go/G1, el de HR predomina en la reparación de los DSBs en células en fases S y G2 del ciclo celular. Dicha reparación cromosómica requiere el uso de la cromátida hermana a la dañada como molde, e implica toda una compleja maquinaria enzimática celular, a saber: El complejo MRN formado por las proteínas Mre11/Rad50/NBS1, la proteína de replicación A (RPA), Rad51, Rad52, el heterodímero Rad55/Rad57, Rad54 y en Eucariotas superiores los parálogos de Rad51 y la proteína BRCA2. La importancia individual de estos genes viene marcada por sus alteraciones patológicas de tipo monogénico. Así, los genes Rad51 o BRCA2 son letales embrionarios. El defecto en el gen NBS1 produce el Síndrome de Nijmegen. Las mutaciones en el gen Mre11 dan lugar a la enfermedad similar a la Ataxia-telangiectasia (ATLD). Ambas enfermedades presentan alterados los puntos de control del ciclo celular y reordenamientos cromosómicos. Finalmente, el gen BRCA2 conocido como el gen de la anemia de Fanconi D1, es de gran importancia oncológica. Así, sus mutaciones producen susceptibilidad a los cánceres de mama y ovario.

La recombinación homóloga (HR) puede jugar un papel fundamental en los mecanismos carcinogénicos. Tres modelos de carcinogénesis son los más comúnmente aceptados, a saber: 1.- El modelo más sencillo es el de una única alteración génica. Esta única alteración puede recaer en un oncogen, cuya ganancia de función puede producir el fenotipo tumoral. Así, puede ocurrir con alteraciones en oncogenes tales como c-ABL1, H-RAS, c-MYC, c-ERBB, v-FOS, y c-JUN. Alternativamente, el modelo de una única alteración génica puede recaer en un gen recesivo que presente una mutación, la cual conlleva generalmente una pérdida de heterocigosidad (LOH). 2.- El modelo más sencillo de dos alteraciones es el que recae sobre genes recesivos que presentan pérdida de heterocigosidad debido a la mutación de uno de los dos alelos por vía hereditaria o somática. Este es el caso de genes supresores tales como p53, p105Rb, o APC, cuya pérdida de función puede dar lugar al fenotipo tumoral. 3.- Finalmente, la carcinogénesis mediada por la aparición de múltiples alteraciones. El escenario más obvio sería la alteración primaria de la maquinaria de reparación del DNA, seguida de una acumulación secundaria de múltiples genes que afecten al fenotipo tumoral, o el desarrollo de una alta inestabilidad genómica. Estos pacientes con una tasa de inestabilidad genómica elevada tienen una mayor incidencia de cáncer que el resto de la población general, así como un desarrollo más temprano de ciertos tumores.

La HR puede jugar un papel fundamental en la pérdida

de heterocigosidad como acontecimiento primario o secundario del proceso canceroso. Además, determinadas enfermedades que predisponen al desarrollo de cáncer tienen un fenotipo de inestabilidad genética, algunas de las cuales presentan una tasa elevada de HR. Dicha elevación de la tasa de recombinación homóloga celular hace que se pueda aumentar la LOH, pero además aumenta las probabilidades de que la HR cause reordenamientos cromosómicos aberrantes que puedan actuar como paso inicial en el proceso carcinogénico. De hecho, la HR es más prevalente en células proliferativas. Finalmente, las células cancerosas que tienen activado el sistema de HR desarrollan una tasa alta de inestabilidad genómica y, además, muestran una resistencia al tratamiento con quimioterápicos antineoplásicos.

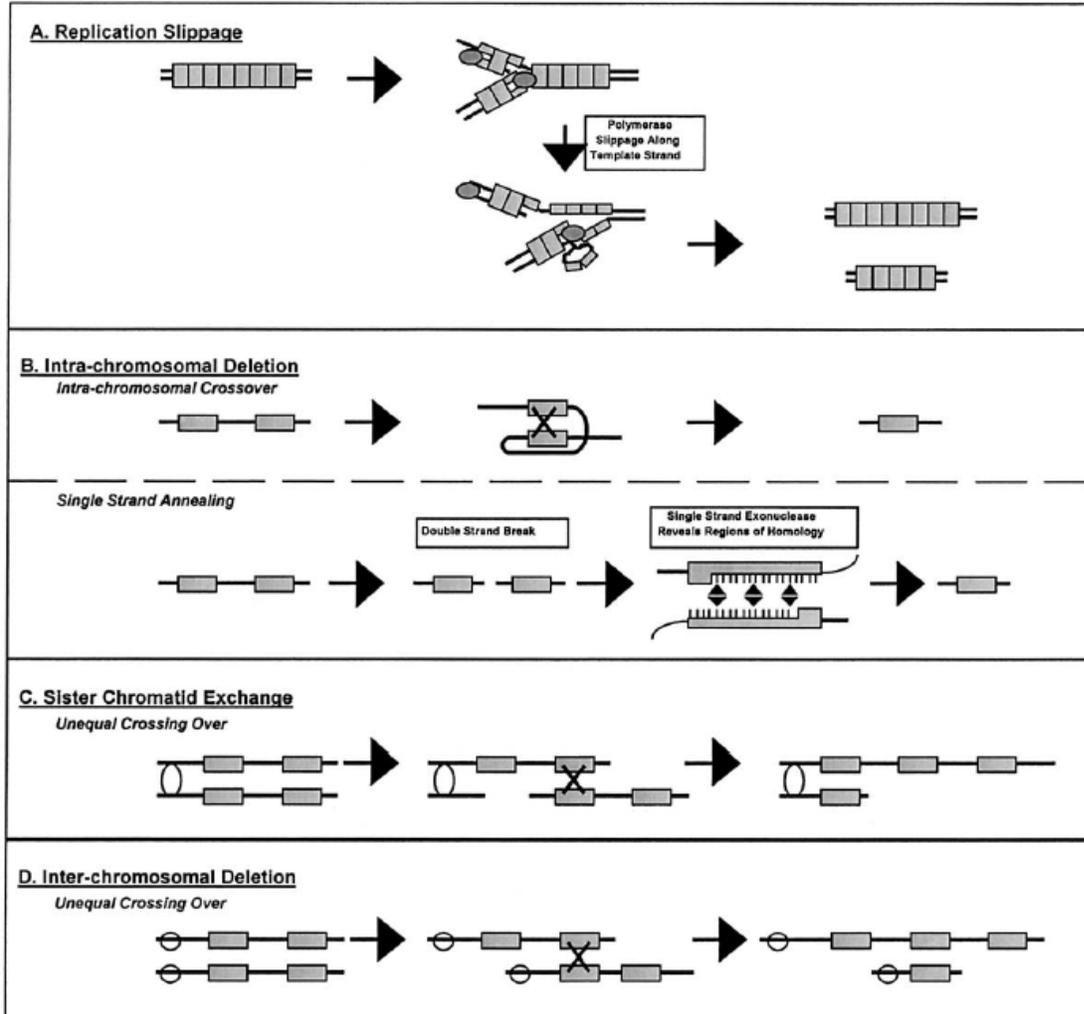
2.3.1. Mecanismos de pérdida de heterocigosidad.

Hay tres mecanismos básicos que pueden producir una delección del DNA. A saber: 1.- Replicación deslizante. 2.- Recombinación intracromosomal. 3.- Recombinación intercromosomal (ver Figura anexa).

1.- La replicación deslizante puede producir delecciones durante la síntesis del DNA. Estas delecciones tienden ser pequeñas y restringidas a regiones con secuencias repetitivas de unos pocos nucleótidos. El ejemplo más común es la inestabilidad a microsatélites, un fenómeno muy prominente en el cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC), el cual acumula errores asociados al proceso replicativo.

2.- Las delecciones intracromosomales son el resultado de recombinaciones aberrantes, muchas veces mediadas por regiones de homología, y pueden deleccionar regiones muy grandes del DNA. Hay varios mecanismos que pueden producir delecciones intracromosomales mediadas por HR, los tres más importantes son, a saber: 2.a. Entrecruzamiento cromosomal entre cromosomas homólogos no necesariamente asociado o no a la replicación celulares. El entrecruzamiento es mediado por secuencias homólogas alineadas, posiblemente seguida por una rotura de cadena sencilla lo cual permite la recombinación de dos secuencias homólogas y la delección de una secuencia de intervención. 2.b. Anillamiento de cadena sencilla. Este mecanismo requiere una doble rotura del DNA entre las secuencias homólogas. Una exonucleasa elimina el fragmento intermedio, de manera que los extremos rotos del DNA se anillan. 2-c. Intercambio de cromátidas hermanas desiguales asociado a la replicación celular, y en concreto a la fase G2 del ciclo celular, tras la replicación de las mismas pero antes de su segregación. El resultado es la formación de dos cromosomas recombinantes, uno deleccionado y otro triplicado.

3.- Las recombinaciones inter- o intra-cromosomales solo son distinguibles por la presencia o ausencia de un producto de duplicación recíproco. La presencia de duplicaciones en genes sugiere la existencia de un mecanismo de entrecruzamiento intercromosomal entre cromosomas homólogos (ver Figura anexa tomada de *Experimental and Molecular Pathology* 2003; 74: 94–105).



2.3.2. Alteraciones genéticas y recombinación homóloga

Asumiendo que los reordenamientos genéticos y las deleciones causan una proporción significativa de tumores, debería haber una correlación entre aquellas alteraciones genéticas que resultan en un aumento en la frecuencia de recombinación homóloga y la predisposición al cáncer. De hecho, existen varias enfermedades genéticas asociadas a un fenotipo de inestabilidad genética que desarrollan una alta frecuencia de desarrollar cáncer. Entre otra cabe destacar el Síndrome de Li-Fraumeni descrito por Livingstone en 1992, la ataxia-teleangiectasia (AT) descrita por Meyn en 1993 y los Síndromes de Lynch I y II de cáncer colorrectal familiar no polipósico (HNPCC) descritos por Lynch.

El Síndrome de Li-Fraumeni es una enfermedad hereditaria dominante caracterizada por el desarrollo temprano de cánceres. Entre los más prominentes destacan los carcinomas de mama, seguidos por los sarcomas, tumores cerebrales, leucemias, carcinomas de pulmón, carcinomas adrenocorticales, generalmente en niños o jóvenes adultos. El riesgo global de cáncer de estos

pacientes es del 100%, de entre los que un 50% desarrolla carcinoma de mama antes de los 50 años. Dichos pacientes son portadores por línea germinal de una mutación recesiva en el gen p53. Dicho gen puede inhibir la recombinación homóloga, por interacción con la proteína de la maquinaria de recombinación homóloga RAD51. La pérdida de función de p53 debido a una mutación genéticamente heredada asociada a la pérdida de heterocigosidad del alelo salvaje, trae como consecuencia un aumento de la frecuencia de recombinación homóloga celular.

La Ataxia telangiectasia (AT) es una enfermedad autosómica recesiva que cursa con inestabilidad cromosómica, radiosensibilidad y susceptibilidad al cáncer linfóide en la infancia. Aunque es una enfermedad rara, el 1% de la población general es heterocigota para mutaciones en el gen ATM. Estos portadores pueden tener predisposición a generar cáncer esporádico de mama. Las células procedentes de los pacientes con AT muestran inestabilidad cromosómica, tanto espontánea como inducida por radiaciones ionizantes o agentes radiomiméticos. El análisis citogenético revela una alta

incidencia de roturas cromosómicas, vacíos cromosómicos y aneuploidia. Tras la exposición a radiaciones ionizantes, las células de los pacientes de AT presentan una mayor incidencia de aberraciones cromosómicas comparadas con las células normales. Además, los ratones carentes del ATM presentan una mayor incidencia de recombinación homóloga (HR).

El gen ATM está implicado en la inducción de p53 en respuesta al daño cromosómico. De hecho, su papel es claramente multifuncional, incluyendo la fosforilación del gen BRAC1 tras la irradiación. Además, el gen ATM, a través del gen c-ABL1, está ligado a la proteína de HR RAD51. Al igual que en el caso de su interacción con p53, no se conoce como la interacción con RAD51 pueda afectar al mecanismo de recombinación homóloga (HR).

La mutación en el gen BRAC1 confiere un riesgo del 70% de contraer un cáncer de mama antes de los 70 años de edad. Además, las mutaciones en los genes BRAC1 y BRAC2 dan cuenta del 12-28% de los cánceres de mama premenopáusicos, los cuales presentan asociación familiar. La inactivación de BRAC1 o BRAC2 confiere inestabilidad genética a las células tales como aneuploidia o reordenamientos cromosómicos. De hecho, ambos genes juegan un papel central en la recombinación homóloga, de manera que su ausencia resulta en una deficiencia en la reparación de las roturas de cadena doble por HR. De esta manera, los genes BRAC1, BRAC2 y RAD51, de manera dependiente del gen ATM, forman focos en el núcleo celular tras el daño del DNA de doble cadena. De hecho, el gen RAD51 forma parte de un complejo formado por las proteínas RAD51, RAD52 y RAD54. La cinética de estos focos nucleares está alterada en las células deficientes en el gen ATM. No obstante, se desconoce la relación de estos focos nucleares y el mecanismo de recombinación homóloga (HR).

Aunque el síndrome de la AT está ligado a las mutaciones en el gen ATM, otras dos mutaciones resultan en síndromes que originariamente fueron confundidos con la enfermedad de AT. Estas variantes de AT son causadas por mutaciones en el gen NBS (Síndrome de rotura de Nijmegen) y en el gen MRE11A. Estas dos variantes presentan un fenotipo similar a la enfermedad de AT, incluyendo la inestabilidad cromosómica. De hecho, los genes NBS, MRE11A y RAD50 forman un complejo modulado por el gen NBS, tras su fosforilación por el gen ATM en respuesta al daño cromosómico.

3. INTEGRIDAD DE LOS EXTREMOS TELOMÉRICOS Y CÁNCER

3.1. Telomerasa y Telómeros

La telomerasa es la enzima que utilizan la mayoría de los organismos eucarióticos para el mantenimiento de sus telómeros. Mediante la incorporación de secuencias teloméricas en el extremo 3' de los cromosomas se equilibra la pérdida de nucleótidos que tiene lugar con cada división celular, como consecuencia del problema de la replicación terminal. Los telómeros son estructuras

especializadas formadas por ADN y proteínas que constituyen, por tanto, los extremos de los cromosomas lineales eucarióticos. Son esenciales para el mantenimiento de la estructura y función de los cromosomas y para la viabilidad celular. El ADN telomérico consiste en repeticiones en tándem de secuencias nucleotídicas cortas ricas en residuos de guanina en dirección 5'→3'. Aunque todos los telómeros de un mismo genoma presentan las mismas repeticiones, éstas varían entre las distintas especies, si bien es notable la gran conservación que existe en las secuencias teloméricas de especies tan distantes en la evolución como vertebrados, plantas y protozoos. En el caso de los telómeros humanos la secuencia que se repite es TTAGGG. En asociación con el ADN telomérico, se sitúan distintas proteínas cuyas funciones se resumen en la Tabla 3.

Los telómeros no sólo actúan como los extremos físicos de los cromosomas que impiden la pérdida de secuencias codificantes, sino que además desempeñan funciones esenciales para el mantenimiento de la función cromosómica. Así, protegen a los cromosomas de procesos de degradación, fusión y recombinación que amenazarían la integridad cromosómica, participan en la organización de la arquitectura nuclear, desempeñando un papel crítico en la segregación cromosómica durante la mitosis y meiosis, e intervienen en funciones de regulación de la expresión génica, mediante el fenómeno conocido como TPE (Telomere Position Effect).

3.2. Telomerasa: componentes y actividad

Desde su identificación en *Tetrahymena*, la telomerasa ha sido estudiada y caracterizada en diversos organismos eucarióticos, entre los que se incluyen ciliados, levaduras, ratones y humanos. Hasta la fecha, todas las telomerasas conocidas son ribonucleoproteínas ADN polimerasas que constan de un componente ARN y de diversos componentes de naturaleza proteica, entre los que destaca la subunidad catalítica de la enzima. El componente ARN de la telomerasa humana, denominado hTR, está codificado por un gen de copia única localizado en 3q26.3. Su transcripción por la ARN polimerasa II y posterior procesamiento en el extremo 3', produce un transcrito maduro de 451 nucleótidos. La región molde para la transcripción inversa, complementaria a la secuencia del ADN telomérico humano (TTAGGG)_n está próxima al extremo 5' y comprende 11 nucleótidos de secuencia 5'-CUAACCCUAAC - 3'. La subunidad catalítica de la telomerasa humana, hTERT, está codificada por un gen de copia única de 40 kb localizado en 5p15.33 compuesto por 16 exones y que genera una proteína de 127 kDa con 1132 aminoácidos. En su extremo N-terminal presenta un dominio T específico de la telomerasa, pues no se encuentra presente en ningún otro tipo de proteínas. En el extremo C-terminal existen siete motivos responsables de la actividad catalítica, motivos RT, comunes a la familia de las transcriptasas inversas (RTs) que incluyen ciertos residuos de aspártico esenciales para la actividad retrotranscriptasa.

La expresión de hTR se ha demostrado en numerosos tejidos, tanto normales como neoplásicos, con independencia de la actividad telomerasa, por lo que no parece ser el componente limitante de la actividad de la enzima. A diferencia del componente ARN, la expresión de hTERT está limitada a tejidos con actividad telomerasa. El gen que codifica para la proteína se expresa a niveles altos en tumores primarios, líneas celulares inmortales y tejidos telomerasa-positivos, pero no en tejidos sin actividad telomerasa. La expresión ectópica de hTERT en células telomerasa-negativas es suficiente para reconstituir la actividad telomerasa. Además, el nivel de expresión del ARNm de hTERT se correlaciona con el nivel de la actividad enzimática del complejo telomerasa. Todos estos estudios apoyan el papel de hTERT como factor limitante de la actividad telomerasa. Si bien la coexpresión de hTR y hTERT es suficiente para reconstituir la actividad telomerasa *in vitro*. Sin embargo, estudios bioquímicos y genéticos sugieren que *in vivo* son necesarios ciertos factores adicionales a este núcleo mínimo, los cuales podrían estar implicados en la biogénesis y ensamblaje de la enzima activa, así como en la regulación del acceso a su sustrato, los telómeros.

Desde el descubrimiento del problema de la replicación terminal y la implicación de los telómeros y la telomerasa en el mismo, distintos estudios plantearon un posible papel de los telómeros en el control de la senescencia celular, que llevaron al planteamiento de la llamada hipótesis telomérica. Esta hipótesis propone que la pérdida telomérica progresiva es un factor limitante en la capacidad replicativa celular y emite una señal que desencadena la entrada en senescencia, de tal modo que los telómeros actúan a modo de reloj mitótico que controla el número de divisiones que una célula puede experimentar. Según el modelo de la hipótesis telomérica (Figura 5), en los tejidos germinales y en una minoría de los tejidos somáticos con alta tasa de proliferación, la longitud de los telómeros se mantiene a medida que las células se dividen debido a la presencia de la telomerasa. Sin embargo, en la mayoría de tejidos somáticos, los telómeros sufren un acortamiento progresivo, pues carecen de la enzima. Cuando los telómeros alcanzan una longitud crítica, las células entran en la fase de mortalidad 1 (M1), donde sufren una parada prolongada del ciclo celular en G1 y, al cabo de cierto tiempo, mueren. El estímulo que induce la parada del crecimiento son las señales de lesión del ADN que se emiten como respuesta a la pérdida telomérica. En estas condiciones, existen células capaces de evadir la senescencia, por ejemplo, células transformadas con oncogenes virales que tienen inactivadas las vías controladas por p53 y Rb. Estas células son capaces de ignorar los avisos para detener su crecimiento y adquieren una ampliación de su capacidad replicativa en la que siguen acortando sus telómeros. Esta ampliación es limitada y finaliza en la fase de mortalidad 2 (M2) o crisis, en la cual la mayor parte de las células han acumulado gran cantidad de alteraciones cromosómicas y sufren apoptosis de manera masiva. Según este modelo, la

reactivación de la actividad telomerasa, o de cualquier otro mecanismo capaz de mantener la longitud telomérica, estabiliza el acortamiento de los telómeros, lo cual trae como resultado un escape de M2 y la adquisición de la inmortalidad celular.

3.3. Mecanismos de mantenimiento telomérico alternativos a la telomerasa (ALT)

Si bien la activación de la telomerasa es el mecanismo predominante para el mantenimiento de la función y longitud telomérica, distintos organismos eucarióticos emplean otras alternativas de regulación telomérica que no incluyen a la telomerasa. En el caso de células humanas también se conocen mecanismos alternativos de mantenimiento telomérico o ALT (Alternative Lengthening of Telomeres), basados en procesos de recombinación homóloga que implican específicamente a los telómeros. Estos mecanismos se han descrito en líneas celulares y en tumores primarios que mantienen sus telómeros en ausencia de actividad telomerasa. Una de las características de las células humanas con ALT, y que permite su detección, es la presencia de telómeros muy largos y heterogéneos, así como la existencia de unas estructuras nucleares denominadas APBs (ALT-associated PML bodies).

3.4. Telómeros, Telomerasa y cáncer

Lo expuesto en los párrafos anteriores de este apartado, con respecto a la conexión entre el mantenimiento de los telómeros y la regulación de las funciones replicativas celulares, implica que las alteraciones en la biología telomérica juegan un papel importante en la transformación celular maligna. En apoyo de esta hipótesis existen en la bibliografía distintos trabajos de investigación en los que se demuestra la reactivación de la telomerasa en la mayoría de los tumores humanos, y la ausencia de esta enzima en los tejidos normales. Los últimos estudios indican que durante las etapas tempranas de la transformación celular, la longitud de los telómeros actuaría limitando la expansión celular; sin embargo, en etapas más avanzadas, coincidiendo con la reactivación de la telomerasa o con la actuación de mecanismos alternativos a la misma (ALT), la oncogénesis se facilitaría (Tabla 4). Por otro lado, además de la función de los telómeros facilitando la inmortalización celular, estas secuencias determinan otro aspecto crítico en la transformación maligna. El acortamiento de los telómeros conduce a la senescencia celular, un proceso que se acompaña de fusiones cromosómicas e incremento de la inestabilidad genómica. Como consecuencia de estos cambios en la estructura genómica, se ha observado que se activa la telomerasa o se ponen en marcha los mecanismos ALT, lo cual facilita la inmortalización celular. Sin embargo, este incremento de la inestabilidad genómica causado por el acortamiento telomérico y la pérdida de la función protectora de los telómeros, puede también conducir a la transformación maligna, en ciertas condiciones. De hecho existen suficientes evidencias que

relacionan el mantenimiento de las secuencias teloméricas, fundamentalmente por reactivación de la telomerasa, y el cáncer.

3.5. Implicaciones clínicas de la telomerasa en cáncer

La detección de la actividad telomerasa en células tumorales in vivo fue descrita por primera vez en 1994, gracias al desarrollo de un método sencillo conocido como TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol). Desde entonces, y gracias a numerosas modificaciones del ensayo original, se ha procedido al análisis de la actividad telomerasa en los diferentes tipos de tumores humanos primarios, así como en tumores metastásicos, lesiones premalignas, tumores benignos y muestras de tejidos normales adyacentes a los correspondientes tumores. Globalmente, alrededor del 85% de los tumores analizados hasta la fecha presentan actividad de la enzima. Los avances logrados en los últimos años, en relación con el entendimiento del papel de los telómeros y de la telomerasa en la patofisiología del cáncer humano, indican que las estrategias encaminadas al análisis de la longitud telomérica y de la actividad telomerasa pueden tener una gran utilidad en el establecimiento del diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los procesos cancerosos humanos. En particular, la telomerasa se ha convertido, en los últimos años, en una diana atractiva para el diseño de compuestos útiles en terapia anticancerosa.

3.5.1. Utilidad de la telomerasa en el diagnóstico del cáncer

La fuerte asociación existente entre la actividad telomerasa y la malignidad celular ha ofrecido la posibilidad de utilizar la telomerasa como marcador en el diagnóstico del cáncer. El empleo de métodos de detección de la enzima de alta sensibilidad y especificidad basados en el ensayo TRAP, así como su análisis a bajo coste en una amplia variedad de muestras, desde biopsias hasta distintos tipos de fluidos corporales que reducen la invasividad, ha potenciado la utilidad de la telomerasa como marcador diagnóstico en distintos tipos tumorales. Además, también puede constituir una herramienta de gran valor en la detección precoz del cáncer o de las metástasis tempranas. Para ello, resulta de vital importancia conocer la expresión diferencial de la telomerasa en los distintos tejidos del organismo. En el caso de la detección precoz, es especialmente relevante conocer la expresión de la enzima durante los estadios benignos, tempranos y avanzados del tumor. Así, por ejemplo, en el caso de la carcinogénesis colorrectal, uno de los modelos mejor caracterizados en lo que respecta a las alteraciones moleculares que tienen lugar en cada etapa del proceso, se ha demostrado que la reactivación de la telomerasa parece ser un evento obligado en la transición de adenoma a carcinoma. Es más, se ha llegado a postular que dicha reactivación tiene lugar después de la mutación en K-ras pero antes de que se produzcan mutaciones en p53. Asimismo, en el desarrollo de carcinomas de tiroides, se ha visto que los estadios benignos y menos avanzados presentan niveles bajos o

indetectables de actividad telomerasa.

3.5.2. Papel de la telomerasa como marcador pronóstico en cáncer

La utilidad de la telomerasa como marcador pronóstico en cáncer se basa en estudios llevados a cabo en distintos tipos celulares, a partir de los cuales se ha postulado que la presencia o no de actividad telomerasa determina, respectivamente, la infinita o finita capacidad proliferativa de las células que integran los distintos tumores. En base a estos análisis, se ha propuesto que los tumores pueden ser divididos en dos grupos: aquellos que contienen células inmortales y aquellos que, por el contrario, carecen de ellas. La correlación entre telomerasa y pronóstico clínico se ha puesto de manifiesto en determinados tipos de cáncer. Así, en cáncer de pulmón, analizando una amplia población de carcinomas no microcíticos (CNMP) y de carcinomas microcíticos (CMP), se observó que los tumores pertenecientes al primer grupo presentaban actividades que oscilaban entre niveles prácticamente inexistentes hasta niveles altos. Sin embargo, en todos los carcinomas microcíticos de pulmón analizados, se observaron niveles muy altos de actividad de la enzima. Estos datos concuerdan con el hecho de que los carcinomas microcíticos de pulmón presentan globalmente un peor pronóstico. Asimismo, la actividad telomerasa se ha correlacionado con mal pronóstico en cáncer gástrico, en cáncer de mama, o en cáncer colorrectal. Por otro lado, en leucemias agudas, una elevada actividad telomerasa se asocia con un desenlace clínico adverso y, además, se ha observado que la actividad enzimática decrece durante la fase de remisión de la enfermedad.

Todos estos datos demuestran que la detección de la actividad telomerasa puede constituir un marcador molecular útil, tanto para predecir el desenlace del cáncer, como a la hora de aportar nuevos datos acerca del tratamiento más adecuado, en cada caso. Así pues, un pronóstico basado en la detección de la telomerasa puede ser de gran ayuda en el caso de tumores que experimentan recurrencias, ya que en estos casos se podría establecer una terapia adyuvante más agresiva. El papel de la telomerasa como marcador pronóstico podrá ser, por tanto, más relevante en aquellos tipos de neoplasias para las que existen tratamientos definidos en base al grado de agresividad del tumor.

3.5.3. La telomerasa como marcador de progresión tumoral

Aparte de su posible utilidad en lo que a diagnóstico y pronóstico se refiere, el estudio de la actividad telomerasa puede utilizarse como marcador de progresión tumoral. Así, la detección de dicha actividad puede ser útil en la monitorización de la efectividad de las terapias antineoplásicas clásicas, puesto que el nivel de actividad de la enzima podría emplearse para determinar el número de células inmortales presentes en un paciente sometido a tratamiento. Estas determinaciones permitirían reducir, por ejemplo, en el caso de trasplantes autólogos de médula

ósea, el número de recurrencias debidas a la presencia de células cancerosas no detectadas previamente.

3.5.4. Inhibición de la telomerasa y su utilidad en la terapia antitumoral

La presencia de la telomerasa en un alto porcentaje de tumores humanos y su ausencia en la gran mayoría de células normales, indican que la inhibición de la enzima podría constituir una alternativa a las estrategias actuales contra el cáncer. Los inhibidores de la telomerasa producirían un acortamiento telomérico progresivo que conduciría finalmente al estado de senescencia y, por ello, a una eventual destrucción de las células tumorales. Puesto que las células continuarían proliferando hasta que sus telómeros alcanzaran una longitud crítica, estas terapias anti-telomerasa serían especialmente útiles como tratamiento adyuvante de las terapias actuales, a fin de evitar recidivas debidas a la presencia de células tumorales que no hayan sido eliminadas por completo con los tratamientos convencionales. Con respecto a los posibles efectos adversos, se piensa que la importancia de los mismos sería inferior a las terapias actuales.

Hasta la fecha se han desarrollado distintas clases de agentes inhibidores de la telomerasa, entre los que se encuentran oligonucleótidos antisentido contra el componente ARN, mutantes dominantes negativos de la subunidad catalítica, así como moléculas de pequeño tamaño con alta especificidad por la enzima, si bien ninguno de ellos se utiliza aún en clínica.

Otras líneas de investigación están dirigidas a la obtención de vacunas contra la telomerasa. Se trataría de estimular el sistema inmune para que reconociera las células telomerasa positiva y las eliminara. Estas vacunas, en principio, no afectarían a las células normales de tejidos de alto recambio, dado que éstas presentan niveles bajos de actividad de la enzima. Por el contrario, las células tumorales son capaces de expresar con frecuencia componentes de la telomerasa unidos a moléculas del sistema principal de histocompatibilidad, con lo que serían reconocidas como dianas de destrucción.

4. BIBLIOGRAFÍA

Bishop AJR, Robert H. Schiestl RH. Role of homologous recombination in carcinogenesis. *Experimental and Molecular Pathology*. 2003; 74: 94–105.

Blasco MA. Telomeres and cancer: a tail with many ends. *Curr Opin Genet Dev*. 2003; 13: 70-6.

Bryant PE. Repair and chromosomal damage. *Radiotherapy and Oncology*. 2004; 72: 251–6.

Caldes T, Godino J, Sánchez de Abajo A, Corbacho, C, de la Hoya M, Asenjo JL, Saez C, Sanz J, Benito M, Ramón y Cajal S, Diaz-Rubio E. Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 AND MSH6 mutations carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Oncology Rep*. 2004; 12: 621-9.

Godino J, de la Hoya M, Diaz-Rubio E, Benito M, Caldés, T. Eight novel germline MLH1 and MSH2 mutations in hereditary non-polyposis colorectal cancer families from Spain. *Human Mutation*. 2001; 18: 549.

Hahn WC. Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 2034-43.

Hendricks CA, Engelward BP. “Recombomice”: The past, present, and future of Recombination-detection in mice. *DNA Repair*. 2004; 3: 1255–61.

Jiricny J, Marra G. DNA repair defects in colon cancer. *Curr Op Gen Dev*. 2003; 13: 61-69.

Morán A, Iniesta P, de Juan C, González-Quevedo R, Sánchez Pernaute A, Diaz-Rubio, E, Ramón y Cajal S, Torres, A, Balibrea JL, Benito M. Stromelysin-1 promoter mutations impair gelatinase B activation in High-Microsatellite-Instability sporadic colorectal tumors. *Cancer Research*. 2002; 62: 3855-60.

Richardson C, Horikoshi N, Pandita TK. The role of the DNA double-strand break response network in meiosis. *DNA Repair*. 2004; 3: 1149–64.

Rubbi CP, Milner J. p53-guardian of the genomes guardian? *Cell Cycle*. 2003; 2: 20-21.

Shay JW, Wright WE. Telomerase: a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2002; 2: 257-65.

Shamoo Y. Structural insights into BRCA2 function. *Current Opinion in Structural Biology*. 2003; 13: 206–11.

Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE. Telomerase and Cancer. *Hum Mol Genet*. 2001; 10: 677-85.

Shaw CJ, James R. Lupski1, JR. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Human Molecular Genetics*- 2004; 13: 1 R57–R64.

Shin DS, Chahwan C, Huffman JL, Tainer JA. Structure and function of the double-strand break repair machinery. *DNA Repair*. 2004; 3: 863–73.

Schofield MJ, Hsieh P. DNA mismatch repair: Molecular mechanisms and biological functions. *Annu. Rev. Microbiol*. 2003; 57: 579–608.

Shivji MKK, Venkitaraman AR. DNA recombination, chromosomal stability and carcinogenesis: insights into the role of BRCA2. *DNA Repair*. 2004; 3: 835–43.

Stojic L, Brun R, Jiricny J. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair*. 2004; 3: 1091–1101.

Venkitaraman AR. Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *J Cell Sci*. 2001;114: 3591-8.