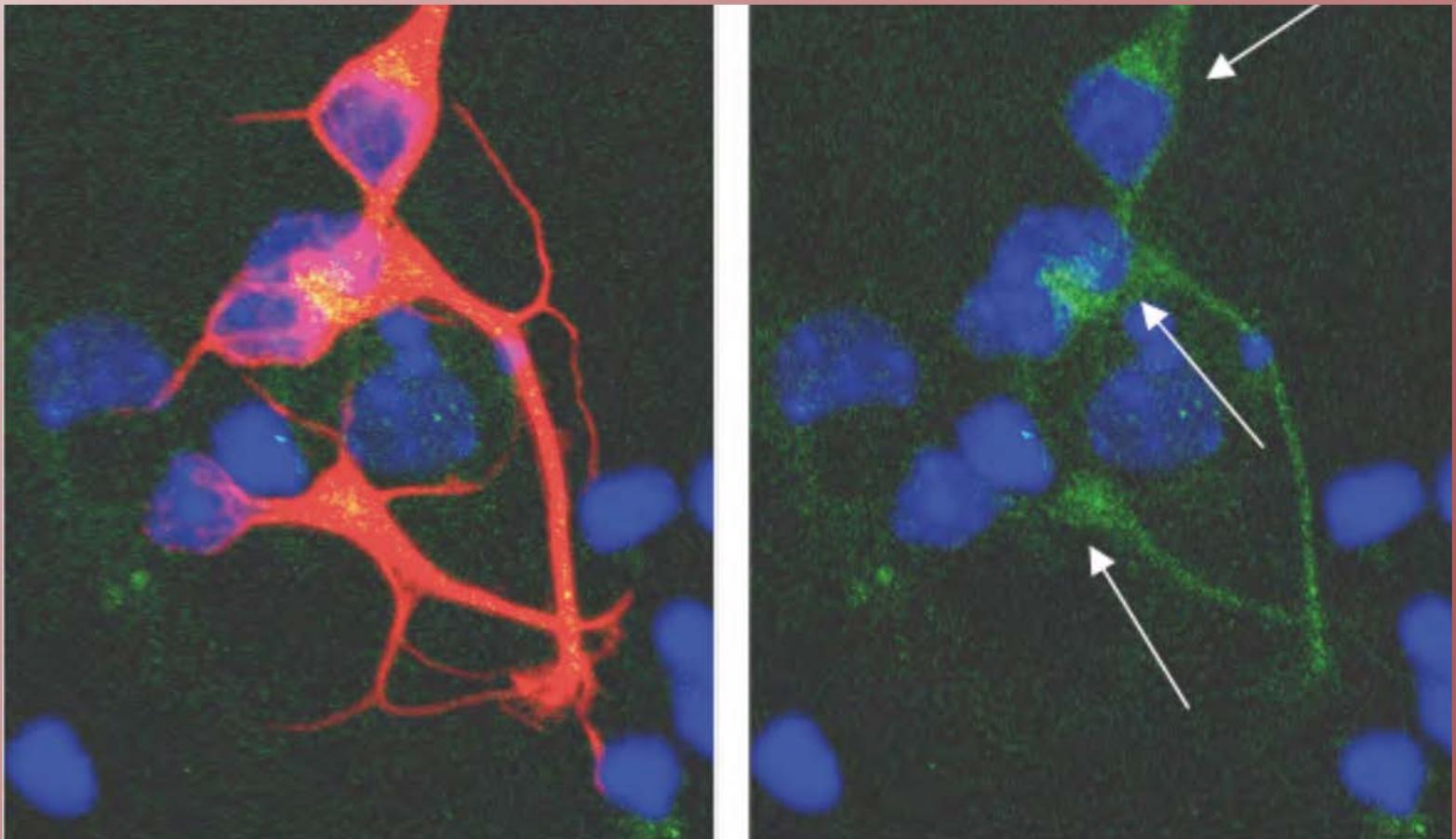


# ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Volumen 82 | Número 4 | Octubre-Diciembre 2016 | Páginas



[www.analesranf.com](http://www.analesranf.com)

ISSN 1697-4271



REAL ACADEMIA  
NACIONAL DE  
FARMACIA



Instituto  
De España



Ministerio de  
Educación Cultura  
y Deporte

Publicación científica electrónica trimestral

Madrid, Spain





## Access to medicines

**Title in Spanish:** *El acceso a los medicamentos*

M.<sup>a</sup> del Carmen Avendaño López<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Catedrática de Química Orgánica y Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

**ABSTRACT:** This is a reflection about how the uncertainties regarding the rise of drug prices may affect their access even in developed countries.

**RESUMEN:** Se reflexiona aquí sobre cómo las incertidumbres que levanta la elevación del precio de los medicamentos pueden afectar a su acceso incluso en los países desarrollados.

\* **Corresponding Author:** avendano@farm.ucm.es

**Received:** October 28, 2016 **Accepted:** October 28, 2016

An Real Acad Farm Vol. 82, N° 4 (2016), pp. 362-371

**Language of Manuscript:** Spanish

### 1. INTRODUCCIÓN

A nivel global, el acceso a los medicamentos es discriminatorio según la ubicación geográfica o la situación económica, lo que amplía las desigualdades en salud de las poblaciones. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), al menos un tercio de la población mundial no tiene acceso regular a medicamentos esenciales y, especialmente en África, uno de cada diez medicamentos que se encuentran a disposición de los pacientes están caducados o adulterados. El Consejo de Derechos Humanos de las Naciones Unidas, en una resolución adoptada el 1 de julio 2016, ha reconocido que el acceso no discriminatorio a los medicamentos es "uno de los elementos fundamentales para lograr progresivamente la plena realización del derecho de toda persona al disfrute del más alto nivel posible de salud física y salud mental".

Los países industrializados, con una población envejecida cada vez más numerosa, se enfrentan a una creciente demanda para gozar de una salud de calidad, y desde los años 70 han desarrollado programas para promover la disponibilidad, el acceso, y el uso racional de los medicamentos. Su mayor dificultad es realizar una selección adecuada de los "medicamentos esenciales", considerando como tales a los que proporcionan el tratamiento para un problema de salud considerado prioritario (1). Su selección es consecuencia de la importancia de dicho problema y de la evidencia clínica acerca de su eficacia y seguridad, así como de los que tienen una mejor relación coste/eficacia (eficiencia) entre los distintos tratamientos disponibles. Desde 1977, la OMS viene publicando cada dos años una lista de medicamentos esenciales para que sirva de modelo a los gobiernos de los distintos países, a las organizaciones no gubernamentales y al sector privado (la *Model Essential Medicines List*, EML), añadiéndose en el año 2007 la *WHO Model List of Essential Medicines for Children* (EMLc). Antes del año

2002 no se incluían en ellas algunos tratamientos por ser demasiado caros, pero la introducción ese año de 12 medicamentos anti-HIV a pesar de su alto coste, supuso un cambio de concepto: los medicamentos deberían estar al alcance de todos los pacientes que los necesiten (2).

Las modificaciones que se introducen en cada nueva lista se llevan a cabo por un comité de expertos (el *EML Expert Committee*) que estudia las propuestas de personas, gobiernos, compañías farmacéuticas y organizaciones médicas. Este comité elaboró en abril del 2015 la 19<sup>a</sup> *Model List of Essential Medicines* (EML) y la 5<sup>a</sup> *Model List of Essential Medicines for Children*, en las que se incluyeron 36 y 16 nuevos medicamentos respectivamente, varios de los cuales afectan a tratamientos contra el cáncer, la hepatitis C y la tuberculosis multirresistente (MDR-TB). Su gran número, el coste de algunos de ellos, los complejos y caros tests diagnósticos que se requieren para su correcta prescripción, y la inclusión de medicamentos fuera de indicación (con la consiguiente dificultad para establecer las dosis y duración de los tratamientos) han sido objeto de diversos debates científicos.

Dentro del coste global de los sistemas de salud, el incremento del gasto farmacéutico y las políticas enfocadas a contenerlo han adquirido gran relevancia, y obligan a que muchos pacientes se pregunten si se desarrollarán los medicamentos que necesitan o de dónde saldrá el dinero para costearlos. Además, no les resulta sencillo comprender por qué razón el precio que deben pagar por ellos es tan elevado. Las respuestas a estas preguntas son necesariamente complejas, pero el primer paso para encontrarlas sería reconocer que la continuidad del *statu quo* es insostenible (3). ¿Tenemos miedo de hablar de las dificultades económicas para sostener la asistencia sanitaria y costear el precio de los medicamentos? Lo que sin duda es una realidad irrefutable es que las necesidades en salud de la población son prácticamente infinitas, pero los recursos disponibles para

afrontarlas no lo son. Se podría aplicar aquí una célebre frase de Francisco Cambó: “Hay dos maneras de llegar al desastre: una, pedir lo imposible; otra, retrasar lo inevitable”.

Para alguien convencido de la enorme importancia que ha tenido, tiene y tendrá la innovación farmacéutica en la salud, resulta muy difícil compartir las durísimas críticas que recibe la industria farmacéutica, a la que se considera poco transparente, manipuladora de información, e insaciable económicamente. En las últimas décadas, el desarrollo de nuevos fármacos ha alargado la vida media y mejorado notablemente la calidad de vida de millones de personas en todo el mundo; las vacunas han reducido notablemente la prevalencia de enfermedades como la poliomielitis; los fármacos antiretrovirales han cambiado la vida de los enfermos afectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV); y los tratamientos personalizados con fármacos anticáncer dirigidos a dianas específicas permiten esperar importantes avances en este campo. Sin embargo, a pesar del innegable progreso en estas y otras muchas enfermedades, millones de personas que las padecen mueren porque no pueden acceder a los tratamientos que están disponibles para los que pueden costearlos.

## 2. CARACTERÍSTICAS DE LA INVESTIGACIÓN Y EL DESARROLLO FARMACÉUTICOS

Aunque puede aplicarse a otras industrias, el riesgo, la complejidad y la incertidumbre caracterizan al negocio de las empresas farmacéuticas. La investigación farmacéutica se dirige en gran medida a desarrollar medicamentos rentables para satisfacer a los inversores que la sostienen y enfrentarse a la competencia cada vez más amplia del mercado de medicamentos genéricos (4). Según la OMS, un medicamento genérico “es un producto farmacéutico, usualmente destinado a ser intercambiable con un producto innovador, que es fabricado sin una licencia de la compañía innovadora y comercializado después de la fecha de expiración de la patente u otros derechos exclusivos”. En contraposición a los derechos e intereses de la industria farmacéutica, la sociedad reclama que los precios de los nuevos medicamentos no sean tan altos y que no se abandone el desarrollo de fármacos “huérfanos” ni el abordaje de tratamientos de enfermedades del mundo no desarrollado.

Los fármacos “huérfanos” merecen ser comentados para entender por qué representan el 25 % de los nuevos medicamentos en la Unión Europea. Se califican así los medicamentos dirigidos a cubrir necesidades de salud pública que no se han cubierto todavía por la industria farmacéutica, fundamentalmente por razones económicas. Para que un medicamento se designe como “huérfano” en la Unión Europea debe cumplir los siguientes requisitos: 1) que sirva para el diagnóstico, prevención o tratamiento de una enfermedad que amenace la vida o conlleve una incapacidad crónica; 2) que la prevalencia de la enfermedad en la Unión Europea no sea mayor de 5/10.000 habitantes o resulte improbable que la

comercialización del medicamento genere suficientes ingresos para justificar la inversión necesaria para desarrollarlo; y 3) que no exista ninguna terapia satisfactoria autorizada para dicha afección o, de existir, que el medicamento aporte un beneficio considerable. Esta calificación se concede por las agencias reguladoras como un paso previo a su desarrollo clínico, y esto conlleva incentivos para el laboratorio que lo va a realizar. Dado que la investigación clínica de los medicamentos “huérfanos” se enfrenta al problema del escaso número de pacientes con enfermedades raras, se admiten diseños de ensayos clínicos alternativos, lo que puede afectar a la calidad de estos. Según los expertos, esta investigación es “claramente mejorable”, y algunos se preguntan si se está tergiversando la definición de enfermedad rara, si la condición de “huérfano” debería tenerse en cuenta en la evaluación farmacoeconómica, y si las compañías farmacéuticas están abusando de esta regulación para lanzar al mercado más rápidamente sus medicamentos. Su elevado coste tampoco parece justificable en muchos casos, debido a que esta investigación cuenta con importantes ayudas públicas. Desde los sistemas de salud se intenta abordar los problemas mediante la elaboración de informes de posicionamiento terapéutico y la negociación de contratos de riesgo compartido con las compañías farmacéuticas, de los que hablaremos más adelante (5).

La investigación y desarrollo de nuevas vacunas, medicamentos y métodos de diagnóstico se realizan a menudo en universidades y otras instituciones de investigación pública, estimándose que a nivel mundial el 41 % de los gastos invertidos en esta I+D están subvencionados con los fondos que manejan dichas instituciones. Sin embargo, son pocas las organizaciones públicas o filantrópicas que pueden abordar los costes que implica el desarrollo clínico, por lo que la entrada de la industria farmacéutica es necesaria para llevar estos productos al mercado. El sistema de colaboración más frecuente consiste en que los laboratorios públicos desarrollan moléculas hasta una fase muy avanzada (investigación básica y preclínica), y las grandes compañías se ocupan de los ensayos clínicos con pacientes. En esta situación, es la empresa la que se beneficia en mayor medida de las correspondientes patentes. Así lo estima la BUKO-Pharma-Kampagne, formada por un conjunto de grupos que trabajan en Alemania a favor del tercer mundo.

El tratamiento de las enfermedades que afectan fundamentalmente al tercer mundo es un objetivo difícil de cumplir. Si nos centramos en el caso de la malaria, incluso siendo uno de los casos más exitosos, aún existen importantes necesidades que cubrir. Se necesitan todavía diagnósticos rápidos y fiables (particularmente para detectar el parásito *P. vivax*), superar las resistencias a los medicamentos e insecticidas, desarrollar tratamientos que consigan la curación total y bloqueen la transmisión de las personas infectadas pero asintomáticas y, fundamentalmente, desarrollar vacunas efectivas. La OMS

ha estimado que habría que invertir 673 millones de dólares anuales hasta el 2030 y, además, lograr la participación de las empresas farmacéuticas para su comercialización (6).

La inversión en investigación farmacéutica es fundamental para avanzar en sanidad, y es crucial para el futuro de la UE. Sin embargo, Europa dedica anualmente a la misma un 0,8 % del PIB menos que EEUU y un 1,5 % menos que Japón. Para paliar este desfase, el Parlamento Europeo aprobó en noviembre de 2013 un instrumento financiero plurianual denominado Horizonte 2020, al que se asignó un presupuesto de 77.000 millones de euros durante el periodo 2014-2020, a fin de eliminar obstáculos y facilitar que el sector privado y el público caminen juntos. Su objetivo es que se invierta un 3 % del PIB en innovación sanitaria antes de 2020 (7).

Cuando la industria farmacéutica decide desarrollar una molécula basándose en sus características altamente prometedoras según los resultados de la investigación básica, el éxito está muy lejos de estar garantizado. En palabras de P. Roy Vagelos, que fue un importante Director Ejecutivo de la empresa Merck & Co: *“The vast majority of basic research projects fail. The amazing thing is that some succeed”*. Otro rasgo diferencial de la industria farmacéutica es ser uno de los sectores más regulados, ya que sus productos han de ser aprobados por las correspondientes agencias gubernamentales. El Centro Tufts para el Estudio del Desarrollo de Fármacos (*Tufts CSDD*), que pertenece a una universidad privada ubicada en Medford, Massachusetts, estimó en 2014 que la probabilidad de que un candidato a fármaco progrese desde los primeros ensayos con pacientes (fases I y II) a los de fase III que implican un gran número de pacientes, era del 35,52 %. De estos, sólo un 55,97 % llegan a presentarse para su aprobación por las agencias reguladoras (8). A su vez, estas agencias han de analizar una gran información, contenida en unas 50.000 páginas como media, y han de superar las presiones de asociaciones de enfermos, empresas y políticos. La aprobación de un fármaco que acaba produciendo efectos secundarios adversos puede levantar un gran revuelo social y conducir al establecimiento de controles todavía más estrictos, mientras que una decisión negativa puede desincentivar la investigación y afectar al empleo de miles de trabajadores muy cualificados. Si procede la retirada de un medicamento tras su comercialización, también pueden establecerse conflictos de interés. Casos como el uso de benfluorex (Mediator<sup>®</sup>), un adyuvante para el tratamiento de la hiperlipidemia y la diabetes usado también fuera de indicación para la obesidad que causó valvulopatías, o el uso en embarazadas del anticonvulsivo valproato sódico (Depakine<sup>®</sup>), que causó malformaciones congénitas y alteraciones del desarrollo en su progenie, están todavía sin terminar de resolver (9).

Los efectos de los tratamientos a largo plazo y las interacciones entre distintos fármacos han aumentado la importancia de los estudios clínicos de fase IV como medio para detectar efectos secundarios que hayan pasado

inadvertidos en las fases I-III. Pero, como ya se comentó con motivo de la retirada en septiembre del 2004 del inhibidor de COX-2 rofecoxib (Vioxx<sup>®</sup>) (10), estos estudios tienen dos efectos opuestos: por una parte aumentan la seguridad de los medicamentos y por otra aumentan la inversión y el riesgo de su desarrollo y, por lo tanto, el coste final. Sin embargo, a pesar de estas dificultades, la industria farmacéutica es uno de los sectores empresariales más rentables e influyentes del mundo.

### 3. EL SISTEMA DE PATENTES Y EL DERECHO A LA SALUD. ACUERDOS ADPIC Y ACUERDOS DE LIBRE COMERCIO

Las reglas del mercado y la protección de la propiedad intelectual con patentes se desarrollaron para promover el crecimiento económico e incentivar la innovación. En 1994, los acuerdos de la *World Trade Organization* (WTO) sobre los *Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights* (TRIPS) marcaron el comienzo de la protección y fortalecimiento de la propiedad intelectual a nivel global, introduciendo al mismo tiempo “flexibilidades” por las que los países podrían satisfacer los requerimientos de sus ciudadanos relacionados con su salud. El problema se centra en cómo lograr estas flexibilidades.

En 2003 la Organización Mundial del Comercio (OMC), que se ocupa desde 1995 de las normas que rigen el comercio entre los países, al margen de la ONU y otros organismos como el Banco Mundial o el FMI, propuso que si un país está inmerso en una crisis sanitaria no respete la protección intelectual para un fármaco y fabrique o importe un genérico. Dentro del Acuerdo sobre los Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual (ADPIC) parecía abrirse el camino a una de las reivindicaciones de muchas ONG (“Médicos sin Fronteras” depende de los fármacos genéricos para sus actividades médicas en todo el mundo), pero la principal reacción de los gobiernos de los países desarrollados ha sido manifestar su preocupación por el respeto de los derechos de propiedad intelectual a nivel internacional, dando lugar a disputas formales o al uso de medios de presión, como veremos en alguno de los siguientes ejemplos.

La India se conoce como la “farmacia del mundo en desarrollo”, porque tiene una ley de patentes que permite a los fabricantes de genéricos competir por el mercado y producir muchas versiones genéricas asequibles de fármacos patentados en otros lugares, poniendo muy alto el listón para reconocer en la India dichas patentes. El gobierno de Brasil ha sido muy activo para favorecer la producción de medicamentos genéricos, y en las negociaciones con las compañías farmacéuticas comenzó desde el año 2001 a amenazar con adoptar medidas polémicas, como las licencias obligatorias (que equivalen al no reconocimiento de las patentes originales). En el año 2007, Brasil se convirtió en el primer país de Iberoamérica que cumplió esta amenaza al suspender la patente del agente anti-HIV de Merck Sharp&Dohme efavirenz (Sustiva<sup>®</sup>), que era el más utilizado en este país para el

tratamiento del SIDA. Esta decisión se tomó tras las negociaciones en las que Brasil exigía a la empresa el mismo precio ofrecido por esta a Tailandia (0,65 dólares por cada comprimido de 600 mg), mientras que la compañía imponía a Brasil un precio de 1,59 dólares por cada uno de estos comprimidos. La propuesta final de Merck fue reducir un 2 % del precio, pero fue rechazada por el gobierno de Brasil por considerarla insuficiente. El Ministerio de Salud Pública de Tailandia había conseguido para efavirenz el precio que hemos mencionado tras amenazar con decretar una licencia obligatoria por cinco años. En enero de 2007, anunció su intención de promulgar nuevas licencias obligatorias para el antirretroviral de Abbott Kaletra<sup>®</sup> (una combinación de lopinavir y ritonavir). Abbott decidió retirar todas sus solicitudes de registro en Tailandia y no sacar al mercado tailandés ningún medicamento nuevo, incluido Aluvia<sup>®</sup>, una versión termoestable de Kaletra<sup>®</sup>, pero Tailandia amenazó con importar el genérico de la India, por lo que Abbott aceptó reducir su coste. Las compañías Sanofi Aventis y Bristol-Meyers Squibb también ofrecieron un mejor precio para su anticoagulante clopidogrel (Plavix<sup>®</sup>) después de que Tailandia anunciara para este medicamento una licencia obligatoria. En 2008 el Ministerio de Salud de Brasil declaró medicamento de interés público a tenofovir (Viread<sup>®</sup>), el primer agente anti-VIH dentro del grupo de análogos de nucleótidos inhibidores de transcriptasa inversa que mostró una actividad duradera (también es activo frente a la hepatitis). Dicho ministerio rechazó la patente de la compañía Gilead Sciences, alegando que no existía la actividad inventiva requerida para patentar un medicamento. En consecuencia, empezó a producir la versión genérica, que salió al mercado en 2011. Curiosamente, hoy día, cerca del 40 % del mercado de genéricos en Brasil está en manos de grandes farmacéuticas internacionales como Sanofi-Aventis y Pfizer. En abril del año 2009, Sanofi-Aventis adquirió Medley (la principal empresa de genéricos en Brasil), mientras que Pfizer adquirió el 40 % del Laboratorio Teuto Brasileño en 2010, posiblemente por la extinción de algunas patentes clave para el negocio de esta compañía en Brasil, como las de Viagra y Lipitor.

Desde el año 2008 se han efectuado confiscaciones de medicamentos genéricos originarios de India en tránsito por puertos y aeropuertos de la Unión Europea, especialmente de los Países Bajos hacia Brasil, por infracción de patentes, aunque estas medidas se justifican formalmente como parte del esfuerzo realizado para identificar y evitar el comercio de medicamentos falsos.

Con el fin de garantizar un mayor grado de protección a los derechos de propiedad intelectual que los establecidos por el Acuerdo sobre los ADPIC, los países desarrollados están buscando la promoción de acuerdos de libre comercio. Uno de los elementos más controvertidos de estos acuerdos se refiere a la protección de los datos que se presenten en relación a un producto. En el caso de un medicamento, se trata de garantizar que los datos de seguridad y eficacia que se aportan para su registro y

autorización no puedan ser utilizados por un tercero, impidiendo así que las autoridades sanitarias puedan autorizar otro medicamento solicitado como esencialmente similar, mediante un dossier de registro abreviado. Todo lo que el genérico tiene que demostrar es que es idéntico al producto original, mientras que si los datos de los ensayos clínicos de una compañía originaria están protegidos por la "exclusividad", los productores de genéricos tendrían que presentar sus propios datos sobre seguridad y eficacia del medicamento en cuestión para poder registrarlo. Esto les obligaría a repetir los ensayos clínicos, algo que requeriría años.

En septiembre del 2015, 193 estados miembros de las Naciones Unidas aprobaron la 2030 *Agenda* para lograr un desarrollo sostenible en el año 2030. Dentro de esta agenda se nombró un panel de expertos para resolver el enfrentamiento entre el sistema de patentes y el derecho a la salud (*High-Level Panel on Innovation and Access to Health Technologies*). Como hemos visto, el sistema de patentes protege la propiedad intelectual pero es una barrera que impide el acceso a muchos medicamentos esenciales.

#### 4. ECONOMÍA Y SALUD

Sin olvidar que los enfoques para resolver los problemas de la salud pública están fuertemente ligados a las ideologías sociales y políticas, es indudable que dependen de las disponibilidades económicas de los ciudadanos y de los gobiernos. El quinto Foro Europeo sobre Bioética, celebrado en Estrasburgo en febrero de 2015, se dedicó a debatir la relación entre la economía y la salud. Aunque siempre puede haber propuestas para abaratar los costes de la salud<sup>1</sup> es evidente que, como se dijo en dicho foro: "*no money, no health*".

Las dificultades para sufragar la asistencia sanitaria afectan no sólo a los países en vías de desarrollo sino también a países avanzados económicamente y, aunque no adquieren demasiada relevancia mediática, las propuestas para solucionarlas influyen en gran medida en sus vaivenes políticos. Las dificultades para mantener el *National Health System* (NHS) en el Reino Unido han tenido cierta influencia en el *Brexit*. Ya en 2012, una encuesta del *Macmillan Cancer Support* reveló que un 67 % de los oncólogos y otros profesionales sanitarios de dicho país conocían casos de pacientes a los que se les había denegado un tratamiento por tener una edad avanzada y, recientemente, la entidad que gestiona la sanidad pública del Valle de York ha propuesto que los hospitales con problemas de liquidez retrasen operaciones no urgentes a pacientes obesos y fumadores. Estos datos y otros muchos

<sup>1</sup> Entre las propuestas más "originales" podría incluirse una reciente del Ministerio de Sanidad de Guatemala para promover que terapeutas mayas colaboren con los profesionales médicos en patologías derivadas de la superstición, como el mal de ojo, la pérdida del alma, los sustos y los antojos.

justifican las palabras de Simon Stevens, Director Ejecutivo del NHS los días previos al Brexit: “*When the British economy sneezes, the NHS catches a cold.*” Los partidarios del Brexit afirmaban que, si se aprobaba la salida del Reino Unido, parte de la aportación económica que ya no tendría que enviar a Europa se dedicaría a mejorar los problemas de la sanidad británica.

La sanidad es uno de los pilares fundamentales sobre los que se asienta el modelo social europeo. Un indicador clásico que se utiliza para valorar el funcionamiento de los sistemas sanitarios en los distintos países es la participación del gasto sanitario total en el PIB. En el año 2012 era cercano al 12 % en Holanda, mientras que Alemania y Francia superaban ligeramente el 11 % y España e Italia tenían una participación de 9,2 %. Este no es siempre un indicador fiable si tenemos en cuenta que Estados Unidos, con una participación del gasto sanitario total del 20 % del PIB, tiene 40 millones de ciudadanos sin cobertura sanitaria. No deja de ser sorprendente que, a pesar de los avances producidos en los últimos años, el país más avanzado en las tecnologías de la salud no haya sido todavía capaz de lograr mejores perspectivas para el cuidado de todos sus ciudadanos. Con motivo de las próximas elecciones presidenciales norteamericanas, la revista *The Lancet* ha dedicado algunos editoriales a este asunto, resaltando los distintos enfoques que los candidatos dan al mantenimiento o revisión de la *Affordable Care Act* (ACA), al trabajo para disminuir los costes relacionados con el cuidado de la salud y al fortalecimiento de la investigación biomédica (11). La candidata demócrata Hillary Clinton ha manifestado su preocupación por el aumento del coste de los medicamentos y su empeño en rebajarlo. Su ahora compañero de campaña, Bernie Sanders, ha emprendido entre otras acciones una lucha con la empresa norteamericana Ariad Pharmaceuticals por el aumento de precio de ponatinib (Iclusig<sup>®</sup>), un potente inhibidor de varios tipos de cinasas (Bcr-Abl, VEGFR y FGFR), que fue aprobado por la FDA en 2012 para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (12). Es la cuarta vez que la empresa ha subido su precio a lo largo de este año, hasta que el tratamiento anual ha alcanzado un coste próximo a los 199.000 dólares.

Además de la participación del gasto sanitario total en el PIB, hay otros indicadores igualmente importantes: la eficiencia en la gestión de los recursos, la mayor o menor accesibilidad de los ciudadanos a las prestaciones y servicios, los copagos, la calidad de la asistencia y, sobre todo, los resultados en salud. Los copagos, considerados a día de hoy un requisito y al mismo tiempo una barrera para acceder a la asistencia en la UE, están generalizados hoy en un amplio número de países miembros, aunque España, Dinamarca y Reino Unido no los aplican en los tratamientos hospitalarios. Otro indicador importante para valorar los sistemas sanitarios es el de la esperanza de vida después de los 65 años. Una mayor longevidad refleja en general mayor frecuentación asistencial, mayor consumo de medicamentos y mayor número de personas con

discapacidad y dependencia que requieren servicios especiales, luego demuestra que el sistema es más eficaz.

En el contexto de crisis económica actual, el gran reto de la sanidad en España es lograr una prestación eficiente que facilite de manera sostenible la promoción y el acceso clínico a la innovación asistencial. El Ministerio de Hacienda en funciones realizó el pasado mes de julio el Cierre Contable de la Administración (13), que impedía aprobar nuevos gastos a fin de afrontar la desviación del déficit público y cumplir con las exigencias de nuevos recortes impuestos por la Comisión Europea. Con esta medida, se pretendía un ahorro de 1.000.000 € en la Sanidad Pública, cuyo gasto se recortó en un 11 % entre los años 2008 y 2015 (más de 9.000 millones de euros), pero no se contuvo el que corresponde a los medicamentos, que creció hasta los 9.362.000 €. En 2013, según un estudio de la *Association of the British Pharmaceutical Industry* (ABPI), nuestro país se situaba, respecto al consumo de medicamentos, en uno de los primeros lugares a nivel mundial. Por otra parte, un reciente estudio realizado en España, Dinamarca, Alemania, Suecia y el Reino Unido sobre el consumo en Europa de ciertos medicamentos sin receta (opioides, sedantes y estimulantes), ha revelado que nuestro país es líder en el consumo de medicamentos como Orfidal<sup>®</sup>, Trankimazin<sup>®</sup> o Valium<sup>®</sup> (14). El gasto en medicamentos hospitalarios creció un 26 % a lo largo del 2015 (debido principalmente a los nuevos medicamentos contra la hepatitis C) y sigue haciéndolo a lo largo del 2016, aumentando también el gasto en los medicamentos expedidos en farmacias no hospitalarias. Por otra parte, el gasto sanitario gestionado por el sector privado en España ha ido creciendo hasta situarse en el 29 % del gasto sanitario total.

Si se estudia el gasto farmacéutico se encuentran datos contradictorios, y algunas fuentes de información proporcionan cifras más bajas que las que aquí se mencionan. No obstante, puede afirmarse que las políticas para reducirlo han fracasado hasta el momento. Entre ellas se encuentra la introducción del copago de medicamentos (Real Decreto Ley 16/2012) o la creación del Fondo de Liqueidez Autonómica. Tampoco parece haberse cumplido el acuerdo con la industria farmacéutica para que el gasto en medicamentos no creciera por encima de límites establecidos. Según instituciones especializadas que estudian cómo puede optimizarse la repercusión del gasto farmacéutico en el coste de los sistemas nacionales de salud, como la *Office of Health Economics* promovida por la ABPI o el Departamento de Estudios Económicos de Farmaindustria, parece claro que lograr descuentos en los precios de los medicamentos por parte de las administraciones públicas ha resultado menos eficaz que la creación de mercados competitivos para los fármacos genéricos, una política que se ha impulsado sobre todo en Estados Unidos, el Reino Unido, Alemania y Suecia (15).

## 5. POLÍTICAS FARMACÉUTICAS NOVEDOSAS. LOS ACUERDOS “DE RIESGOS COMPARTIDOS” Y LOS DE “TECHO DE GASTO”

El coste de los fármacos atrae más la atención que el de los internamientos y los servicios hospitalarios, porque son la parte del gasto más “gerenciable”. Los nuevos medicamentos se producen e incorporan principalmente en la farmacia hospitalaria, cuyo gasto supone alrededor de un tercio del gasto farmacéutico total. Sus servicios han de comprar bien, gestionar mejor, seleccionar adecuadamente a los pacientes, y evaluar correctamente los medicamentos que llegan. Su gestión ha tenido que hacer frente a la incorporación de sistemas de información, la evaluación de objetivos asistenciales y económicos, la centralización de compras, los contratos de gestión, o los acuerdos de riesgo compartido o pago por resultados (aunque estos se realizan normalmente a nivel institucional).

Los acuerdos de riesgo compartido (ARC) son acuerdos de acceso gerenciado (*Managed entry agreements*) que tratan de resolver los conflictos entre la incertidumbre que genera un nuevo medicamento y la propuesta de su valor. Se conoce la eficacia de un nuevo medicamento por sus resultados en los ensayos clínicos, pero no su efectividad en la práctica médica. Por ello, las administraciones públicas y el sector privado acuerdan compartir los riesgos (16).

Se considera que el primer ejemplo de acuerdo de riesgo compartido, basado en resultados clínicos, se realizó en 1994 entre la administración de EEUU y la compañía farmacéutica Merck & Co (MSD en el resto de países). En él, la empresa garantizaba devolver el coste de finasterida (Proscar<sup>®</sup>) para tratar la hiperplasia benigna de próstata si el paciente requería cirugía después de un año de tratamiento (17). La primera iniciativa europea tuvo lugar entre Dinamarca y Novartis en 2004, con un acuerdo del tipo “si no cura, no se paga” para el antihipertensivo amlodipino. En 2010 se firmó el primero de este tipo de contratos en España, entre el Hospital Virgen de las Nieves de Granada y la empresa GSK para utilizar ambrisentan (Volibris<sup>®</sup>) en el tratamiento de la hipertensión pulmonar. Los criterios que se tuvieron en cuenta en este caso fueron el alto impacto económico del tratamiento y que el parámetro para valorar la respuesta era fácil de medir al cabo de doce semanas: el test de la marcha de los seis minutos. La media de mejoría de los pacientes en el ensayo clínico era una marcha de 36 metros. Si el resultado en un paciente superaba la media, el hospital pagaba la totalidad del medicamento, pero, si era inferior, iba pagando menos hasta un límite de 28 metros. A nivel institucional, el Ministerio de Sanidad (a través de la dirección general de Cartera Básica de Servicios y Farmacia) anunciaba a finales de 2013 su entrada en el mundo del riesgo compartido con el fármaco fampridina (Fampyra<sup>®</sup>), un fármaco pensado para la mejora de la marcha en pacientes de esclerosis múltiple con EDSS (escala ampliada del estado de discapacidad) de 4 a 7.

Debido a que la evidencia generada en los ensayos clínicos sólo garantizaba un beneficio para el 40 % de los afectados por esta enfermedad, la financiación de este fármaco estaría sujeta a una fórmula en la que la compañía biotecnológica Biogen Idec y la Administración compartirían riesgos. Esta no tendría que pagar nada en las primeras dos semanas de tratamiento y, tras este periodo, se le aplicarían al paciente dos pruebas de forma que, si este consigue una mejora de la marcha del 20 % o superior, continúa la terapia y se paga el medicamento, pero en caso contrario no hay que pagar nada.

Todos estos acuerdos permiten compensar las incertidumbres en torno a los resultados en condiciones de práctica clínica habitual de un nuevo producto, pero son procesos lentos y complejos técnicamente que han de diseñarse caso por caso y tienen un seguimiento difícil. Por ello, una de sus principales dificultades es el temor de que el coste administrativo de su puesta en marcha y monitorización pueda ser mayor que la disminución del coste del medicamento. En España están teniendo más éxito los “acuerdos de techo máximo de gasto” que los de riesgos compartidos, porque son menos complejos en su formulación y más fáciles de medir por parte de la administración. Este es el caso de tratamientos para la hepatitis C en los que el sistema paga hasta un nivel de gasto, tras el cual lo cubre la farmacéutica. En septiembre de 2014 el Ministerio de Sanidad y MSD llegaron a un acuerdo para aprobar y financiar un costoso tratamiento para dicha enfermedad con una triple terapia que incluía al inhibidor de proteasa boceprevir (Victrelis<sup>®</sup>), aprobado por la FDA en 2011. En noviembre de 2015, la Administración General del Estado (representada por los ministros de Hacienda y Administraciones Públicas y de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad) y la industria farmacéutica (representada por el presidente de la patronal de la industria farmacéutica (Farmaindustria), firmaron un protocolo de colaboración para garantizar el acceso a los nuevos medicamentos sin comprometer la sostenibilidad del sistema sanitario. La eficacia de este protocolo no ha sido todavía evaluada.

## 6. EL PRECIO DE LOS MEDICAMENTOS

La asociación “Médicos sin Fronteras” ha considerado imposible la utilización en los países pobres de varios fármacos considerados esenciales en las últimas listas de la OMS. Citemos como ejemplos el tratamiento de la tuberculosis con bedaquilina (Sirturo<sup>®</sup>) y el de la hepatitis C con sofosbuvir (Sovaldi<sup>®</sup>). Bedaquilina se descubrió en el año 2005 en la empresa farmacéutica Tibotec, y se desarrolló en la empresa Janssen Pharmaceutica, siendo aprobada por la FDA en diciembre del año 2012 tras 40 años en que no se aprobaba ningún fármaco antituberculoso. En 2014 fue autorizada en la Unión Europea (18). Su selección entre varios derivados de diarilquinolina como un candidato a fármaco antituberculoso se debió a su capacidad para inhibir la síntesis de ATP micobacteriana y por su actividad frente a cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) susceptibles y resistentes (19). Sin embargo, su aprobación acelerada por

la FDA suscitó cierta controversia porque en vez de la disminución de la letalidad se utilizó como criterio de actividad su capacidad para convertir el cultivo de esputo de los pacientes de positivo para *Mtb* en negativo. El coste de 6 meses de tratamiento con bedaquilina fluctúa entre 30.000, 3.000 y 900 dólares, según que se trate de países de ingresos altos, medios o bajos. En España no está financiado por el SNS (20).

En cuanto a la hepatitis C, la OMS estima que entre 130 y 150 millones de personas son portadoras del virus que la provoca (HCV). El tratamiento con sofosbuvir de los genotipos 1 y 2 de este virus dura 12 semanas y su coste en EEUU se cifra alrededor de 84.000 dólares (1.000 \$/día). Si se trata el genotipo 3, que requiere 24 semanas, su coste sube a 168.000 dólares. Se calcula que el primer tratamiento mencionado supone un gasto en el Reino Unido de 44.000 €, de unos 40.000 € en Francia y alrededor de 13.000 € en España, mientras que ese mismo tratamiento utilizando la versión genérica se vende en India por 220 € (21). Las patentes para sofosbuvir terminan en 2029, pero han sido rechazadas en Egipto, China y Ucrania, y se han presentado distintas oposiciones en Argentina, Brasil, Rusia, Tailandia y la Unión Europea. El colectivo *Initiative for medicines, access and knowledge* (I-MAK) y la Red de Delhi de Personas Positivas presentaron en noviembre de 2013 su oposición a la patente del sofosbuvir de Gilead argumentando que el fármaco era “un avance antiguo” y que la patente no cumplía con el estándar necesario para ser patentado en India. Pero cuando en febrero de 2016 tuvo lugar la correspondiente audiencia en la Oficina de Patentes de ese país, esta otorgó la patente a Gilead Secuencias, una decisión calificada por “Médicos Sin Fronteras” como una “mala noticia”. La asociación “Médicos del Mundo”, asesorada por I-MAK, también presentó un recurso contra la patente de Gilead en la Oficina Europea de Patentes el 10 de febrero de 2015 por considerar que no cumple con los criterios definidos por la Convención Europea sobre Patentes (EPO). Este recurso se ha resuelto el 5 de octubre de 2016 tras una audiencia pública de dos días en la sede de la Oficina Europea de Patentes en Múnich (Alemania). Esta oficina no aceptó en su totalidad los argumentos planteados por la empresa para defender su patente y decidió que “se mantenga sólo parcialmente”. Esto significa que no se ha revocado, aunque se ha obligado a Gilead a introducir modificaciones que todavía no se conocen, siendo imposible predecir ahora si estas podrían conllevar cambios en los precios (22).

En España, el Ministerio de Sanidad acordó a finales de 2014 un precio de 25.000 euros por el tratamiento de 12 semanas con Sovaldi<sup>®</sup> con un tope de gasto de 125 millones anuales (que es el coste de 6.000 tratamientos). El Informe de Posicionamiento Terapéutico del Ministerio acotaba su uso como tratamiento de primera instancia y señalaba la posibilidad de usar tratamientos alternativos para el grueso de enfermos. Al parecer, la utilización de este antiviral y de otros dirigidos a la misma enfermedad supuso para España un incremento del 23 % en el gasto

farmacéutico hospitalario en el año 2015.

Como vemos, los precios de Sovaldi<sup>®</sup> impuestos por Gilead han generado un rechazo por considerarlos inabordables, aunque muchos piensan que están justificadas por las ventajas que suponen frente a tratamientos alternativos. Entre los que critican estos precios se encuentra Jeffreys Sachs, un exprofesor de la Universidad de Harvard que fue asesor de Naciones Unidas y colabora con distintas agencias internacionales. Sach desató una gran polémica al publicar un artículo titulado “La codicia de Gilead que mata”, en el que argumentaba que la mayor parte de la investigación básica de sofosbuvir se realizó con fondos públicos de Estados Unidos, la empresa privada Pharmasset participó luego invirtiendo menos de 200 millones de dólares en su investigación y desarrollo, y Gilead Sciences compró este y otros compuestos en 2011 por 11.000 millones de dólares, actuando al final del proceso poco tiempo antes de su aprobación por la FDA. Sach calcula que Gilead habría recuperado su inversión a los dos años de su aprobación.

En noviembre de 2015, para expresar las barreras que suponía el coste de los fármacos anti HCV, un editorial de la revista *The Lancet* utilizó parte de la conversación entre Cecil Graham y Lord Darlington en “Lady Windermere’s Fan” de Oscar Wilde: “*What is a cynic?: A man who knows the price of everything and the value of nothing*” (23).

Ahora veamos el lado farmacológico de sofosbuvir: se trata de un profármaco que se metaboliza originando 2'-desoxi-2'- $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -C-metiluridina-5'-trifosfato, y este metabolito es el que inhibe la polimerasa de ARN, una enzima que utiliza el virus HCV para la síntesis de su ARN. Sofosbuvir fue aprobado por la FDA el 6 de diciembre del 2013 en combinación con ribavirina (RBV) para el tratamiento oral de la hepatitis C producida por los genotipos 2 y 3 del virus, mientras que los genotipos 1 y 4 requieren un tratamiento triple con la adición de interferón pegilado. La EMA recomendó su autorización en 2013, y el 1 de noviembre de 2014 el Ministerio de Sanidad español resolvió su financiación. Ya se conocían varios análogos de nucleósidos activos que actuaban por este mecanismo, pero su potencia era baja debido a que la incorporación del primer grupo fosfato, necesaria para originar después el nucleótido trifosfato activo, es lenta. En sofosbuvir este grupo ya está presente, aunque se ha modificado para optimizar su farmacocinética enmascarando sus dos cargas negativas a fin de facilitar su entrada en las células infectadas.

El tratamiento con sofosbuvir tiene buenos resultados en el 50-90 % de los casos, mostrando eficacia para limitar el desarrollo de cirrosis y cáncer de hígado. Esta eficacia, y la de otros antivirales, ha permitido que la erradicación de la hepatitis C en el mundo parezca ahora un objetivo realista (gracias también a que el virus se desarrolla muy lentamente, no tiene ningún reservorio animal, y las personas no se contagian fácilmente). Sin embargo, esta enfermedad y las relacionadas con ella, continúan siendo un grave problema de salud debido a que muchos

pacientes desconocen que están infectados, no reciben ningún tratamiento, y pueden ser foco de nuevas infecciones. Por ello, es necesaria una vacuna preventiva, cuya búsqueda ha estado limitada hasta el momento por la falta de un modelo animal apropiado y un sistema de cultivo celular *in vitro* que sea capaz de reproducir el ciclo replicativo completo del virus y la producción de nuevas partículas virales infecciosas.

Si nos referimos al precio de los tratamientos oncológicos, hay que decir en primer lugar que estos han disminuido la mortalidad causada por todos los casos de cáncer, aunque sigue siendo una de las enfermedades (realmente un conjunto de enfermedades) más difícil de tratar. El cáncer es responsable aproximadamente del 14 % de todas las muertes. Además, su incidencia aumenta debido al envejecimiento de la población en la mayoría de los países. En paralelo, el coste de los medicamentos oncológicos ha crecido exponencialmente y se estima que supone el 12 % del gasto hospitalario, que más de dos tercios de las muertes que produce el cáncer ocurren en los países con ingresos medios o bajos, y que su incidencia parece que será mayor en estos países que en aquéllos que tienen ingresos altos (24).

La Presidencia de los EEUU ha promovido importantes iniciativas para la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos oncológicos. Casi 50 años después de que el Presidente Nixon declarara en 1971 la “guerra al cáncer” con la creación del U.S. *National Cancer Program* y el *National Cancer Institute* (NCI), el Presidente Barak Obama, durante su discurso del Estado de la Unión celebrado el 12 de enero de 2016, anunció la creación de un *Cancer Moonshot* para acelerar la investigación sobre la enfermedad y la promoción de nuevos tratamientos, especialmente inmunoterápicos, a fin de conseguir su curación en 2020. Esta iniciativa de Obama, dirigida por su Vicepresidente Joe Biden (que había librado el año anterior su propia batalla perdiendo a un hijo de cáncer de cerebro), se suma a la de la *University of Texas MD Anderson Cancer Center*, y fue inspirada por el cirujano Soon-Shiong, exprofesor de UCLA y hombre de negocios de éxito (25). Soon-Shiong, interesado en la investigación del cáncer a nivel práctico, dejó su carrera académica y creó la compañía biofarmacéutica *Abraxis BioScience*, que desarrolló *Abraxane*<sup>®</sup>. Se trata de una formulación de paclitaxel enlazado a albúmina que representa una de las estrategias que resuelven el problema de solubilidad de los taxanos. *Abraxane*<sup>®</sup> fue aprobado por la FDA en 2005 y por la EMA en 2008 para el tratamiento del cáncer de mama metastático, y se ha evaluado también para otros tipos de cáncer (26). Habiendo logrado este importante objetivo, en 2010 vendió *Abraxis* a Celgene Corporation y fundó la compañía NantKwest para investigar tratamientos oncológicos basados en la inmunoterapia. Su vida refleja cómo el afán investigador y la preocupación por resolver graves problemas de salud pueden proporcionar el éxito científico y el económico.

La evolución de los tratamientos oncológicos ha progresado, lenta pero positivamente, a través de los años.

Pongamos como ejemplo el tratamiento del mieloma múltiple (MM), que es el segundo cáncer hematológico más común. A partir del año 1960, el tratamiento con el agente alquilante melfalán (*Alkeran*<sup>®</sup>) más el antiinflamatorio prednisona aumentó la supervivencia de estos enfermos en 2-3 años. La introducción de la quimioterapia masiva previa al autotrasplante de médula supuso un aumento de la supervivencia media en 4-5 años. La de antiangiogénicos como talidomida (*Thalomid*<sup>®</sup>), lenalidomida (*Revlimid*<sup>®</sup>) y pomalidomida (*Imnovid*<sup>®</sup>), o de inhibidores de proteasoma como bortezomib (*Velcade*<sup>®</sup>) (27) más dexametasona, aumentó aquella a unos 7 años (28). Los nuevos inhibidores de proteasoma, como carfilzomib (*Krypolis*<sup>®</sup>), así como los inhibidores de histona desacetilasas como vorinostat (*Zolinza*<sup>®</sup>) o panobinostat, y los anticuerpos monoclonales como BHQ880, que bloquea la proteína DKK-1 y promueve la actividad de los osteoclastos, o las vacunas terapéuticas autólogas (a través de la reintroducción linfocitos T que pueden haber sido modificados genéticamente para aumentar la respuesta inmune), siguen aumentando el arsenal terapéutico para estos enfermos. ¿Cómo discutir el precio de unos medicamentos que pueden alargar la vida?

Comentaremos el caso de lenalidomida (*Revlimid*<sup>®</sup>). Fabricada por Celgene y aprobada por la FDA en 2006, es un análogo del viejo fármaco talidomida cuya actividad se basa en sus propiedades antiangiogénicas, proeritropoyéticas e inmunomoduladoras (29). A este respecto, conviene mencionar la dificultad de calificar a muchos nuevos fármacos como innovadores, y recordar las palabras de Sir James Whyte Black, descubridor de fármacos como el propranolol y la cimetidina y Premio Nobel de Medicina de 1988: “*The most fruitful basis for the discovery of a new drug is to start with an old drug*”.

La eficacia de lenalidomida es innegable, ya que puede alargar significativamente la vida de los enfermos de MM, pero su precio puede parecer poco justificable teniendo en cuenta que la talidomida es relativamente barata. En EEUU, 28 cápsulas de lenalidomida de 2,5 mg cuestan alrededor de 16.457 dólares y en España, 21 cápsulas de 25 mg alrededor de 6.500 €, mientras que 28 cápsulas de 50 mg de talidomida cuestan unos 378 €. La patente de lenalidomida, propiedad de Celgene, expira en abril de 2027. En un litigio con otras empresas en el que se discutía esta fecha, Celgene defendía la innovación farmacéutica: “*We will continue to focus on developing our many important pipeline assets, which provide great potential promise to patients with unmet medical needs.*”... al mismo tiempo que defendía con uñas y dientes sus patentes: “*We remain confident in the strength of our patents, and will continue to vigorously defend them.*”

Finalizaremos estas reflexiones con un breve comentario sobre las terapias biológicas y las nanotecnologías. Las terapias con productos biológicos (también llamados biotecnológicos o bioterapéuticos) incluyen anticuerpos monoclonales, inmunoterapia, vacunas, genes, y oligonucleótidos antisentido. Puede decirse que eran desconocidas hace apenas 10 años,

mientras que hoy se utilizan fundamentalmente en cáncer y artritis y suponen el 40-50 % del gasto en farmacia hospitalaria. Uno de los ejemplos más controvertidos en la relación coste/eficacia de tratamientos biológicos oncológicos es una vacuna autóloga diseñada para estimular la respuesta inmune en el cáncer de próstata que se llama sipuleucel-T (Provenge<sup>®</sup>) (30). En este tratamiento, las células mononucleares autólogas de sangre periférica se incuban con una proteína de fusión formada por fosfatasa ácida prostática (PAP) y un factor de señalización, y después se vuelven a inyectar al enfermo (31). Al parecer, las células presentadoras de antígeno activadas por PAP inducen a las células T endógenas a atacar a las células de cáncer de próstata que contienen el antígeno PAP. Un tratamiento de 3 dosis separadas 2 semanas alarga varios meses la vida de los pacientes, pero según datos del año 2010 costaba 93.000 dólares.

Dado que los altos precios se dan especialmente en las terapias biológicas, la introducción de productos biosimilares (similares a los productos biotecnológicos de referencia que han dejado de estar protegidos por la correspondiente patente) resulta de gran interés (32). Estos medicamentos se están introduciendo rápidamente, y varios de los productos de referencia aprobados en Europa han perdido o están a punto de perder la protección de su patente. ¿Puede esperarse una disminución en el precio de los biosimilares similar a la lograda con los genéricos? La respuesta parece ser negativa por el momento. Los compuestos activos de los medicamentos biológicos derivan de proteínas (hormonas, factores o anticuerpos) y de otros compuestos producidos por seres vivos, siendo más complejos que los fármacos clásicos producidos por síntesis química. El esfuerzo que hay que realizar para que un biosimilar tenga la misma eficacia y sea intercambiable con el producto biotecnológico de referencia no es comparable al de la producción de genéricos, ya que un biosimilar requiere entre otras cosas estudios preclínicos y clínicos. Por ello, habría que incentivar su producción para compensar este esfuerzo (33). Aunque hay diferencias sustanciales entre los distintos países y áreas terapéuticas, la disminución del precio de los biosimilares en Europa es menor del 30 % respecto al precio de los productos de referencia, mientras que se sitúa alrededor del 80 % en los fármacos genéricos (34).

El uso de nanotecnologías para la liberación específica de fármacos en su lugar de acción, a fin de que interaccionen con su diana farmacológica, también era desconocido hace unos años. Se trata de una estrategia que no ha hecho más que comenzar, por lo que no es fácil comentar cual será su repercusión económica.

## 7. CONCLUSIÓN

Tenemos muy buenas noticias de las multinacionales farmacéuticas en relación al número e indicaciones de los nuevos medicamentos en fase de desarrollo pero, como han pretendido poner de manifiesto estas reflexiones, esto pondrá en riesgo la sostenibilidad económica de los sistemas sanitarios públicos y aumentará las desigualdades de salud, dado que su acceso podría estar limitado a la

población con mayor poder adquisitivo, como reconocen muchos laboratorios. Resulta imprescindible la estrecha colaboración entre políticos, gestores e industria farmacéutica innovadora para asegurar la sostenibilidad del sistema sanitario y la mejor atención posible a los ciudadanos. Confiemos en que, como ha ocurrido con el sida, los avances científicos terminen llegando a los más pobres.

## 8. REFERENCIAS

1. a) Hogerzeil HV. The concept of essential medicines: Lessons for rich countries. *BMJ* 2004; 329: 1169-72. b) Editorial. A new Lancet Commission on essential medicines. *The Lancet* 2014; 384: 1642.
2. a) Manikandan S. Are we moving towards a new definition of essential medicines? *J Pharmacol Pharmacother* 2015; 6: 123-5. b) AL, Wirtz VJ, EF, MR, Hogerzeil HV. Essential medicines are still essential. *The Lancet*, 2015; 386: 1601-3.
3. Editorial. Access to medicines-the statu quo is no longer an option. *The Lancet* 2016; 388: 1250.
4. a) Avendaño C. La Innovación Farmacéutica (en Nuevos Avances en Medicamentos), Monografía XV de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2004, pág. 11-56. b) Avendaño C. El futuro de los medicamentos (en Anticipaciones Académicas del Siglo XXI), Instituto de España, 2003, pág. 361-420. c) Mestre-Ferrandiz J. Defining Innovation in Medicines: How to Transform Innovation into Value. Curso de verano sobre la Evaluación de Medicinas, Universidad de Alcalá, 26 de Junio de 2013.
5. Garjón J. Medicamentos huérfanos: regulación y controversias. *Boletín de información farmacoterapéutica de Navarra* 2015; 23: 1-13.
6. Berdud M, Towse A, Kettler H. Fostering incentives for research, development, and delivery of interventions for neglected tropical diseases: lessons from malaria. *Oxford Review of Economic Policy* 2016; 32: 64-87.
7. Sánchez Fierro J. Sanidad en Europa: la innovación en los presupuestos comunitarios. *Revista española de economía de la salud*, 2016; Número 1: 68-73.
8. Grabowski HG, Hansen RW. Innovation in the Pharmaceutical Industry: New Estimates of R&D Costs. Cost of developing a new drug. Informe del Tufts Center for the Study of Drug Development, 18 de noviembre de 2014.
9. a) Mullard A. Mediator scandal rocks French medical community. *The Lancet* 2011; 377: 890-2. b) Casassus B. Drug scandals in France: have the lessons been learnt? *The Lancet* 2016; 388: 550-2.
10. Avendaño C. La innovación farmacéutica. Comentarios sobre tres noticias. *Anal Real Acad Nac Farm* 2005; 71: 873-904.
11. a) Editorial. The Patient Protection and Affordable Care Act: 5 year review. *The Lancet* 2016; 387: 2164. b) Editorial. The 2016 US Election: a platform for improving health. *The Lancet* 2016; 388: 1025. c)

- Editorial. US presidential candidates' proposals to reduce drug prices. *The Lancet* 2016; 388: 855-6.
12. Huang WS, Metcalf CA, Sundaramoorthi R, Wang Y, *et al.* Discovery of 3-[2-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-N-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl}benzamide (AP24534), a potent, orally active pan-inhibitor of breakpoint cluster region-abelson (BCR-ABL) kinase including the T315I gatekeeper mutant. *J Med Chem* 2010; 53: 4701-19.
  13. Orden HAP/1169/2016 de 14 de Julio, BOE Núm. 171, 16 de Julio de 2016, Sección I, Pág. 50232-6.
  14. Novak SP, Håkansson A, Martinez-Raga J, Reimer J, Krotki K, Varughese S. Nonmedical use of prescription drugs in the European Union. *BMC Psychiatry* 2016; DOI: 10.1186/s12888-016-0909-3.
  15. Mestre-Ferrandiz J, Sussex J, Towse A. The R&D Cost of a New Medicine. OHE (Office of Health Economics) Research paper, London (2012).
  16. a) Ferrario A, Kanavos P. Managed entry agreements for pharmaceuticals: the European experience. Final report, London School of Economics and Political Science, 2013. EMINEet, Brussels, Belgium. b) Garrison LP, Toese A, Briggs A, *et al.* Informe del Grupo de trabajo de ISPOR sobre Buenas Prácticas para los Acuerdos de Riesgo Compartido basado en el Desempeño. *Value in Health*, 2013; 16: 703-19. c) LAA, Bernardini C, Siviero PD, Montilla S, Pani L. Managed entry agreements. *Orphanet J Rare Dis*. 2014; doi: 10.1186/1750-1172-9-S1-O27.
  17. a) Goluboff ET, Olsson CA. Urologists on a tightrope: coping with a changing economy. *J Urol*. 1994; 151: 1-4. b) Albertsen PC, Pellissier JM, Lowe FC, *et al.* Economic analysis of finasteride: A model-based approach using data from the Proscar<sup>®</sup> long-term efficacy and safety study. *Clin Therap* 1999; 21: 1006-24.
  18. a) Guillemont J1, Meyer C, Poncelet A, Bourdrez X, Andries K. Diarylquinolines, synthesis pathways and quantitative structure-activity relationship studies leading to the discovery of TMC207. *Future Med Chem* 2011; 3: 1345-60. b) Mahajan R. Bedaquiline: First FDA-approved tuberculosis drug in 40 years. *Int J Appl Basic Med Res* 2013; 3: 1-2.
  19. Avorn J. Approval of a tuberculosis drug based on a paradoxical surrogate measure. *JAMA* 2013; 309: 1349-50.
  20. Ver Informe de Posicionamiento Terapéutico en : <https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT-bedaquilina-Sirturo-tuberculosis-pulmonar.pdf>.
  21. a) Hill A, Khoo S, Fortunak J, Simmons B, Ford N. Minimum Costs for Producing Hepatitis C Direct-Acting Antivirals for Use in Large-Scale Treatment Access Programs in Developing Countries. *Clinical Infectious Diseases* 2014; doi:10.1093/cid/ciu012. b) Avendaño C. Noticias científicas: Análisis. United States to approve potent oral drugs for hepatitis C. Improved treatments offer hope for eradication of viral liver infection. *An Real Acad Farm* 2014; 80: 242-9.
  22. Redacción Médica. 6 de octubre de 2016.
  23. Editorial. Hepatitis C: cost of lost opportunities. *The Lancet* 2015; 386:1917.
  24. Alwan A, editor. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva: World Health Organization; 2011.
  25. Razmaria A. Surgeon, Scientist, and Entrepreneur: One Man's Fight Against Cancer. *JAMA* 2016; 316: 1345-7.
  26. a) Briger I, Dubemet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 631-51. b) Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J* 2005; 19: 311-30.
  27. a) Paramore A, Frantz S. Bortezomib. *Nature Rev Drug Discov* 2003; 2: 611-2. b) Kane RC, Bross PF, Farrell AT, Pazdur R. Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *Oncologist*. 2003; 8: 508-13. c) Moreau P, Richardson PG, Cavo M, Orlowski RZ, San Miguel JF, Palumbo A, Harousseau J-L. Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood* 2012; 120: 947-59.
  28. Kisselev AF, van der Linden WA, Overkleeft HS. Proteasome Inhibitors: An Expanding Army Attacking a Unique Target. *Chem Biol* 2012; 19: 99-115.
  29. Maier SK, Hammond JM. Role of lenalidomide in the treatment of multiple myeloma and myelodysplastic syndrome. *Ann Pharmacother* 2006; 40: 286-9.
  30. Huber ML, Haynes L, Parker C, Iversen P. Interdisciplinary critique of sipuleucel-T as immunotherapy in castration-resistant prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104: 273-9.
  31. Avendaño C, Menéndez JC. Medicinal Chemistry of anti-cancer drugs. Second Edition, Elsevier, 2015, Chapter 12, pag. 576.
  32. European Medicines Agency. Document reference EMA/837805/2011. Questions and answers on biosimilar medicines (similar biological medicinal products). London: EMA 2012.
  33. Mestre-Ferrandiz J, Towse A, Berdud M. Biosimilars: How Can Payers Get Long-Term Savings?, *PharmacoEconomics* 2016; 34: 609-16.
  34. Grabowski HG, Guha R, Salgado M. Biosimilar competition: lessons from Europe. *Nat Rev Drug Discov*. 2014; 13: 99-100.



# The carotid rete mirabile: its history and its function

**Title in Spanish:** *La rete mirabile carotídea: su historia y su función*

Godofredo Diéguez Castrillo<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Profesor Emérito, Facultad de Medicina, Universidad Ceu-San Pablo, c/Julio Palacios, 29, Madrid, Spain.

**ABSTRACT:** The carotid rete mirabile is an arterial plexus that during many years, from its first description (century III B.C.) until century XVIII, it was considered that it was also present in humans. At present it is known that this plexus is mostly placed within the cranium, proximal to the Circle of Willis, and it is formed by medium sized, muscular arteries of short length that are freely anastomosed, and are poorly innervated. This rete is present in many animal species but not in human beings. About its function, it has been proposed several hypotheses: biochemic/metabolic, counter-current heat exchanger, and hemodynamic. Since it has a close anatomical relation with the cerebral circulation, the hypothesis more attractive is that it is probably involved in the regulation of cerebral hemodynamics, but how is this function performed remains uncertain. In the first part of this review, a historical review is made from its first description, and how its knowledge was transmitted through the following centuries. In the second part, several studies about morphology and function of the rete are commented. Some studies show that retial arteries have low contractile capacity, and the rete could participate in the regulation of cerebral circulation by producing passive changes in vascular resistance, thus protecting brain vasculature from abrupt, exaggerated hemodynamic alterations. The influence of the classical, old ideas about the carotid rete yet remains in the description of some clinical cases about patients with cerebral ictus where the authors refer to cerebrovascular malformations as rete mirabile.

**RESUMEN:** La rete mirabile carotídea es un plexo arterial que durante muchos años, desde su primera descripción (siglo III AC) hasta el siglo XVIII, se creyó que también estaba en los seres humanos. Hoy sabemos que suele estar dentro del cráneo, proximal al Círculo de Willis, y está formado por arterias de tamaño medio y de corta longitud, que se anastomosan libremente entre sí y tienen poca innervación. Está presente en numerosas especies de animales, pero no en los seres humanos. Sobre su función, se han propuesto varias hipótesis: bioquímica/metabólica, intercambiador térmico y hemodinámica. Dada su relación anatómica con la circulación cerebral, la hipótesis más atractiva es su probable participación en la regulación de la hemodinámica cerebral, pero aun no está claro cómo realiza esta función. En la primera parte de esta revisión se hace un recuerdo histórico de cómo se empezó a conocer la rete carotídea y cómo se fue transmitiendo este conocimiento a través del tiempo. En la segunda parte se comentan varios estudios encaminados a conocer su morfología y función. Algunos estudios indican que sus arterias tienen poca capacidad para contraerse, y la rete podría participar en la regulación de la circulación cerebral produciendo cambios pasivos en la resistencia vascular, evitando modificaciones hemodinámicas bruscas y exageradas en los vasos sanguíneos cerebrales. Aun sigue vigente la influencia de las ideas clásicas y ya pretéritas sobre esta rete; pues algunos autores aún siguen llamando rete mirabile a ciertas malformaciones cerebrovasculares observadas en algunos pacientes que presentan ictus cerebrales.

\*Corresponding Author: godofredo.dieguez@gmail.com

Received: October 3, 2016 Accepted: January 17, 2017

An Real Acad Farm Vol. 82, N° 4 (2016), pp. 372-407

Language of Manuscript: Spanish

## 1. INTRODUCCIÓN

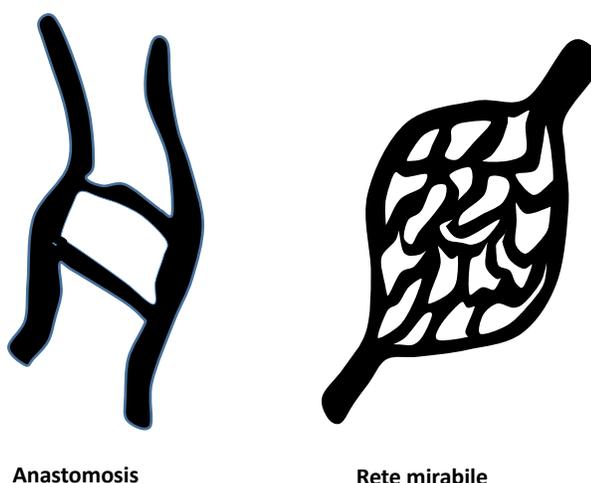
Los plexos vasculares, en particular los formados por arterias, han atraído el interés de los estudiosos desde la antigüedad. Este interés fue mayor cuando estos plexos tenían relación con las arterias que nutren las vísceras como, por ejemplo, el cerebro. Los antiguos se dieron cuenta de la importancia que debían de tener las arterias que llevan la sangre al cerebro para la función de este órgano, y el estudio del sistema arterial cerebral desde el punto de vista anatómico empezó muy pronto; mucho más reciente es su estudio desde el punto de vista fisiológico y clínico. El origen del nombre de las arterias que llevan la sangre al cerebro es variado, y la importancia que debían

tener las arterias para la función del cerebro se refleja, por ejemplo, en el nombre que se dio a una de las principales arterias que riegan el cerebro, la carótida. Este nombre deriva de “caros”, que significa sueño, probablemente porque los antiguos ya se dieron cuenta de que la oclusión en el cuello de ambas carótidas inducía “sueño o somnolencia” (en realidad, inducía pérdida de conocimiento). La relación entre las arterias y el cerebro aparece en textos antiguos: en el Papiro de Smith (2800 años A.C.) se describe que en los obreros que trabajan en la construcción de las pirámides y sufrían un traumatismo craneoencefálico, a través de las heridas del cráneo se veía que el cerebro pulsaba en sincronía con el pulso de las

arterias. Los asirios comprimían las carótidas en los varones jóvenes para amortiguar el dolor durante la circuncisión. Parece ser que Galeno llevó a cabo la ligadura de las carótidas y de las venas yugulares en el cuello, y observó que esta maniobra causaba pérdida de conocimiento de forma irreversible.

Entre las primeras estructuras anatómicas intracraneales que empezaron a llamar la atención de los que se ocupaban de la anatomía intracraneal y que empezaron a describirse en la literatura con nombre específico fueron el cerebro con su sistema ventricular, los senos venosos de la duramadre y la rete mirabile. A conocer esta última estructura se dedica la presente revisión.

En general, se entiende por **rete mirabile** (red maravillosa; en plural, **retia mirabilia**) un complejo de arterias (rete arterial), venas (rete venosa) o ambos tipos de vasos, que se forma por la división de una o más arterias o una o más venas, dando lugar a muchos vasos de corta longitud que se anastomosan profusa y libremente entre sí, y después se reúnen para formar, a su salida, una o varias arterias o venas. Esta estructura vascular adopta la forma de red u ovillo, se encuentra localizada en sitios específicos del organismo de múltiples especies de vertebrados y debe distinguirse de una anastomosis vascular sencilla (**Figura 1**).



**Figura 1.** Representación esquemática de una anastomosis vascular sencilla y de una rete mirabile.

Se han descrito retia mirabilia en múltiples especies de peces, batracios, reptiles, aves y en la mayoría de los órdenes de los mamíferos. Los territorios vasculares donde asienta una rete son muy variados: la base del cráneo, la coroides del globo ocular, la órbita ocular, el espacio epidural del canal espinal, el tórax, el sistema intercostal, los vasos mesentéricos, la vejiga natatoria, la cavidad pélvica, las extremidades y la cola.

Las formas que adoptan estos plexos también son muy variadas y se pueden clasificar de diversas maneras. Una manera las clasifica en fasciculada, reticulada, serpiginosa (sinuosa), como una pluma. La más común es la forma fasciculada (p.e., en las extremidades de algunos mamíferos como los lemúridos y perezosos) y la más infrecuente es la que tiene forma de pluma (p.e., en el sistema vascular de la pared intestinal de tiburones y pseudobranquias de algunos peces). La forma reticulada está representada por la rete mirabile carotídea, situada en la base del cerebro, y la forma serpiginosa está

representada por el plexo intercostal de los delfines. Según su posición anatómica, se han descrito una rete arterial baso-craneal, una rete arterial carotídea extracraneal, una rete arterial carotídea intracraneal (rete mirabile carotídea), una rete arterial cervical, una rete arterial etmoidal, una rete arterial intercostal, una rete arterial oftálmica, una rete arterial espinal, una rete arterial torácica.

La verdadera rete mirabile es la que está presente en todos los miembros de una especie animal y su localización en el sistema vascular es constante y específica. El nombre de la rete viene dado por el principal vaso que la forma y así existe una rete mirabile carotídea, torácica, oftálmica, espinal, tibiotarsal, caudal, etc. Aquí se tratará de las **retia** que están interpuestas entre el corazón y el cerebro, en particular la **rete mirabile carotídea** (rete mirabile caroticum, rete mirabile precerebralis, rete mirabile cerebri, rete de Galeno).

La rete mirabile carotídea es un plexo arterial, intra o extracraneal, situado frecuentemente entre las carótidas

externas y el polígono de Willis. Esta estructura vascular está presente en una gran variedad de especies animales y en las especies de animales que la tienen, toda o gran parte de la sangre que llega a su cerebro pasa a través de la rete.

La rete mirabile carotídea está presente en una amplia variedad de órdenes de animales: edentados, roedores, carnívoros, cetáceos, sirénidos, artiodáctilos y perisodáctilos. Dentro de un mismo orden, la rete puede estar presente en algunas especies y ausente en otras; donde es más frecuente es en los ungulados y cetáceos. No parece estar relacionada su presencia con la vida terrestre o acuática, ni con la postura de la cabeza (aunque en un principio se pensaba que su presencia guardaba relación con la postura de la cabeza y longitud del cuello). Su tamaño y desarrollo es muy variable entre las especies que la tienen. Las arterias aferentes a la rete son, en general, las siguientes: arteria vertebral, arteria occipital, arteria espinal, arteria carótida interna o arteria carótida externa. Esta última parece ser la más frecuente, pudiéndose decir que la rete mirabile carotídea está más presente en las especies en las que la arteria carótida externa es la principal fuente de riego sanguíneo al cerebro.

No se ha encontrado una clara relación, si es que la hay, entre las especies de animales que tienen el privilegio de estar dotadas de este plexo vascular. Tal vez la relación se deba a su función.

Cuando se ve esta estructura arterial con una lupa o un microscopio no sorprende que se le diera el nombre de rete mirabile ya que su aspecto es realmente maravilloso, admirable. Este nombre parece que se lo dio por primera vez Herófilo de Calcedonia o alguno de sus colaboradores (1).

**Erik Ask-Upmark** (1901-1985), sueco, fue Profesor de Medicina en la Universidad de Uppsala (Suecia) de 1946 a 1978. En 1935 publicó una extensa revisión y un extenso estudio sobre la circulación cerebral, el seno carotídeo y la rete mirabile carotídea (2). Su estudio

anatómico lo llevó a cabo en 18 especies de animales y en él planteó su hipótesis sobre la función de la rete.

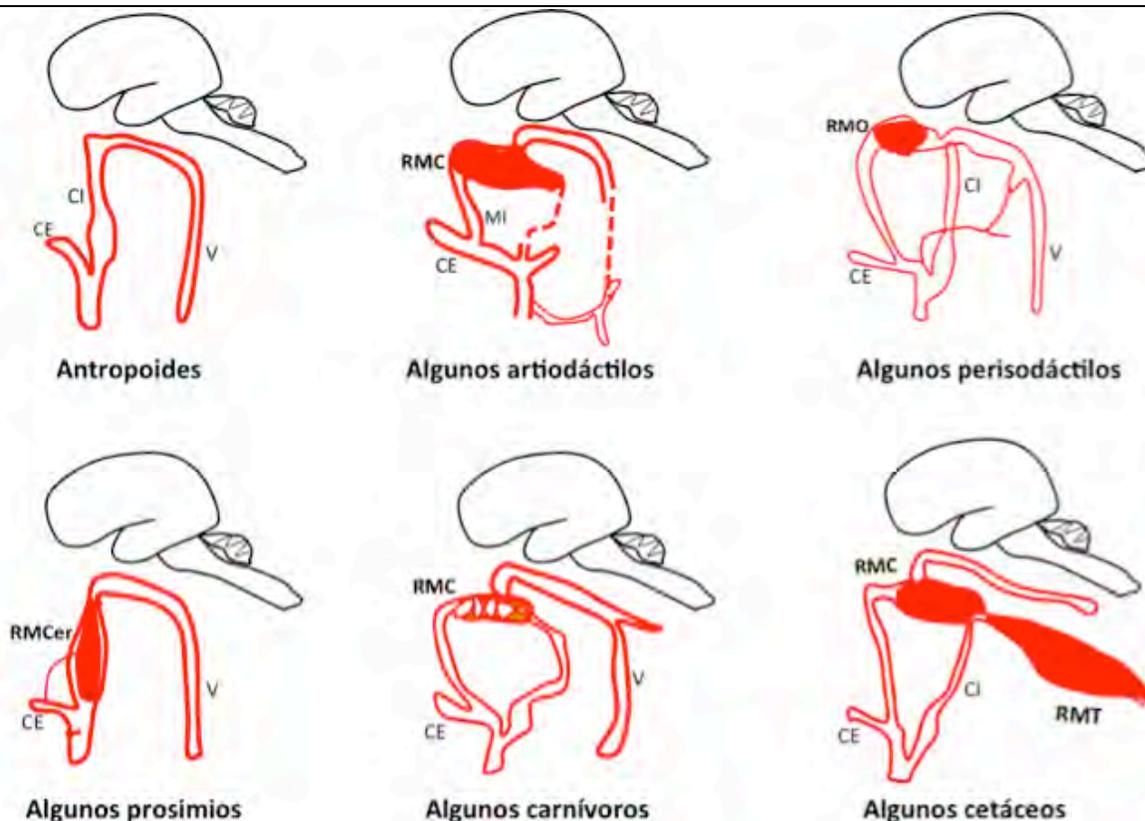
Tras el análisis de la literatura y de sus propios estudios, E. Ask-Upmark llegó a la conclusión de que se pueden distinguir varios patrones del sistema arterial que riega el cerebro de los mamíferos. Estos patrones se pueden resumir en dos: a) la sangre que llega al cerebro lo hace sin pasar por una rete mirabile, y b) la sangre que llega al cerebro pasa a través de una rete mirabile. Dentro de estos dos grupos, existen las siguientes variantes:

- a) Cuando no hay rete mirabile carotídea:
  - La sangre llega al cerebro a través del sistema carotídeo y del sistema vertebral.
  - La carótida interna aporta toda o casi toda la sangre al cerebro.
  - La arteria vertebral representa el principal aporte sanguíneo al cerebro.
- b) Cuando sí hay rete mirabile carotídea:
  - Toda la sangre que llega al cerebro pasa a través de la rete.
  - La sangre que llega al cerebro pasa solo parcialmente a través de la rete, y el resto lo hace directamente a través de arterias.

Por lo tanto, el cerebro de los mamíferos se riega a través de uno o más de los siguientes sistemas:

- a) sistema arterial anterior (arteria carótida interna o arteria carótida externa), o
- b) de un sistema arterial posterior (arteria vertebral o arteria occipital).

En su trabajo, Ask-Upmark publicó varios diagramas con algunos de los patrones del aporte sanguíneo al cerebro de diversos mamíferos. Estos diagramas se resumen en la **Figura 2**.



**Figura 2. Tipos de aporte sanguíneo arterial al cerebro de varias especies de mamíferos.** Adaptada de figuras publicadas por E. Ask-Upmark (2).

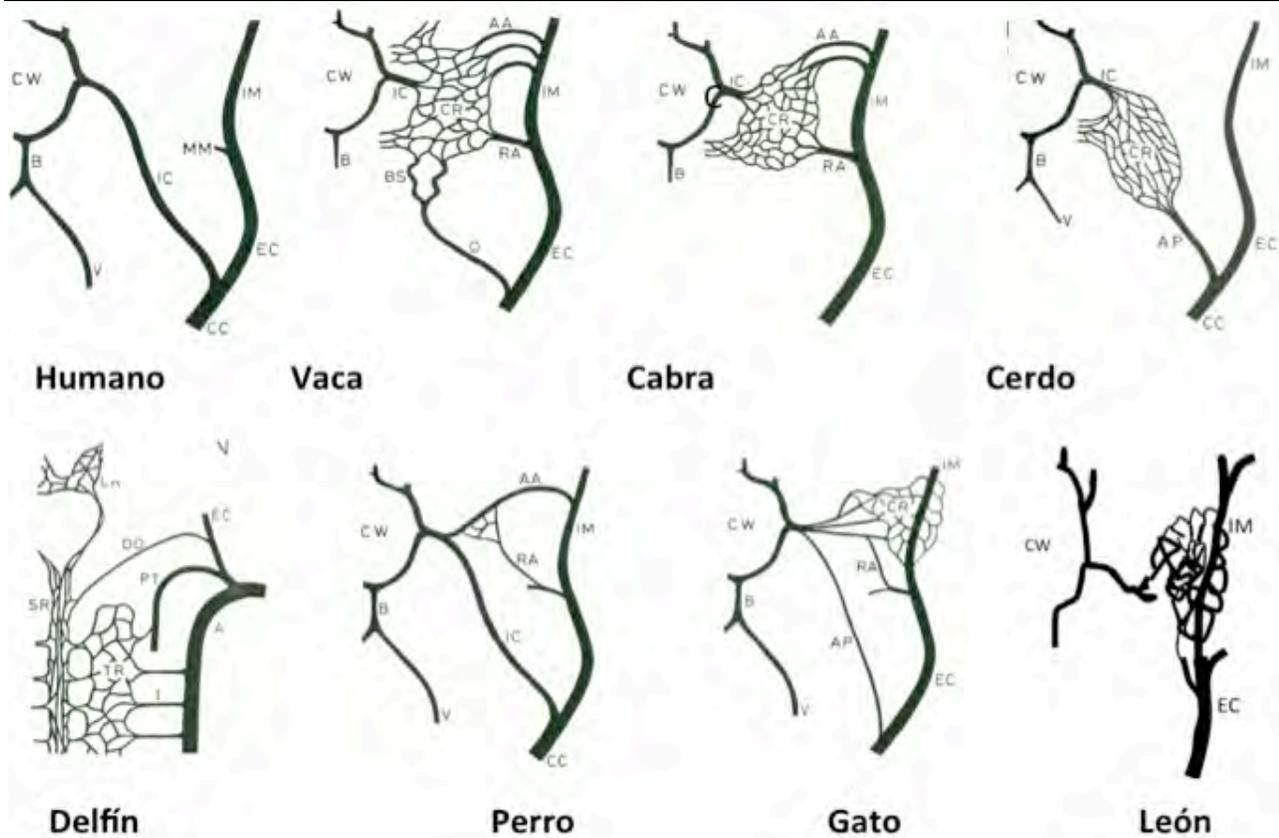
RMC = rete mirabile carotídea; RMO = rete mirabile oftálmica; RMCer = rete mirabile cervical; RMT= rete mirabile torácica. CE = arteria carótida externa; CI = arteria carótida interna; V = arteria vertebral.

En 1985, **A. L. García Villalón** realizó su Tesis Doctoral sobre el estudio morfológico y funcional de la rete mirabile de los artiodáctilos y en esta Tesis presenta un esquema de la rete mirabile carotídea y de sus principales arterias nutricias, correspondientes a varias especies de mamíferos (**Figura 3**) (3).

Los seres humanos no tienen rete mirabile carotídea, pero durante muchos años se consideró que era una estructura anatómica normal en la especie humana. En la medicina moderna, el término rete mirabile aún se conserva en la clínica para referirse a una anomalía congénita de los vasos cerebrales.

Dada la especial situación anatómica de la rete carotídea y su presencia en un gran número de especies de animales, no es sorprendente que durante muchos años se

haya tenido interés por conocer su función, la cual no es bien conocida todavía. La mayoría de las hipótesis propuestas para explicar su función se basan en especulaciones; realmente son muy pocos los estudios que se han realizado para conocer su función o funciones. Como el sistema vascular cerebral de cada especie guarda relación filogenética, para entender cómo evoluciona este sistema en respuesta al medio ambiente es conveniente comparar anatómicamente, funcionalmente y el grado de desarrollo de este sistema y de la rete en las diferentes especies. El grado de desarrollo de la rete podría estar relacionado con su función, la cual podría ser diferente en cada especie (4).



**Figura 3. Esquemas de la rete mirabile carotídea y de sus principales arterias nutricias en diversas especies de animales (tomada en su mayor parte de la Referencia 3).**

CR = rete mirabile carotídea; TR = rete torácica; SR = rete espinal; CW = círculo de Willis; AA = arteria anastomática; RA = ramo anastomótico; IC = arteria carótida interna; EC = arteria carótida externa; IM = arteria maxilar interna; PA = arteria faríngea; B = arteria basilar; V = arteria vertebral.

## 2. LA RETE MIRABILE EN EL PERIODO ANTIGUO Y MEDIEVAL

La rete mirabile carotídea se conoce desde la antigüedad, y los griegos y romanos estuvieron fascinados por ella. En el periodo antiguo podríamos destacar dos personalidades que han marcado un hito en esta particular historia: Herófilo de Calcedonia y Claudio Galeno.

**Herófilo de Calcedonia** (siglo III A.C.) (5, 6) nació en Calcedonia (Bitinia, actual Turquía) y se fue a vivir a Alejandría, llamado por Ptolomeo I Soter. Al parecer presionado por el Faraón, Herófilo hizo disecciones en cadáveres humanos pero no está claro que hiciera vivisecciones en criminales sentenciados a muerte. Siguió las ideas racionalistas o dialécticas de Hipócrates y pensaba que las partes principales del cuerpo debían ser accesibles a los sentidos. Llevó a cabo estudios anatómicos y enseñó Anatomía en el Museo de Alejandría; se considera el padre de la Anatomía y quizá el fundador de la Neuroanatomía. Su mayor contribución la hizo al conocimiento del sistema nervioso: describió los ventrículos cerebrales, meninges, vasos meníngeos, plexos coroideos, distinguió cerebro y cerebelo, distinguió nervios y tendones, y relacionó los nervios con el cerebro y el movimiento; distinguió varios pares craneales. Describió la confluencia de los senos venosos de la duramadre en

una estructura que lleva su nombre (prensa torcular de Herófilo). Dijo que el cerebro es la sede de la inteligencia, del movimiento y de la sensación, y que los ventrículos cerebrales son la sede del alma. En el cerebro, el espíritu vital (aire, pneuma) se convierte en espíritu animal (pneuma psíquico). Consideró al cerebro como el órgano más importante del cuerpo, como lo entendía Hipócrates, y no el corazón como pensaban Aristóteles y Praxágoras.

También contribuyó a conocer el sistema cardiovascular y distinguió arterias y venas, aurículas y ventrículos. Contó el pulso arterial con el reloj de agua, comentó las fases del corazón (sístole y diástole) y dijo que el pulso tenía cuatro propiedades: frecuencia, ritmo, tamaño y fuerza, y que el pulso era consecuencia de los movimientos del corazón. Demostró que la pared de las arterias es seis veces (ó más) más gruesa que la de las venas, y que contienen sangre durante la vida pero se quedan vacías al morir.

Cuando estaba en Alejandría, Herófilo, o alguno de sus colaboradores, parece ser que fueron los primeros en identificar y dar nombre a la “red maravillosa” al observarla en el interior del cráneo de algunos ungulados y probablemente creyeron que estaba presente en la cabeza de los seres humanos (1). Claudio Galeno así lo acredita y

él mismo le prestaría mucha atención a esta curiosa estructura vascular (1).

**Claudio Galeno** (130-200 AD) (1, 7, 8) nació en Pérgamo (actual Bergama, Turquía), en el seno de una familia acomodada. Su padre, Nicón, tuvo un sueño durante el cual el dios Asclepio le ordenó que su hijo estudiara Medicina, así que a los 16 años de edad, Claudio Galeno ingresó como aprendiz con Sátiro, un médico local.

A los 21 años de edad Galeno viajó por varios sitios para seguir estudiando medicina, y llegó a Alejandría, en donde recibió las enseñanzas de Herófilo y Erasístrato. En Alejandría estudió anatomía, en la que llegó a ser un experto a pesar de que no realizó disecciones en cadáveres humanos. Después de casi 12 años en Alejandría, Galeno regresó a Pérgamo y fue nombrado cirujano de gladiadores. Tres años después, Galeno viajó a Roma donde (con una breve ausencia de un par de años) permaneció el resto de su vida. Allí tuvo gran éxito, al principio como anatomista y experimentador, y posteriormente como médico y polemista.

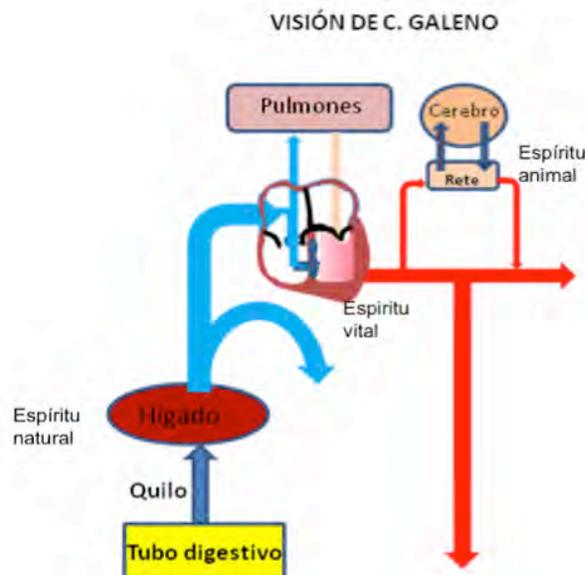
Sus escritos son los más voluminosos de la Antigüedad y abarca toda la medicina; su ídolo es Hipócrates, cuyos escritos cree conocer mejor que nadie y además los interpreta con la mayor fidelidad. Los textos de Galeno representan una síntesis del conocimiento médico antiguo y contienen varios esquemas generales que posteriormente fueron copiados, interpretados y comentados a lo largo de toda la Edad Media, hasta el Renacimiento. La palabra de Galeno se transformó en la última corte de apelación de todas las discusiones en Medicina hasta la época de Andrés Vesalio.

Combinando las ideas humorales hipocráticas con las antiguas teorías pitagóricas de los cuatro elementos, a los que agregó su propio concepto de un *pneuma* presente en todas partes, Galeno procedió a explicar absolutamente todo. Abandonó la anotación cuidadosa de los hechos, tan importante para Hipócrates, y uno de sus grandes errores fue asumir que la anatomía del hombre no difería sustancialmente de la anatomía de animales que él disecó (monos, cerdos, vacas, osos, perros).

Aceptó el *pneuma* (anima) como espíritu vital esencial para la vida y que era obtenido en la respiración; entraba a través de la tráquea (arteria rugosa) hasta los pulmones y desde aquí por la arteria venosa (vena pulmonar) pasaba al ventrículo izquierdo. Como hizo Platón, distinguió tres tipos de *pneuma*: animal, situado en el cerebro; vital, situado en el corazón, y natural, situado en el hígado. Cada uno de ellos tenía una identidad material.

Desarrolló su idea sobre la circulación de la sangre, en la que aparece una de sus falacias más brillantes: parte de la sangre del ventrículo derecho pasaba al ventrículo izquierdo por poros del tabique interventricular; fue la única forma que encontró para transportar la sangre de un ventrículo al otro. En el ventrículo izquierdo la sangre se encontraba por primera vez con *pneuma* o espíritu del mundo exterior que desde los pulmones llega al ventrículo izquierdo por la vena pulmonar (arteria venalis). La respiración tenía el propósito de proporcionar aire para la

vida y para enfriar el fuego que hay en el ventrículo izquierdo. Esta sangre purificada se distribuía, desde el ventrículo izquierdo, por el sistema arterial a todas las partes del cuerpo. La dirección de la sangre era gobernada por válvulas de una dirección situadas en las cuatro cavidades del corazón. Creía que el corazón no era un músculo por lo que no se puede mover voluntariamente, y su dilatación “pulsística” hacía que la sangre pasara de la vena cava al ventrículo derecho. En resumen, consideraba que sólo una pequeña parte de la sangre se desplazaba por el cuerpo en forma de flujo y reflujo (Figura 4).



**Figura 4. Representación esquemática de la circulación sanguínea según la idea de C. Galeno;** obsérvese la posición de la rete mirabile (Rete) (8).

Habló del pulso y lo describió con gran detalle, conocía la mecánica respiratoria, conoció en detalle el sistema muscular y describió la unidad funcional entre el cerebro, médula espinal y nervios periféricos. El cerebro era la sede del pensamiento, y su actividad era proporcionada por el *pneuma* psíquico, dejando sin respuesta la cuestión de la naturaleza del espíritu.

Todo su conocimiento permaneció casi sin cambiar hasta los tiempos modernos. Sus aciertos predominan sobre sus errores, y probablemente la Fisiología de Galeno representa el mayor logro en la Medicina de la Antigüedad. Es asombrosa su aceptación durante más de catorce siglos y tanta fue su influencia en la Medicina que en 1649 Jean Rioloano declaró que si en las disecciones se encontraba algo distinto a lo dicho por Galeno es que la Naturaleza había cambiado.

Galeno "El Sereno" fue un gigante intelectual. Heredó, discutió y sintetizó todo el saber filosófico, filológico, científico y médico acumulado durante ocho siglos por las civilizaciones griega y helenística. Su mayor logro en la fisiología cardiovascular fue su concepto de movimiento unidireccional de la sangre y del aire a través de los pulmones, concepto que duró hasta W. Harvey. En Roma adquirió gran fama, llegando a ser médico y amigo del

emperador Marco Aurelio y de su hijo Comodo (también emperador). Sus colegas le encontraban arrogante y con una ostentación insufrible (no tuvo discípulos), aunque reconocían su talento y saber. Llegó a ser dogmático y a proponer fuerzas indemostrables y conceptos fisiológicos para explicar los fenómenos naturales.

Parece ser que Galeno vio la rete en el interior de la cabeza de terneras y ovejas, le prestó gran atención y la describió con verdadero entusiasmo, asignándole una función importantísima, transformar el espíritu vital en espíritu animal (psíquico). Galeno fue médico de gladiadores durante unos dos años y medio cuando estuvo en Pérgamo, a su regreso de Alejandría. Algunos historiadores piensan que Galeno no solía explorar con mucho detalle lo que había dentro del cráneo de los gladiadores heridos, y cuando levantaba el cerebro veía que había abundantes plexos venosos y sangre en la base del cerebro. Es probable que pensara que estos plexos y sangre eran la rete, lo que le llevó a pensar que la rete también estaba presente en la cabeza de los seres humanos. Esta idea de Galeno se mantendría vigente durante varios siglos como iremos viendo a lo largo de este texto.

Para Galeno, la rete mirabile jugaba un papel crucial, pues al extraer los espíritus animales de la sangre y refinarla, la rete convertía el espíritu vital en espíritu animal, lo cual consideraba que era necesario para que el cerebro pudiera formar el razonamiento, transmitir la fuerza a las partes del cuerpo y causar el movimiento, ideas que también perdurarían durante siglos.

Durante todo el periodo medieval se aportó muy poco al conocimiento de la rete y se mantuvieron prácticamente intactas las ideas de Galeno.

### 3. LA RETE MIRABILE EN LOS SIGLOS XVI-XVIII

Después de Galeno y hasta las que hicieron Leonardo da Vinci y Magnus Hundt, las representaciones iconográficas de la rete mirabile son muy escasas; no le daban una forma orgánica ni una situación precisa.

**Leonardo da Vinci** (1452-1519), italiano (9, 10), fue probablemente el hombre más sobresaliente del Renacimiento y es el padre de la ilustración médica. Estaba dotado de un enorme talento y su campo de interés era muy amplio; en todos los campos ha sido una figura sobresaliente: pintura, geología, geografía, astronomía e ingeniería. Sus dibujos anatómicos son numerosos y extraordinarios donde incluye las características del corazón y los grandes vasos coronarios; intentó esquematizar los “poros invisibles” de Galeno en el tabique interventricular.

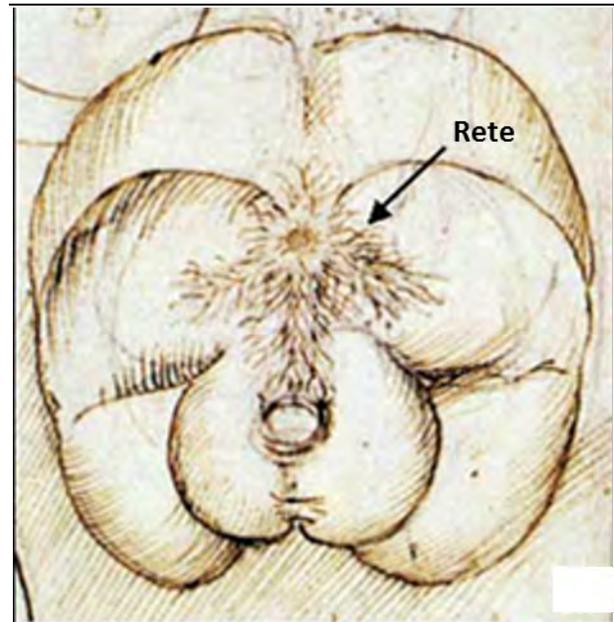
Señaló que la fuerte contracción del corazón empuja la sangre, que al rozar con las paredes cardíacas se calentaba y producía el espíritu vital. Cuando la sangre colisionaba con las válvulas y las cerraba, se creaba un tono que se transmitía por todo el sistema arterial. Todas las venas y arterias se originaban en el corazón y no en el hígado, y los pulmones son como esponjas conteniendo bronquios que se ramifican en terminaciones ciegas. No creyó que el aire pudiera pasar de los pulmones a los vasos y al corazón,

puesto que los pulmones aislados se mantienen llenos de aire cuando se insuflan. Los pulmones seguían pasivamente los movimientos del tórax, el cual era movido por los músculos costales; el tórax y el diafragma actuaban como dos campanas. Los músculos están formados por finas fibras y están conectados con un nervio, y éste transmitía el impulso para hacerlos contraer.

Describió los ventrículos cerebrales, así como la conexión entre cerebro, médula espinal y nervios. Utilizó modelos mecánicos para explicar la función de algunos órganos, pero la idea de circulación sanguínea seguía oscura, y es improbable que L. da Vinci conociera la circulación pulmonar. Consideró los músculos como palancas y los ojos como lentes. Relacionó la muerte de muchos ancianos con lo que hoy conocemos como arteriosclerosis.

Antes de él, los esquemas anatómicos eran surrealistas, como pinturas de niños. En sus dibujos sobre Anatomía Humana, da Vinci representaba la rete de forma difusa en la base del cerebro; seguía la tradición sobre la presencia de la rete mirabile en la cabeza humana, derivada de las ideas de C. Galeno (**Figura 5**).

No publicó sus dibujos y se los dio a un amigo. La historia no ha podido autenticar cuantas creaciones aportó, cuantas anotó.

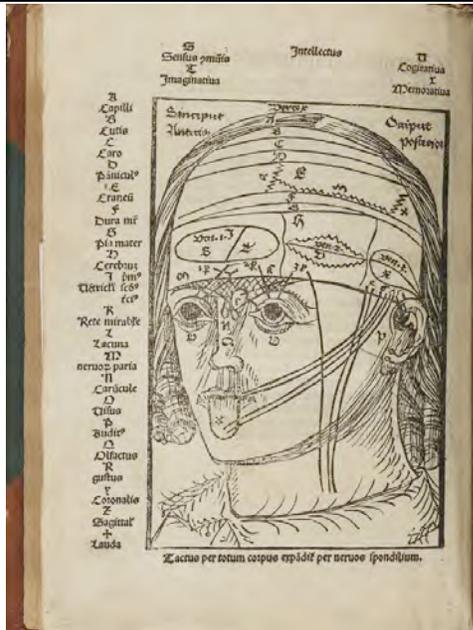


**Figura 5. Leonardo da Vinci también representó la rete mirabile, en la base del cerebro, tal como muestra este dibujo tomado de sus libros de notas.**

Magnus Hundt (1449-1519), teólogo, médico y filósofo alemán (7, 11). Es considerado uno de los fundadores de la antropología moderna. Comenzó a estudiar a los 33 años de edad y llegó a ser Rector de la Universidad de Leipzig (Alemania). Su obra más destacada fue “Antropologium de hominis dignitate, natura, et proprietatibus, de elementis, partibus et membris humani corporis”, publicada en 1501, donde expone el cuerpo humano no solo desde el punto de vista anatómico y fisiológico, sino también desde el punto

de vista filosófico y religioso, para recalcar que el hombre fue creado a imagen y semejanza de Dios. Y en esta obra aparece por primera vez el término técnico “Antropología”.

En dicha obra, Hundt también representa la rete como se muestra en la Figura 6. Este modelo de rete sería usado 3 décadas después por Johann Dryander.



**Figura 6. Representación de la rete en forma de cuadrícula encima de la nariz** (M. Hundt, *Antropologium de hominis dignitate, natura et proprietatibus, de elementis, partibus et membris humani corporis*, 1501) (7).

Johann Eichmann (Dryander) (1500-1560), anatomista alemán. (7, 12). Estudió Medicina en la Universidad de París y en 1535 fue nombrado Profesor de Medicina en la Universidad de Marburgo (Alemania). Fue de los primeros en hacer disecciones de cadáveres en público y probablemente publicó el primer libro de importancia sobre la Anatomía de la cabeza y del cerebro. En 1536 hizo dos disecciones anatómicas en público y fue el autor del primer texto donde ilustra sobre la disección del cerebro humano. En 1537 publicó una edición ampliada que tituló “*Anatomiae pars prior*”. Sus libros mostraban el cerebro en ocho figuras además de otras láminas donde se ilustraba el cráneo, la base del cráneo y otras partes del cráneo. En una de las láminas de este libro, representa la rete de forma difusa encima de la nariz, imitando a M. Hundt (Figura 7).

**Vniuersalis figura omnium partium capitis humani cum sua explicatione.**



**Figura 7. Representación de la rete en forma de cuadrícula encima de los ojos** (7). Un año después de que apareciera esta ilustración de J. Dryander sobre la rete, Vesalio publicó la suya en su *Tabulae anatomicae sex* (1538).

Los textos de Dryander representan una transición del escolasticismo medieval a la observación precisa de Vesalio. Además de Anatomía, Dryander escribió sobre matemáticas y astrología.

Las representaciones gráficas mostrando la rete en forma de cuadrícula como hicieron M. Hundt y J. Dryander no eran realistas, naturales, ni tenían una localización precisa dentro del cráneo.

Walter Herrmann Ryff (1500-1548), médico, anatomista y filósofo alemán (7, 13). Se trata de un personaje algo misterioso, pues no se conoce con seguridad su nombre ni donde nació exactamente. Trabajó como boticario, parece ser que estudió un año de Medicina en Basilea (Suiza) y publicó su obra “*Anatomi*” donde representa la rete plagiando a Vesalio (1541) (Figura 8). Este autor también representó el cuerpo humano según las directrices de Vitrubio (1547).



**Figure 8. Representación de la rete mirabile hecha por W. H. Ryff en 1541** (obsérvese que es prácticamente igual a la representación que hizo A. Vesalio) (7).

Jacobo Berengario de Capri (1470-1550), anatomista italiano, (14, 15). Fue profesor de Anatomía en Bolonia y médico en Ferrara. Publicó su obra “Isagogae” (1522) y realizó uno de los primeros experimentos en los que inyectó agua tibia en las arterias y estudió su circulación. En otra obra mencionó la dilatación cardiaca y fue de los primeros en utilizar mercuriales para tratar la sífilis. Describió por primera vez los ventrículos laterales del cerebro, la glándula pineal y los plexos coroideos. Siguió aceptando las ideas de Galeno.

Parece ser que fue el primero en negar la presencia de la rete en los seres humanos.

Andreas Vesalio (1514-1564), anatomista flamenco nació en el seno de una familia acomodada, y sirvió al emperador Maximiliano como boticario, y luego a su nieto Carlos V como valet de chambre (7, 16-18).

Fue el más brillante de los anatomistas de la fructífera escuela de Padua, así como la figura más sobresaliente de la medicina europea después de Galeno y antes de W. Harvey. Al principio, Vesalio defendía las tesis de Galeno, pero quiso diseccionar cadáveres con sus propias manos y observarlos directamente. Por primera vez en XIV siglos se retó la doctrina de Galeno con hechos, de forma acalorada e incansable, y consideró a Galeno como humano y no infalible. Describió e ilustró las arterias coronarias y no pudo demostrar su origen. Al no poder encontrar los poros del tabique estuvo cerca de descubrir la circulación pulmonar.

Siguió los estudios de Medicina en la Universidad de París, donde estudió las teorías de Galeno bajo la dirección de Jacques Dubois (Jacobus Sylvius) y de Jean Fernel. Fue en esta época cuando empezó a interesarse por la Anatomía: para mejorar sus conocimientos sobre osteología.

Se vio obligado a abandonar París en 1536 a causa de la guerra entre Francia y el Sacro Imperio Romano Germánico, y regresó a Lovaina. Allí completó sus estudios bajo la dirección de Johannes Winter von Andernach, y se graduó al año siguiente. Se instaló durante un tiempo en Venecia y en 1536 se trasladó a la Universidad de Padua, donde se doctoró en 1537. Inmediatamente después de su graduación le fue ofrecido el puesto equivalente a una Cátedra de Cirugía y Anatomía, en la misma Universidad. Enseñó también en las Universidades de Bolonia y de Pisa. Su método de enseñanza era revolucionario: tradicionalmente el profesor enseñaba leyendo los textos clásicos (principalmente la obra de Galeno) y su exposición era seguida de la disección de un animal, realizada por un barbero-cirujano bajo la dirección del profesor. Vesalio, en cambio, convirtió la disección en la parte más importante de la clase, llevándola a cabo por sí mismo, rodeado por sus alumnos. Para Vesalio, la observación directa era la única fuente fiable, lo que suponía una importante ruptura con la práctica medieval, basada fundamentalmente en la lectura de los textos. Estudiantes, médicos y colegas asistían a sus clases para verlo y escucharlo.

Recopiló sus dibujos de Anatomía, para uso de sus

estudiantes, en tablas anatómicas ilustradas. Cuando descubrió que algunos de ellos estaban siendo copiados, los publicó en 1538 con el título de *Tabulae Anatomicae Sex* (Venecia, 1538). Las tres láminas osteológicas fueron realizadas, a instancia suya, por Kalkar, discípulo de Tiziano; las tres relativas a las vísceras las realizó el propio Vesalio.

En 1539 un juez de Padua, interesado por los trabajos de Vesalio, hizo que se le facilitasen para su disección los cadáveres de los criminales ejecutados. Esto le permitió mejorar sus diagramas anatómicos.

En 1541, mientras estaba en Bolonia, Vesalio descubrió que las investigaciones de Galeno estaban basadas en la disección de animales, y no de seres humanos. Como la disección humana había estado prohibida en la antigua Roma, Galeno había diseccionado monos, creyendo que serían anatómicamente similares al ser humano. Vesalio, apoyándose en sus propias observaciones, publicó una corrección de las *Opera omnia* de Galeno, y comenzó a escribir su propio texto de Anatomía.

Vesalio, fiel a sí mismo, continuó provocando controversias, esta vez no demostrando los errores de Galeno, sino de Mondino de Luzzi, e incluso de Aristóteles: los tres habían hecho suposiciones acerca de las funciones y estructura del corazón que eran claramente erróneas. Por ejemplo, Vesalio descubrió que el corazón tenía cuatro cavidades, que el hígado tenía dos lóbulos y que los vasos sanguíneos comenzaban en el corazón, y no en el hígado.

En 1543, Vesalio publicó en Basilea, en siete volúmenes, su obra *De humani corporis fabrica* (Sobre la estructura del cuerpo humano, que dedicó a Carlos V y que fue ilustrada por Jan Stephen van Kalkar. Esta es una de las obras más influyentes sobre los textos de Anatomía Humana. Pocas semanas después publicó una edición compendiada, para uso de estudiantes, *Andrea Vesalii suorum de humani corporis fabrica librorum epitome*, que dedicó al príncipe Felipe, hijo y heredero de Carlos V. Su modelo anatómico contrasta poderosamente con los vigentes en el pasado.

Poco después de la publicación de su obra cumbre, le fue ofrecido el puesto de médico imperial en la corte de Carlos V, donde tuvo problemas en sus relaciones con los otros médicos, que lo consideraban un “barbero”. Durante doce años Vesalio viajó con la corte, tratando heridas de guerra y torneos, realizando operaciones quirúrgicas y autopsias, y escribiendo cartas privadas acerca de cuestiones médicas específicas. Tras la abdicación de Carlos V, continuó ejerciendo como médico en la corte de Felipe II, quien le recompensó con una pensión vitalicia y el nombramiento de conde palatino.

Recibió numerosos ataques y fue condenado a la hoguera por algunas oscuras prácticas, pero Felipe II cambió esta sentencia por una peregrinación a Tierra Santa, la cual emprendió en 1564. Se embarcó con la flota veneciana de Giacomo Malatesta, vía Chipre. Cuando llegó a Jerusalén recibió un mensaje del senado de Venecia

instándole a aceptar su antiguo puesto en la Universidad de Padua, que había quedado vacante a la muerte de su amigo y alumno Falopio. Tras luchar durante varios días con vientos adversos en el Mar Jónico, su barco tuvo que atracar en la isla de Zante. Allí murió poco después, cuando contaba solo cincuenta años de edad.

Sobre la rete:

Negó la presencia de la rete en los seres humanos, lo cual iba en contra de lo que había dicho Galeno. Él mismo dejó escrito: “Cuando disecaba un cadáver, llevaba conmigo la rete de un cordero o de una ternera, para mostrarla al público y no ponerme en evidencia por mi incapacidad para encontrar algo que era tan familiar”; años más tarde dijo: “cuan lejos están estas cosas de la verdad y cuanta indiferencia por la naturaleza...” Y terminó por enfrentarse a la realidad y negar la existencia de la rete en los seres humanos.

Un año después de que lo hiciera Johann Dryander, Vesalio publicó una ilustración de la rete mirabile (1538) (Figuras 9 y 10). En la tercera lámina de su obra, Vesalio todavía mostraba la rete en el centro, en el medio de la cabeza, y al menos hasta 1540, creía que la rete estaba también presente en los seres humanos y la veía en el

centro de la más noble de las tres cavidades del cuerpo, el cráneo.

Pocos años después, Vesalio abandonó esta idea y negó su existencia en el hombre, aunque seguía representándola en sus ilustraciones, pero de forma diferente: aparecía como entidad independiente y fuera del cráneo. Seguía aceptando algunos aspectos de la Anatomía de Galeno, pero poco a poco iba separando la rete del cuerpo humano. Vesalio se opuso a esta idea demostrando con claridad que no es así; esta oposición la hizo con cierta cautela por lo que en aquel entonces aún suponía oponerse a las ideas de Galeno. En su libro De humani corporis fabrica, Vesalio negó la existencia de la rete en los seres humanos y siguió demostrando su presencia en la cabeza de ovejas, indicando así que no verla en la cabeza humana no era debido a su incapacidad para encontrarla. Defendía la idea de que tiene más valor lo que se ve en la Naturaleza que en lo que se lee en los escritos de otros. Refutando las ideas de Galeno, se daba comienzo a la moderna Anatomía (15).

A pesar de que Vesalio demostró que los seres humanos no la tienen, la idea de una rete dentro del cráneo de la especie humana perduraría hasta el siglo XVIII.

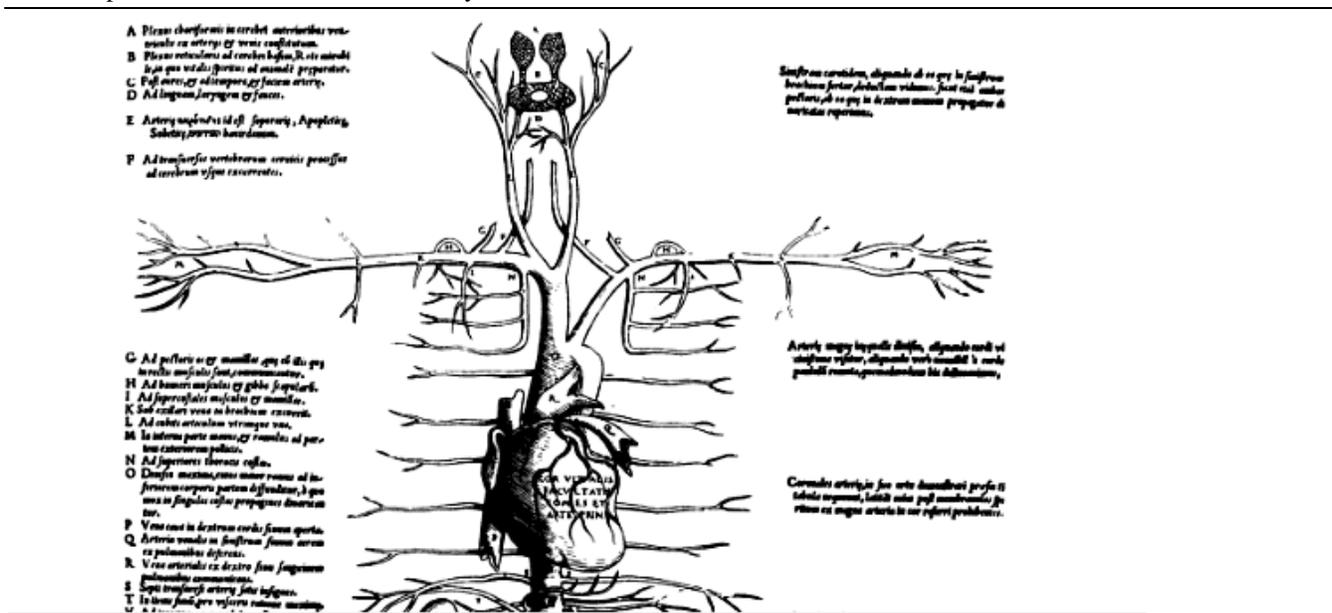
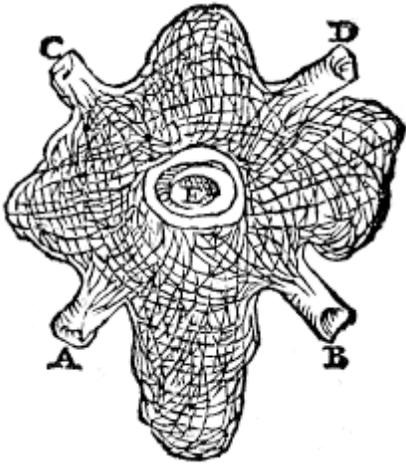


Figura 9. En esta lámina aparece la rete mirabile en el centro de la cabeza (A. Vesalio, Tabulae Anatomicae Sex, 1538) (7).



**Figura 10. Representación de la rete mirabile hecha por A. Vesalio** (De humani corporis fabrica, 1543) (7).

Andreas Laurentius (André du Laurens, 1558-1609), anatomista francés (7, 19) Fue profesor de Anatomía en Montpellier y escribió “Opera anatomica” (1593) e “Historia anatomica” (1600). Sus descripciones no son originales, pero su obra tuvo mucha influencia a lo largo del siglo XVII. Acuñó el término “Cauda equina”.

En sus láminas de Anatomía representa la rete en la base del cerebro y se basan en las láminas realizadas por A. Vesalio. Llegó a ser médico de la familia real francesa.

Jean Riolan el Joven (1577-1657), anatomista francés (7, 20). Fue hijo de Jean Riolan el Viejo (1539-1605) y, como su padre, fue un miembro influyente de la Facultad de Medicina de París. Tenía una visión tradicional de la Medicina y era defensor de las doctrinas de Galeno, y a su vez, contrario a las ideas de Vesalio y de Harvey. Concretamente, se opuso a las ideas de Harvey sobre la circulación de la sangre. Fue médico de María de Médicis y se opuso a la práctica de la vivisección.

Una de sus obras más conocidas es Anthropographie (1618), que trata de la anatomía humana. También escribió Opuscula anatomica (1649), donde critica a Harvey por su visión de la circulación de la sangre. Hay varias estructuras en la Anatomía Humana que llevan su nombre.

Como buen seguidor de Galeno, J. Riolan el Joven defendió que la rete estaba presente en la cabeza de los seres humanos. Merece ser recordada una de sus célebres frases: “...si alguien encuentra en sus disecciones de cadáveres algo diferente a lo observado por Galeno, es que ha cambiado la Anatomía...”.

Julius Casserius (c. 1552-1616), anatomista italiano (7, 21, 22). Este personaje, poco conocido, ocupa, cronológicamente, el cuarto lugar en la lista de seguidores de Vesalio en la Escuela de Padua (23).

Obtuvo el Grado de Medicina en la Universidad de Padua, donde fue ayudante de Fabricius. Destacó como anatomista y mantuvo controversias y rivalidad con su mentor Fabricius; más tarde sucedió a este como Profesor

de Anatomía en la Universidad de Padua.

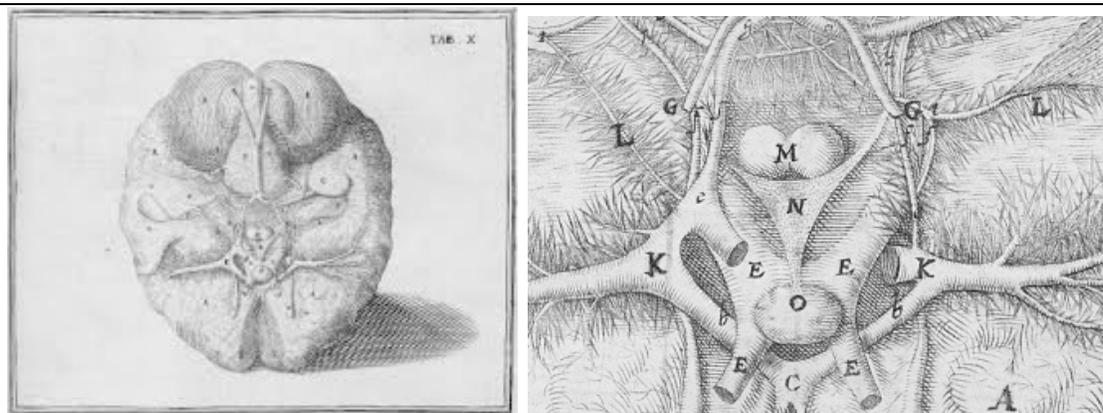
Caserius fue de los primeros en publicar un compendio de anatomía y falleció cuando estaba en la cima de su fama y preparando una obra donde incorporaba nuevas estructuras anatómicas; no llegó a ver editada esta obra. Es considerado un pionero en el conocimiento de la anatomía humana, sus láminas fueron utilizadas posteriormente por otros profesores de varios sitios en Europa e influyó mucho en la enseñanza de la anatomía en los siglos posteriores. Prestó especial atención al estudio anatómico de los órganos de la audición y de la vocalización. Este personaje, innovador en el conocimiento y enseñanza de la anatomía, seguía representando en sus láminas de anatomía la rete en la cabeza humana.

Adriaan van der Spiegel (1578-1625), anatomista belga (7, 24, 25). Nacido en Bruselas, estudió en las Universidades de Lovaina y de Leiden, y posteriormente en la de Padua. En esta última fue alumno de Fabricio y Casserius, y se graduó en 1604. Spiegel fue nombrado médico de estudiantes y ayudó a Fabricio en su práctica privada de la Medicina. Practicó la Medicina con gran éxito en Padua. Publicó Isagoge in rem herbariam libri duo (1606) y De humani corporis fabrica libri X tabulis aere icisis exornati (1627), cuyo título se asemeja mucho al del libro de su colega A. Vesalio

En 1607 compitió sin éxito por una Cátedra de Medicina en Padua. En 1612 dejó Italia y se fue a Bélgica, para finalmente viajar por Alemania y asentarse en Moravia. En 1616 el Senado Veneciano le nombró profesor de Anatomía y Cirugía, sucediendo a Caserio, quien a su vez había sucedido a Fabricio.

En 1617 Spiegel llevó a cabo una demostración de Anatomía en público en Padua donde acudían estudiantes a verle. En 1623 fue elegido Caballero de San Marcos. Murió en 1625 dejando varios manuscritos que se publicarían después, como p.e., De humani corporis fabrica editado por Bucretius e ilustrado con láminas hechas por Josias Murerus (Joseph Maurer) y por Julius Casserius (c. 1552-1616). Julius Casserius fue predecesor de Spiegel como Profesor de Anatomía en Padua (23). El nombre de Spiegel aparece en dos estructuras anatómicas: la línea Spigelii (la línea semilunar situada entre el músculo y la aponeurosis del músculo transversus abdominis, y el lobus caudatus hepatis (Spigelii), el cual ya había sido descrito anteriormente por Eustachio y otros.

Spiegel fue el último hombre de la línea de Vesalio en la Escuela de Padua y seguía representando la rete de manera algo diferente de Vesalio. Spiegel no tenía duda de su existencia en el hombre, aunque admitía que era difícil de encontrarla y era más fácil encontrarla en los animales irracionales (Figura 11).

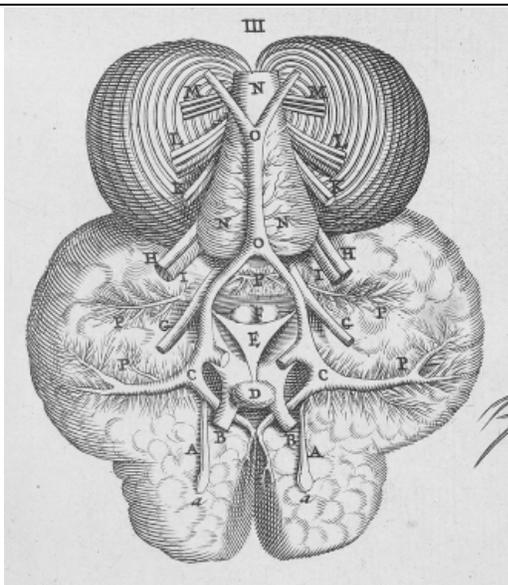


**Figura 11. Izquierda: representación de la rete en la base del cerebro. Derecha: detalle de la figura de la izquierda donde se aprecia mejor la representación de la rete (letra L)** (A. van der Spiegel, 'De humani corporis fabrica', 1627) (7).

Johan Vesling (1598-1649), anatomista alemán (7, 26). Estudió Medicina en Leyden y en Bolonia. Estuvo en Egipto como médico personal del Cónsul de Venecia en este país. Regresó a Padua donde enseñó Anatomía y sucedió como Profesor a A. der Spiegel.

Su libro Syntagma Anatomicum se editó en 1641 y contiene Anatomía y Fisiología. Aunque no fue alumno de Fabricio, lo invoca con frecuencia. Describe el sistema linfático, las cuatro venas pulmonares, el círculo cerebral (antes de hacerlo Willis). Su texto fue muy utilizado en Europa durante los siglos XVII y XVIII, y se tradujo a varios idiomas.

Su libro Syntagma anatomicum, publicis dissectionibus, in auditorum usum, diligenter aptatum se basa en las disecciones que hizo en Padua. En este libro es donde representa el cerebro visto desde abajo, como hacía Spiegel, pero en contra de este, Vesling no presentaba la rete saliendo de la carótida, sino que emergía dentro del plexo coroideo y después se extendía sobre la superficie del cerebro (letra P) (Figura 12).



**Figura 12. Lámina donde se representa la rete mirabile (letra P)** (J. Vesling, Syntagma anatomicum, 1647) (7).

Vesling mantenía la idea de que la rete estaba en el hombre y en ella se formaba el espíritu animal a partir de la sangre, como había dicho Galeno. No obstante, propuso que podía haber otros órganos donde se podía producir también el espíritu animal. Como pensaba que la rete era diferente en los hombres y animales, esta diferencia explicaba las diferencias mentales entre ambos. Esta visión de la rete influiría en los autores de los siglos XVII y XVIII.

En la segunda mitad del siglo XVII, la estructura y función del cerebro atrae la atención de los anatomistas y aparecen las destacadas obras de Johann Jakob Wepfer (Observaciones anatómicas, 1658), Thomas Willis (Cerebri anatome, 1664) y Nicolaus Steno (L'anatomie du cerveau, 1669).

Nicolaus Steno (Niels Steensen, 1638-1686), anatomista y científico danés (7, 27). Estudió la anatomía del cerebro y estructuras relacionadas como las meninges. En 1669 dijo: "El cerebro, pieza maestra de la creación, es casi desconocido para nosotros". Como consecuencia del azar, dirigió sus pasos hacia la botánica y los fósiles, y es considerado el padre de la Geología. Tras convertirse al catolicismo, murió como obispo misionero; fue beatificado recientemente por el Papa Juan Pablo II. En sus estudios anatómicos no menciona la rete pero su metodología para el estudio anatómico fue muy útil para aclarar la cuestión de la existencia de la rete en el hombre, y con ello dónde se produce el espíritu animal.

Johann J. Wepfer (1620-1695), médico suizo (7, 28, 29). Es recordado por sus estudios de la anatomía vascular del cerebro y de las enfermedades cerebrovasculares; publicó un libro sobre la vascularización del cerebro y la apoplejía. Parece ser que también describió el polígono arterial en la base del cerebro antes de que lo hiciera T. Willis. Utilizando el método de N. Steno, fue el primero en proponer la hipótesis de que el ictus cerebral es causado por hemorragia o por obstrucción de una de las arterias cerebrales. Asimismo, en sus estudios en cadáveres humanos llegó a la idea de que las carótidas y vertebrales aportan sangre al cerebro.

También aborda el tema de la rete y señala que las ramas de la carótida se reúnen y forman una red arterial,

pero después de varios años llega a la conclusión de que esta estructura no existe en el hombre. Entonces ¿dónde se refina la sangre y se produce el espíritu animal en los seres humanos?. Wepfer abandonó la idea de que el espíritu animal se produce en la rete o en los ventrículos cerebrales, y en su lugar propuso que este refinamiento de la sangre se produce en la sustancia blanca del cerebro. Así daba solución al problema de dónde se produce el espíritu animal en los seres humanos.

Thomas Willis (1621-1675), médico británico (7, 30, 31). Estudió Medicina en Oxford, donde estaba William Harvey, quien le enseñó, de primera mano, los nuevos conocimientos sobre la circulación de la sangre.

Es una figura muy destacada en la historia de la Anatomía y de la Neurología. Fue uno de los fundadores de la Royal Society londinense. Describió el cerebro con mucho detalle en varias especies animales, incluida la especie humana, y lo hizo con una idea funcionalista (se le reconoce como el padre de la Anatomía Comparada). Fue uno de los primeros en atribuir a las estructuras cerebrales funciones cognitivas precisas. Su obra más renombrada es "Cerebri anatome" (1664) y en esta obra incluyó también la figura, ya clásica, del polígono arterial que lleva su nombre, a pesar de haber sido descrito antes por J Vesling y por J. J. Wepfer.

Fue partidario de las ideas de Vesalio y de Harvey, y parece ser que describió por primera vez la diabetes mellitus y quien empleó por primera vez la palabra "neurología".

Consideró que la rete está formada por arterias, venas y nervios. Tomando las ideas de J. Wepfer sobre la rete, en su obra "Cerebri anatome" señala que en el hombre y el caballo la carótida entra en el cráneo y llega directamente al cerebro (no hay rete), mientras que en otros animales la carótida se ramifica formando la rete. Esto le llevó a discusiones sobre el origen del espíritu animal y a decir que la ausencia de la rete era la base para considerar al hombre superior a los animales. Willis tuvo la brillante idea de adscribir a la rete la función de regular la presión de la sangre que llega al cerebro y también la de facilitar el drenaje venoso del cerebro.

A diferencia de J. Wepfer, T. Willis no negaba con rotundidad la presencia de la rete en el hombre y decía que podía estar en algunos sujetos de tipología especial o con algún tipo de anomalía, recalcando la idea de que la presencia de la rete significa una naturaleza imperfecta. Estimaba que el espíritu animal se formaba en la corteza cerebral. Como los seres humanos, los caballos tampoco tienen rete por lo que consideró a este animal como "noble", aunque su cerebro fuera menos desarrollado que el de los humanos

Willis muestra sus reservas sobre la presencia de la rete en los seres humanos con la siguiente frase: "If that be true as some affirm, that the wonderful Net is some times also found in a human Brain, I believe it is only in those sort of men who being of a slender wit or unmoved disposition, and destitute of all force and ardor of the mind, are little better than dull working beasts in fortitude and wisdom

Wepfer y Willis influirían notablemente en los autores que vinieron después. Pero estos autores cogían unas ideas y omitían otras. Muchos de ellos, incluso figuras destacadas de la Medicina, se resistían a aceptar que el hombre no tuviera rete; entre estos estaban el francés Raymond de Vieussens, el inglés Henry Ridley, el holandés Ysbrand van Diemberbroeck y el flamenco Philip Verheyen. No obstante, en general se estaba de acuerdo con la teoría especulativa de que la rete intervenía en la regulación del riego sanguíneo cerebral.

Raymond de Vieussens (1641-1716), médico francés (7, 32, 33). Sobre todo es recordado por su obra pionera en el campo de la cardiología. También hizo estudios anatómicos sobre el cerebro y la médula espinal.

Se cree que Vieussens fue el primer médico que dio una descripción exacta del ventrículo izquierdo, así como varios vasos sanguíneos del corazón. También fue el primero en realizar una descripción exhaustiva sobre la estenosis mitral. Describió la posición, estructura y cambios patológicos del corazón. Fue el primero en describir correctamente el curso de las arterias coronarias y el seno coronario, y avanzó la idea de que los vasos coronarios tienen comunicación con las cavidades cardíacas. Hizo el primer diagnóstico de aneurisma aórtico durante la vida del paciente. También contribuyó al conocimiento del sistema nervioso, del oído y de la acción fermentativa de la saliva.

Sobre la rete, rechazó la idea de Willis de que estuviera formada por arterias, venas y nervios. Vieussen consideraba que solo estaba formada por arterias y venas, se podía encontrar en animales y solo en muy raras ocasiones se podía encontrar en seres humanos. Aceptó, como Willis, que la rete regulaba el aporte de sangre al cerebro y que refinaba la sangre en los animales que la tenían.

Steven Blankaart (1650-1704), médico holandés (7, 34). Proclamó que la rete podía estar solo en algunas especies de animales, pero no en el hombre ni en el caballo como antes había afirmado T. Willis. Y consideró que una de las funciones de la rete era regular el flujo sanguíneo cerebral.

La incertidumbre sobre la rete continuó durante todo el siglo XVII, y su representación aun continuaba en los textos de Anatomía del siglo XVIII. El médico escocés James Keill (1673-1719) publicó su obra "The anatomy of the humane body" que se editó 16 veces hasta 1771 y en ella no se refería a si la rete estaba o no en los seres humanos, aunque decía que regulaba la velocidad de la sangre que llega al cerebro. Para el inglés James Drake la rete tenía la función en los animales que tenía la hipófisis en el hombre, y consideraba que la rete está ausente en el hombre (1707). En su obra "Anatomy of the brain", Humphrey Ridley (1653-1708) señala que la rete no está totalmente ausente en el hombre, pero es mucho más pequeña que en los animales; la llamó Seno Circular.

En este momento, el asunto de la presencia de la rete en los seres humanos todavía era contradictorio, pero iba perdiendo fuerza e interés. Por ello, sus representaciones

disminuyen notablemente. La mayoría de los anatomistas, aunque no todos, ya aceptaban que la rete estaba ausente en la cabeza de los seres humanos.

Lorenz Heister (1683-1758), anatomista alemán (7, 35). Fue un destacado médico y cirujano, y fue Profesor de Anatomía en la Universidad de Helmstedt (Alemania). Participó como médico en la Guerra de Sucesión Española (1701-1714).

En su obra "Compendium anatomicum" (1717) añadió más confusión al asunto de la rete. Confirma que la rete está presente en los seres humanos, aunque es poco evidente y de poca consideración, y "su función es desconocida" En posteriores ediciones de su obra, reafirma la presencia de la rete en el hombre y se molestó porque Frederik Ruysch no aceptara con firmeza su presencia a pesar de presentar un grabado con esta estructura.

Frederik Ruysch (1638 -1731), botánico y anatomista holandés (7, 36). Es recordado por sus avances en la preservación de las piezas anatómicas. En 1699 publicó su obra "Epístola anatómica problemática" y en la lámina duodécima muestra el cerebro de un joven de 10 años de edad, y lo representa visto desde la base como lo hacían der Spiegel y Vesling. La rete aparece a la izquierda y derecha del nervio óptico, pero Ruysch lo comenta con poca consideración, como si fuera un cuento de hadas. Esta representación, realizada por Jan Wandelaar para la obra "Epístola Anatómica", era diferente y menos prominente que las realizadas por Wepfer y por der Spiegel (Figura 13). Parecía que esta representación iba a ser la última en la que se mostraba la rete como parte de la anatomía humana, pero no sería así.



**Figura 13. Izquierda: dibujo de la rete hecho por Jan Wandelaar para la obra "Epístola Anatómica" de F. Ruysch (1721) (39).** Jan Wandelaar (1690-1759) fue un pintor y grabador holandés. Derecha: detalle de la parte izquierda; la letra T indica la rete mirabile.

La rete mirabile seguía apareciendo en algunas publicaciones anatómicas del siglo XVIII; por ejemplo, aparece en la obra "An essay on comparative anatomy" (1744) del anatomista escocés Alexander Monro el primero. En esta obra, el autor insistía en la presencia de la rete en el hombre. Su hijo, Alexander Monro el segundo, mantenía la opinión de su padre (7).

En la familia Monro hubo tres generaciones de anatomistas en la Universidad de Edimburgo (Escocia) representadas por los tres Alejandro: Alejandro Monro: el primero (1697-1767), el segundo (1733-1817) y el tercero (1773-1859). Esta dinastía ocupó la Cátedra de Anatomía en dicha Universidad durante 126 años y alcanzó tal fama que muchos de los doctores escoceses, e incluso de otros países, se iban a formar a la Escuela de Medicina escocesa.

Alexander Monro el segundo (1733-1817), anatomista escocés (7, 37). De los tres Monro, el más famoso es el Segundo, quien publicó "Observations on the structure and function of the nervous system" (1783). Destacó por sus estudios sobre el Sistema Nervioso, los ventrículos cerebrales, el líquido cefalorraquídeo y la hidrocefalia. Ha contribuido a dar su nombre a la Doctrina de Monro-Kelly sobre la regulación de la circulación cerebral durante la

hipertensión intracraneal. En el primer capítulo de esta obra trata de la circulación de la sangre en la cabeza y hace una breve descripción de la rete mirabile. Dice que es más fácil encontrarla en los animales que en el hombre y representa una rete del feto de una ternera; dice que tiene la función de regular el aporte de sangre al cerebro.

A finales del siglo XVIII, los Monro se encuentran prácticamente solos en su defensa de la presencia de la rete en los seres humanos.

Albrecht von Haller (1708-1777), fisiólogo suizo (7, 38). Fue el mayor fisiólogo del siglo y es considerado el padre de la Fisiología moderna. Fue Profesor de Anatomía, Cirugía y Botánica en Inglaterra. Fue un prolífico escritor contribuyendo con más de 13000 artículos, varios de ellos relacionados con el corazón y la circulación. Describió con precisión la estructura del corazón y señaló los cambios que se producen durante la sístole. Probó el automatismo cardiaco dando la base de la teoría miogénica de la actividad cardiaca, la cual no se formularía hasta el siglo siguiente. También describió la estructura del pericardio y la de las válvulas correctamente, y fue el primero en describir la calcificación del pericardio. Describió la pulsación del corazón en un embrión de pollo. Publicó su

gigantesco trabajo sobre fisiología “*Elementa Physiologiae Corporis Humani*” en 9 volúmenes entre 1759 y 1769. Sus estudios no se limitaron al campo cardiovascular, sino también a otras áreas. Su “*Bibliothecae*” incluía 52000 trabajos, dando idea de su capacidad de lectura.

También publicó el texto de Anatomía “*Iconum anatomicarum*” (1743-1756) donde ilustró y discutió mucho sobre la rete. Llegó a la conclusión de que no estaba en el cuerpo humano y consideró que era una estructura inútil para los seres humanos.

John Bell (1763-1820), cirujano y anatomista británico (7, 39). Estudió con Alexander Monro el segundo. Escribió un texto sobre Anatomía que publicó en 1797 y tituló “*Anatomy of the human body*”, estudiando con detalle el sistema nervioso central.

Destacó como médico e impartió clases privadas de Anatomía, especialmente dirigidas a cirujanos. Como asistían muchos alumnos, construyó una escuela donde enseñó Anatomía durante 13 años. Hizo con sus manos las láminas para su libro. Dejó escrito que “...dissection is the first and last business of the student...”. Después de esta actividad como docente, se dedicó a la práctica de la cirugía.

Sobre la rete mirabile, mantuvo la idea de Haller y escribió en 1797 que “no hay el menor vestigio de una rete mirabile en el cuerpo humano” y “que debido a su posición erecta, el hombre no necesita una estructura para regular la entrada de sangre en la cabeza”.

Samuel T. Soemmering (1733-1830), anatomista alemán de origen polaco (7, 40), estudió Medicina en la Universidad de Gotinga (Alemania) y llegó a ser Decano de su Facultad de Medicina. Describió la organización de los pares craneales y publicó varios temas sobre Anatomía, Neuroanatomía y otras ramas de la ciencia. También fue el primero en escribir sobre la estructura del esqueleto de las mujeres.

Estudió diversos sistemas del organismo, en particular los sistemas vascular y nervioso, y lo hizo de forma ordenada y meticulosa. El estudio del sistema vascular y del sistema nervioso lo hizo de forma separada, y consideró que el sistema vascular estaba para nutrir los tejidos y el sistema nervioso para transmitir la información sensorial. Consideró los nervios como fibras y no como tubos que transportaran “el jugo nervioso”: En consecuencia, consideró que la rete mirabile, que tendría la función de transferir una sustancia de un sistema a otro, no tenía sentido que existiera en los seres humanos.

Se llegó, por fin, a la idea de que la rete mirabile era exclusiva de algunas especies de animales y de que estaba ausente en los seres humanos. A finales del siglo XVIII, esta estructura vascular había desaparecido de la Anatomía Humana y ello se reflejaría ya en los textos de Anatomía de los diferentes autores. La presencia de una estructura tal que la rete, que transformaría el espíritu vital en espíritu animal, ya no tendría sentido en los seres humanos.

En resumen, asombra la duración que tuvo la creencia de que una rete mirabile carotídea estaba presente en los

seres humanos. Aunque esta creencia fue perdiendo fuerza a lo largo del siglo XVII, algunos autores de renombre la mantuvieron viva hasta finales del siglo XVIII.

En la medicina moderna el término rete mirabile aún se conserva para referirse a una anomalía vascular congénita de los vasos cerebrales. Se han descrito varios casos clínicos que a menudo debutan con un accidente cerebrovascular agudo y en estos pacientes la angiografía o la resonancia magnética demuestran la presencia de una malformación vascular unilateral o bilateral, nutridas por la arteria carótida externa. A esta malformación se le ha llamado, con frecuencia, rete mirabile. Varios especialistas, entre ellos angioradiólogos, no comparten la idea de llamar a esta malformación rete mirabile porque ello puede confundirse con la rete mirabile propiamente dicha, que existe en numerosas especies animales pero no en los seres humanos. Por ejemplo, en 1972 se describió un caso de malformación vascular cerebral en un paciente con ictus cerebral. En esta publicación, los autores describen la historia de “este fascinante y mitológico órgano” y recomiendan abandonar el uso de este término en la clínica humana, pues las malformaciones vasculares cerebrales vistas en los pacientes son muy diferentes a la rete mirabile (41).

No obstante, a pesar de la llamada hecha por diversos especialistas, todavía se puede ver en la literatura dar el nombre de rete mirabile a ciertas malformaciones cerebrovasculares, a pesar de que comparten muy poco, excepto el nombre, con la mítica estructura que le da nombre. Como muestra de que aún sigue apareciendo su nombre en la clínica, a continuación se mencionan dos citas publicadas recientemente (Line E, Linfante I, Dabus G. Unilateral rete mirabile as a result of segmental agenesis of the ascending petrous segment of the internal carotid artery: embryology, differential diagnosis and clinical implications. *Interv Neuroradiol*, 19 (1):73-7, 2013; Eric Homero Albuquerque Paschoal, Vitor Nagai Yamaki, Fernando Mendes Paschoal Júnior, Ronie Leo Piske, Manoel Jacobsen Teixeira, Edson Bor-Seng-Shu. Carotid rete mirabile associated with subarachnoid hemorrhage from intracranial aneurysm: A case report and systematic review, *Interv Neuroradiol* February: 21 (1) 55-60, 2015).

#### 4. LA RETE MIRABILE EN LOS SIGLOS XX Y XXI

En este periodo empiezan a aparecer datos más objetivos sobre las características morfológicas y sobre la posible función de este plexo vascular.

##### 4.1. Características morfológicas

###### 4.1.1. Anatomía

La rete mirabile carotídea, ausente en los seres humanos, está presente en una gran variedad de especies animales: cetáceos (delfines, ballenas), sirénidos (manatí, dugongo), artiodáctilos (hipopótamo, jirafa, ciervo, camello, llama, antílopes, cabra, oveja, vaca, cerdo), carnívoros (gato, hiena, perro, tigre, león) y primates primitivos (lémures, gálagos), por lo que en estas especies de animales, toda o gran parte de la sangre que llega a su cerebro pasa a través de la rete.

En la gran mayoría de los mamíferos que la tienen, la rete carotídea está dentro del cráneo, en la base del cerebro. En algunos como el gato y los lemúridos la rete es extracraneal, y en el cerdo hay una rete extracraneal que se continúa con otra más desarrollada situada dentro del cráneo.

Cuando es intracraneal, la rete está situada dentro de un lago venoso (seno cavernoso), suele tener dos partes simétricas, a ambos lados de la hipófisis, y es proximal al Círculo de Willis. En los cetáceos, la rete está embebida en tejido conectivo graso y no está rodeada de sangre (2, 4).

En 1906, J. Tandler describió en algunos ungulados que la rete se forma a partir de botones vasculares de la carótida interna, la cual después se atrofia. Posteriormente, la carótida externa pasa a ser la principal arteria nutricia de la rete y este plexo arterial se encierra dentro del seno cavernoso. La degeneración de la carótida interna en animales que tienen rete también fue descrita por otros investigadores en cetáceos, felinos y artiodáctilos (42-44).

Como el sistema vascular cerebral guarda relación filogenética, para entender cómo evoluciona este sistema en respuesta al medio ambiente es conveniente comparar anatómicamente, funcionalmente y el grado de desarrollo de este sistema y de la rete en las diferentes especies. El grado de desarrollo de la rete podría estar relacionado con su función, que podría ser diferente en cada especie (4).

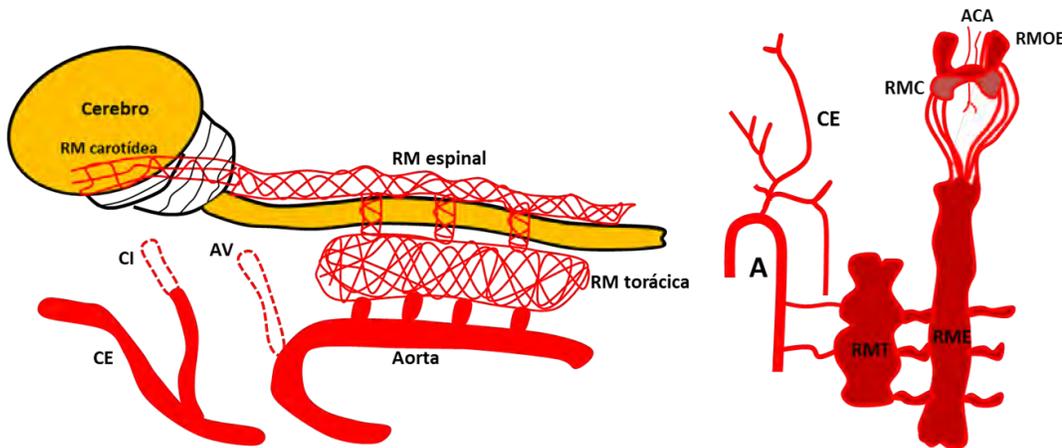
#### *Estudios en cetáceos*

En los cetáceos, el patrón de la circulación es similar al de otros mamíferos y el aporte sanguíneo al cerebro pasa a través de un sistema vascular tóraco-espinal. Estos animales acuáticos presentan una rete mirabile muy desarrollada, que incluye una parte intracraneal, otra torácica y otra espinal, que podría representar la adaptación de una vida terrestre anterior a la actual totalmente acuática. Esta rete arterial en la región torácica probablemente fue descrita por primera vez en marsopas por E. Tyson (1680) (45) y más tarde diseccionada con detalle en el narval por H. S. Wilson (1880) (46). Después vendrían otros estudios. En el narval y en el delfín beluga se ha observado que la rete se origina de las principales arterias cervicales, torácicas y lumbares. Después se extiende por el canal espinal y la cavidad craneal. La rete aparece embebida en una matriz grasa y rara vez se relaciona con sangre venosa. Entre estas dos especies, la rete muestra algunas diferencias: 1) en la cantidad de rete originada en las arterias intercostales, y 2) en el tamaño de la rete. Ambos aspectos son más grandes en el narval que en el delfín, al igual que ocurre con los valores del hematocrito y hemoglobina en el plasma sanguíneo, que

son más elevados en el narval. Esto sugiere que la rete está ligada a la capacidad de los cetáceos para hacer inmersiones acuáticas más profundas y más duraderas, para lo cual parece estar más dotado el narval que el delfín (47).

En un estudio realizado mediante angiografías en delfines anestesiados, disecciones anatómicas y obtención de castings, se muestra que las carótidas internas y arterias vertebrales están presentes en los embriones pero después se atrofian y el aporte sanguíneo al cerebro de los delfines se hace completamente a partir de una extensa rete tóraco-espinal e intracraneal. La rete torácica está situada retropleural en la pared posterior del tórax y se nutre de ramas procedentes de la aorta torácica. A través de los agujeros intervertebrales, ramas de la rete torácica penetran en el canal raquídeo para formar una extensa rete espinal, la cual avanza y penetra en el cráneo a través del foramen magnum. Este plexo intracraneal da ramas meníngeas y se forma la rete oftálmica interna. Del complejo vascular intracraneal emergen las arterias que nutren el cerebro, dando lugar a posibles arterias homólogas con la arteria cerebral media, cerebral anterior y cerebral posterior, pero no hay equivalencias con el Círculo de Willis (Figura 14). Las paredes de las arterias de la rete contienen gran cantidad de tejido colágeno. La rete tóraco-espinal parece tener un efecto amortiguador de la presión arterial y quizá actúe como reservorio de oxígeno para aportarlo al corazón y cerebro durante las prolongadas inmersiones acuáticas.

La rete mirabile, aunque no es exclusiva de los mamíferos acuáticos, ha alcanzado su mayor desarrollo en cetáceos (ballenas, delfines y marsopas) y está algo menos desarrollada en los sirenios. En los pinnípedos (mamíferos acuáticos carnívoros, con pies en forma de aletas) no hay rete y el cerebro está regado por las carótidas internas y arterias vertebrales como en la mayoría de los animales terrestres. Parece existir una clara filogenia en la evolución de los sistemas arteriales que riegan el cerebro; en los mamíferos primitivos la sangre llega al cerebro solo a través de las carótidas internas, y en los mamíferos más evolucionados, al sistema carotídeo interno se añaden las arterias vertebrales. En varias de las especies de mamíferos también se añade retina mirabilia en el aporte sanguíneo al cerebro, probablemente con una función diferente en cada especie. Debido a esta posibilidad es conveniente comparar anatómicamente, funcionalmente y el grado de desarrollo de la rete en las diferentes especies para entender cómo evolucionan los sistemas biológicos en respuesta al medio ambiente (4).



**Figura 14. . Izquierda: esquema general de la rete mirabile (RM) espinal y torácica de los cetáceos. CI=vestigio de la carótida interna; AV=vestigio del arteria vertebral; CE=carótida externa (Esta figura está modificada de la realizada por McFarland et al.) (4). Derecha: esquema de la rete mirabile torácica (RMT), espinal (RME) y carotídea (RMC) de los delfines. A=aorta; CE=carótida externa; ACA=arteria cerebral anterior; RMOE=rete mirabile oftálmica externa. (Esta figura está modificada de la realizada por McFarland et al.) (4).**

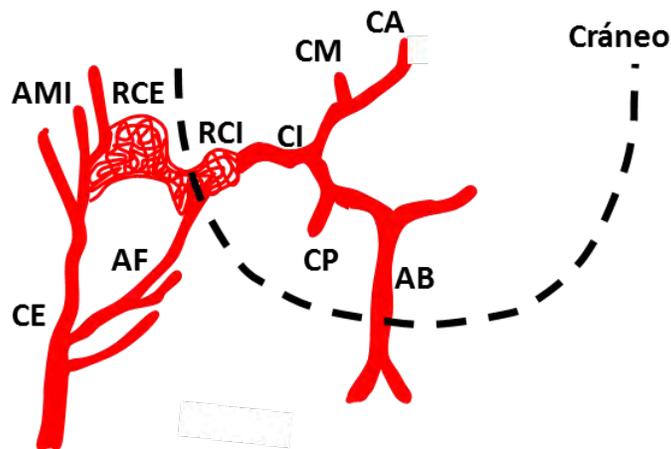
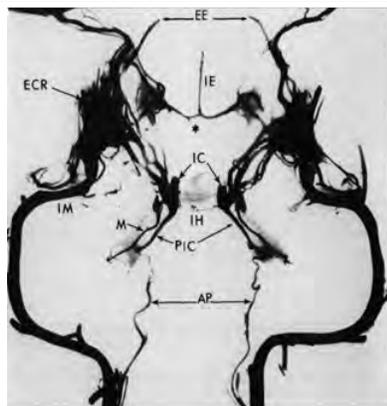
*Estudios en carnívoros*

El patrón del aporte sanguíneo al cerebro de los carnívoros es muy diverso. Hay carnívoros como el gato y la hiena que tienen una rete muy desarrollada, mientras que otros carnívoros no tienen rete aunque sí tienen abundantes anastomosis entre los sistemas carotídeos externo e interno.

**Gato:**

Diversos tipos de estudios muestran que en el gato, la rete tiene dos componentes: uno extracraneal que se continúa con otro intracraneal (Figuras 3 y 15). La parte

extracraneal recibe la sangre de la arteria maxilar interna, y de la cara medial de esta rete nacen ramos que pasan por la fisura orbitaria al interior del cráneo para formar la porción intracraneal que está dentro del seno cavernoso. Esta porción intracraneal se reúne para formar la carótida interna (la porción cervical de esta arteria es un vestigio). Esta arteria carótida interna, con la del otro lado, forma el equivalente al Círculo de Willis; no hay arteria comunicante anterior (3, 48).



**Figura 15. Izquierda: Radiografía del aporte sanguíneo cerebral del gato (48). Derecha: representación esquemática del aporte sanguíneo cerebral del gato.**

ECR= rete carotídea extracraneal.; ICR=rete carotídea intracraneal; AP=arteria faríngea ascendente; EC=carótida externa; IC=carótida interna; IM= arteria maxilar interna; PIC= carótida interna primitiva.

**León:**

La rete del león es muy parecida a la del gato. En el león, es extracraneal y se nutre a partir de la arteria maxilar interna. De esta rete salen ramas que penetran en el cráneo a través de la fisura orbitaria donde se reúnen para formar la carótida interna, totalmente intracraneal. La carótida

interna extracraneal es un vestigio. De esta rete también salen ocho arterias eferentes y es la principal fuente de sangre que llega al cerebro (49, 50) (Figura 3)

**Perro:**

En el perro doméstico, la parte proximal de la carótida interna es pequeña. Como en el gato, la principal fuente de

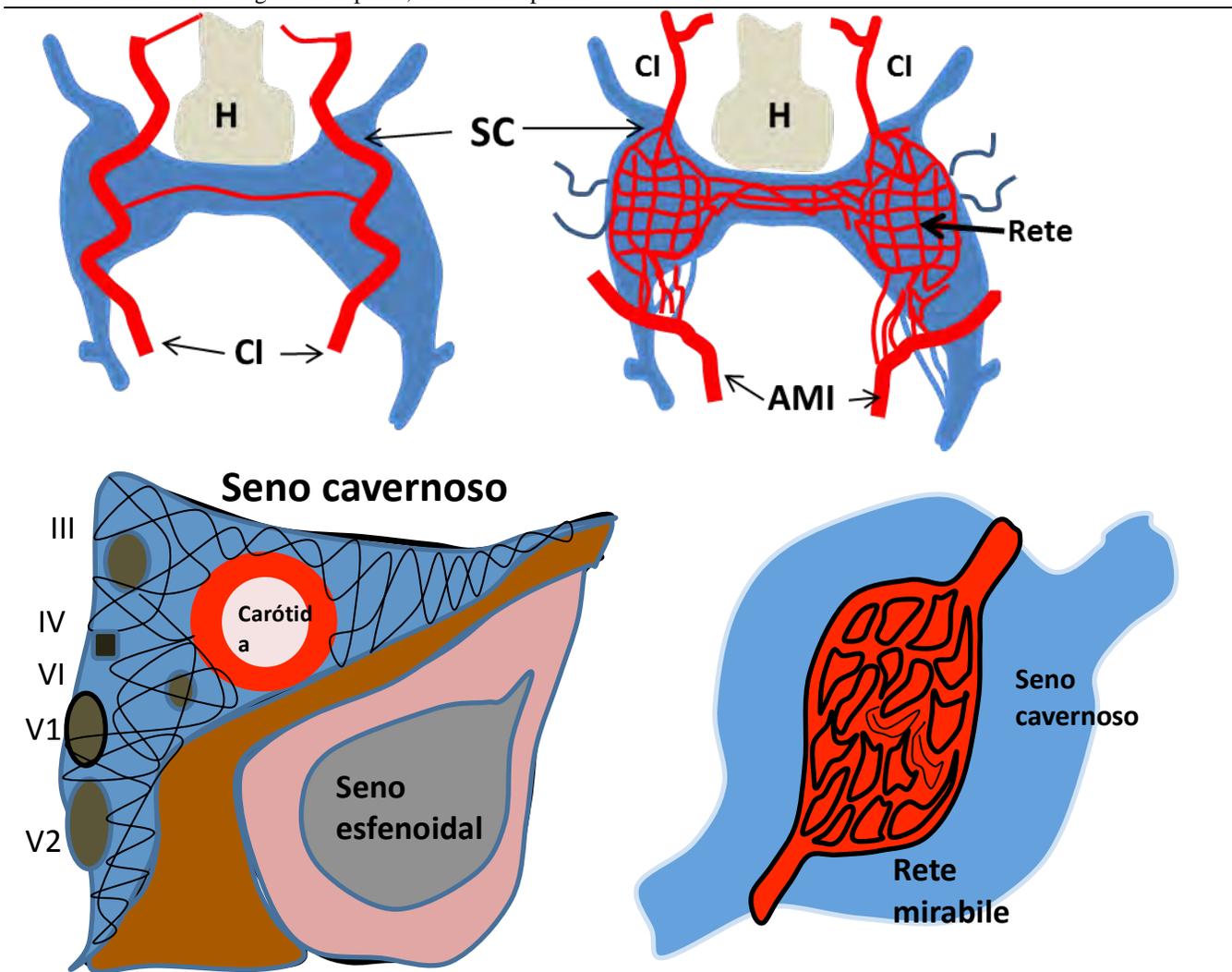
sangre al cerebro se hace a través de la arteria maxilar interna, de la cual se forma la rete, que es intracraneal (está situada dentro del seno cavernoso). De la rete emerge la carótida interna que es intracraneal. A diferencia del gato, en el perro no hay rete extracraneal y su equivalente con respecto al gato es el ramus anastomotico (2, 3, 51) (Figura 3).

*Estudios en artiodáctilos*

Los artiodáctilos representan las especies mas numerosas de los ungulados, mas de 220 de las 237 especies de ungulados que existen. En los artiodáctilos es donde más estudios de la rete se han realizado (3, 52-54).

En un estudio llevado a cabo en 257 cabezas de animales de 50 especies del orden de los artiodáctilos, los autores llegan a la conclusión de que las arterias que nutren la rete varían según la especie, e incluso puede

variar dentro de una misma especie, en lo que se refiere a las arterias aferentes, así como al lugar de origen, número y diámetro de estas arterias. De todas las arterias del cuello, la que es más constante en contribuir a la formación de la rete en las distintas especies es la arteria carótida externa (52). En un gran número de estas especies, la rete se forma habitualmente a partir de una o más ramas que salen de la arteria carótida externa, y después se ramifican para formar este plexo. Después, se vuelven a reunir para formar una arteria única (arteria carótida interna, totalmente intracraneal), que con la carótida interna del otro lado forman el Círculo de Willis. En muchas especies de artiodáctilos, la rete ocupa el sitio del sifón carotídeo y ambas estructuras están dentro del seno cavernoso (Figura 19).



**Figura 16** Izquierda: esquema del seno cavernoso con el segmento intracavernoso de la carótida interna en los seres humanos. Derecha: esquema del seno cavernoso con la rete mirabile en su interior en los artiodáctilos.

H=hipofisis; CI=arteria carótida interna; AMI=arteria maxilar interna; SC=seno cavernoso.

Estudios anatómicos realizados en el cerdo, buey y oveja muestran que en estos artiodáctilos no hay carótida interna extracraneal y tienen una rete carotídea intracraneal

que se forma a partir de ramas de la arteria maxilar interna, a su vez rama de la carótida externa. De esta rete surge una carótida interna que es totalmente intracraneal, que junto

con la del lado opuesto forma el Círculo de Willis. En las tres especies, la arteria basilar tiene muy pocas conexiones con las arterias vertebrales y la arteria basilar tiene una dirección caudal. La rete está dentro del seno cavernoso. El caballo no tiene rete carotídea (52).

Utilizando la inyección de contraste radiopaco o de látex de neopreno, en el gato, oveja, cabra, buey y cerdo se encontró una rete bien desarrollada, en el perro era rudimentaria y no existía en la rata ni en el conejo. En la oveja, cabra, buey y cerdo es intracraneal y está situada dentro del seno cavernoso. En el gato hay una rete extracraneal y otra intracraneal, dentro de un lago venoso. La rete está formada por una compacta red de arterias de corta longitud que se anastomosan libremente entre sí. Cuando es intracraneal, la rete de un lado se comunica con la del otro lado mediante arterias muy finas. En la cabra, oveja y cerdo no había carótida interna proximal a la rete, pero sí había una carótida interna distal que comunica la rete con el Círculo de Willis.

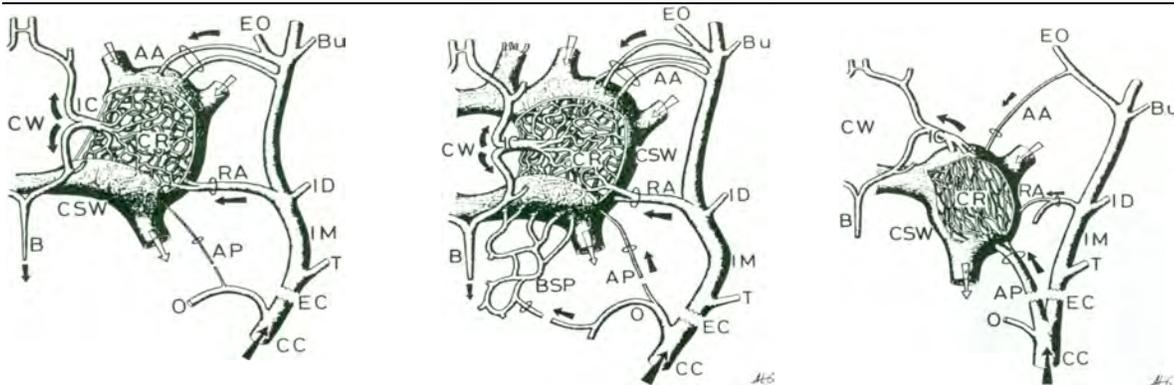
Los principales vasos que nutren la rete son la arteria maxilar interna (habitualmente a través del ramus anastomótico y la arteria anastomótica), la arteria faríngea ascendente y la arteria occipital. En el gato, oveja, cabra y buey la principal es la arteria maxilar interna, pero en el cerdo es la faríngea ascendente. En el buey también hay una notable contribución de la arteria occipital. Se sugiere que el ramus anastomótico y la arteria anastomótica son homólogas a la arteria meníngea recurrente y a la arteria meníngea media del conejo y de los seres humanos. El Círculo de Willis parece derivar de una o más de cinco fuentes: la carótida interna, carótida externa, arteria faríngea ascendente, arteria vertebral a través de la arteria basilar, y la arteria occipital (52, 53)

Oveja y buey:

Mediante preparados obtenidos con látex de neopreno se estudió la anatomía de la irrigación arterial del cerebro de ovejas y bueyes. En estas dos especies la sangre destinada al Círculo de Willis pasa por una rete carotídea intracraneal bien desarrollada. En la oveja, la principal fuente de suministro de sangre a la rete es la arteria carótida externa, y lo hace a través de ramas de la arteria maxilar interna. Tanto en la oveja como en el buey, la arteria carótida interna está poco desarrollada y emerge como una arteria eferente de la rete, que se divide para formar, con la del otro lado, el Círculo de Willis. En el buey, la sangre que llega a la rete lo hace a partir de la carótida externa, a través de ramas de la arteria maxilar interna, y a partir de las arterias vertebrales, a través del plexo arterial basi-occipital. La arteria basilar, tanto en ovejas y bueyes, tiene sólo tenues conexiones con la arteria vertebral, se estrecha en sentido caudal y se continúa como la arteria espinal ventral. Es decir, que la arteria basilar puede ser considerada como una rama en dirección caudal del Círculo de Willis en estas dos especies de animales (55).

Cabra, vaca y cerdo:

La cabra, vaca y cerdo pertenecen al orden de los Artiodáctilos y tienen una rete carotídea de estructura similar y situada dentro del seno cavernoso. La arteria maxilar interna es la principal arteria que nutre la rete en las tres especies, pero en el cerdo también interviene de forma notable la arteria faríngea ascendente (3, 55-57). La Figura 17 muestra un esquema de la rete en estas tres especies.



**Figura 17. Representación esquemática del aporte sanguíneo de la rete mirabile carotídea de cabra (Izquierda), vaca (Centro) y cerdo (Derecha) (3, 57).**

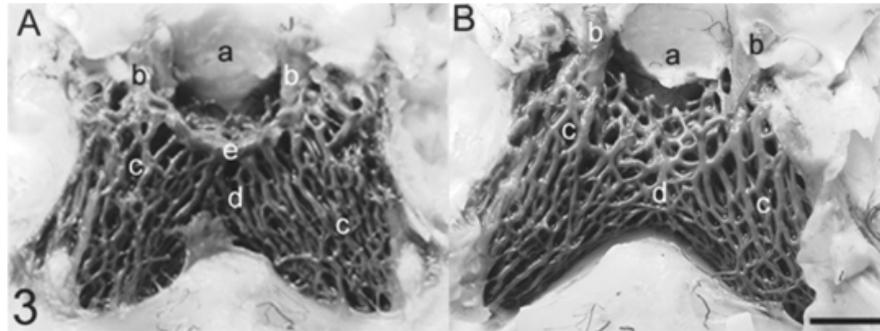
CR = rete mirabile carotídea; CW = círculo de Willis; AA = arteria anastomótica; RA = ramo anastomótico; IC = arteria carótida interna; EC = carótida externa; IM = arteria maxilar interna; PA = arteria faríngea ascendente; B = arteria basilar; V = arteria vertebral.

Jabalí:

Estudios realizados en 32 cabezas de jabalíes salvajes muestran que la carótida común se divide en carótida externa y carótida interna. Esta última emite las arterias occipital y condilar, y después se ramifica para dar lugar a la rete mirabile rostral epidural. La carótida externa se continúa como arteria maxilar interna, de la que emerge la

arteria meníngea media y la arteria oftálmica externa; esta contribuye a la formación de la rete mirabile rostral epidural. La rete mirabile rostral izquierda y derecha se anastomosan entre sí y forman una red en forma de H, de la cual nacen las arterias cerebrales. La rete mirabile epidural caudal se forma principalmente a partir de la arteria occipital, arteria condilar y arteria vertebral; de esta

rete nace la arteria basilar (56) (Figura 18).

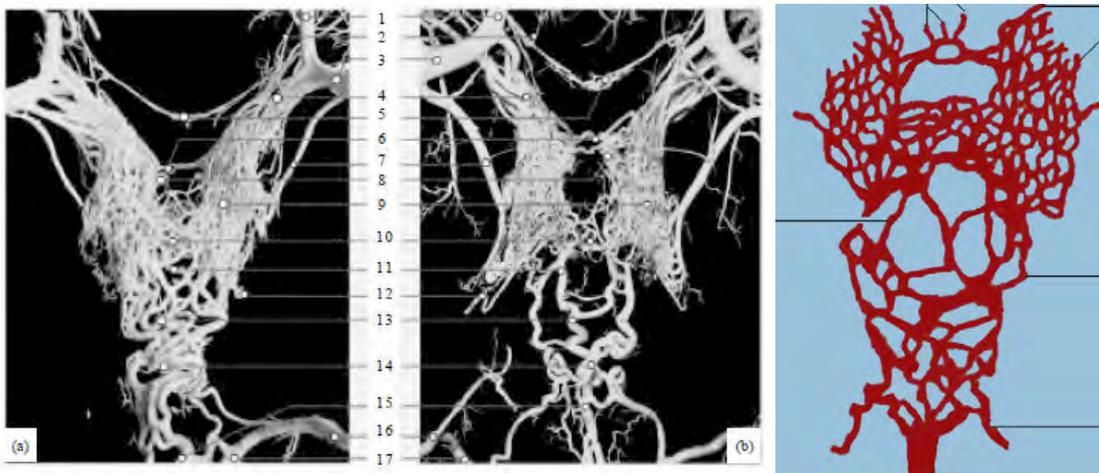


**Figura 18. Detalle de la rete mirabile epidural rostral del jabalí, después de separar la duramadre (56).**

Yak y vaca:

Para estudiar y comparar la rete del yak y la de la vaca, se utilizó la técnica de corrosión en 12 cabezas de yak y 10 cabezas de vaca. El aspecto y la forma exterior de las dos

retes era similar en ambas especies, aunque era algo más grande especialmente hacia la base occipital en el yak que en la vaca. La contribución de la arteria maxilar interna también era similar (58, 59) (Figura 19).



**Figura 19. Reproducción de la rete mirabile del yak (a) y de la vaca (b) utilizando técnicas de corrosión tras la inyección de un polímero acrílico (58). A la derecha, un esquema de la rete del yak (59).**

(3)=arteria maxilar interna; (8)=arteria carótida cerebral; (12)=arteria carótida interna; (15)=arteria vertebral; (16)=arteria occipital.

En terneras se ha descrito la presencia de una rete epidural formada por dos partes, una parte principal situada dentro de un seno circular y formada por dos lóbulos, y otra parte en forma de V situada en el foramen óptico. La rete recibe el aporte sanguíneo de la arteria maxilar interna, del plexo arterial occipital y de la carótida interna (esta está poco desarrollada). De la rete salen la carótida cerebral (interna) y la oftálmica interna. El seno circular recibe sangre venosa de la región facial, cornetes, órbitas y fosas nasales. La sangre de este seno drena en el plexo venoso basilar y a través de cuatro venas emisarias. Las arterias de la parte principal de la rete son de tipo muscular (60).

Jirafa:

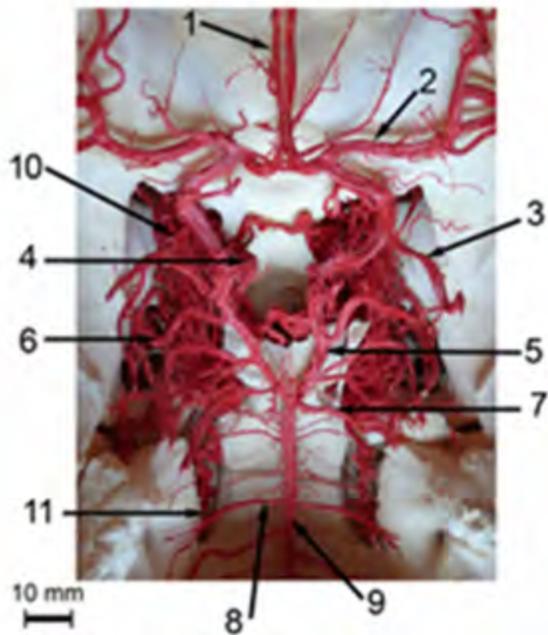
El estudio se realizó en 12 cabezas de jirafa a las que se les inyectó látex y supercloruro de vinilo disuelto en acetona. Como en otros rumiantes, el segmento extracraneal de la carótida interna está obliterado. Tienen una rete mirabile intracraneal que se nutre de la arteria maxilar interna, y de la rete emerge el segmento

intracraneal de la carótida interna. Esta arteria, con la del otro lado, forma el círculo de Willis, del cual salen las arterias que riegan el cerebro. La arteria basilar es delgada y tal vez no contribuya al aporte sanguíneo al cerebro (61).

Recientemente se ha realizado otro estudio en jirafas, donde se describe los patrones de las arterias craneales, desde que nacen hasta que alcanzan la senescencia. En este estudio se muestran imágenes muy demostrativas y elegantes (62).

Antílopes:

En tres subespecies de antílopes se observó que el círculo arterial de la base del cerebro se forma a partir de la carótida interna intracraneal de ambos lados, la cual emerge de la rete mirabile que es totalmente intracraneal. El segmento extracraneal de la carótida interna está obliterado y la rete se nutre principalmente de la arteria maxilar interna (63) (Figura 20).



**Figura 20. Vista del círculo arterial de la base del cerebro del eland común de la sabana (63).**

1=Rostral cerebral artery, 2=arteria cerebral media; 4=arteria carótida interna; 6=arteria cerebral caudal; 7=arteria cerebral rostral; 9=arteria basilar; 10=rete mirabile epidural rostral; 11=rama de la asrteria condilar.

En el mismo laboratorio del estudio anterior y utilizando el mismo procedimiento (63), se examinaron 106 cabezas y arterias cerebrales de 8 especies de cérvidos. En todos ellos se encontró una rama de la arteria condílea que se dirige a la rete mirabile epidural rostral, como también ocurre en la jirafa. Asimismo, se sugiere que el patrón vascular del encéfalo es universal en los cérvidos y

difiere del de los rumiantes por tener una conexión entre la rete mirabile y la arteria condílea (63, 64).

#### 4.1.2. Histología

De un estudio histológico realizado en la rete de dos toros y cuatro ovejas, y publicado en 2007, se concluye, entre otras cosas, lo siguiente (64):

La limitación de la capacidad para dilatarse que impone el seno cavernoso

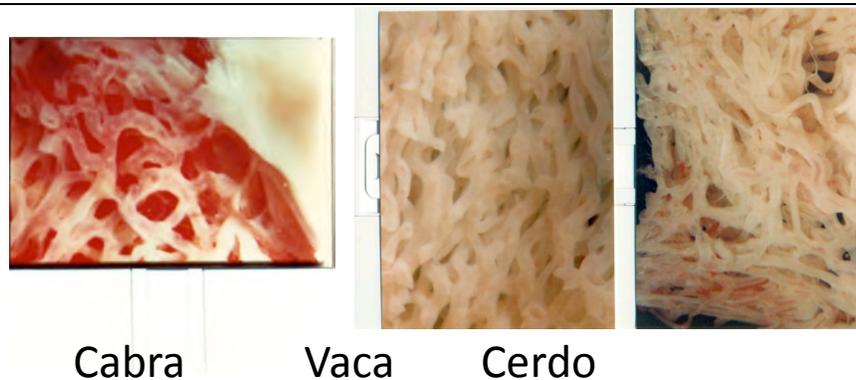
a la rete mirabile, induce el polimorfismo de esta estructura como plexo.

b) La rete está cubierta por fibras nerviosas que se originan principalmente en el sistema simpático por encima del esfenoides, así como en los pares craneales 3º, 4º y 6º. Histológicamente, estas fibras nerviosas están separadas de la pared vascular por tabiques de tejido conjuntivo.

c) La capa media de las arterias está formada por capas concéntricas de células de músculo liso; son abundantes las fibras elásticas.

d) Las arterias de la rete están tapizadas, en su luz, por endotelio arterial y, en su superficie externa, por endotelio del seno venoso.

En la cabra, vaca y cerdo, las arterias que componen la rete de estas tres especies son de corta longitud, tamaño medio y de pared relativamente gruesa; en fresco tienen un diámetro externo de 50-600 µm. Los estudios histológicos muestran que las arterias son musculosas y tienen una capa media muscular y una capa externa de tejido conectivo (adventicia) bien desarrolladas. La luz interna está tapizada por una capa de endotelio de tipo arterial y la cara externa está tapizada a su vez por un endotelio de tipo venoso (Figuras 21-23) (3, 65, 66).



**Figura 21. Fotografías de fragmentos de la rete carotídea de cabra, vaca y cerdo, sumergidos en suero salino fisiológico.**

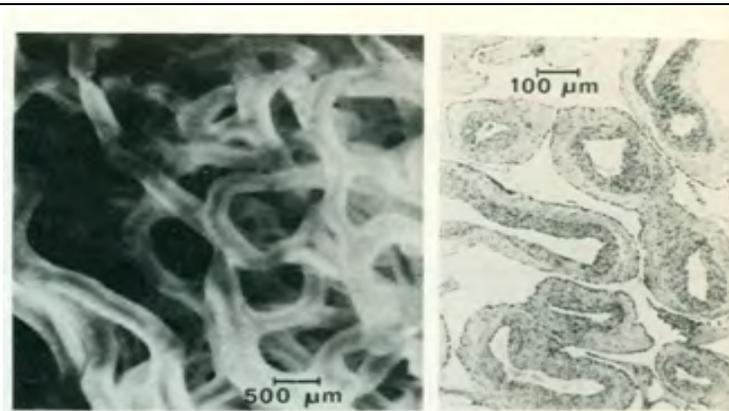


Figura 22. Izquierda: fotografía de un fragmento de rete de cabra sumergida en suero salino fisiológico. Derecha: corte histológico de arterias de rete de cabra (71).

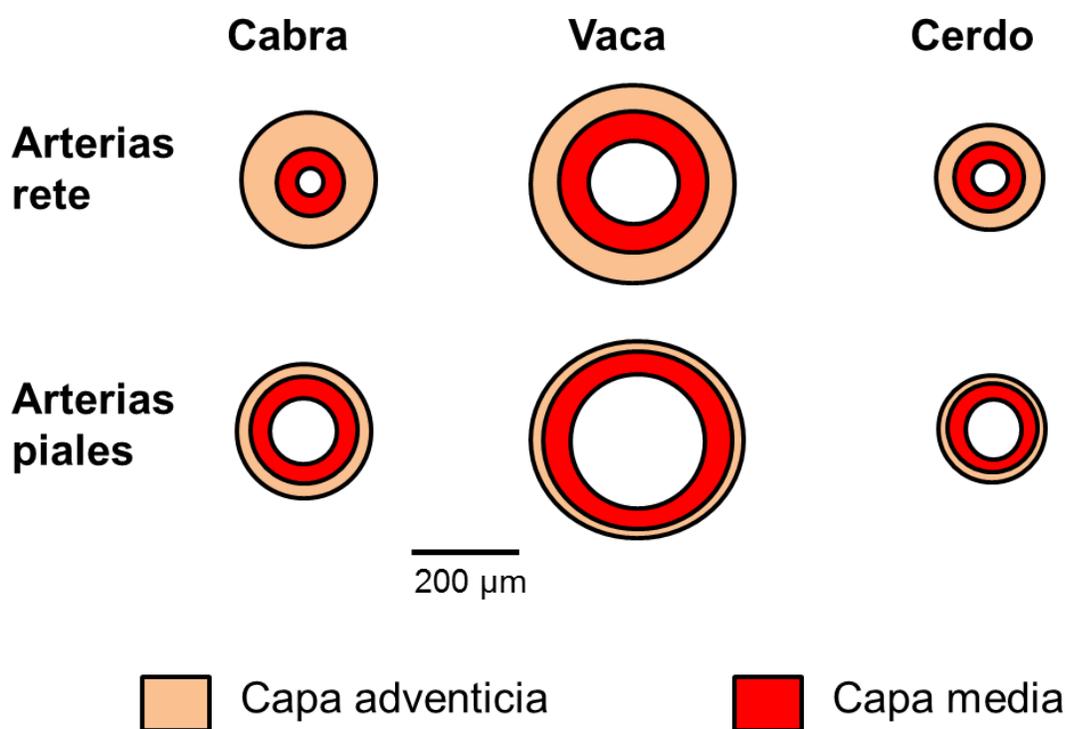


Figura 23. Representación esquemática y comparativa de cortes transversales de arterias de rete y arterias piales de cabra, vaca y cerdo, mostrando el grosor de la capa media (muscular) y de la capa adventicia (tejido conectivo). Este esquema resume los hallazgos histológicos de la Referencia 3.

#### 4.1.3. Inervación

Los estudios sobre la inervación de las arterias de rete son escasos.

Mediante técnicas de histofluorescencia se ha demostrado que la rete mirabile, en las especies en las que se ha examinado, tiene pobre inervación simpática, lo cual contrasta con la notable inervación simpática observada en las arterias cerebrales de las mismas especies. De todas las especies estudiadas, solo en el gato la rete parece tener una considerable inervación simpática. En la rete extracraneal del gato se ha observado que sus arterias contienen abundantes fibras situadas entre la adventicia y la media.

Estas fibras nerviosas son ricas en acetilcolinesterasa, noradrenalina, polipéptido pancreático, péptido intestinal vasoactivo y sustancia P (67).

En 1991 se observó que la rete de la jirafa tiene muy poca inervación simpática, lo cual contrasta con la marcada inervación que tienen las arterias cerebrales de esta misma especie. Estos estudios morfológicos sugieren que la rete no debe tener un papel activo en la respuesta vasoconstrictora durante los cambios posturales de la cabeza (68).

En el narval *Monodon monoceros*, utilizando procedimientos de histofluorescencia y microscopía

electrónica, se observó que las arterias de la rete están pobremente inervadas con fibras adrenérgicas; solo la parte caudal de la rete espinal tienen abundante inervación adrenérgica. Esto sugiere que la rete mirabile de los cetáceos probablemente no está bajo control nervioso simpático (47).

En las arterias de rete de cabra, cuando se mide el contenido de noradrenalina como indicador indirecto de la densidad de inervación simpática, se ha encontrado que este contenido en las arterias de rete es aproximadamente solo el 13% del contenido en las arterias cerebrales de esta misma especie animal (3, 65).

La microscopía electrónica demostró la presencia de fibras adrenérgicas en arterias cerebrales y en arterias de rete de cabra, pero la densidad de inervación fue mucho menor en las arterias de rete que en las arterias cerebrales.

En resumen, los datos disponibles en la literatura permiten decir que en todos los mamíferos en los que se ha estudiado la rete carotídea, esta estructura presenta las siguientes características comunes:

Está formada por un plexo de arterias cortas anastomosadas libremente entre sí.

Aunque sus vías aferentes varían según las especies de animales, está situada entre las principales arterias que riegan el cerebro, proximal al Círculo de Willis.

Es intra y/o extracraneal y está dentro de un lago venoso, excepto en los cetáceos, que está rodeada de grasa.

Las arterias son de tamaño medio y su pared tiene una capa de músculo liso bien desarrollada, son pobres en tejido elástico y tienen, en general, pobre inervación simpática (de los conocidos, solo en el gato la rete tiene una considerable inervación simpática adrenérgica).

#### 4.2. Función de la rete mirabile

Aunque no existe rete en los seres humanos, la función de la rete mirabile carotídea sigue siendo una cuestión intrigante. Dada su especial situación anatómica, su relación anatómica con la circulación cerebral y su presencia en un gran número de especies de animales, no es sorprendente que durante muchos años se haya tenido interés por conocer su función, la cual no es bien conocida aun. La mayoría de las hipótesis propuestas para explicar su función se basan en especulaciones y realmente son muy pocos los estudios que se han realizado con este fin.

A lo largo del tiempo se le han atribuido principalmente las siguientes funciones:

A) Siglo II: C. Galeno dice que la rete es donde se transforma el espíritu vital en espíritu animal (psíquico). Este aspecto se ha comentado anteriormente.

B) Siglos XVII-XVIII: se le atribuye la función de regular la presión y el flujo de sangre que llega al cerebro

C) Siglo XX: se le atribuye la función de actuar como intercambiador de temperatura, así como una función hemodinámica.

Galeno estudió la rete con verdadero entusiasmo y le asignó una función importantísima, pues creía que en la rete se refinaba la sangre y el espíritu vital se transformaba

en espíritu animal, el cual se transportaba desde el cerebro por los nervios, supuestamente huecos, a todos los músculos del cuerpo. Este espíritu animal causaba la distensión muscular y su ausencia causaba la contracción muscular. Este espíritu animal también servía para que el cerebro pudiera producir el razonamiento. Probablemente esta supuesta función contribuyó a que la idea de una rete en los seres humanos perdurara tanto tiempo porque de no haber rete en el hombre ¿dónde se realizaría esa función tan importante?. Con el tiempo, no solo desapareció la rete de la anatomía humana sino también desapareció la necesidad de una función de tal naturaleza.

En su estudio publicado en 1935, E. Ask-Upmak (2) llama la atención sobre la presencia de una rete en tan amplia variedad y número de especies de animales y también hace referencia a las posibles funciones de este plexo arterial.

Ask-Upmark comenta lo siguiente:

A) La rete, al estar presente en especies tan diferentes entre sí, llevaría a cabo funciones muy similares en todas las especies. No obstante, esta hipótesis no es fácil de aceptar porque entre estas especies las hay que tienen marcadas diferencias entre sí, tal como ocurre entre el delfín, el leopardo y el armadillo.

B) Basado en el aspecto morfológico, sugirió la existencia de una relación genética entre las especies que poseen rete. Es decir, que estas especies tendrían tendencia a desarrollar una rete y que estas especies tendrían tendencia a desarrollar un sistema cerebrovascular similar.

Estas dos hipótesis en principio se pueden descartar porque no hay datos que permitan apoyarlas. Los estudios sobre la morfología y desarrollo del sistema cerebrovascular en las diferentes especies son más bien escasos.

C) Dada su relación anatómica con las arterias que llevan la sangre al cerebro y su cercanía anatómica con este órgano y con la hipófisis, parece razonable que se haya propuesto la hipótesis de que este plexo arterial podría tener tres funciones principales:

- 1) Modificar la composición de la sangre.
- 2) Influir en la circulación de la sangre a través de reflejos.
- 3) Regular el aporte de sangre al cerebro.

Aparte de la proposición hecha por Ask-Upmark, recogiendo lo descrito en la literatura, al menos tres funciones pueden atribuirse hipotéticamente a la rete:

a) Regular el flujo y presión de la sangre que llega al cerebro. La rete está mejor desarrollada en animales que tienen un cuello relativamente largo y cuando mueven la cabeza, hacia arriba y hacia abajo, pueden variar su altura notablemente; en este caso la rete amortiguaría los cambios hidrodinámicos y, por tanto, la llegada de sangre al cerebro al desplazar la cabeza (30, 31). Esta función amortiguadora de la presión arterial parece que podría ocurrir también en los cetáceos, que obviamente no tienen el cuello largo (69). Esta hipótesis que propone que la rete tendría una función hemodinámica está apoyada por

observaciones experimentales en animales terrestres (artiodáctilos) (70, 71).

b) Transferir sustancias de la sangre venosa que viene de la mucosa nasal a la sangre arterial de la rete (72). En artiodáctilos primitivos que dependen en gran parte de la información olfatoria, la transferencia de sustancias de la sangre venosa que procede la mucosa nasal hacia la sangre de la rete para llegar después al cerebro sería de importancia para el comportamiento de estos animales.

c) Los animales que tienen rete (p.e., los artiodáctilos) tendrían ventaja frente a los animales que no la tienen (p.e., los perosidáctilos) porque la rete, al participar en la regulación térmica del cerebro estarían en mejores condiciones de resistir las situaciones en que aumente la temperatura corporal por diferentes motivos (73, 74).

En las marsopas, como en otros cetáceos, la rete torácica y espinal está rodeada de grasa. El nitrógeno es unas 6 veces más soluble en grasa que en el agua. Los autores del estudio realizado en esta especie animal sugieren que el nitrógeno en sangre pasa a la grasa por difusión cuando la sangre pasa por la rete. Esto evitaría que se formen burbujas de nitrógeno y pasen al cerebro cuando los animales ascienden a la superficie desde las profundidades del agua (75).

Como ya se ha comentado anteriormente, el narval y el delfín beluga son dos especies que tienen rete, pero entre estas dos especies existen dos diferencias principales relacionadas con este plexo vascular: tanto la cantidad de rete originada en las arterias intercostales como el tamaño de la rete torácica son más grandes en el narval que en el delfín. Curiosamente ocurre algo parecido con los valores del hematocrito y hemoglobina, que también son más elevados en el narval. Estas diferencias sugieren que el narval estaría dotado de una mayor capacidad para hacer inmersiones acuáticas más profundas y más duraderas que el delfín (47).

Funciones más aceptadas actualmente:

#### 4.2.1. Intercambiador de calor

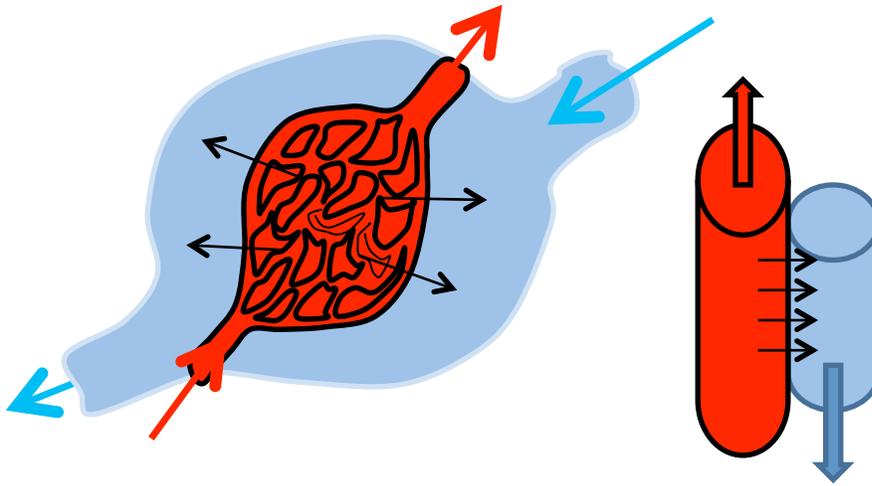
La temperatura corporal es un elemento esencial para el mantenimiento del medio interno de las células de los diferentes tejidos, por lo que la regulación térmica del organismo es una función crucial. Asimismo, se acepta la presencia de mecanismos que enfrían selectivamente el

cerebro de los animales (74, 75) así como el enfriamiento selectivo del cerebro humano durante la hipertermia (76)

En 1966, C. R. Taylor descubrió que cuando las cabras presentan hipertermia, la temperatura del cerebro aumenta menos que la temperatura del resto del cuerpo; a esto se le llamó “enfriamiento selectivo del cerebro” y esta peculiaridad se identificó también en muchos otros miembros de los artiodáctilos. De forma intuitiva se pensó que este fenómeno protegería al cerebro del daño térmico (87). Sin embargo, esto choca con la organización general de los mecanismos termorreguladores de los mamíferos (78).

En la década de los 1970, M. A. Baker realizó una serie de estudios encaminados a dilucidar si la rete actúa o no como intercambiador de temperatura para enfriar la sangre arterial que llega al cerebro. De sus estudios, la autora sugirió que la rete actúa como un intercambiador de temperatura entre la sangre arterial que entra y circula por su interior y la sangre venosa que sale y la baña, evitando así el calentamiento del cerebro en los días calurosos y particularmente en situaciones en que aumenta la temperatura corporal (p.e., durante una carrera). A modo de ejemplo, se ha dicho que la presencia de rete en el perro le permite alcanzar a la liebre que no tiene rete; al primero no se le calienta el cerebro y puede seguir corriendo mientras que a la segunda si se le calienta el cerebro y tiene que detenerse; el cerebro es muy sensible al calentamiento. Esta función de la rete también explica, probablemente, la tolerancia del cerebro a las altas temperaturas ambientales en carnívoros y ungulados que tienen rete. (74, 77-79).

En la Figura 24, mostrada a continuación, se trata de indicar, esquemáticamente, que la rete y el seno cavernoso actúan como un intercambiador de temperatura al circular la sangre en sentido opuesto (contracorriente); así, se transfiere calor de la sangre arterial de la rete que va a entrar al cerebro, y está más caliente, a la sangre venosa del seno cavernoso, el cual recoge sangre fría que procede de las vías respiratorias altas. Este enfriamiento de la sangre de las vías respiratorias altas se produce bien porque el aire que entra por las fosas nasales está frío o bien porque ese aire se enfría durante el jadeo.



**Figura 24.** Esquemas mostrando el sistema vascular contracorriente entre la sangre arterial y la sangre venosa, que permite la transferencia térmica de la sangre arterial a la venosa. En la izquierda se muestra lo que ocurriría entre la sangre de la rete que pasa al cerebro y la sangre del seno cavernoso que sale del cráneo.

En una de sus publicaciones, G. Mitchell y A. Lust (73) comentan el interesante hecho de la evolución que han seguido dos especies de animales tales como los Artiodáctilos y los Perisodáctilos. Parece ser que desde el Eoceno se ha incrementado la diversidad de los Artiodáctilos, mientras que la de los Perisodáctilos ha disminuido. Se han dado dos razones principales para explicar esta diferente evolución: la especialización del tubo digestivo y la mejor adaptación a la locomoción. En los Artiodáctilos, la capacidad del tubo digestivo para la rumia ha facilitado la fermentación de los alimentos y ha actuado como reservorio de agua y de energía en ambientes calurosos, permitiéndoles pastar a largas distancias de las reservas de agua; esta especialización del tubo digestivo no ha ocurrido en los Perisodáctilos, por lo que estos animales no deben alejarse mucho de las fuentes de agua. Desde el Eoceno y Mioceno, el número de especies dentro de los Artiodáctilos ha crecido y el de los Perisodáctilos ha disminuido. Esta diferencia en la evolución del número de especies entre los Artiodáctilos y los Perisodáctilos también se ha atribuido a otros factores, como por ejemplo la interacción competitiva entre ambas especies, y a la adaptación y supervivencia a los cambios y adversidades térmicas (73). En esta capacidad de adaptación a la temperatura ambiental parece intervenir la presencia de la rete.

Como se ha indicado en varias ocasiones en este texto, los Artiodáctilos tienen rete carotídea y los Perisodáctilos no la tienen. G. Mitchell y A. Lust (73) sugieren que la presencia de una rete carotídea en los Artiodáctilos también ha desempeñado un relevante papel en la diferente evolución de ambas especies de animales. A los Artiodáctilos, la rete les conferiría la capacidad para regular la temperatura del cerebro de forma independiente de la del resto del cuerpo. En los Perisodáctilos, que no tienen rete, la temperatura del cerebro y la del resto del cuerpo cambian de forma paralela y la termorregulación requiere abundante alimentación y agua para calentar o

enfriar el cuerpo. En consecuencia, los Perisodáctilos ocupan hábitats de pocos cambios estacionales y con abundante disposición de alimentos y de agua, tal como los bosques tropicales. Por el contrario, la flexibilidad adaptativa térmica de los Artiodáctilos, que sí tienen rete, les permitiría la invasión de nuevas zonas que van desde el Círculo Ártico a las sabanas tropicales (73).

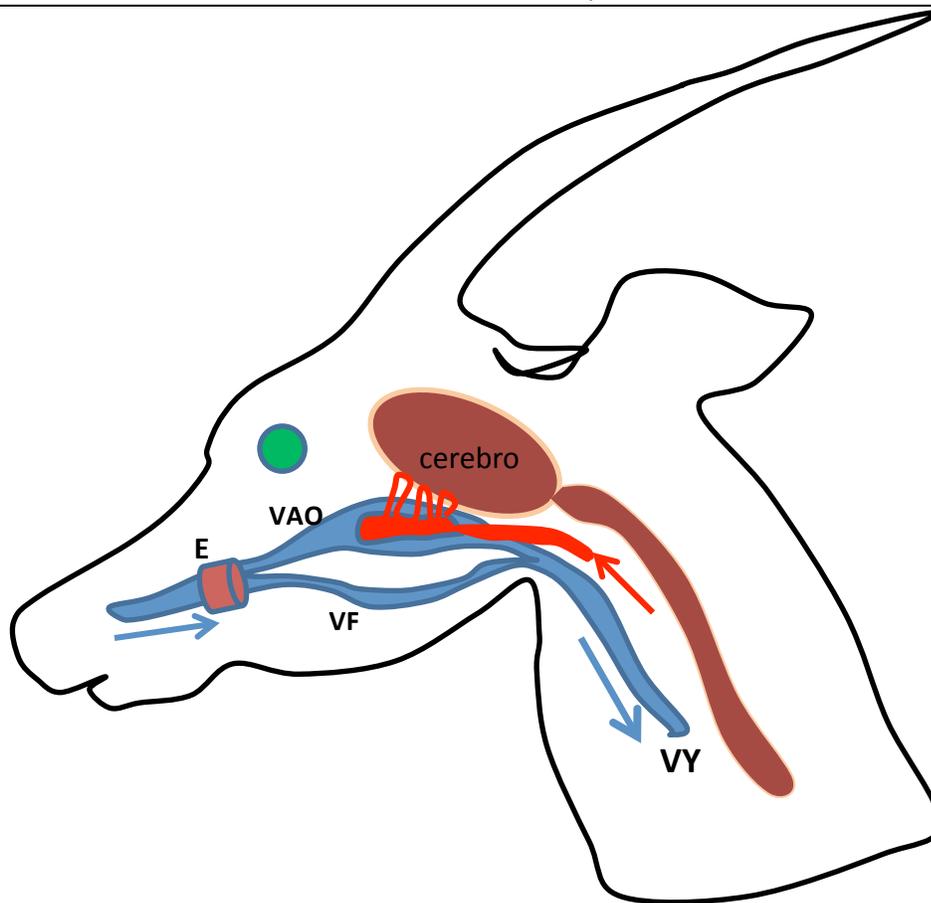
Las gacelas viven en las sabanas de África y están expuestas a altas temperaturas y a la depredación de los grandes felinos, por lo que con frecuencia desarrollan elevadas temperaturas y les es difícil eliminar el calor de su cuerpo. El cerebro es muy sensible a las altas temperaturas y para evitar su daño, estos Artiodáctilos han desarrollado un mecanismo de contracorriente que eliminaría calor de la sangre antes de que esta llegue al cerebro. Este mecanismo protector térmico del cerebro lo realizaría la rete carotídea, la cual intercambiaría calor entre la sangre arterial de la rete (sangre caliente) y la sangre venosa que procede de las fosas nasales (sangre fría). De esta manera la sangre arterial que llega al cerebro estaría menos caliente. Durante una carrera, la temperatura corporal de una gacela es 2,7°C superior a la del cerebro. Esta diferencia no tiene lugar en los felinos, por lo que durante una carrera en un día caluroso a estos se les calienta mucho el cerebro y no pueden seguir corriendo tras la gacela. El mantener el cerebro fresco gracias a la rete, dota a las gacelas de un medio de adaptación y de supervivencia (73).

En 1998, Claus Jessen publicó un estudio en el que demuestra que los Artiodáctilos utilizan un sistema de enfriamiento selectivo para el cerebro durante la hipertermia experimental. Sin embargo, observó que en los animales en estado libre este sistema específico funciona cuando la temperatura es baja pero no funciona cuando la temperatura está cerca de 42°C. Curiosamente, el principal efecto de este sistema específico es ajustar la actividad de los mecanismo de pérdida de calor a la situación de estrés producida por el calor en sentido general, más que a la

protección del propio cerebro frente al daño térmico (80).

Un hecho importante de este sistema específico es que el intercambio térmico en la rete podría no ser obligatorio en todo momento. La sangre fresca de las fosas nasales drena fundamentalmente por dos rutas (80) (Figura 25) : a) una, por la vena angularis oculi y si sigue esta ruta llega sangre fresca al seno cavernoso, se enfría la sangre arterial de la rete y el sistema específico de enfriamiento cerebral entra en funcionamiento; y b) la otra ruta, por la vena facial, que va a la yugular interna y no pasa por el seno cavernoso, por lo que no enfría la sangre arterial de la rete ni el cerebro. Que pase por una u otra vena dependerá de la actividad de las fibras simpáticas que inervan el esfínter situado en las venas antes de dividirse en vena facial y

vena angularis oculi. Cuando aumenta la actividad simpática se inhibe el enfriamiento cerebral y aumenta la eliminación de calor. ¿Cómo se regula esta actividad simpática? Parece ser que depende de la temperatura que alcance el cerebro: si aumentan la temperatura cerebral y corporal a la vez, se produce jadeo pero no se activa el sistema específico de enfriamiento cerebral, pero si aumenta la temperatura cerebral y se mantiene baja la corporal, entonces se activa este sistema específico y no hay jadeo. Por tanto, en el rango de hipertermia parece ser que el cerebro tiene la capacidad de regular su propia temperatura de forma separada del resto del cuerpo (80).



**Figura 25. Representación esquemática del aporte sanguíneo al cerebro a través de la rete en los Artiodáctilos (80).**

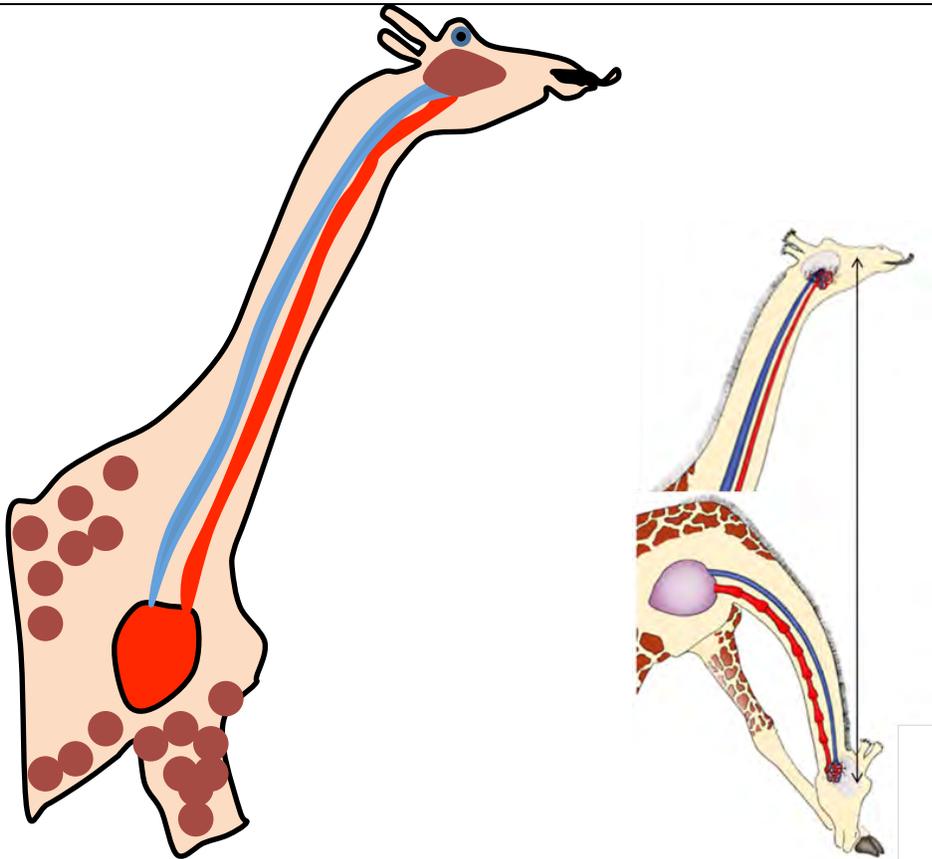
VAO=vena angularis oculi; VF=vena facial; VY=vena yugular interna; E=esfínter venoso.

#### 4.2.2. Facilitador del drenaje venoso intracraneal

En 1961, Barnett y Marsden realizaron experimentos en ovejas y con los resultados obtenidos estos autores sugieren que la rete podría contribuir a facilitar el retorno venoso desde el interior del cráneo mediante pulsaciones rítmicas transmitidas desde sus arterias a la sangre del seno cavernoso (81).

La jirafa es un animal espectacular y desde la antigüedad ha llamado la atención, sobre todo por tener un cuello tan largo; este animal parece como una anomalía de la naturaleza. Una jirafa adulta suele medir 4.5-5.5 m de

altura y el corazón está a mitad de camino entre las pezuñas y la cabeza (Figura 26). Su corazón tiene que generar una presión muy alta para hacer llegar la sangre al cerebro; a nivel del corazón la presión arterial sistólica es de 200-300 mm Hg y la diastólica es de 100-170 mm Hg. Las paredes de las arterias y las de los ventrículos del corazón son relativamente muy gruesas. Esta especie animal también tiene rete carotídea y se ha especulado que podría intervenir en la regulación de la presión arterial que llega al cerebro (82).



**Figura 26.** Izquierda: Esquema mostrando la longitud del cuello de la jirafa, dando idea de la fuerza que debe generar el corazón para hacer llegar la sangre arterial al cerebro cuando el animal tiene la cabeza levantada. Derecha: Esquema mostrando la distancia que puede variar la posición de la cabeza cuando la tiene levantada o bajada. Cuando baja la cabeza, debe disponer de mecanismos que faciliten el drenaje de la sangre intracraneal.

Las especies de animales que tiene el cuello largo, como la jirafa, cuando bajan la cabeza tendrían dificultades para drenar la sangre venosa del interior del cráneo, porque tiene que vencer el efecto hidrostático de toda la sangre que se aloja en las venas yugulares. Esta situación puede ser especialmente comprometida en la jirafa cuando baja su cabeza para beber agua (**Figura 26**): en esta especie, al tener un cuello largo, sus venas yugulares son también largas y alojan un gran volumen de sangre (puede alcanzar unos 11 litros). Estas características anatómicas dificultan el drenaje venoso de la cavidad craneal. En esta especie, el pulso de las arterias de la rete empujaría la sangre del seno cavernoso, facilitando así la salida de la sangre intracraneal y empujaría la sangre de las venas yugulares hacia el corazón (**83**). Esta idea concuerda con la propuesta hecha anteriormente por Barnett y Marsden (**81**).

#### 4.2.3. Función bioquímica o metabólica

La rete está muy cerca de la hipófisis y en algunas especies, incluso la rodea. Debido a esta cercanía la sangre que pasa por la rete podría recibir, entre otras, sustancias liberadas por la hipófisis, especialmente de su lóbulo posterior. Estas hormonas, al pasar a la sangre de la rete, llegarían al cerebro donde ejercerían sus efectos (**72**).

La rete también podría actuar como almacén de sangre

oxigenada o de glucosa, lo cual permitiría a los animales acuáticos (p. e., cetáceos) llevar a cabo inmersiones profundas y duraderas, pues en esas circunstancias podrían utilizar el O<sub>2</sub> almacenado en la sangre de la rete. En estos animales existe una rete tóraco-espinal muy desarrollada y es relativamente muy grande, como ya se ha indicado anteriormente (**69**).

#### 4.2.4. Función hemodinámica

Esta es la hipótesis más difundida y ya fue sugerida en los siglos XVII-XVIII por el inglés T. Willis y el holandés S. Blankaart. Estos autores propusieron que, dada su situación anatómica, la rete podría intervenir en la regulación de la presión y del flujo sanguíneo que llega al cerebro.

En 1953, P. M. Daniel et al. (**53**), de sus estudios anatómicos en varias especies de animales, sugieren que dada su situación anatómica la rete debe tener un significado hemodinámico en relación con la circulación cerebral. Y, a juicio de estos autores, esto debe tenerse en cuenta cuando se aborda el estudio de la regulación de la circulación cerebral en animales que tengan esta estructura vascular. Las hipótesis planteadas por estos autores son meramente especulativas y realmente no llegaron, en este aspecto, mucho más lejos que T. Willis y S. Blankaart.

En 1963, Baldwin y Bell realizaron estudios

hemodinámicos en la oveja y en la ternera (83), y concluyen principalmente lo siguiente:

a) El flujo sanguíneo es mayor en las carótidas que en las arterias vertebrales, y el flujo de las arterias vertebrales es mayor en la ternera que en la oveja.

b) En las dos especies, la oclusión de una carótida común produce un aumento inmediato en la otra carótida común y en las arterias vertebrales, sin cambiar la presión arterial sistémica.

c) En las dos especies, la oclusión de una arteria vertebral produce un aumento inmediato del flujo en la otra arteria vertebral pero no cambia el flujo en las carótidas.

d) Se sugiere que la circulación cerebral depende de cambios físicos, principalmente de cambios en los gradientes de presión arterial.

En 1968, Nagel et al. llevaron a cabo estudios en el delfín (*Tursiops truncatus*), especie dotada de una rete intracraneal y una extensa rete cervico-torácica situada entre el sistema arterial sistémico y las arterias cerebrales (Figura 27). En estos estudios los autores realizaron mediciones de la presión arterial y revelan que la presión arterial en la rete es relativamente no-pulsátil. A partir de estos datos, sugieren que esta estructura debe tener un efecto amortiguador de la presión de la sangre que llega al cerebro. De esta manera, las arterias cerebrales estarían protegidas en situaciones en que se produzca un aumento excesivo de la presión arterial sistémica (69).

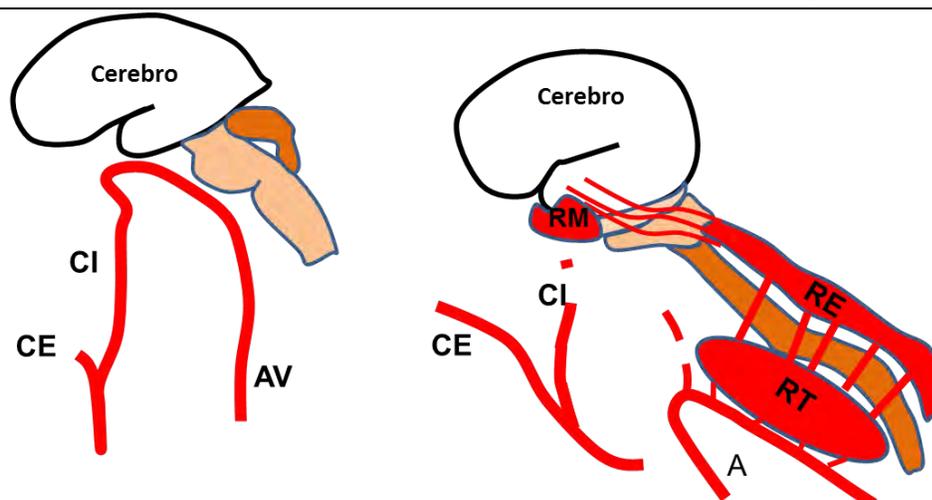


Figura 27. Fotografía de un delfín (Izquierda) y esquemas del aporte arterial al cerebro humano (Centro) y al cerebro del delfín (Derecha) (basada en la Ref. 69).

RM=rete mirabile carotídea; RE=rete espinal; RT=rete torácica.

Es destacable el hecho de que entre la rete del narval y la del delfín beluga hay dos notables diferencias: 1) la cantidad de rete originada en las arterias intercostales, y 2) el tamaño de la rete torácica. Ambos aspectos están más desarrollados en el narval que el delfín, al igual que ocurre, curiosamente, con los valores del hematocrito y hemoglobina que también son más elevados en el narval. Esto sugiere que la rete está ligada a la capacidad de los animales para hacer inmersiones acuáticas, las cuales parecen estar más desarrolladas en el narval que en el delfín (47).

Probablemente el estudio hemodinámico más detallado sobre la rete, con mediciones de varios parámetros funcionales, lo haya realizado S. Lluch y sus colaboradores a finales del pasado siglo XX. Estos investigadores, en la década de los años 1980, llevaron a cabo varios estudios en la rete de cabra, vaca y cerdo. Estos resultados se resumen a continuación.

**Salvador Lluch López** (1936- ), médico y fisiólogo español (84). Nació y estudió Medicina en Valencia (España). Durante su estancia en USA colaboró al desarrollo de un modelo experimental para medir el flujo sanguíneo cerebral en animales sin anestesiarse.

A su regreso a España en 1972, fue Profesor de Fisiología en la Facultad de Medicina, UAM, y en 1986 se trasladó a la Facultad de Medicina de Valencia, donde es actualmente Profesor Emérito. Probablemente es la persona que más ha contribuido a la investigación cardiovascular en España por su trabajo y por la formación de investigadores en este campo.

Este grupo de investigadores llevaban varios años estudiando la regulación de la circulación cerebral, en particular la función de la inervación simpática de los vasos cerebrales en esta regulación. Estos estudios los realizaban en un modelo experimental en la cabra despierta, especie que tiene una rete mirabile carotídea bien desarrollada. Cuando trataban de publicar sus observaciones y presentaban sus estudios en los diferentes congresos, era muy frecuente que otros investigadores pusieran objeciones a los resultados porque estos iban en contra de la opinión dominante sobre el papel de la inervación simpática en la regulación de la circulación cerebral. S. Lluch y colaboradores veían que la inervación simpática juega un papel activo en la regulación de la circulación cerebral en condiciones normales, mientras que la mayoría de los investigadores veían que este papel era

muy pobre o nulo. Las objeciones que ponían otros investigadores probablemente encontraban apoyo en una recomendación aparecida en una publicación de 1953 hecha por P. M. Daniel y colaboradores (53). Estos investigadores indican que la rete debe tenerse en cuenta cuando se aborda el estudio de la regulación de la circulación cerebral en animales que tengan esta peculiar estructura vascular.

Ante esta situación, S. Lluch y colaboradores decidieron estudiar la función hemodinámica de la rete, primero en la cabra y después en la vaca y cerdo; estas dos últimas especies también tienen una rete mirabile carotídea bien desarrollada como en el caso de la cabra.

La cabra, vaca y cerdo pertenecen al orden de los Artiodáctilos y en ellas la rete carotídea es intracraneal y está situada entre la carótida externa y el polígono de Willis, dentro del seno cavernoso, a ambos lados de la hipófisis. La rete se forma a partir de dos ramas (arteria anastomótica y ramo anatómico) de la arteria maxilar interna (rama de la carótida externa), de las cuales se forma una profusa red de arterias de corta longitud que se

anastomosan libremente entre sí, y después se reúnen para formar un vestigio de la carótida interna que es totalmente intracraneal; esta arteria con la del lado opuesto forma el Círculo de Willis como se ha dicho anteriormente. Los estudios morfológicos de las arterias de rete de estas especies aparecen resumidos en páginas anteriores.

*Estudios funcionales* (S. Lluch y col.)

*Estudios in vitro:*

Utilizando segmentos de arterias aisladas (diámetro externo=150-600  $\mu\text{m}$ ; longitud=2 mm) se observó que las arterias de rete tienen una capacidad para distenderse pasivamente similar a la de las arterias piales de diámetro externo comparable. Sin embargo, ambos tipos de arterias diferían en su capacidad para contraerse activamente: las arterias de rete mostraron una capacidad contráctil menor (aproximadamente un 40%) que las arterias cerebrales (3, 85). (Figura 28).

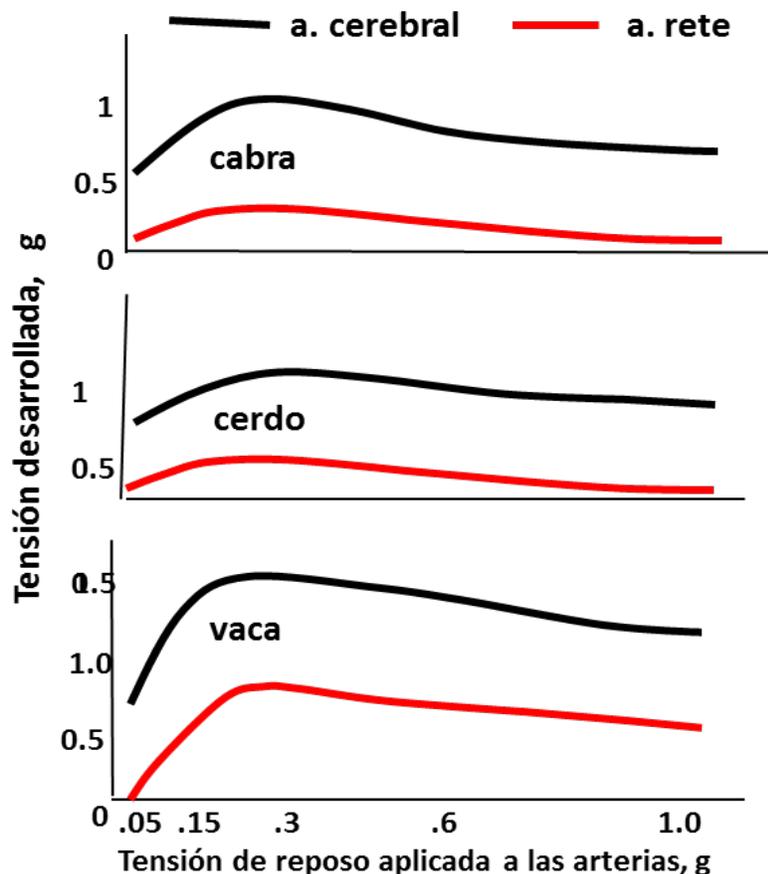


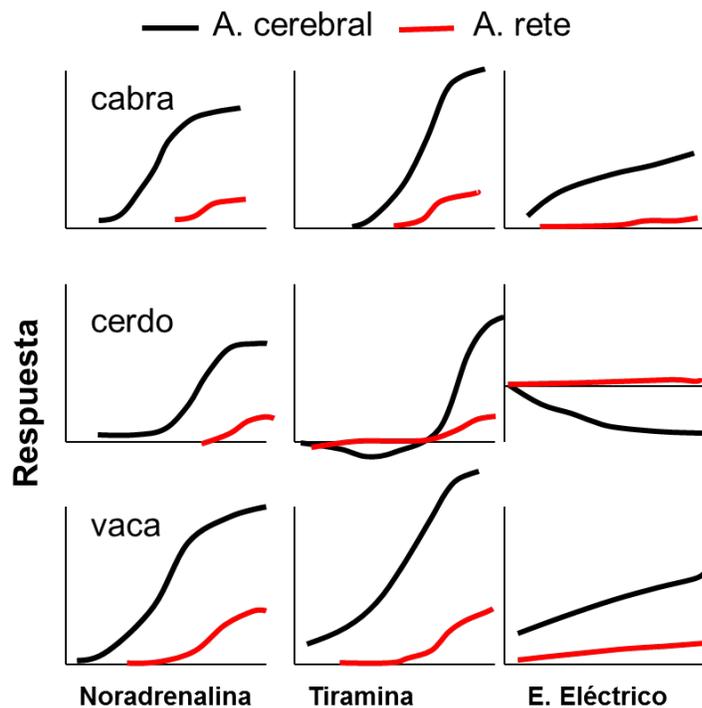
Figura 28. Capacidad de contracción de las arterias de rete y de las arterias cerebrales de cabra, cerdo y de vaca, cuando se aumenta la tensión pasiva de la pared (también aumenta el radio vascular) y se activan con KCl (Adaptada de la referencia 3). Se puede observar que la capacidad contráctil de las arterias de rete es claramente menor que la de las arterias cerebrales (piales).

Asimismo, la capacidad de respuesta frente a estímulos nerviosos, adrenérgicos, serotoninérgicos e histaminérgicos también era mucho menor en las arterias

de rete que en las arterias piales (3, 65, 66) (Figura 29). Esta pobreza en la respuesta contráctil de las arterias de rete contrasta con la notable presencia de una capa media

(muscular) bien desarrollada en este tipo de arterias y está en consonancia con la pobre densidad de inervación

adrenérgica observada en los estudios morfológicos.



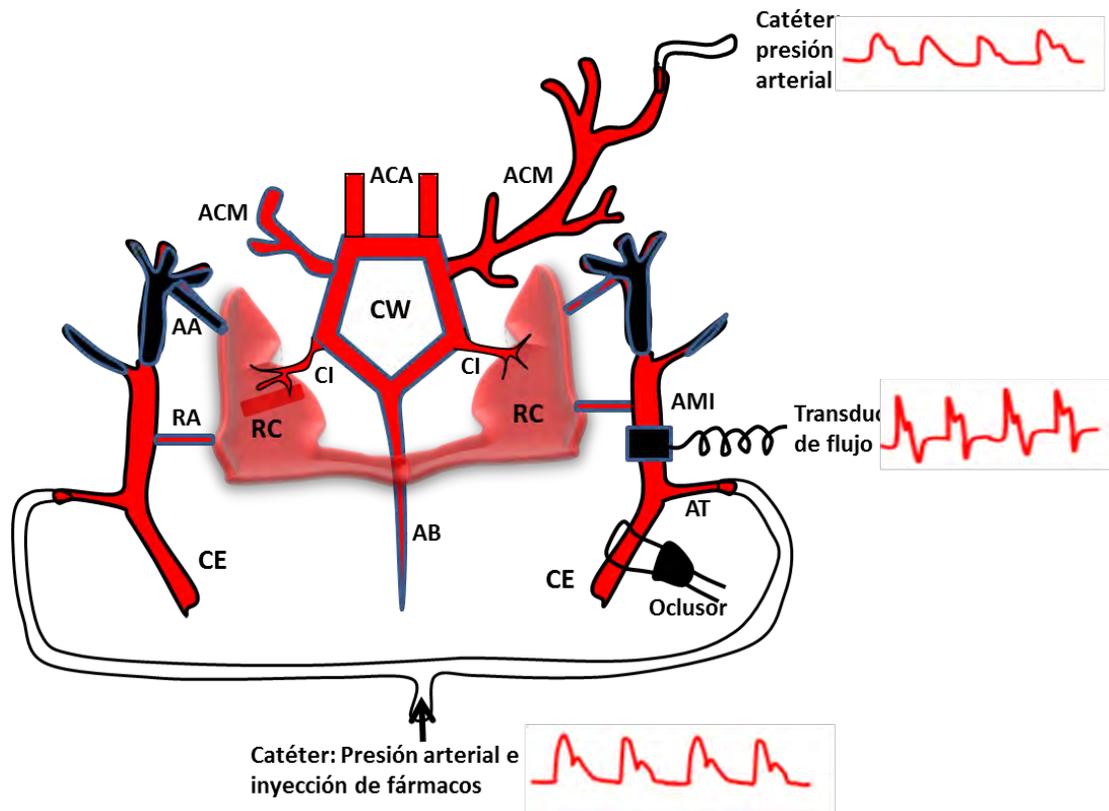
**Figura 29. Resumen de los efectos de la noradrenalina, tiramina y estímulo eléctrico de campo en las arterias cerebrales y arterias de rete de cabra, cerdo y vaca** (Adaptada de la referencia 66). Se puede observar que la respuesta in vitro de las arterias de rete a la estimulación adrenérgica es mucho menor que la de las arterias cerebrales (piales).

Estos datos sugieren que la rete mirabile de los artiodáctilos, al estar formada por arterias con muy poca capacidad contráctil, debe tener muy poco significado funcional en el control activo del aporte de sangre al cerebro, especialmente en las situaciones en las que se produzca activación nerviosa/adrenérgica. Es decir, que tiene poca capacidad para cambiar activamente la resistencia al paso de sangre, lo cual se confirmaría

posteriormente en los estudios realizados en la cabra anestesiada.

*Estudios in vivo:*

Estos experimentos se llevaron a cabo en cabras anestesiadas, cuya preparación experimental se muestra en el esquema de la **Figura 30**.

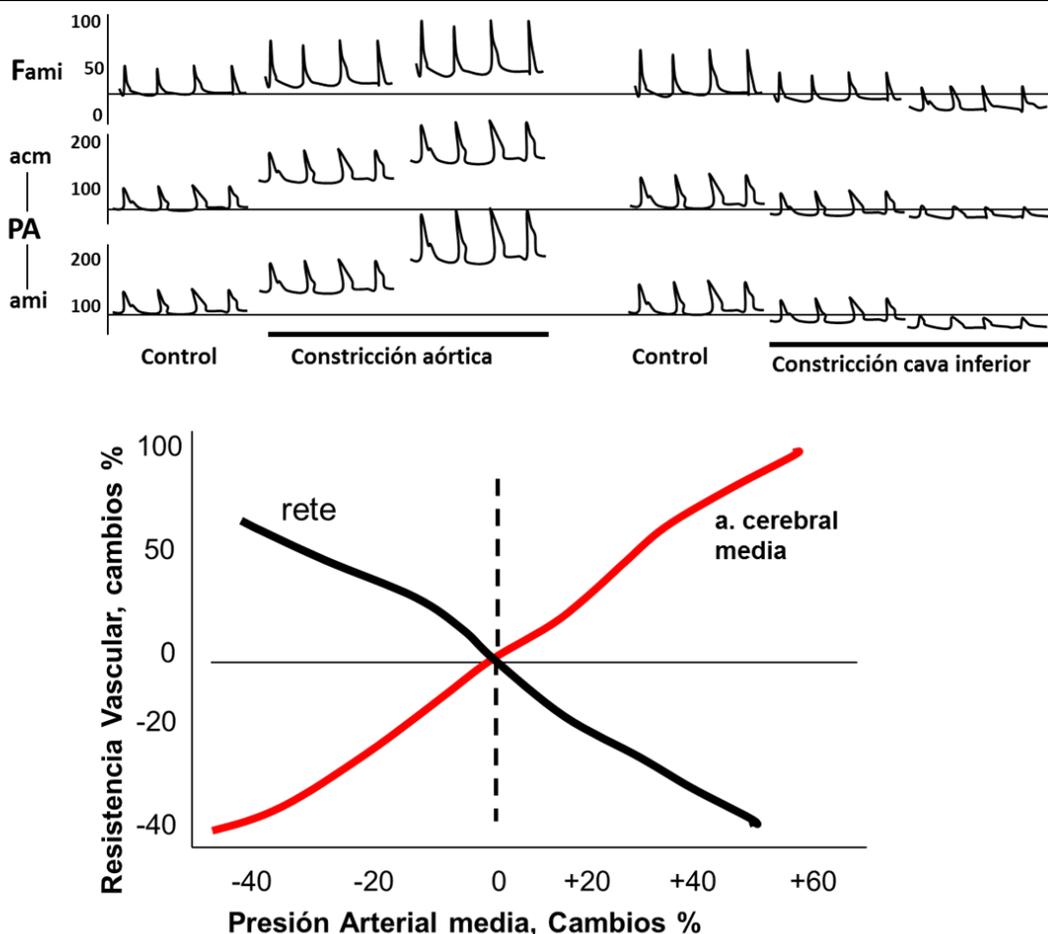


**Figura 30. Representación esquemática del preparado experimental utilizado en la cabra anestesiada.** A la derecha, se muestran registros de la presión en una rama de la arteria cerebral media (MCA) (arriba), del flujo en la arteria maxilar interna (IMA) (medio) y de la presión en la arteria carótida externa (ECA) (abajo) (Adaptada de la referencia 71).

IAM=arteria maxilar interna; ICA=arteria carótida interna; ECA=arteria carótida externa; TA=arteria temporal; MCA=arteria cerebral media.

En cabras anestesiadas se midió la presión en la arteria maxilar interna (proximal a la rete) y en la arteria cerebral media (distal a la rete) y se produjo hipertensión arterial mediante constricción de la aorta torácica e hipotensión arterial mediante constricción de la vena cava inferior (71). Durante la hipertensión, la resistencia a través de la rete disminuye y durante la hipotensión aumenta; los cambios de la resistencia en las arterias cerebrales fueron en sentido

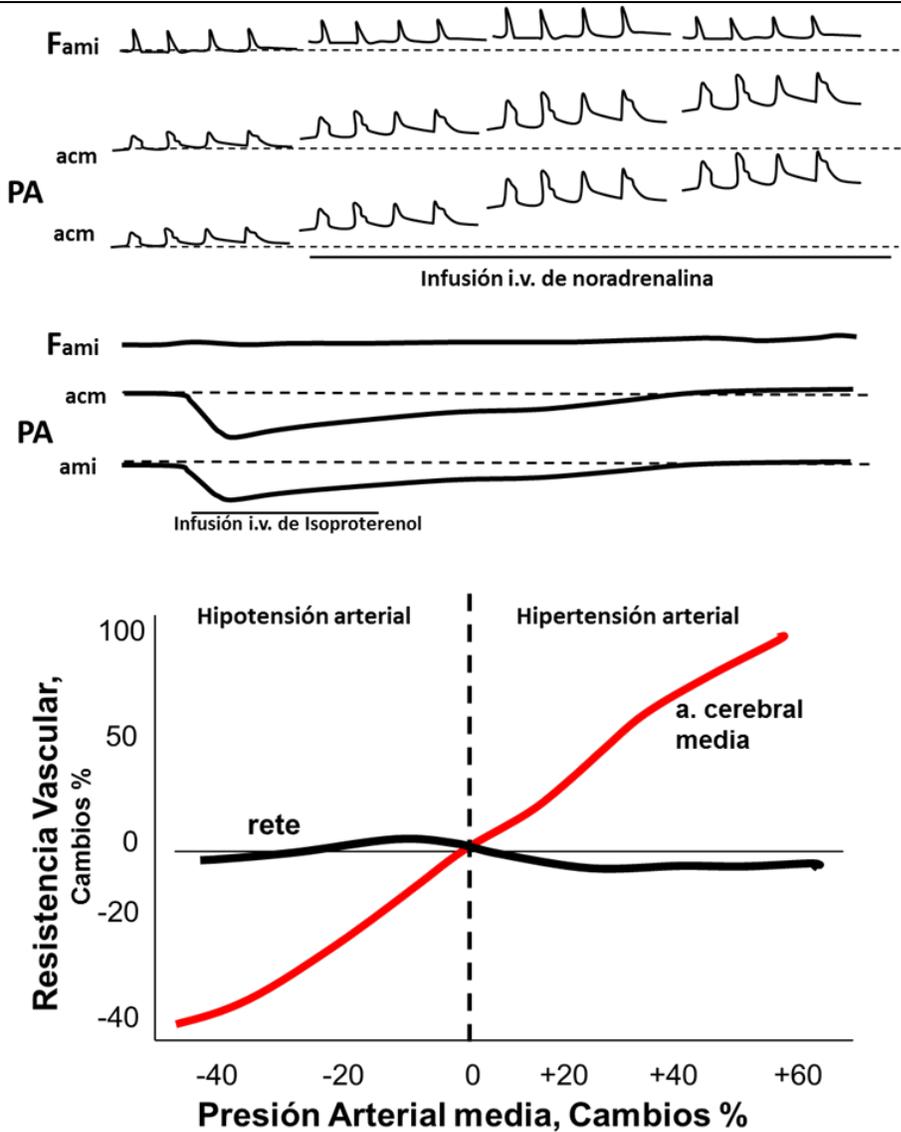
opuesto a los observados en la rete (Figura 31). Esto sugiere que la rete, al disminuir pasivamente su resistencia, actuaría como un sistema facilitador del paso de sangre en situaciones en que los vasos cerebrales se contraen. Por el contrario, al incrementar su resistencia al paso de sangre durante la hipotensión, la rete limitaría el paso de sangre cuando los vasos cerebrales se dilatan.



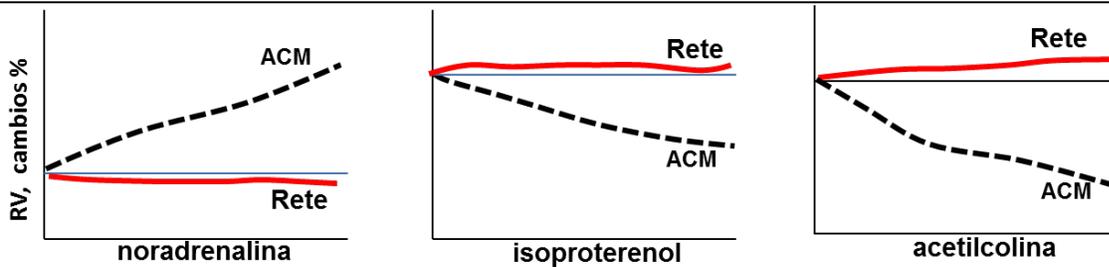
**Figura 31.** Arriba: registros de la presión en la arteria maxilar interna (**ami**, arteria sistémica) y en la arteria cerebral media (**acm**), así como del flujo en la arteria maxilar interna (**ami**), del mismo lado, durante la hipertensión arterial inducida mediante constricción de la aorta torácica, y durante la hipotensión arterial inducida mediante constricción de la vena cava inferior (adaptada de la que aparece en la referencia 71). Abajo. Resumen de los cambios de la resistencia vascular (RV) a través de la rete y a través de la arteria cerebral media durante la hipertensión arterial inducida mediante constricción de la aorta torácica y durante la hipotensión arterial inducida mediante constricción de la vena cava inferior (adaptada de la que aparece en la referencia 71).

En otro grupo de cabras anestesiadas, se observó que en condiciones control, la presión en la arterial cerebral media (distal a la rete) es un 18 % menor que en la arteria maxilar interna (proximal a la rete) (70). El gradiente de presión a través de la rete no cambia cuando la presión arterial sistémica aumenta (mediante inyección i.v. de noradrenalina) o cuando disminuye (mediante inyección i.v. de isoproterenol) (Figura 32). La hipercapnia o la inyección de isoproterenol o de acetilcolina en la arteria maxilar interna aumenta el flujo sanguíneo y disminuye la

presión en la arteria cerebral media, mientras que la inyección de noradrenalina disminuye el flujo sanguíneo y aumenta la presión en la arteria cerebral media (Figura 33). En estos casos, el gradiente de presión a través de la rete no cambiaba. Por tanto, la respuesta activa de la rete a estas sustancias es muy pequeña y se sugiere que la rete podría tener una función amortiguadora frente a los cambios del flujo sanguíneo al mantener la resistencia al flujo sanguíneo cuando cambia el calibre de los vasos sanguíneos cerebrales (70).



**Figura 32.** Arriba: registros de la presión en la arteria maxilar interna (**ami**, arteria sistémica) y en la arteria cerebral media (**acm**), así como del flujo en la arteria maxilar interna (**ami**), del mismo lado, durante la hipertensión arterial inducida mediante infusión i.v. de noradrenalina, y durante la hipotensión arterial inducida mediante infusión i.v. de isoproterenol (Adaptada de la que aparece en la referencia 70). Abajo: Resumen de los cambios en la resistencia vascular a través de la rete y de la arteria cerebral media durante la hipertensión arterial inducida con noradrenalina i.v. (parte derecha) y durante la hipotensión arterial inducida con isoproterenol i.v. (parte izquierda) (adaptada de la referencia 70).



**Figura 33.** Resumen de los cambios en la resistencia vascular (RV) a través de la rete y de la arteria cerebral media (ACM) durante la inyección en la arteria maxilar interna de noradrenalina, isoproterenol o acetilcolina en la cabra anestesiada (Adaptadas de la referencia 70).

Estos estudios sugieren que las arterias de la rete mirabile carotídea tienen poca capacidad activa para

regular el aporte de sangre al cerebro y, por otro lado, también sugieren que la rete podría desempeñar un papel fundamentalmente pasivo para amortiguar los cambios de la presión arterial sistémica. De esta manera, la rete protegería a los vasos cerebrales de los cambios excesivos de la presión arterial, lo cual puede ser de importancia ya que los vasos cerebrales son relativamente frágiles.

Con estos estudios, además de contribuir a conocer la función hemodinámica de esta curiosa estructura vascular, también se daba respuesta a aquellos autores que creían que era la rete la responsable de los efectos vasculares que veíamos en nuestro laboratorio cuando aplicábamos diversos tipos de estímulos en nuestro laboratorio y que nosotros atribuíamos a los cambios en los vasos cerebrales y no en la rete. Es decir, que los efectos que veíamos en aquellos estudios en el animal despierto eran debidos principalmente a los cambios que se producían en la resistencia vascular cerebral y no en la resistencia a través de la rete, como S. Lluch y col. defendían.

## 5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Los datos de la literatura permiten sugerir que la rete mirabile carotídea:

1. Está presente en numerosas especies de animales, pero no en los seres humanos.
2. Está situada dentro y/o fuera del cráneo, en el interior de un lago venoso, excepto en los cetáceos que está rodeada de grasa.
3. Esta formada por un plexo de arterias de corta longitud, anastomosadas libremente entre sí, y está situada entre las principales arterias que llevan sangre al cerebro, proximal al Círculo de Willis.
4. Las arterias son de tamaño medio, son musculosas, tienen poca capacidad contráctil. y en la mayoría de los casos están pobremente inervadas.
5. Parece intervenir en la regulación de la temperatura del cerebro contribuyendo a evitar el calentamiento excesivo de este órgano en situaciones de hipertermia exógena o endógena.

Parece participar en la regulación de la presión y del flujo sanguíneo arterial cerebral, produciendo cambios, fundamentalmente pasivos, en la resistencia vascular, evitando así modificaciones hemodinámicas bruscas y exageradas en los vasos sanguíneos cerebrales.

## 6. REFERENCIAS

1. Forester JM. The Marvelous Network and the History of Enquiry into Its Function. *J of the History of Medicine and Allied Sciences* 2002; 57 (2): 198-221.
2. Ask-Upmark E. The Carotid Sinus and the Cerebral Circulation. *Acta Psychiatr Neurol Scand Suppl.* 1935; 6: 1-374.
3. García Villalón AL. La rete mirabile de los artiodáctilos: estudio morfológico y funcional, Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, 1985.
4. McFarland WL, Jacobs MS, Morgane PJ. Blood supply to the brain of the dolphin, *Tursiops truncatus*, with comparative observations on special aspects of the cerebrovascular supply of other vertebrates,

- Neuroscience and Biobehavioral Reviews 1979; Vol 3, Suppl 1.
5. Diéguez G. Herofilo de Calcedonia. In: *El corazón: de ayer a hoy*. Madrid: CEU, 2012; pp. 32-33.
6. Pearce JMS. The Neuroanatomy of Herophilus. *Europ Neurol* 2013; 69: 292-5.
7. Pranghoffer S. It could be Seen more Clearly in Unreasonable Animals than In Humans: Representation of the Rete Mirabile in Early Modern Anatomy. *Med Hist* 2009; 53(4): 561-86.
8. Diéguez G. Claudio Galeno. In: *El corazón: de ayer a hoy*. Madrid: CEU, 2012; pp. 37-41.
9. Gross CG. Leonardo Da Vinci on the Brain and Eye. In: *Brain, Vision, Memory: Tales of the History of Neuroscience*. Massachusetts: Technology Institute, 1999; cap. 2.
10. Diéguez G. Leonardo da Vinci. In: *El corazón: de ayer a hoy*. Madrid: CEU, 2012; pp. 50-51.
11. Magnus H. Historical Anatomies in the Web, *Hystory of Medicine Division, U.S. National Library of Medicine*, 2012.
12. Ragen W, Foster R. Dryander of Marburg and the first textbook of neuroanatomy. *Neurosurgery* 1990; 26 (3):489-98.
13. Walter Herrmann Ryff. <https://medicablogs.diariomedico.com>.
14. Diéguez G. Jacobo Berengario de Capri. In: *El corazón: de ayer a hoy*. Madrid: CEU, 2012; p. 11.
15. Malomo AO. Lessons from History: Human Anatomy, from the Origin to the Renaissance. *Int. J. Morphol* 2006; 24(1):99-104.
16. Diéguez G. Andreas Vesalio. In: *El corazón: de ayer a hoy*, Madrid: CEU, 2012; pp. 53-56.
17. Bataille B, Wager M, Lapierre F, et al. The significance of the rete mirabile in Vesalius's work: an example of the dangers of inductive inference in medicine. *Neurosurgery* 2007; 60(4):761-8.
18. Maurits Biesbrouck. *Vesaliana, An Updated Vesalius Bibliography Including all Known Publications on Andreas Vesalius (1514-1564) and His Works Roeselare (Belgium)*, January 2016.
19. André de Laurens. *Portraits of European Neuroscientists*. N. Wade, M. Piccolino and A. Simmons. Images, 2012.
20. Jean Riolan el Joven. <https://www.biografasyvidas.com>.
21. Hunt D. Jr. Julius Casserius. *Boston Medical Surg J* 1878; 98: 629-31.
22. Wysocki M, Saganiak K, Zwinczewska H, et al. Iulius Casserius: revolutionary anatomist, teacher and pioneer of the sixteenth and seventeenth century, *Anatomical Science International Article*, January 2016.
23. Adriaan van der Spiegel. *Complete Dictionary of Scientific Biography, Encyclopedya.com*, 2008.
24. Adriaan van der Spiegel (1578–1625): Anatomist, physician, and botanist. S. Ghosh, S. Sharma, S. Biswas and S. Chakraborty, *Clinical Anatomy, Article*

- first published online: 9 May 2014, DOI: 10.1002/ca.22414.
25. Martin J. The Vesalian School of Anatomy in Renaissance Padua. Books at Iowa 1973; 18, 3-17.
  26. Ghosh SK. Johann Vesling (1598-1649): seventeenth century anatomist of Padua and his Syntagma Anatomicum. Clin Anat 2014; 27(8):1122-7.
  27. Nicolaus Steno. <http://www.ucmp.berkeley.edu/history/steno.html>.
  28. Karenberg A. Johann Jakob Wepfer (1620–1695). Journal of Neurology 2004; 251 (4): 501-2.
  29. Luzzatti C, Whitaker H, Schenck J, et al. Jakob Wepfer: Clinical and anatomical observations in the prehistory of neurolinguistics and neuropsychology. J Neurolinguist 1996; 9 (3): 157-64.
  30. Hughes JT. Thomas Willis 1621-1675: His life and work. New England Journal of Medicine 1993; 328: 816-7.
  31. Thomas Willis. <https://www.historiadelamedicina.org>.
  32. Diéguez G. Raymond de Viieussens. In: El corazón: de ayer a hoy, Madrid: CEU, 2012; pp. 76-77.
  33. Raymond de Vieussens. <https://www.encyclopedia.com>
  34. Steven Blankaart. <http://ebling.library.wisc.edu/historical/bts/bts>
  35. Lorenz Heister. <https://www.encyclopedia.com>
  36. Kooijmans L. Frederik Ruysch: The Artist of Death. <http://publicdomainreview.org/2014/03/05/frederik-ruysch-the-artist-of-death>.
  37. Alenxander Monro el Segundo. <http://rea.uninet.edu/index.php>
  38. Buess H. Albrecht von Haller and his 'Elementa Physiologiae' as the beginning of pathological physiology. Med Hist 1959; 3(2): 123-31.
  39. John Bell. <https://.historyofscience.com>.
  40. S. T. Von Sömmering (1755-1830). <http://www.mcncbiografias.com/app-bio/do/>.
  41. de Gutiérrez-Mahoney CG, MM. The myth of the rete mirabile in man, Neuroradiology 1972; 4(3): 141-58.
  42. Tandler J. Zur vergleichenden anatomie der kopfarterien bei den Mammalia. Denksch der kais. Akad der Wiss. Math Naturwiess, Wien, 1899; 67: 677-784.
  43. Lawrence WE, Rewel RE. The cerebral blood supply in the giraffidae. Proc. Zool. Soc. London 1948; 118: 202-12.
  44. Viamonte M, Morgane PJ, Galliano RE et al. Angiography in the living dolphin and observations on blood supply to the brain. Am J Physiol 1968; 214: 1225-49.
  45. Tyson E. Phocæna, or the Anatomy of a Porpess, Dissected at Gresham College: with a Præliminary Discourse Concerning Anatomy, and a Natural History of Animals. London: Benjamin Tooke, 1860.
  46. Wilson HS. The rete mirabile of the narwhal. J Anat Physiol 1879;14: 377-400.
  47. Vogl W, Fisher HD. Arterial retia related to supply of the central nervous system in two small toothed whales– narwhal (*Monodon monoceros*) and beluga (*Delphinapterus leucas*). Journal of Morphology 1982; 174 (1): 41-56.
  48. Kamijyo Y, García JH. Carotid Arterial Supply of the Feline Brain Applications to the study of regional cerebral ischemia. Stroke 1974; 6: 361-9.
  49. Frackowiak H. The rete mirabile of the maxillary artery of the lion (*Panthera leo*, L. 1758), Ant Histol Embryol 1989; 18(4): 342-348.
  50. Hsieh HM, Takemura A. The rete mirabile of the maxillary artery in the lion (*Panthera leo*). Okajimas Folia Anat Jpn 1994; 71(1): 1-11.
  51. Gillilan LA. Extra- and intra-cranial blood supply to brain of dog and cat. Am J Anatomy 1976; 146 (3): 237-53.
  52. Gillilan LA. Blood supply to brain of ungulates with and without a rete mirabile caroticum Journal of Comparative Neurology 1974; 153 (3): 275-90.
  53. Daniel PM, Dawes JDK Prichard ML. Studies of the Carotid Rete and Its Associated Arteries. Phil Trans R Soc London B 1953; 237 (645): 173-20.
  54. O'Brien HD, Gignac PM, Hieronymus TL, et al. A comparison of postnatal arterial patterns in a growth series of giraffe (*Artiodactyla: Giraffa camelopardalis*). Peer J 4:e1696 <https://doi.org/10.7717/peerj.1696>, 2016.
  55. Baldwin BA. The anatomy of the arterial supply to the cranial regions of the sheep and ox. Am J Anat 1964; 115\_ 101-118.
  56. Oliveira JCD, Campos R. The rostral and caudal epidural rete mirabile and its blood supply source in wild boar (*Sus scrofa scrofa*). Cienc Rural 2004; 34 (3): 795-802.
  57. Diéguez G, García AL, Conde MV et al. In vitro studies of the carotid rete mirabile of Artiodactyla. 1987; 33 (2): 143-54.
  58. Wan XR, Liu Y, Zhsang LP, et al. Comparativer anatomical study of the eopidural retia mitabile in the yak and cattel. Asian J. of Animal and Veterinary Advances 2012; 7: 884-90.
  59. Ding Y, Shao B, Wang J. The arterial supply to the brain of the yak (*Bosgrunniens*). Ann Anat 2007; 189 (1): 31-8.
  60. Uehara M, Kudo N, Sugimura M. Morphological studies on the rete mirabile epidurale in the calf. Jap J Vet Res 1978; 26: 11-18.
  61. Frackowiak H, Jakubowski H. Arterial Vascularization in the Giraffe Brain. Annales Zoologici Fennici 2008; 45 (4): 353-9.
  62. Kiełtyka-kurc A, Frackowiak H, Brudnicki W. The Arteries of Brain Base in Species of the Cervid Family. Anat Rec 2015; 298: 735-40.
  63. Frackowiak H, Zdun M, Kowalczyk K, et al. Comparison of cerebral base arteries in antelopes of *Tragelaphus*, *Taurotragus* and *Boselaphus* genera. Zoomorphology 2014.
  64. Dumitrescu I, Predoi G, Cornila N, et al. A histological study of the rete mirabile at domestic mammals. Lucrari Stinifice Medicina Veternara, Vol. XL, 2007 (Timisoara).

65. Diéguez G, Conde MV, Gómez B, et al. Rete mirabile of goat: in vitro effects of adrenergic stimulation. *Brain Res* 1983; 289 (1-2): 281-4.
66. Diéguez G, García AL, Conde MV, et al. In vitro studies of the carotid rete mirabile of *Artiodactyla*. *Microvasc Res* 1987; 33(2): 143-54.
67. Uddman R, Edvinsson L, Malm L. Perivascular nerves in the feline carotid rete. *Cell Tissue Res* 1982; 226: 301-8.
68. Kimami JK, Opole IO, Ogeng'o JA. Structure and sympathetic innervation of the intracranial arteries in the giraffe (*Giraffa camelopardalis*). *J Morphol* 1991; 208(2):193-203.
69. Nagel OL, Morgane WL, McFarland WL, et al. Rete mirabile of dolphin: its pressure-damping effect on cerebral circulation. *Science* 1968; 30,161 (3844):898-900.
70. Lluch S, Diéguez G, García AL, et al. Rete mirabile of goat: its flow-damping effect on cerebral circulation. *Am J Physiol*. 1985; R482-9.
71. Diéguez G, García-Villalón AL, Gómez B et al. Hemodynamic significance of the carotid rete during changes in arterial blood pressure. *Am J Physiol* 1988; 254: R770-R775.
72. Grzegorzewski WL, Skipor J, Wasows B et al. Countercurrent transfer of I-125-LHRH in the perihypophyseal cavernous sinus—carotid rete vascular complex, demonstrated on isolated pig heads perfused with autologous blood. *Domest Anim Endocrinol* 1997; 14: 149-60.
73. Mitchell G, Lust A. Artiodactyl success and the carotid rete. *Biol Lett* doi: 10.1098/rsbl.2008.0138, 2008.
74. Baker MA. Brain cooling in endotherms in heat and exercise. *Annu Rev Physiol*. 1982; 44: 85-96.
75. Blix AS, Walloe L, Messelt EB. On how whales avoid decompression and why they sometimes strand. *J Exp Biol* 2013; 216 (18): 3385-7.
76. Mitchel D., Maloney SK, Jessen C et al, A. Fuller. Adaptative heterothermy and selective brain cooling in arid-zone mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 2002; 131: 571-85.
77. Baker MA. A brain cooling system in mammals. *Scientific American* 1979; 240: 114-122.
78. Cabanac M. Selective brain cooling in humans: fancy or fact? Maastricht, The Netherlands, Nov 1992; 2-6.
79. Taylor CR. The vascularity and possible thermoregulatory function of the horns in goats. *Physiol Zool* 1966; 39: 127-139.
80. Jessen C. Brain cooling: An Economy Mode of temperature Regulation in Artiodactyls. *Physiol* 1998; 13: 281-286.
81. Barnett CH., Marsden D. Functions of the Mammalian Carotid Rete Mirabile. *Nature* 1961; 191: 88 -9.
82. Warren JB. The Physiology of the Giraffe. *Scientif American* 1974; 231 (5).
83. Baldwin BA, Bell FR. Arteries of the sheep and calf. *J Physiol* 1963; 167: 448-62.
84. Diéguez G. Salvador Lluch. In: *El corazón: de ayer a hoy*. Madrid: CEU, 2012; p.137.
85. García-Villalón AL, Diéguez G, Gómez B, et al. Mechanics of arteries forming the carotid rete of goat and cattle. *Microvascular Research* 1989; 37: 204-17.



# Solid lipid nanoparticles for gene therapy

**Title in Spanish:** *Nanopartículas sólidas lipídicas para terapia génica*

Alicia Rodríguez Gascón<sup>1,\*</sup>, M.<sup>a</sup> Ángeles Solinís Aspiazú<sup>1</sup>, Ana del Pozo Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Farmacia, Centro de investigación Lascaray ikergunea, Grupo Farmacocinética, Nanotecnología y Terapia Génica (FarmaNanoGene), Universidad del País Vasco UPV/EHU.

**ABSTRACT:** Gene therapy is a rapidly advancing field with great potential for the treatment of genetic and acquired systemic diseases. This therapy requires the introduction of foreign genetic material in the target cells to modify a genetic sequence. Viral vectors are the most effective, but their application is limited by their immunogenicity, oncogenicity and the small size of the DNA they can transport. Non-viral vectors, however, are safer, lowered cost, and more reproducible and do not present DNA size limit. The main problem of non-viral systems is their low transfection efficiency, although it has improved during the last years. This review presents the contribution of our research group to the design and evaluation of SLNs based non-viral vectors for gene transfer. We report our studies about the relationship between formulation factors and cell uptake and intracellular trafficking of the genetic material, very important for transfection. We have shown, for the first time, the ability to induce transgene protein expression of the SLNs after endovenous administration to mice. This revision also reports our work about the potential application of SLNs to the treatment of infectious and rare diseases, as the X-linked juvenile retinoschisis, a retinal disorder due to a deficiency in the protein retinoschisin, and characterized by poor eyesight and degeneration of the retina. The intraocular injection of SLNs bearing the gene that encodes retinoschisin to diseased mice led to the partial recovery of the retina. All together, our results show the potential of SLNs as a system for gene delivery.

**RESUMEN:** La terapia génica consiste en la administración de ácidos nucleicos con el fin de modular la expresión de proteínas específicas y revertir así una enfermedad. Es una nueva área de la medicina con gran potencial para el tratamiento de enfermedades tanto hereditarias como adquiridas. Hasta ahora, los sistemas virales de administración de ácidos nucleicos han resultado eficaces, pero presentan importantes problemas de seguridad. Los vectores no virales, en cambio, son más seguros pero menos eficaces, aunque su eficacia ha aumentado significativamente en los últimos años. Esta revisión recoge la contribución de nuestro grupo de investigación al diseño de vectores no virales basados en nanopartículas sólidas lipídicas (SLNs) para terapia génica. Hemos estudiado la relación entre factores de la formulación con los procesos de internalización y disposición intracelular del material genético, que condicionan la eficacia de transfección, y por primera vez demostramos la capacidad de las SLNs para inducir la síntesis de una proteína tras su administración endovenosa a ratones. Esta revisión también recoge nuestros trabajos sobre la aplicación de las SLNs en el tratamiento de enfermedades infecciosas y enfermedades raras, como la retinosquisis juvenil ligada al cromosoma X, enfermedad en la que la retina está desestructurada debido a la deficiencia de la proteína retinosquisina. La administración de SLNs con el gen que codifica esta proteína en un modelo animal de esta enfermedad indujo la recuperación estructural de la retina. Los trabajos aquí recogidos muestran el gran potencial de las SLNs como sistemas de administración de ácidos nucleicos.

\*Corresponding Author: alicia.rodriguez@ehu.eus

Received: October 28, 2016 Accepted: February 13, 2017

Premio "Real Academia Nacional de Farmacia" del Concurso científico 2016 de la Real Academia Nacional de Farmacia

An Real Acad Farm Vol. 82, N° 4 (2016), pp. 408-423

Language of Manuscript: Spanish

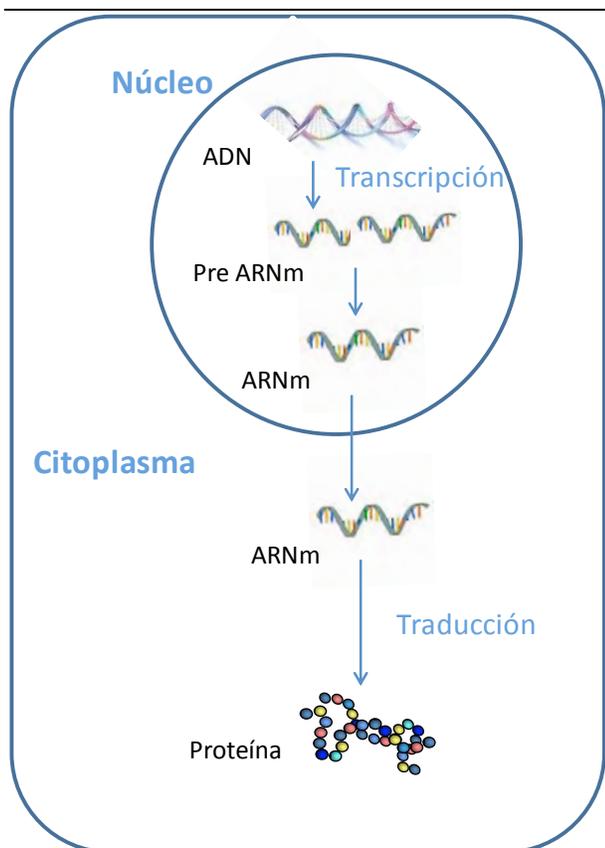
## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, debido a la descodificación del genoma humano y los continuos avances en biotecnología, la terapia génica ha emergido como una prometedora herramienta terapéutica basada en la utilización de ácidos nucleicos para modificar la expresión de proteínas que están alteradas en determinadas enfermedades. Según la Agencia Europea del Medicamento (EMA), un producto

terapéutico basado en terapia génica consiste en un vector o sistema de administración que contiene un constructo genético para expresar una secuencia terapéutica o una proteína específica responsable de la regulación, reparación, adición o delección de una secuencia genética determinada (1). Son muchas las patologías que pueden ser potencialmente tratadas con terapia génica, desde enfermedades de tipo genético hasta otras como el cáncer

o el SIDA. El primer producto de terapia génica aprobado en Europa por la EMA, denominado Glybera<sup>®</sup>, está indicado para el tratamiento de la deficiencia familiar de la lipoproteinlipasa, un raro trastorno autosómico recesivo, y que produce un retraso en el metabolismo de los quilomicrones. La acumulación de quilomicrones en el plasma causa accesos recidivantes de pancreatitis, que habitualmente comienzan en la infancia.

En la expresión de los genes que codifican las proteínas en células eucariotas intervienen varios procesos (figura 1): síntesis de un pre ARN mensajero (ARNm), que a su vez se transforma en un ARNm, que sale del núcleo de la célula al citoplasma, donde se produce el proceso de traducción mediante el cual se sintetizan las proteínas. La interferencia de alguno de estos procesos puede dar lugar a un cambio en la expresión de las proteínas (2). La introducción en la célula de una secuencia genética para modificar artificialmente la expresión de un determinado gen (incrementar o bloquear) se conoce como transfección.



**Figura 1. Procesos implicados en la expresión génica en células eucariotas.**

El proceso de transfección para modificar la expresión génica de una célula se puede conseguir con la administración de ADN o ARN exógeno. La terapia génica con ARN está ganando un gran interés en los últimos años. La administración de ARNm (3) generalmente da lugar niveles de transfección mayores que el ADN, ya que no tiene que llegar al núcleo de la célula, uno de los pasos limitantes para la transfección; sin embargo, la duración

del efecto es menor, lo que puede limitar su aplicación terapéutica (4), aunque sí puede llegar a ser más útil en vacunación (5,6). Si lo que se pretende es bloquear en lugar de inducir la expresión de un gen, el ARN de interferencia (ARNi) ofrece la posibilidad de silenciar genes de forma específica. Este proceso se basa en la utilización de “short interfering” RNA (siARN), que son secuencias cortas de ARN de doble cadena de 21 nucleótidos capaces de interactuar de forma específica y bloquear el ARNm (7). El siARN puede ser introducido en la célula como tal, o bien puede utilizarse lo que se conoce como “short hairpin” ARN (shARN), que es un plásmido de ADN que lo codifica e induce su formación en el interior de la célula (8). Otra forma de ARNi es la utilización de micro ARN (miARN), que están constituidos por ARN de cadena simple de entre 19-25 nucleótidos originados a partir de la transcripción de un gen, de tal forma que se unen al ARNm e inducen su destrucción o la inhibición de la síntesis de la proteína correspondiente (9).

Una vez administrados, los ácidos nucleicos son eliminados del organismo muy rápidamente; además tienen grandes dificultades para atravesar las membranas celulares para acceder al citoplasma de las células diana. Por ello, un aspecto fundamental para el éxito de la terapia génica es la utilización de un sistema de administración eficaz y seguro (10), que proteja al material genético de la degradación, facilite su internalización en las células, y lo libere en su interior. Los sistemas de administración se clasifican en dos grandes grupos: vectores virales y no virales (11). Los vectores virales se preparan a partir de virus que han sido modificados mediante ingeniería genética de modo que permiten la expresión del gen que portan en las células diana, pero que no son capaces de replicarse en ellas (12). Los vectores virales permiten alcanzar eficacias de transfección altas; sin embargo presentan importantes limitaciones debido al potencial oncogénico e inmunogénico (por las proteínas víricas). Otro problema de los vectores virales es la incapacidad de incorporar ácidos nucleicos de elevado tamaño. Los sistemas virales más utilizados en terapia génica son los virus adenoasociados, adenovirus, retrovirus y lentivirus (13-15). Los vectores no virales, en cambio, son sistemas más seguros, y su fabricación a gran escala es más sencilla, más barata y más reproducible; además, no presentan ninguna limitación en cuanto al tamaño del material genético que pueden incorporar. Sin embargo, la eficacia de transfección de los vectores no virales es menor que la de los vectores virales, aunque en los últimos años ha mejorado significativamente. De hecho, se ha incrementado el número de ensayos clínicos que utilizan este tipo de vectores (16). Son numerosos los sistemas no virales que se pueden utilizar en terapia génica (17), incluyendo sistemas físicos, como la electroporación (18) o la inyección hidrodinámica (19), y los sistemas químicos. Estos últimos pueden estar compuestos por péptidos (20), polímeros (21), lípidos (22), o combinaciones entre ellos. Es importante que estos

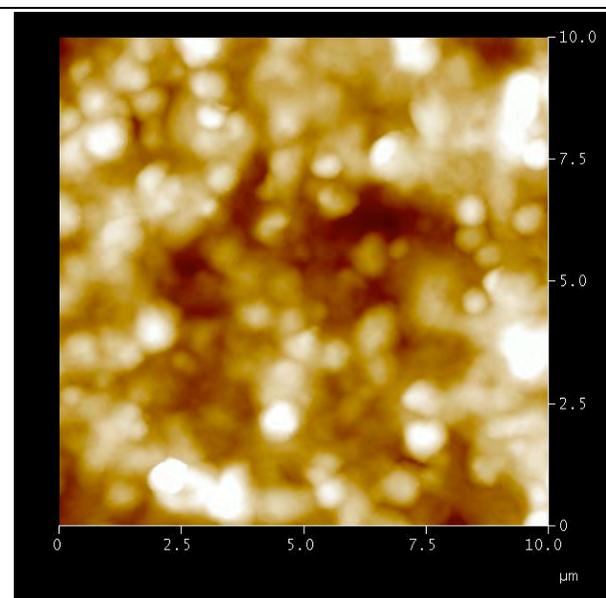
materiales sean biocompatibles y biodegradables. Entre los sistemas lipídicos más utilizados para terapia génica están las nanopartículas sólidas lipídicas (SLNs), que en los últimos años han demostrado un gran potencial como sistemas de administración de ácidos nucleicos.

## 2. NANOPARTÍCULAS SÓLIDAS LIPÍDICAS (SLNs) COMO SISTEMA DE ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA TERAPIA GÉNICA

Las SLNs son partículas esféricas en el rango de los nanómetros formadas por un núcleo lipídico sólido rodeado de una capa de tensioactivos. Están constituidas por lípidos fisiológicos muy bien tolerados, frecuentemente aprobados para uso farmacéutico (23), lo que les confiere ventajas desde el punto de vista de la seguridad. Fueron inicialmente diseñadas como sistemas de administración de fármacos debido a su capacidad de proteger las sustancias activas frente a la degradación, a la posibilidad de modular el perfil de liberación, a su estabilidad, y a la posibilidad de ser sometidas a procesos de esterilización y liofilización (24-26). Actualmente se considera a las SLNs uno de los sistemas más prometedores para la administración de ácidos nucleicos (27-29), tanto en estudios *in vitro* (30-32) como *in vivo* (33-35). Además, con relación a otros vectores no virales, presentan importantes ventajas, ya que, debido a su composición, son bien toleradas fisiológicamente, presentan una buena estabilidad a largo plazo, se pueden preparar con metodologías sencillas y pueden ser sometidas a procesos de esterilización y liofilización (36). En nuestro grupo de investigación trabajamos en el diseño y evaluación de vectores no virales a base de SLNs para terapia génica. En la figura 2 se recoge una fotografía de SLNs preparadas en nuestro laboratorio obtenida mediante microscopía de fuerza atómica.

Las SLNs para terapia génica se suelen preparar con lípidos catiónicos, cuyas cargas positivas interaccionan con las cargas negativas de los ácidos nucleicos, de tal forma que estos quedan adsorbidos sobre la superficie de la nanopartícula. Además, los lípidos catiónicos utilizados para preparar las SLNs para terapia génica deben actuar también como tensioactivos para favorecer la formación de una emulsión inicial, que es el primer paso para la elaboración de las SLNs. La unión del ácido nucleico a la nanopartícula facilita su movilidad a nivel intracelular y le confiere protección frente a la degradación enzimática. La relación entre el material genético y las SLNs es fundamental para que el vector final tenga las características adecuadas para la transfección, de tal manera que debe existir un equilibrio entre la capacidad de condensación del material genético, que debe ser suficiente para que quede protegido, pero no excesiva para no impedir su liberación en el citoplasma de la célula diana. Normalmente los vectores tienen carga superficial neta positiva para facilitar la interacción con la superficie celular, cargada negativamente, y su posterior entrada en la

célula.



**Figura 2. Imagen de SLNs obtenida por microscopía de fuerza atómica.**

## 3. BARRERAS PARA LA TRANSFECCIÓN

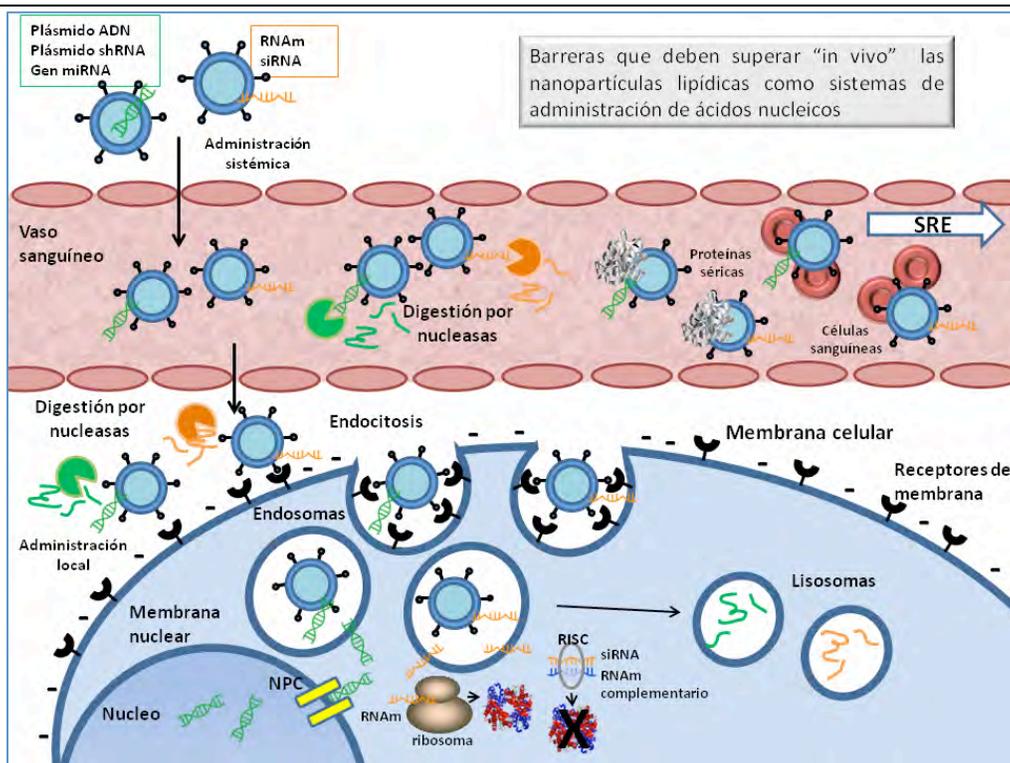
Los ácidos nucleicos deben superar una serie de barreras hasta alcanzar el lugar de acción (el citoplasma en el caso del ARN, o el núcleo en el caso del ADN): estabilidad en el medio extracelular, paso a través de la membrana celular, difusión intracelular, e internalización en núcleo. En la figura 3 se recoge un esquema con los pasos limitantes del proceso de transfección tras la administración sistémica de ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos son muy sensibles a la acción de las nucleasas, por lo que una vez administrados se degradan rápidamente, y el tiempo de residencia en el organismo es muy corto (37). Por ello, uno de los objetivos de la utilización de sistemas nanoparticulados es la protección frente a las nucleasas. Como se ha comentado anteriormente, el material genético generalmente se condensa sobre la superficie de la nanopartícula, lo que le proporciona estabilidad frente a la degradación. Tras la administración sistémica, puede haber una interacción con componentes sanguíneos, como las proteínas séricas, lo que da lugar a la formación de agregados que son eliminados por el sistema retículo endotelial, o retenidos a nivel pulmonar (37).

Una vez que el material genético llega a la célula, debe ser capaz de atravesar la membrana celular y acceder al citoplasma. Los ácidos nucleicos, debido a su tamaño y a las cargas negativas, tienen grandes dificultades para ser captados por la célula, por lo que la utilización de nanopartículas con carga superficial positiva facilita este proceso. Mediante interacciones electrostáticas, las cargas positivas de las nanopartículas interaccionan con las cargas negativas de la membrana celular, iniciándose el proceso de endocitosis, el principal mecanismo de internalización (38). Son varios los mecanismos de endocitosis que los

vectores pueden utilizar para penetrar en las células: macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolas, endocitosis dependiente

de flotilina, etc. (39), de tal forma que intervendrá un mecanismo u otro según el tipo de célula y el tipo de vector.



**Figura 3. Principales barreras para la transfección: degradación enzimática, agregación y opsonización, paso a través de la membrana celular, degradación lisosomal, liberación del vector, entrada en el núcleo.** NPC: complejo de poros nucleares, RISC: “RNA-induced silencing complex”, SER: sistema retículo endotelial.

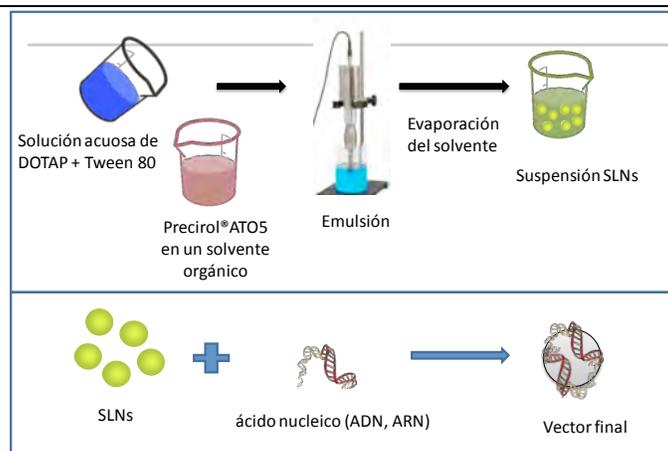
Una vez en el interior de la célula, el vector queda incluido en un endosoma que se puede fusionar con los lisosomas, formándose un endolisosoma, en el que la presencia de enzimas hidrolíticas hace que los ácidos nucleicos se puedan degradar. Por ello, es conveniente que el vector permanezca poco tiempo en el interior del endosoma, es decir, se debe favorecer el escape endosomal. La utilización de sustancias como DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina), colesterol, cloroquina, o algunos péptidos (GALA, KALA) favorecen el escape endosomal y por lo tanto la transfección (12). Existe también la posibilidad de preparar vectores capaces de proteger el material genético frente a la degradación lisosomal, de tal forma que la fusión del endosoma con el lisosoma no necesariamente conduzca a la inhibición de la transfección (40).

En el caso de ADN, una vez en el citoplasma debe ser capaz de atravesar la membrana nuclear y acceder al núcleo. Este es un paso limitante debido a que la membrana nuclear es una barrera selectiva para moléculas de tamaño superior a 40 kDa, como son las moléculas de ADN. La entrada en el núcleo puede llevarse a cabo a través de dos mecanismos: durante la mitosis, ya que disminuye el efecto barrera de la membrana, o a través de los llamados complejos de poros nucleares (nuclear pore

complex, NPC). Por ello, una estrategia para incrementar la entrada al núcleo es incorporar péptidos que porten secuencias de señalización nuclear, como es el caso de la protamina, que tiene secuencias de 6 argininas consecutivas que actúan como secuencias de señalización nuclear (41). Este péptido ha demostrado su capacidad de mejorar el proceso de transfección gracias a su capacidad de favorecer la entrada del material genético al núcleo celular (42).

#### 4. DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE SLNs PARA TERAPIA GÉNICA: INFLUENCIA DE FACTORES RELACIONADOS CON LA FORMULACIÓN

A la hora de diseñar un vector no viral a base de SLNs, es fundamental llevar a cabo una adecuada selección de los componentes de la formulación. En uno de nuestros primeros estudios (43), evaluamos la influencia de la composición de las SLNs sobre la capacidad de transfección *in vitro*. Las SLNs se elaboraron mediante una técnica de emulsificación/evaporación del solvente, y los componentes utilizados fueron el lípido sólido Precirol® ATO5, el lípido catiónico DOTAP (dioleoil fosfatidil etanolamina), y el tensioactivo Tween 80. En la figura 4 se recoge un esquema con el método de elaboración de las SLNs empleado (44).



**Figura 4. Esquema con el método de elaboración de nuestros vectores a base de SLNs.**

El DOTAP es uno de los lípidos catiónicos más utilizados en terapia génica. Su actividad tensioactiva permite formar la emulsión inicial, y su carga positiva facilita la interacción con las cargas negativas del ADN. Por otro lado, el Tween 80 es uno de los tensioactivos más utilizados en la industria farmacéutica; además las cadenas de poli(etilenglicol) (PEG) del Tween 80 reducen la agregación de las nanopartículas, reduciendo su toxicidad y aumentando el tiempo de circulación en el organismo. En nuestro estudio, se evaluaron diferentes proporciones de DOTAP y Tween 80, siendo la proporción DOTAP 0,4% y Tween 80 0,1% la que proporcionó eficacias de transfección mayores. Otro factor a tener en cuenta a la hora de diseñar los vectores es la carga de ADN en las nanopartículas (expresada como relación entre el DOTAP y el ADN, en peso), ya que condiciona el tamaño de partícula, el potencial zeta o carga superficial, la capacidad de protección frente a desoxirribonucleasas, y la capacidad para que el ADN se libere a nivel intracelular. Utilizando el plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente (pCMS-EGFP), evaluamos distintas proporciones DOTAP:ADN (entre 15:1 y 1:1) y caracterizamos los vectores en términos de tamaño de partícula, carga superficial, capacidad de unión del plásmido, capacidad de protección frente a DNasa I, capacidad de liberación, y eficacia de transfección en células HEK293 (células embrionarias de riñón humano). El tamaño, en el rango nanométrico, y la carga superficial o potencial zeta de los vectores son fundamentales para la transfección. Los vectores presentaron un tamaño de partícula que osciló entre 217 nm y 260 nm para los vectores preparados con DOTAP:ADN entre 15:1 y 4:1, y en el caso de los vectores preparados con DOTAP:ADN de 3:1, su tamaño fue mayor de 1  $\mu\text{m}$ , indicativo de la formación de agregados. En cuanto a la carga superficial, osciló entre +32 y +47 para los vectores con tamaño nanométrico; sin embargo, la carga superficial de los vectores con tamaño mayor de 1  $\mu\text{m}$  fue negativa, debido al alto contenido de ADN. La capacidad de protección del ADN se mantuvo cuando las SLNs se prepararon con proporciones DOTAP:ADN de 4:1 o superiores, y a medida que aumentaba la proporción de ADN en las

nanopartículas, la capacidad de protección disminuía. Por el contrario, para las proporciones más bajas de ADN en las SLNs, el alto grado de condensación impedía su liberación. Los estudios de transfección en HEK293 pusieron de manifiesto que la mayor eficacia de transfección se conseguía con la formulación que era capaz de condensar completamente el plásmido, lo protegía de la acción de la DNasa I, y no impedía su liberación, y nos permitió seleccionar la relación DOTAP:ADN de 5:1 para estudios posteriores. Estos resultados pusieron de manifiesto la importancia, a la hora de diseñar un vector, de conseguir un equilibrio entre estos tres procesos: unión, protección y liberación. Otra característica que deben tener los vectores para poder ser útiles en terapia génica, es la seguridad. Nuestros vectores demostraron que, una vez administrados en los cultivos celulares, no producían una disminución de la viabilidad celular.

Comprobamos la eficacia de transfección a lo largo del tiempo en dos modelos celulares: HEK293 y ARPE-19 (células humanas de epitelio pigmentado de retina). Las SLNs fueron capaces de transfectar ambas líneas celulares, aunque los niveles de transfección en las células ARPE-19 fueron menores que en las HEK293. Además, en las células HEK293, la expresión de proteína se detectó a partir de las 24 horas, mientras que en las células de retina no se detectó hasta las 72 horas. Esta diferencia en la producción de la proteína puede ser debida a las diferentes barreras que tiene que superar el ADN contenido en la nanopartícula hasta llegar al núcleo de la célula y que dependen de la formulación. Por ello, utilizando SLNs marcadas con el fluoróforo rojo NileRed, estudiamos la internalización celular en los mismos modelos celulares (38). Pudimos observar una internalización más lenta en las células ARPE-19 que en las células HEK293, lo que puede justificar el retraso en la transfección observado. Comprobamos además, que en las células HEK293, los vectores eran captados principalmente por endocitosis mediada por caveolas, mientras que en las células ARPE-19 entraban mayoritariamente por endocitosis mediada por clatrin. También encontramos diferencias en la disposición de los vectores a nivel intracelular: en las células HEK293 se encontraban distribuidos

homogéneamente por todo el citoplasma, pero en las células de retina estaban localizados en la zona correspondiente al retículo endoplasmático rugoso y al aparato de Golgi, donde son sintetizados los lisosomas. Esto demuestra que la menor transfección que se observó en las células ARPE-19 estaba asociada a la endocitosis mediada por clatrina, que conduce a los vectores hacia los lisosomas, donde el material genético se puede degradar. Otra razón que puede justificar la menor transfección de los vectores en ARPE-19 está relacionada con la entrada del ADN en el núcleo. Las células HEK293 se dividen más rápidamente que las células ARPE-19, por lo que la entrada en el núcleo será más difícil en estas últimas. Una vez caracterizados los vectores y estudiado su comportamiento intracelular, se estudió su capacidad de transfección *in vivo* (34) tras su administración por vía endovenosa a ratones Balb/c. Tras el análisis de muestras de pulmón, hígado y bazo, pudimos observar expresión de proteína en estos dos últimos órganos hasta 7 días después de la administración, pero no a nivel pulmonar.

## 5. ESTRATEGIAS PARA INCREMENTAR LA CAPACIDAD DE TRANSFECCIÓN

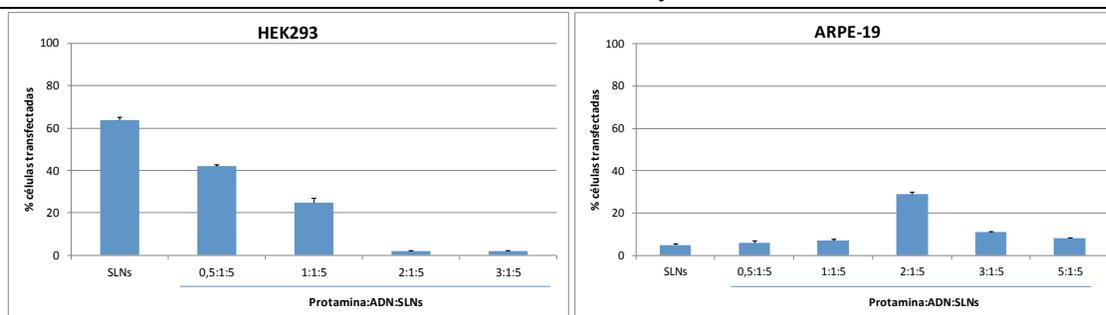
### 5.1. Utilización de péptidos de penetración celular: SAP

El uso de péptidos capaces de atravesar las membranas celulares (péptidos de penetración celular o CPP) es una estrategia muy utilizada en terapia génica para incrementar la capacidad de transfección de los vectores no virales. Muchos de estos péptidos contienen aminoácidos cargados positivamente, y son hidrofóbicos, normalmente debido a una secuencia anfipática (45). Para incrementar la capacidad de transfección, incorporamos en las SLNs el péptido SAP (46), cuya secuencia es (VRLPPP)<sup>3</sup> (compuestos por tres unidades repetidas de VRLPPP; V: valina; R: arginina, L: leucina, P: prolina), que presenta ciertas ventajas sobre otros CPP debido a su origen no viral, anfipaticidad, solubilidad en agua, y a su falta de toxicidad (47). La presencia de SAP en los vectores no modificó la carga superficial pero sí el tamaño de partícula cuando la cantidad de SAP en el complejo era más elevada. Tanto en células HEK293 como en ARPE-19, la

presencia del péptido en las SLNs incrementó la capacidad de transfección de los vectores, incremento que se relacionó con el proceso de internalización, que en ambas líneas celulares se produce por endocitosis mediada por clatrina y por endocitosis mediada por caveolas. Aunque en ambos casos el SAP aumentó la transfección actuando sobre la endocitosis, el mecanismo fue diferente dependiendo de la línea celular. En las células HEK293, el incremento de la transfección se relacionó con una mayor entrada de los vectores en las células. Sin embargo, en las células ARPE-19, el SAP no modificó el grado de internalización celular. En estas células observamos que incrementaba la internalización de las SLN por endocitosis mediada por caveolas y este cambio en el mecanismo de entrada, de clatrina a caveolas, daría lugar a una reducción de la degradación lisosomal, favoreciendo la localización de los vectores en las inmediaciones del núcleo, lo que facilita su entrada en el mismo, y por tanto la transfección.

### 5.2. Utilización de péptidos con señales de internalización nuclear: protamina

Otra estrategia para incrementar la capacidad de transfección de nuestros vectores fue la incorporación en las SLNs de protamina, un péptido de señalización nuclear, que además actúa facilitando la transcripción y presenta una gran capacidad de condensación de los ácidos nucleicos, lo que favorece su protección frente a la degradación (48). Preparamos los vectores con SLNs y diferentes proporciones de protamina (40) y comprobamos como la capacidad para incrementar la transfección dependía de la línea celular. En las células HEK293, contrariamente a lo esperado inicialmente, la capacidad de transfección disminuía a medida que aumentaba la proporción de protamina en las nanopartículas. En cambio, en las células ARPE-19, la protamina incrementaba la transfección cuando se utilizaba en una proporción determinada, por encima de la cual, la transfección disminuía. En la figura 5 se recoge una gráfica con los niveles de transfección de las formulaciones de SLNs con diferente proporción de protamina en las células HEK293 y ARPE-19.



**Figura 5. Porcentaje de transfección de células HEK293 y ARPE-19 tratadas con los vectores preparados con SLNs y diferentes proporciones de protamina.**

Los estudios de internalización celular mostraron la falta de correlación entre la entrada en la célula del vector y el nivel de transfección. En células HEK293, los vectores entran mayoritariamente por endocitosis mediada

por caveolas, independientemente de la presencia o no de protamina. Sin embargo, en las células de retina la protamina indujo un cambio en el mecanismo de internalización, pasando de endocitosis mediada por

caveolas a endocitosis mediada por clatrin. Si tenemos en cuenta que la endocitosis mediada por clatrin conduce el vector hacia los lisosomas, podemos deducir que es la actividad lisosomal la que favorecería la liberación del ADN de las SLNs, donde se encuentra fuertemente unido debido a la alta capacidad de condensación de la protamina. La falta de actividad lisosomal de la vía caveolar justifica la disminución de la eficacia transfección de las células HEK293 a medida que aumenta la proporción de protamina en el vector. El efecto de la protamina disminuyendo la eficacia de transfección de los vectores en células HEK293 revela que la introducción en la formulación de algún componente para salvar uno de los pasos limitantes del proceso de transfección no siempre asegura un incremento en la eficacia porque puede suceder que otro de los pasos del proceso de transfección se vea perjudicado. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la evaluación de los mecanismos de internalización y disposición intracelular de los vectores para optimizar la formulación, teniendo en cuenta además la célula diana que se pretende transfectar.

### 5.3. Utilización de polisacáridos

#### 5.3.a. Dextrano

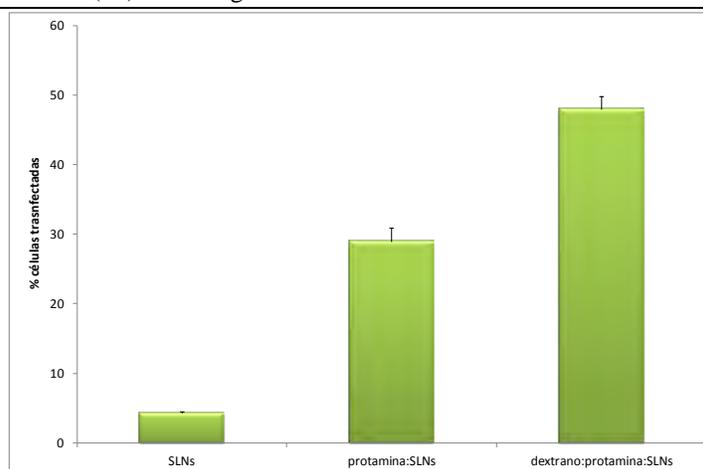
Otra opción para incrementar la eficacia de las SLNs es incorporar en la formulación polisacáridos aniónicos. Una vez conocido el efecto de la protamina sobre la eficacia de transfección y su relación con la actividad lisosomal, incorporamos dextrano en las SLNs debido a que favorece la endocitosis mediada por clatrin (49). En la figura 6 se

recoge una fotografía de los vectores preparados con dextrano y protamina obtenida por microscopía electrónica de transmisión.



**Figura 6. Fotografía de vectores preparados con dextrano:protamina:ADN:SLNs obtenida por microscopía electrónica de transmisión.**

Los estudios de transfección mostraron que la presencia de dextrano en las nanopartículas incrementaba significativamente la eficacia de transfección en ARPE-19. En la figura 7 se recoge la eficacia de transfección de células ARPE-19 tratadas con vectores preparados con SLNs, protamina y dextrano.



**Figura 7. Transfección in vitro de células ARPE-19 tratadas con vectores no virales preparados con SLNs, protamina y dextrano.**

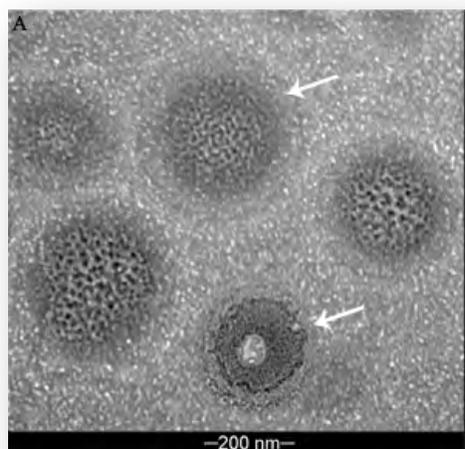
Estos resultados demuestran el potencial de este vector como sistema de administración de material genético para tratamientos a base de terapia génica. Además, se comprobó que no tiene actividad hemolítica y que no induce aglutinación de glóbulos rojos (49), lo que demuestra su biocompatibilidad. La administración endovenosa a ratones Balb/c indujo transfección a nivel de hígado, bazo y pulmón, que se pudo detectar hasta los 7 días post-administración. La formulación preparada con SLNs, dextrano y protamina, indujo mayores niveles de transfección y más duraderos en hígado y en bazo que las

SLNs solas (34) y además fue capaz de transfectar también el pulmón. Estos resultados son debidos por un lado, al efecto de la protamina, ya que su alto grado de condensación del ADN hace que esté más protegido frente a la degradación; por otro lado, el dextrano evitaría la interacción con componentes sanguíneos y aumentaría el tiempo de permanencia del vector en circulación sanguínea.

#### 5.3.b. Acido hialurónico (AH)

La capacidad del AH de interactuar con el receptor

CD44, implicado en procesos de internalización celular es bien conocida (50). De hecho se ha podido demostrar que este receptor está implicado en la internalización celular de diferentes nanosistemas (51). Por ello, estudiamos el efecto que podría tener la incorporación de AH en nuestros vectores basados en SLNs. Preparamos vectores con SLNs, protamina y AH (52) y evaluamos la eficacia de transfección en HEK293 y en ARPE-19. Utilizamos AH de diferentes pesos moleculares (150, 500 y 1500 kDa). La figura 8 muestra una fotografía obtenida por microscopía electrónica de transmisión de los vectores preparados con SLNs, protamina y AH<sub>500</sub>, donde puede observarse alrededor de la partícula una capa o “corona” debido a la disposición de las cadenas de AH (flechas blancas).



**Figura 8. Fotografía de vectores preparados con AH<sub>500</sub>:protamina:SLNs obtenida por microscopía electrónica de transmisión.** Puede observarse alrededor de la partícula una capa o “corona” debido a la disposición de las cadenas de AH (flechas blancas).

Los vectores fueron capaces de transfectar eficientemente ambas líneas celulares, y se comprobó que el peso molecular no afectaba a la transfección de células

HEK293 y ARPE-19, pero con el AH de 150 y 500 kDa, la transfección aumentaba al aumentar su proporción en las nanopartículas. El mayor incremento en la transfección respecto a las nanopartículas preparadas sin AH ni protamina se observó en las células ARPE-19 (hasta 7 veces más células transfectadas). Estas células presentan receptores CD44, y el bloqueo de este receptor por la presencia en el medio de cultivo de un exceso de AH, hizo disminuir significativamente la transfección, lo que indica la participación de este receptor en la internalización celular del vector. Los estudios de internalización y disposición intracelular de los vectores en células HEK293 y ARPE-19 pusieron de manifiesto diferencias en el grado de descondensación del plásmido en el citoplasma celular en función de la composición del vector y de la línea celular. La interacción del AH con la matriz intracelular modifica la unión entre los componentes de la formulación, lo que favorecería la descondensación del ácido nucleico, y por tanto su liberación del vector (53). Esto es especialmente importante si el vector es internalizado por endocitosis mediada por caveolas, ya que la falta de actividad lisosomal hace más difícil la liberación del material genético cuando este está fuertemente unido al vector. Si el vector entra por endocitosis mediada por clatrina, es la actividad lisosomal y no el efecto del polisacárido, la principal responsable de la liberación intracelular del ácido nucleico.

## 6. APLICACIONES DE LAS SLNs EN TERAPIA GÉNICA

La terapia génica es una estrategia terapéutica relativamente reciente, y desde el primer ensayo clínico aprobado por la FDA en 1990 (14,54) se han llevado a cabo más de 2000 ensayos clínicos. La tabla 1 recoge las indicaciones más frecuentes para las que los productos evaluados van dirigidos (13). Tal y como se observa en la tabla, la principal indicación es el cáncer, con un 65% del total de ensayos, seguido de las enfermedades cardiovasculares, con un porcentaje mucho menor (7,5%).

**Tabla 1. Principales indicaciones de los productos a base de terapia génica evaluados en los ensayos clínicos realizados en todo el mundo.**

Orden	Indicación	Número de ensayos	Porcentaje respecto al número total de ensayos
1	Cáncer	1517	64,4
2	Enfermedades cardiovasculares	177	7,5
3	Marcadores genéticos	50	2,1
4	Voluntarios sanos	53	2,2
5	Enfermedades infecciosas	179	7,6
6	Enfermedades inflamatorias	14	0,6
7	Enfermedades monogénicas	235	10
8	Enfermedades neurológicas	43	1,8
9	Enfermedades oculares	34	1,4
10	Otras	54	2,3

A continuación se presentan nuestras aportaciones que demuestran la potencial aplicación de las SLNs para terapia génica. Más específicamente, nos hemos centrado en las enfermedades raras y en las enfermedades infecciosas.

### 6.1. Enfermedades raras

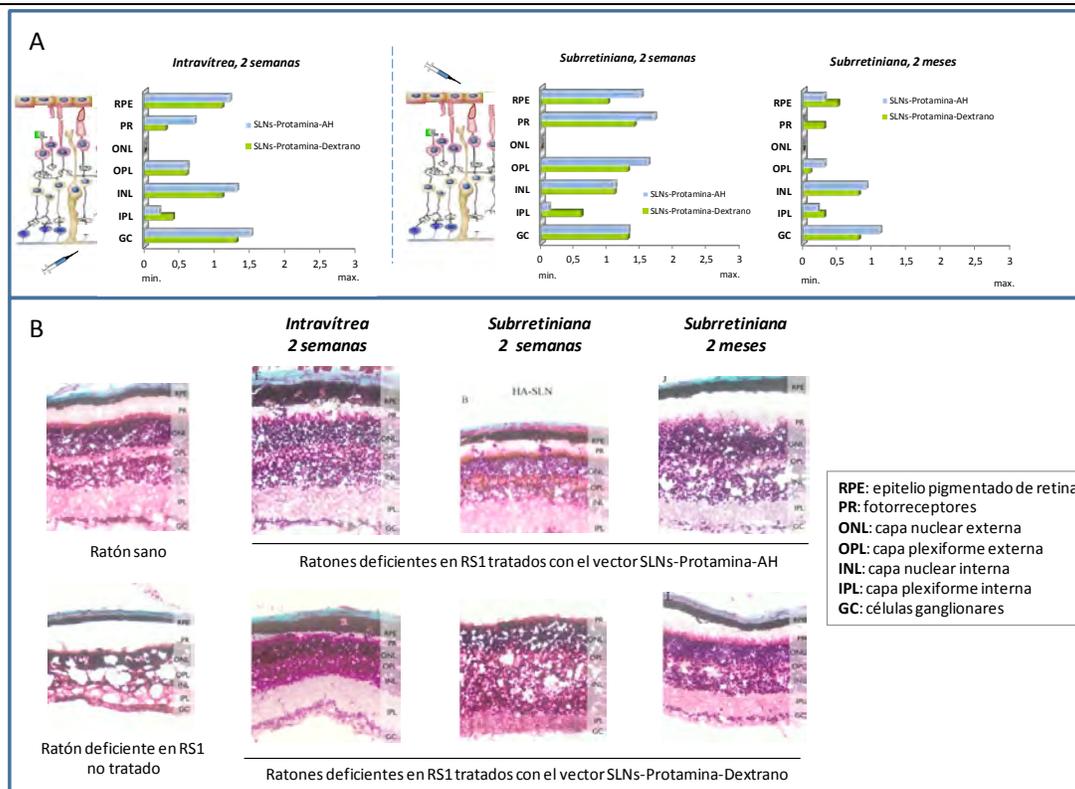
#### 6.1.a. Retinosquiasis juvenil ligada al cromosoma X (XLRS)

La XLRS es una enfermedad degenerativa de la retina central que tiene un modo de herencia recesivo afectando casi exclusivamente a hombres, aunque también hay casos aislados descritos en mujeres, con una prevalencia estimada de 1/5.000 – 1/25.000 (55). Puede desarrollarse desde edad muy temprana, pero lo más frecuente es detectarla en pacientes entre 5 y 10 años porque los pacientes de esas edades encuentran dificultades en la lectura. Los principales síntomas que se experimentan desde la infancia son la dificultad para ver en detalle y la disminución de la visión central, que progresa muy lentamente. A veces se produce disminución brusca de la visión debido a hemorragias o desprendimiento de retina. En el centro de la retina se observa una cavidad quística que puede desarrollarse en la fovea. También puede presentarse en la retina periférica. Los quistes presentan un patrón estrellado y estrías radiales que se han comparado con los radios de una rueda de bicicleta; pueden coalescer para formar una gran cavidad quística central, lo que conduce a una rápida pérdida de visión. El gen responsable de la retinosquiasis (*RS1*) codifica una proteína de 224 aminoácidos, la retinosquiasina (56,57). Esta proteína se expresa muy abundantemente en los fotorreceptores (retina externa), pero la enfermedad típicamente afecta a las capas retinianas más internas que contienen células ganglionares, incluida la capa de fibras nerviosas. Tras la síntesis y secreción de retinosquiasina por los fotorreceptores, la proteína alcanza la superficie de las células retinianas y es la responsable de la interacción/adhesión entre fotorreceptores, células bipolares y células de Müller, contribuyendo al mantenimiento de la integridad de la retina. El espectro de mutaciones en el gen *RS1* es amplio, habiendo mutaciones que truncan la proteína (deleciones pequeñas, inserciones y *splice site*) o mutaciones *missense* que suelen encontrarse en el dominio discoidin (importante para la adhesión entre células). Al fallar esta proteína, falla la adhesión entre las células, lo que permite que se formen los espacios quísticos que dan nombre a la enfermedad (58).

La terapia génica ha sido propuesta como una potencial herramienta para el tratamiento de diferentes enfermedades oculares, incluyendo las enfermedades degenerativas de la retina (59,60). Por ello, para conocer la potencial utilidad de nuestros vectores en el tratamiento de la XLRS, preparamos los vectores a base de SLNs con el plásmido pCEP4-RS1, y evaluamos su capacidad para inducir la producción de retinosquiasina en células ARPE-19. Comprobamos que tras el tratamiento, las células eran capaces de expresar el gen *RS1* y sintetizar la proteína; además detectamos una mayor producción de retinosquiasina cuando el vector incluía, además de las SLNs, protamina y dextrano (61) y más aún cuando se sustituía el dextrano por el AH (33). Posteriormente demostramos que ese vector, preparado con un gen marcador (pCMS-EGFP), que codifica para la proteína verde fluorescente, era capaz de transfectar la córnea tras su administración tópica a ratas, y la retina tras la administración intravítrea y subretiniana, también en ratas. Además, observamos que en el caso de la retina, el tipo de células transfectadas dependía de la vía de administración. Así, la administración intravítrea daba lugar a una mayor transfección de células ganglionares, mientras que se transfectaban más fotorreceptores y células del epitelio pigmentario cuando el vector se administraba por vía subretiniana (61).

En una fase posterior, administramos los vectores a ratones transgénicos deficientes en el gen *RS1*, por vía subretiniana y por vía intravítrea. A las dos semanas de la administración, pudimos detectar la retinosquiasina producida como consecuencia del proceso de transfección en las diferentes capas de la retina, y cuando los vectores se administraron por vía subretiniana, pudimos detectar la retinosquiasina también a los dos meses. El análisis estructural confirmó la recuperación parcial de la estructura de la retina, que estaba significativamente dañada en los animales como consecuencia de la enfermedad. En la figura 9 se recoge la expresión de retinosquiasina en la retina de los animales, e imágenes de las retinas tras la tinción tricrómica de Masson. Puede observarse la recuperación de la integridad de las retinas de los animales tratados (33, 62).

Estos trabajos han demostrado por primera vez la eficacia de un vector no viral para transfectar la retina de animales deficientes en el gen *RS1*, producir retinosquiasina y mejorar la integridad de la retina. Hasta nuestro conocimiento, son los estudios más avanzados que muestran el potencial real de las SLNs en terapia génica.



**Figura 9. A. Expresión de retinosiquinasa en las retinas de los ratones deficientes en RS1 tratados por vía intravítrea o por vía subretiniana con los vectores SLNs-Protamina-AH y SLNs-Protamina-Dextrano. B. Imágenes de las retinas tratadas con la tinción tricrómica de Masson.**

**6.1.b. Enfermedad de Fabry (EF)**

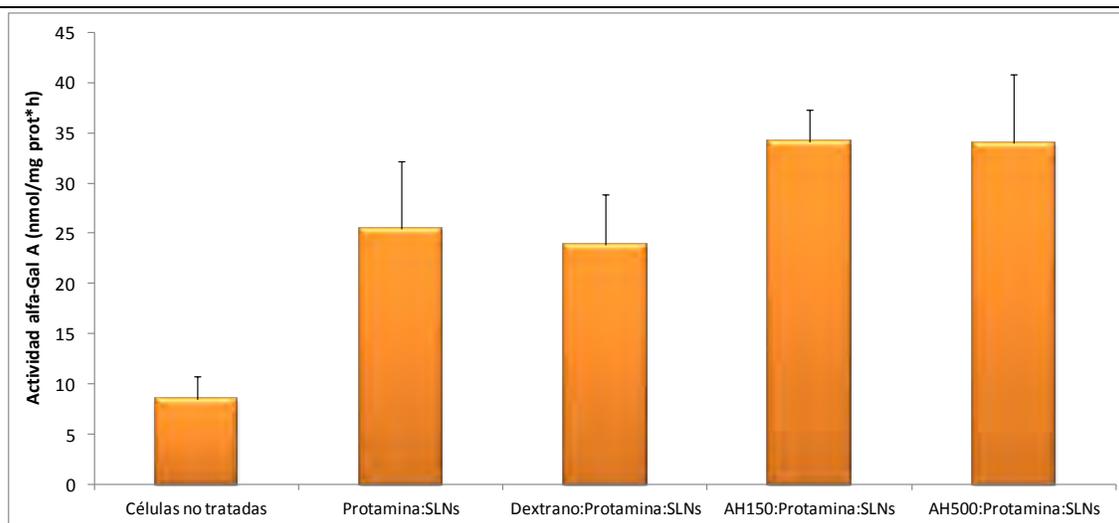
La EF es una alteración metabólica, multisistémica y grave, de carácter hereditario. Se trata de una enfermedad monogénica, ligada al cromosoma X, que se produce por diversas mutaciones en el gen de la  $\alpha$ -galactosidasa A ( $\alpha$ -Gal A). En condiciones normales esta enzima rompe la porción de  $\alpha$ -galactosilo terminal de la globotriaosilceramida Gb3, para dar galactosa y lactosilceramida. En los casos en los que la  $\alpha$ -Gal A es defectuosa, se acumula Gb3 principalmente en los lisosomas, pero también en el retículo endoplasmático, la membrana y en el núcleo de las células endoteliales vasculares, afectando de forma predominante a órganos como la piel, el sistema nervioso, el riñón y el corazón (63). La acumulación de Gb3 da lugar a manifestaciones clínicas diversas: neuropatía dolorosa, lesiones cutáneas, opacidad corneal, afectación renal, afectación cardíaca (hipertrofia del ventrículo izquierdo), manifestaciones neurológicas (accidente isquémico transitorio, crisis comiciales, lesiones isquémicas), manifestaciones gastrointestinales (dolor abdominal de tipo cólico y postprandial, diarrea autolimitada). La incidencia de la EF, que es considerada una enfermedad rara, no es bien conocida y oscila entre 1:117.000 y 1:476.000. La terapia enzimática sustitutiva (TES) es actualmente el único tratamiento. Existen dos medicamentos basados en la enzima recombinante aprobados por la EMA y por la Food and Drug Administration (FDA): agalsidasa alfa

(ReplagalTM®) y agalsidasa beta (Fabrazyme®). Estos medicamentos deben administrarse por vía parenteral cada dos semanas, y producen mejora de la patología renal y cardíaca además de reducir el dolor y mejorar la calidad de vida de los pacientes (65,66) pero su eficacia depende claramente de que se instaure en fases iniciales (67,68). Otro inconveniente es que desencadena la formación de anticuerpos anti- $\alpha$ -Gal A (69). También hay que considerar los efectos adversos (70), y el elevado coste del tratamiento; se estima que el coste anual por paciente es de aproximadamente 210.000 euros (71). Debido a las limitaciones de la terapia actual de la EF, existe una clara necesidad de buscar nuevas estrategias para mejorar la calidad de vida de los pacientes. La terapia génica para tratar la EF es una nueva opción terapéutica que ha ido ganando interés en los últimos años (72). Son varias las razones que hacen que esta enfermedad sea una buena candidata a ser tratada mediante terapia génica (73): 1) se debe a la alteración de un único gen, 2) con un nivel de actividad de tan solo el 15-20% del nivel normal se consigue eficacia clínica, 3) se puede conseguir efecto terapéutico a largo plazo, y 4) menor coste que la TES.

Para probar la utilidad de las SLNs en la EF, preparamos diferentes formulaciones con el plásmido pR-M10- $\alpha$ Gal A, que codifica para la  $\alpha$ -Gal A, a base de SLNs, protamina y dextrano. Los vectores fueron capaces de transfectar la línea celular HepG2 (células hepáticas de origen humano) e inducir la producción de  $\alpha$ -Gal A,

alcanzándose niveles de actividad hasta 12 veces superior con respecto a las células sin tratar (74). En un estudio posterior, evaluamos vectores preparados con SLNs, protamina y dextrano o AH de 150 y 500 kDa en una línea celular inmortalizada de células endoteliales obtenida a partir de células de un paciente con EF, denominada IMFE1 (75). Setenta y dos horas post-transfección, las células fueron capaces de expresar la enzima, siendo las formulaciones preparadas con AH las más eficaces, con un aumento de la actividad de la  $\alpha$ -Gal A de hasta 4 veces con respecto a las células sin tratar. Los resultados se

confirmaron mediante RT-PCR. En la figura 10 se recoge el nivel de actividad de la  $\alpha$ -Gal A en las células IMFE1 tratadas con los vectores (30). Como se ha comentado previamente, para esta enfermedad un pequeño incremento en la actividad es suficiente para obtener un efecto terapéutico a largo plazo, por lo que es de esperar que el aumento en la actividad  $\alpha$ -Gal A en las células tratadas con una única dosis del vector sea suficiente para conseguir efecto terapéutico in vivo.



**Figura 10. Actividad  $\alpha$ -Gal A en células IMFE1 tratadas con los diferentes vectores a base de SLNs.**

Como se ha comentado, en la EF se produce una acumulación de glucoesfingolípidos en las células, que son componentes del sistema de caveolas, implicado en los procesos de internalización de los sistemas nanoparticulados (76). Por tanto, los mecanismos implicados en la captación de nuestros vectores posiblemente están afectados por la alteración de las células como consecuencia de la enfermedad. De hecho, los estudios de internalización descartaron la entrada por endocitosis mediada por caveolas. Sí pudimos confirmar la co-localización de los vectores con los lisosomas, que facilitarían la liberación del plásmido del vector, donde se encuentra fuertemente condensado debido a la protamina. Estos resultados confirman una vez más, la importancia no solo del vector si no de la célula diana en el proceso de diseño de un vector no viral para terapia génica.

En resumen, nuestro estudio demuestra por primera vez la eficacia de vectores no virales a base de SLNs para transfectar un modelo celular de la EF, induciendo un incremento significativo en la actividad  $\alpha$ -Gal A.

#### 6.2. Enfermedades infecciosas: Virus de la hepatitis C (VHC)

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre 3 y 4 millones de personas se infectan cada año con el VHC, y aproximadamente 150 millones presentan infección crónica, que puede derivar en cirrosis y/o hepatocarcinoma. Se estima que 350.000 personas mueren cada año como consecuencia de la infección por

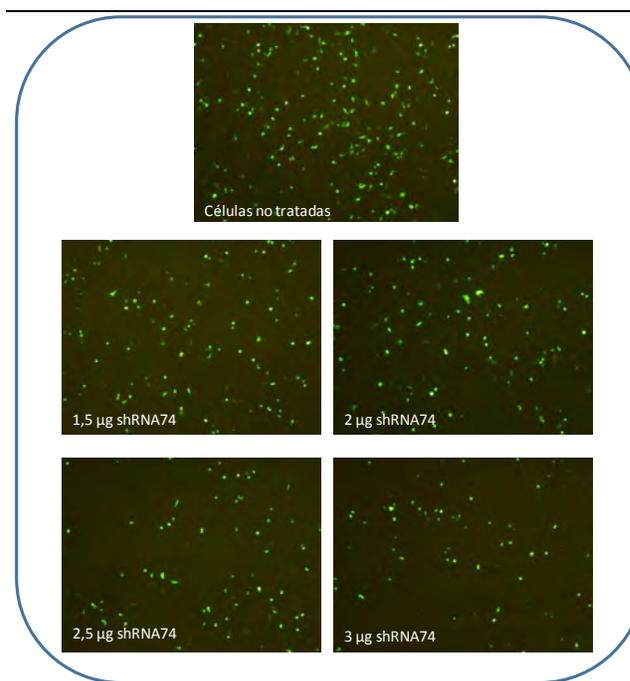
VHC (77). Los nuevos inhibidores de proteasas como el simeprevir o sofosbuvir han mejorado sustancialmente la respuesta antiviral (78); sin embargo, es de esperar que con su uso, debido a la presión farmacológica se seleccionen resistencias frente a estos nuevos fármacos, ya que el virus presenta una alta tasa de mutación (79). Además, el tratamiento es excesivamente caro y debe administrarse conjuntamente con otros fármacos, como el interferón pegilado y la ribavirina, que incrementan la posibilidad de aparición de efectos adversos (80). Por ello, es evidente la necesidad de desarrollar nuevos antivirales más efectivos, más seguros y de menor coste para el tratamiento de aquellos pacientes para los que los fármacos actuales no son efectivos. En este sentido, el ARNi se postula como una prometedora estrategia (81).

Desde el descubrimiento del ARNi, muchos estudios han demostrado su potencial como estrategia terapéutica, y actualmente representa una interesante herramienta para el control y/o tratamiento de enfermedades, como el cáncer (82), enfermedades neurodegenerativas (83), y enfermedades infecciosas (81). Entre las enfermedades infecciosas que pueden ser potencialmente tratadas con ARNi, destacan las infecciones debidas al virus de la inmunodeficiencia humana, al virus de la hepatitis B o al VHC (84). En la mayoría de los casos, con la terapia génica se busca el bloqueo de genes del agente infeccioso.

El genoma del VHC consta de una sola cadena de ARN (+), que se replica en el citoplasma celular, y por tanto,

este virus puede ser un buen candidato para el tratamiento con ARNi a través del silenciamiento de secuencias específicas de su ARN. En este sentido, la secuencia denominada “Sitio Interno de Entrada al Ribosoma” (IRES), que se encuentra en el extremo 5' de la región no traducida (UTR) y que es necesaria para la síntesis proteica y por tanto para la replicación del virus, ha sido propuesta como secuencia diana para la inhibición del virus (85,86).

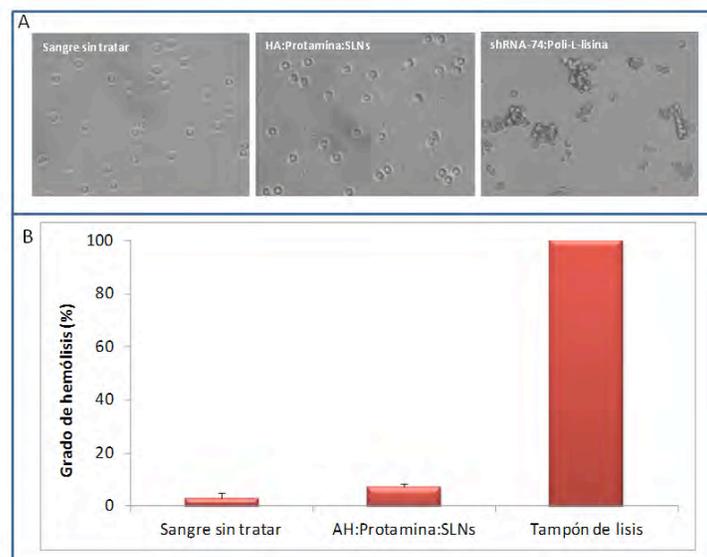
Teniendo en cuenta estas consideraciones, estudiamos la potencial aplicación de los vectores preparados con SLNs, protamina y dextrano o AH, para el tratamiento de la infección crónica debida al VHC, a los que incorporamos un plásmido que codifica un ARNi frente al dominio II de la secuencia IRES-VHC (shRNA74) (31,32). Puesto que el VHC se replica y acantona en el interior de los hepatocitos a lo largo de su ciclo de vida, los estudios in vitro de eficacia de silenciamiento los llevamos a cabo en las líneas celulares HepG2 y Huh-7 (células de hepatoma de origen humano). Los vectores fueron internalizados en las células de forma rápida y eficiente, independientemente del polisacárido empleado, siendo el principal mecanismo de entrada la endocitosis mediada por clatrin, y en menor medida la endocitosis mediada por caveolas. La captación mediada por el receptor CD44 también estaba implicada, aunque este mecanismo resultó ser mucho menos eficiente para el silenciamiento. Asimismo, se comprobó que la macropinocitosis no intervenía en el proceso de entrada a la célula. Al tratar células HepG2 y Huh-7 con los vectores que expresaban IRES-GFP tras un proceso previo de transfección, se comprobó una disminución del IRES-GFP, consecuencia del proceso de silenciamiento debido al shRNA74 incorporado en los vectores. Independientemente de la presencia de AH o dextrano en el vector, el silenciamiento incrementaba al aumentar la dosis; además, resultó ser más eficaz el vector preparado con AH, que permitió alcanzar, para la dosis más alta (3  $\mu\text{g}$  de shRNA74), un silenciamiento del 60% en las células HepG2, y un 50% en las células Huh-7. En la figura 11 se recogen imágenes de las células Huh-7 en las que se puede observar como la expresión de IRES-GFP disminuye al aumentar la dosis de shRNA74 en el vector preparado con AH.



**Figura 11. Expresión de IRES-GFP en células Huh-7 tratados con los vectores preparados con SLNs, AH y cantidades crecientes de shRNA74.** Puede observarse como la eficacia de silenciamiento aumenta al aumentar la dosis de shRNA74.

Posteriormente, evaluamos la eficacia de los vectores en la línea celular de hepatoma humano Huh-7 NS3-3 (87), que porta un replicón subgenómico del virus. Se observó una disminución significativa de la cantidad de ARN del VHC, indicativo del silenciamiento del IRES-VHC, siendo este más elevado cuanto mayor es la dosis de shRNA74.

Estudiamos también la potencial toxicidad de los vectores en los dos modelos celulares, y comprobamos que la viabilidad celular no se veía alterada. Puesto que la viabilidad celular por sí sola no es indicativo de toxicidad, y teniendo en cuenta una posible administración parenteral, evaluamos el efecto del vector a nivel hematológico midiendo el grado de hemólisis y la capacidad de aglutinación de eritrocitos. El vector no mostró actividad hemolítica ni tampoco indujo la aglutinación de eritrocitos indicativo de la biocompatibilidad del vector (figura 12). Es importante tener en cuenta que al AH se le atribuye la capacidad de reducir la interacción de las nanopartículas con componentes sanguíneos debido a un impedimento estérico.



**Figura 12. A) Estudio de aglutinación de eritrocitos con los vectores AH:protamina:SLNs. Tampón de lisis: control positivo (100 % lisis). B) Actividad hemolítica de los vectores. shRNA74:PLL: complejo formado por el plásmido shRNA74 y poli-L-lisina (control positivo).**

Estos resultados obtenidos con los vectores preparados con SLNs y el plásmido shRNA74 confirman la potencial utilidad de los vectores no virales basados en SLNs en el tratamiento de la infección crónica por el VHC.

## 7. CONCLUSIONES

El éxito de la terapia génica depende en gran medida del sistema de administración. Los vectores no virales, y más concretamente, las SLNs han demostrado tener propiedades muy adecuadas para la administración de ácidos nucleicos, entre los que cabe destacar la seguridad, la facilidad de producción a gran escala, la estabilidad tanto en fluidos biológicos como durante el almacenamiento, y la posibilidad de ser sometidas a procesos de esterilización y liofilización. En nuestros estudios hemos demostrado que las SLNs presentan una gran capacidad para proteger al material genético de la degradación enzimática y de ser rápida y eficientemente captadas por las células, aunque el grado de captación depende de la composición y de la línea celular. En este sentido, hemos puesto de manifiesto la importancia que tiene el conocimiento de los mecanismos de internalización y disposición intracelular para la optimización de la formulación. Además, por primera vez hemos demostrado la capacidad de un vector no viral basado en SLNs para transfectar e inducir la expresión de proteínas en diferentes tejidos tras su administración sistémica a ratones. Finalmente, hemos estudiado la potencial utilidad de los vectores preparados a base de SLNs para el tratamiento mediante terapia génica de enfermedades raras monogénicas, como la EF o la XLRS, y de enfermedades infecciosas con ARNi, como la infección crónica por el VHC. El principal logro conseguido por nuestro grupo de investigación ha sido la

restauración parcial de la retina tras la administración intraocular a ratones de un vector preparado con SLNs y el gen *RS1*, que codifica la proteína retinosquisina, deficiente en la enfermedad degenerativa de la retina XLRS, en la que se da una desestructuración de la retina que conduce a la pérdida de visión. Todos nuestros resultados nos permiten concluir que las SLNs son una prometedora herramienta como sistema no viral para terapia génica.

## 8. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación recibida del Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco (IT-341-10), el Departamento de Industria de Gobierno Vasco (programa Saiotek), del Ministerio de Economía y Competitividad (SAF SAF2010-19862, SAF2014-53092-R), y de la fundación Genzyme.

## 9. REFERENCIAS

1. EMA (2015) Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. Draft. EMA/CAT/80183/2014. European Medicines Agency.
2. Huang F, Yu CJ, Guo Y. Nucleic acids as regulatory molecules. In: Johnson PH, Ed. RNA Interference. Applications to drug discovery and challenges to pharmaceutical development. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc 2011; pp.12-49.
3. Lee J, Boczkowski D, Nair S. Programming human dendritic cells with mRNA. *Methods Mol Biol* 2013; 969: 111-25.
4. Hecker JG. Nonviral, cationic lipid-mediated delivery of mRNA. *Methods Mol Biol* 2013; 969: 73-88.

5. Phua KK, Nair SK, Leong KW. Messenger RNA (mRNA) nanoparticle tumour vaccination. *Nanoscale* 2014; 6: 7715-29.
6. Rodríguez-Gascón A, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA. Development of nucleic acid vaccines: use of self-amplifying RNA in lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 1833-43.
7. Lares MR, Rossi JJ, Ouellet DL. RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications. *Trends Biotechnol* 2010; 28: 570-9.
8. Moore CB, Guthrie EH, Huang MT, Taxman DJ. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol* 2010; 629: 141-58.
9. Zhang Y, Wang Z, Gemeinhart RA. Progress in microRNA delivery. *J Control Release* 2013; 172: 962-974.
10. Liu F, Shollenberger LM, Conwell CC, Yuan X, Huang L. Mechanism of naked DNA clearance after intravenous injection. *J Gene Med* 2007; 9: 613-619.
11. Rodríguez-Gascón A, del Pozo-Rodríguez A, Isla A, Solinís MA. Vaginal gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; 92: 71-83.
12. Del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA, Gascón AR, Pedraz JL. Terapia génica. Concepto, sistemas de administración y aplicaciones. *Industria Farmacéutica* 2006; 128: 86-99.
13. The Journal of Gene Medicine Clinical Trial Site. 2016. Jon Wiley and Sons Ltd. Disponible en <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinic/al/>.
14. Sheridan C. Gene therapy finds its niche. *Nat Biotechnol* 2011; 29: 121-8.
15. Molla MR, Levkin PA. Combinatorial Approach to Nanoarchitectonics for Nonviral Delivery of Nucleic Acids. *Adv Mater* 2016; 28: 1159-1175.
16. Ramamoorth M, Narvekar A. Non viral vectors in gene therapy-an overview. *J Clin Diagn Res* 2015; 9: GE01-6.
17. Rodríguez-Gascón A, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA. Non-viral delivery systems in gene therapy. In Martín-Molina F, Ed. *Gene Therapy. Tools and potential applications*. Croatia: Intech 2013 pp: 3-33.
18. Young JL, Dean DA. Electroporation-mediated gene delivery. *Adv Genet* 2015; 89: 49-88.
19. Stoller F, Schlegel A, Viecelli HM, *et al*. Hepatocyte Transfection in small pigs after weaning by hydrodynamic intraportal injection of naked DNA/minicircle vectors. *Hum Gene Ther Methods* 2015; 26: 181-92.
20. Pan R, Xu W, Ding Y, Lu S, Chen P. Uptake mechanism and direct translocation of a new CPP for siRNA delivery. *Mol Pharm* 2016; 13: 1366-74.
21. Wang M, Wu B, Tucker JD, Lu P, Lu Q. Poly(ester amine) Constructed from Polyethylenimine and Pluronic for Gene Delivery in vitro and in vivo. *Drug Deliv* 2016; 10: 1-23.
22. Bose RJ, Arai Y, Ahn JC, Park H, Lee SH. Influence of cationic lipid concentration on properties of lipid-polymer hybrid nanospheres for gene delivery. *Int J Nanomedicine* 2015; 10: 5367-82.
23. Schwarz C, Mehnert W, Lucks JS, Müller RH. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *J Control Rel* 1994; 30: 83-96.
24. del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA, Gascón AR, Pedraz JL. Short- and long-term stability study of lyophilized solid lipid nanoparticles for gene therapy. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 71: 181-9.
25. Swathi G, Prasanthi NL, Manikiran SS, Ramarao N. Solid Lipid Nanoparticles: Colloidal Carrier Systems for Drug Delivery. *IJPSR* 2010; 1:1-16.
26. Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54 (Suppl): S131-S55.
27. Olbrich C, Bakowsky U, Lehr C-M, Müller RH, Kneuer C. Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. *J Control Release* 2001; 77: 345-55.
28. Rodríguez-Gascón A, Solinís MA, del Pozo-Rodríguez A, Delgado D, Pedraz JL, inventors; University of the Basque Country UPV/EHU, assignee. Lipid Nanoparticles For Gene Therapy, P200901664, PCT/ES/2010/070519, WO 2011/015701 A3, US2012/0183589 A1, 2011.
29. Rodríguez-Gascón A, Solinís MA, del Pozo-Rodríguez A, Delgado D, Fernández E, inventors; University of the Basque Country UPV/EHU, Universidad Miguel Hernández de Elche, assignees Lipid Nanoparticles for Treating Ocular Diseases. P201031897, PCT/ES2011/070883, US2013/0234592 A1, WO2011015701 (A3), 2012.
30. Ruiz de Garibay AP, Solinís MA, del Pozo-Rodríguez A, Apaolaza PS, Shen JS, Rodríguez-Gascón A. Solid lipid nanoparticles as non-viral vectors for gene transfection in a cell model of Fabry disease. *J Biomed Nanotechnol* 2015; 11: 500-11.
31. Torrecilla J, del Pozo-Rodríguez A, Apaolaza PS, Solinís MA, Rodríguez-Gascón A. Solid lipid nanoparticles as non-viral vector for the treatment of chronic hepatitis C by RNA interference. *Int J Pharm* 2015; 479: 181-8.
32. Torrecilla J, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA, *et al*. Silencing of hepatitis C virus replication by a non-viral vector based on solid lipid nanoparticles containing a shRNA targeted to the internal ribosome entry site (IRES). *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016; 146: 808-17.
33. Apaolaza PS, Del Pozo-Rodríguez A, Torrecilla J, *et al*. Solid lipid nanoparticle-based vectors intended for the treatment of X-linked juvenile retinoschisis by gene therapy: In vivo approaches in Rs1h-deficient mouse model. *J Control Release* 2015; 217: 273-83.

34. del Pozo-Rodríguez A, Delgado D, Solinís MA, *et al.* Solid lipid nanoparticles as potential tools for gene therapy: in vivo protein expression after intravenous administration. *Int J Pharm* 2010; 385: 157-62.
35. Delgado D, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA, Bartkowiak A, Rodríguez-Gascón A. New gene delivery system based on oligochitosan and solid lipid nanoparticles: 'in vitro' and 'in vivo' evaluation. *Eur J Pharm Sci.* 2013 Nov 20;50(3-4):484-91.
36. Battaglia L, Serpe L, Foglietta F, *et al.* Application of lipid nanoparticles to ocular drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2016; 24: 1-15.
37. Gottfried LF, Dean DA. Extracellular and Intracellular Barriers to Non-Viral Gene Transfer. In: Wei M, Good D, Eds. *Novel Gene Therapy Approaches.* Croatia: InTech 2013; pp.75-88.
38. del Pozo-Rodríguez A, Delgado D, Solinís MA, Gascón AR, Pedraz JL. Solid lipid nanoparticles for retinal gene therapy: transfection and intracellular trafficking in RPE cells. *Int J Pharm* 2008; 360: 177-83.
39. Ruiz de Garibay AP, Solinís MA, Rodríguez-Gascón A, Ganjian H, Fuchs R. Role of endocytic uptake in transfection efficiency of solid lipid nanoparticles-based nonviral vectors. *J Gene Med* 2013; 15: 427-40.
40. Delgado D, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA, Gascón A.R. Understanding the mechanism of protamine in solid lipid nanoparticle-based lipofection: the importance of the entry pathway. *Eur J Pharm Biopharm* 2011; 79: 495-502.
41. Biegeleisen K. The probable structure of the protamina-DNA complex. *J Theor Biol* 2006; 241: 533-40.
42. Vighi E, Montanari M, Ruozi B, Tosi G, Magli A, Leo E. Nuclear localization of cationic solid lipid nanoparticles containing protamine as transfection promoter. *Eur J Pharm Biopharm* 2010; 76: 384-93.
43. del Pozo-Rodríguez A, Delgado D, Solinís MA, Gascón AR, Pedraz JL. Solid lipid nanoparticles: formulation factors affecting cell transfection capacity. *Int J Pharm* 2007; 339: 261-8.
44. del Pozo-Rodríguez A, Delgado D, Gascón AR, Solinís MÁ. Lipid nanoparticles as drug/gene delivery systems to the retina. *J Ocul Pharmacol Ther* 2013; 29: 173-88. doi: 10.1089/jop.2012.0128.
45. El-Sayed A, Khalil IA, Kogure K, Futaki S, Harashima H. Octaarginine- and octalysine-modified nanoparticles have different modes of endosomal escape. *J Biol Chem* 2008; 283: 23450-61.
46. del Pozo-Rodríguez A, Pujals S, Delgado D, *et al.* A proline-rich peptide improves cell transfection of solid lipid nanoparticle-based non-viral vectors. *J Control Release* 2009; 133: 52-9.
47. Fernández-Carneado J, Kogan MJ, Castel S, Giralte E. Potential peptide carriers: amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of gamma-zein. *Angew Chem Int Ed Engl* 2004; 43: 1811-4.
48. Masuda T, Akita H, Harashima H. Evaluation of nuclear transfer and transcription of plasmid DNA condensed with protamine by microinjection: the use of a nuclear transfer score. *FEBS Lett* 2005; 579: 2143-8.
49. Delgado D, Gascón AR, del Pozo-Rodríguez A, *et al.* Dextran-protamine-solid lipid nanoparticles as a non-viral vector for gene therapy: in vitro characterization and in vivo transfection after intravenous administration to mice. *Int J Pharm* 2012; 425: 35-43.
50. Ruponen M, Rönkkö S, Honkakoski P, Pelkonen J, Tammi M, Urtti A. Extracellular glycosaminoglycans modify cellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *J Biol Chem* 2001; 276: 33875-80.
51. de la Fuente M, Seijo B, Alonso MJ. Novel hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for ocular gene therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 2016-24.
52. Apaolaza PS, Delgado D, del Pozo-Rodríguez A, Gascón AR, Solinís MÁ. A novel gene therapy vector based on hyaluronic acid and solid lipid nanoparticles for ocular diseases. *Int J Pharm* 2014; 465: 413-26.
53. Ito T, Iida-Tanaka N, Niidome T *et al.* Hyaluronic acid and its derivative as a multi-functional gene expression enhancer: protection from non-specific interactions, adhesion to targeted cells, and transcriptional activation. *J Control Release* 2006; 112: 382-8.
54. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, *et al.* Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 1990; 323: 570-8.
55. Molday RS, Kellner U, Weber BH. X-linked juvenile retinoschisis: clinical diagnosis, genetic analysis, and molecular mechanisms. *Prog Retin Eye Res* 2012; 31: 195-212.
56. Molday LL, Hicks D, Sauer CG, Weber BH, Molday RS. Expression of X-linked retinoschisis protein RSL1 in photoreceptor and bipolar cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:8 16-25.
57. Sauer CG, Gehrig A, Warneke-Wittstock R, *et al.* Positional cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis. *Nat Genet* 1997; 17: 164-70.
58. Weber BH, Schrewe H, Molday LL, *et al.* Inactivation of the murine X-linked juvenile retinoschisis gene, Rsl1h, suggests a role of retinoschisin in retinal cell layer organization and synaptic structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 6222-7.
59. Solinís MA, del Pozo-Rodríguez A, Apaolaza PS, Rodríguez-Gascón A. Treatment of ocular disorders by gene therapy. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; 95: 331-42.
60. Delgado D, Rodríguez-Gascón A, Solinís MA, Aspiazu MA, del Pozo-Rodríguez A, Pedraz JL.

- Terapia génica aplicada al tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina. *Industria Farmacéutica* 2008;139:98-105.
61. Delgado D, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA, et al. Dextran and protamine-based solid lipid nanoparticles as potential vectors for the treatment of X-linked juvenile retinoschisis. *Hum Gene Ther* 2012; 23: 345-55.
  62. Apaolaza PS, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MA, et al. Structural recovery of the retina in a retinoschisin-deficient mouse after gene replacement therapy by solid lipid nanoparticles *Biomaterials* 2015; 90: 40-9.
  63. Barbado Hernández FJ. Biografía de la enfermedad de Fabry. *Med Clin Monogr* 2010;11:3-6.
  64. Quinta R, Rodrigues D, Assunção M, et al. Reduced glucosylceramide in the mouse model of Fabry disease: correction by successful enzyme replacement therapy. *Gene* 2014; 536:97-104.
  65. Ramaswami U. Update on role of agalsidase alfa in management of Fabry disease. *Drug Des Devel Ther* 2011; 15: 155-173
  66. Hoffman B, Garcia de Lorenzo A, Mehta A, et al. Effects of enzyme replacement therapy on pain and health related quality of life in patients with Fabry disease: data from FOS (Fabry Outcome Survey). *J Med Genet* 2005; 42: 247-252.
  67. Germain DP, Charrow J, Desnick RJ, et al. Ten-year outcome of enzyme replacement therapy with agalsidase beta in patients with Fabry disease. *J Med Genet* 2015; 52: 353-8.
  68. Seydelmann N, Wanner C, Störk S, Ertl G, Weidemann F. Fabry disease and the heart. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2015; 29: 195-204.
  69. Wilcox WR, Linthorst GE, Germain DP, et al. Anti-alpha galactosidase A antibody response to agalsidase beta treatment: data from the Fabry Registry. *Mol Genet Metab* 2012; 105: 443-9.
  70. Hopkin RJ, Cabrera G, Charrow J. Risk factors for severe clinical events in male and female patients with Fabry disease treated with agalsidase beta enzyme replacement therapy: Data from the Fabry Registry. *Mol Genet Metab* 2016; 119: 151-9.
  71. Vedder AC, Linthorst GE, Houge G, et al. Treatment of Fabry disease: outcome of a comparative trial with agalsidase alfa or beta at a dose of 0.2 mg/Kg. *PLoS One* 2007; 2: e598.
  72. Hollak CE, Vedder AC, Linthorst GE, Aerts JM. Novel therapeutic targets for the treatment of Fabry disease. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11: 821-33.
  73. Ruiz de Garibay A, Solinís MA, Rodríguez-Gascón A. Gene therapy for Fabry disease: a Review of the literature. *BioDrugs* 2013; 27: 237-46.
  74. Ruiz de Garibay AP, Delgado D, Del Pozo-Rodríguez A, Solinís MÁ, Gascón AR. Multicomponent nanoparticles as nonviral vectors for the treatment of Fabry disease by gene therapy. *Drug Des Devel Ther* 2012; 6: 303-310.
  75. Shen JS, Meng XL, Schiffmann R, Brady RO, Kanetski CR. Establishment and characterization of Fabry disease endothelial cells with an extended lifespan. *Mol Genet Metab* 2007; 92: 137-44.
  76. Shu L, Shayman JA. Caveolin-associated accumulation of globotriaosylceramide in the vascular endothelium of alpha-galactosidase A null mice. *J Biol Chem* 2007; 282: 20960-7.
  77. Hepatitis C. Fact sheet. World Health Organization. 2016. Disponible en: (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>)
  78. Pungpapong S, Aql B, Leise M, et al. Multicenter experience using simeprevir and sofosbuvir with or without ribavirin to treat hepatitis C genotype 1 after liver transplant. *Hepatology* 2015; 61:1880-6.
  79. Romano KP, Ali A, Aydin C, et al. The Molecular Basis of Drug Resistance against Hepatitis C Virus NS3/4A Protease Inhibitors. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002832.
  80. Preciado MV, Valva P, Escobar-Gutierrez A, et al. Hepatitis C virus molecular evolution: transmission, disease progression and antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 15992-6013.
  81. Chandra PK, Kundu AK, Hazari S, et al. Inhibition of hepatitis C virus replication by intracellular delivery of multiple siRNAs by nanosomes. *Mol Ther* 2012; 20: 1724-36.
  82. Huang PI, Lo WL, Cherng JY, Chien Y, Chiou GY, Chiou SH. Non-viral delivery of RNA interference targeting cancer cells in cancer gene therapy. *Curr Gene Ther* 2012; 12:275-84.
  83. González-Alegre P. ARN de interferencia terapéutico para enfermedades neurodegenerativas. *Rev Neurol* 2008; 47: 641-7.
  84. Torrecilla J, Rodríguez-Gascón A, Solinís MÁ, del Pozo-Rodríguez A. Lipid nanoparticles as carriers for RNAi against viral infections: current status and future perspectives. *Biomed Res Int* 2014; 161794.
  85. Moon JS, Lee SH, Kim EJ, et al. Inhibition of Hepatitis C Virus in Mice by a Small Interfering RNA Targeting a Highly Conserved Sequence in Viral IRES Pseudoknot. *PLoS One* 2016; 11:e0146710.
  86. Komar AA, Hatzoglou M. Exploring Internal Ribosome Entry Sites as Therapeutic Targets. *Front Oncol* 2015; 5: 233.
  87. Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999; 285:110-3.



# Tuberin protein: therapeutic target to activate autophagy and mitophagy avoiding the progression to type 2 diabetes

**Title in Spanish:** *La proteína tuberina: diana terapéutica para activar autofagia y mitofagia evitando la progresión a la diabetes tipo 2*

Ana García Aguilar<sup>1,\*</sup>, Carlos Guillén Viejo<sup>1</sup>, Manuel Benito de las Heras<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Pza. Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid.

**ABSTRACT:** Cytoplasmic quality control is essential in maintaining cell viability, and particularly,  $\beta$  pancreatic cells, due to its huge protein synthesis capacity. In this context, it is important the activation of a physiological process called autophagy, in order to eliminate protein aggregates and damaged organelles, resulting in a reduction in the reticulum cell stress. The complex formed by hamartin and tuberin (TSC1-TSC2) has emerged as a central signal, energy status and nutrient-integrating node within the cell. This complex negatively regulates the mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1), and activates autophagy. In this project we aimed to further investigate new molecular mechanisms of TSC2 regulation, as well as cytoplasmic quality control, autophagy and mitophagy ones. We propose that the TSC2 acetylation status, mediated by the deacetylation activity of sirtuin1 (SIRT1), modulates its stability and protein activity, affecting cell homeostasis.

**RESUMEN:** El control de calidad citoplasmático es esencial en el mantenimiento de la viabilidad celular, y particularmente, de las células  $\beta$  pancreáticas, debido a su gran capacidad de síntesis proteica. En este contexto, juega un papel esencial la activación de un proceso fisiológico denominado autofagia, conduciendo a la eliminación de agregados proteicos y/o orgánulos, induciendo la atenuación del estrés de retículo celular. El complejo formado por las proteínas hamartina y tuberina (TSC1-TSC2) ha emergido como un núcleo de integración de la señalización de factores de crecimiento y del estado energético celular. Este complejo funciona como un inhibidor de la actividad de la vía del complejo mecanicístico diana de la rapamicina (mTORC1) y un activador de la autofagia. En este proyecto queremos profundizar en el estudio de nuevos mecanismos moleculares de regulación de TSC2, así como sobre dichos mecanismos de control de calidad citoplasmático, autofagia y mitofagia. Proponemos que el estado de acetilación en lisinas de TSC2, mediado por la actividad desacetilasa de la sirtuina1 (SIRT1), modula la estabilidad y actividad de la misma afectando a la homeostasis celular.

\*Corresponding Author: ana.garcia.aguilar@ucm.es

Received: October 28, 2016 Accepted: February 13, 2017

Premio "Real Academia Nacional de Farmacia" del Concurso científico 2016 de la Real Academia Nacional de Farmacia

An Real Acad Farm Vol. 82, N° 4 (2016), pp. 424-442

Language of Manuscript: Spanish

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Diabetes tipo 2 y papel de la célula $\beta$ pancreática en la homeostasis metabólica

#### 1.1.a. La diabetes en la actualidad

La diabetes mellitus (DM) constituye uno de los principales problemas de salud pública en la actualidad ya que ha alcanzado proporción epidémica, y actualmente afecta a 415 millones de personas en todo el mundo. De acuerdo con predicciones de la OMS, se prevé que sean 642 millones en 2040, lo cual supondría un aumento de la prevalencia desde el 9,1% en 2015 al 10% en 2040. La mitad de los pacientes con diabetes no están diagnosticados (1).

#### 1.1.b. Etiología y fisiopatología de la diabetes tipo 2

La DM es una enfermedad caracterizada por un aumento en los niveles plasmáticos de glucosa tanto en ayuno como en estados postabsortivos, y está asociada a numerosas complicaciones, principalmente cardiovasculares, que conducen al desarrollo de patologías si no se recibe el tratamiento adecuado. Es una enfermedad de carácter poligénico y se da principalmente en adultos. La DM 2 se caracteriza por una disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus acciones biológicas en tejidos diana típicos como el músculo esquelético, el hígado o el tejido adiposo. Este fenómeno se conoce con el nombre de resistencia a insulina.

Tuberin protein: therapeutic target to activate autophagy and mitophagy avoiding the progression to type 2 diabetes

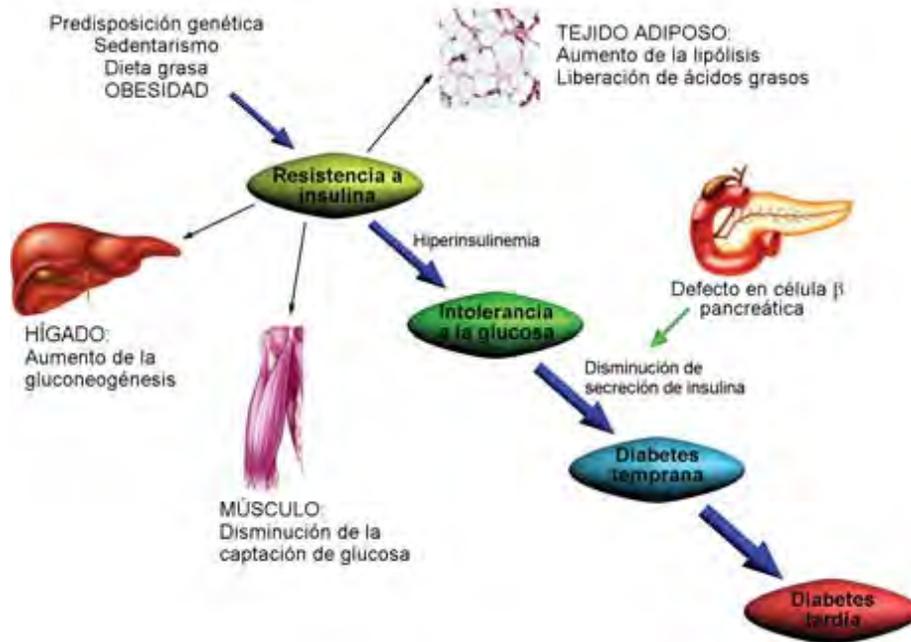
Aunque se desconocen las causas exactas del desarrollo de DM 2, hay numerosos factores de riesgo que están asociados a esta enfermedad, los más importantes son la obesidad, inactividad física, factores genéticos, y el envejecimiento.

Estudios epidemiológicos indican que la diabetes tipo 2 progresa a lo largo de un continuo empeoramiento en la respuesta a insulina, comenzando por una resistencia periférica a la acción de la misma y terminando con la pérdida de secreción por parte de las células  $\beta$  del páncreas (Figura 1).

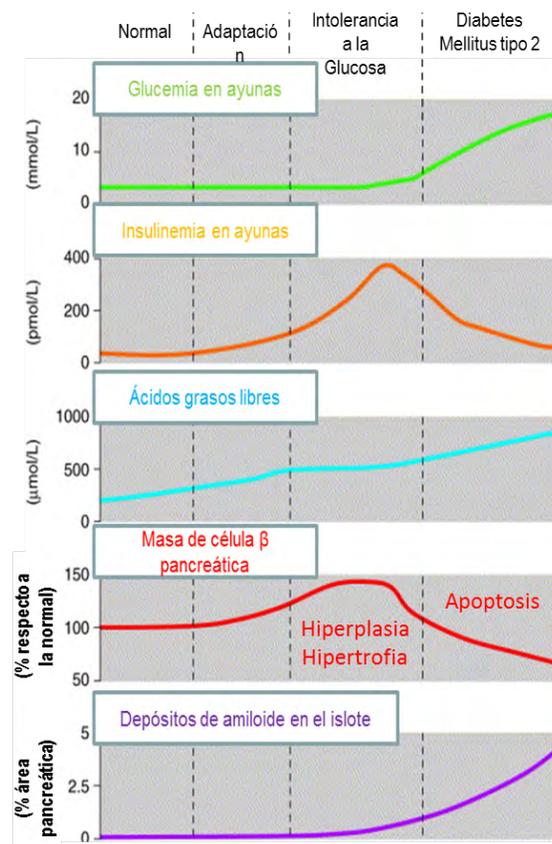
Las células  $\beta$  pancreáticas son fundamentales en la regulación de la homeostasis metabólica, y en los primeros

estadios presentan mecanismos compensatorios como aumento de la masa celular (hiperplasia) y del tamaño (hipertrofia) para suplir la alta demanda de insulina, generando un estado de hiperinsulinemia compensada, lo que contribuye a largo plazo a agravar este desorden metabólico.

El exceso prolongado de insulina circulante hace que las células  $\beta$  no puedan mantener el mecanismo de compensación y fallan a la hora de responder apropiadamente a la glucosa, lo cual desemboca en el desarrollo de intolerancia a la glucosa y la aparición de una diabetes manifiesta (Figura 2).



**Figura 1. Etapas en el desarrollo de la diabetes tipo 2.** Figura del capítulo Resistencia a insulina en el músculo esquelético: ejercicio y activación de receptores nucleares como estrategias terapéuticas. Redes de señalización y estrategias terapéuticas (2).



**Figura 2. Progresión a la diabetes tipo 2.** Se representan los niveles de glicemia en ayunas, insulinemia en ayunas, ácidos grasos libres, masa de célula  $\beta$  pancreática y depósitos de amiloide en cada una de las fases de la progresión a la diabetes tipo 2. El punto de inflexión lo representa el fracaso de la célula  $\beta$ , lo que conlleva una disminución de la insulina circulante y la manifestación de la diabetes. Figura adaptada de (3).

### 1.2. Papel de la restricción calórica en la homeostasis de las células $\beta$ pancreáticas

Se sabe que la esperanza de vida de muchos organismos aumenta al ser sometidos a dietas restringidas en calorías, pero dentro de los parámetros saludables (4). En 1935, McCay et al. publican el primer trabajo donde someten ratas a una restricción calórica (RC) y observan que se extiende su esperanza media de vida (5). Estudios posteriores en otros organismos (levadura, moscas, gusanos y peces) demostraron que la RC retarda el envejecimiento y atenúa la aparición de algunas enfermedades crónicas como diabetes, obesidad y enfermedades vasculares (6). La RC activa la quinasa de la adenina mononucleótido (AMPK), la cual aumenta los niveles de  $\text{NAD}^+$  y activa a SIRT1 (7). Además, se ha sugerido que SIRT1 aumenta la longevidad de los organismos y protege frente al cáncer (8). Por otro lado, SIRT1 inhibe la proliferación ya que regula negativamente a mTORC1 (9).

#### 1.2.a. La vía AMPK y su papel en la célula $\beta$ pancreática

La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) es

muy importante en el mantenimiento de la homeostasis energética celular. Se activa cuando existen niveles bajos de ATP, en situaciones de bajos niveles de glucosa, hipoxia, isquemia, o choque térmico. La vía de la AMPK regula positivamente procesos catabólicos como la autofagia o la oxidación de ácidos grasos, para la obtención de ATP. AMPK juega un relevante papel en la fisiología de la célula  $\beta$  pancreática, y es considerada como una diana terapéutica prometedora en el tratamiento de la diabetes tipo 2.

#### 1.2.b. Las sirtuinas y la regulación del metabolismo

Las sirtuinas o desacetilasas de histonas de clase III, cuyo nombre proviene del ortólogo en levaduras *Sir2*, constituyen una familia de enzimas altamente conservadas en la evolución. Las sirtuinas catalizan la desacetilación de proteínas con lisinas  $\epsilon$ -amino-acetiladas, utilizando como cosustrato dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidado ( $\text{NAD}^+$ ). Se conocen siete sirtuinas en mamíferos (SIRT1-7) cuyas características se encuentran resumidas en la siguiente tabla (Tabla 1).

**Tabla 1. Distribución subcelular y papel fisiológico de los siete isotipos de sirtuinas.**

<b>Isotipo</b>	<b>Localización subcelular</b>	<b>Expresión en tejidos</b>	<b>Funciones</b>	<b>Actividad enzimática</b>
SIRT1	Nuclear y citosólica	Cerebro, músculo esquelético, corazón, riñón, y útero	Supervivencia, longevidad, regulación del metabolismo, inflamación, respuesta a estrés oxidativo	Desacetilasa NAD <sup>+</sup> dependiente
SIRT2	Citosólica y nuclear	Cerebro	Regulación del ciclo celular, desarrollo del sistema nervioso.	Desacetilasa NAD <sup>+</sup> dependiente
SIRT3	Mitocondrial, nuclear y citosólica	Cerebro, corazón, hígado, riñón, tejido adiposo marrón	Regulación del metabolismo mitocondrial	Desacetilasa NAD <sup>+</sup> dependiente
SIRT4	Mitocondrial	Células $\beta$ pancreáticas, hígado, riñón, corazón, cerebro	Regulación del metabolismo mitocondrial y apoptosis	ADP-ribosiltransferasa
SIRT5	Mitocondrial	Cerebro, corazón, músculo.	Apoptosis	Desacetilasa NAD <sup>+</sup> dependiente
SIRT6	Núcleo, asociado a heterocromatina	Músculo, cerebro, corazón, ovario y hueso	Estabilidad genómica, reparación del DNA	Desacetilasa NAD <sup>+</sup> dependiente, ADP-ribosiltransferasa
SIRT7	Nucleolo	Sangre	Regulación de la transcripción y del ciclo celular	Desacetilasa NAD <sup>+</sup> dependiente

De los siete isotipos de sirtuinas en mamíferos, es SIRT1 la proteína más estudiada de la familia. Aunque SIRT1 se encuentra predominantemente en el núcleo, también puede localizarse en el citoplasma en determinadas situaciones gracias a que en su estructura proteica presenta secuencias de localización y de exclusión nuclear (11).

En relación con el metabolismo, son numerosas las dianas que se regulan por acetilación/desacetilación, muchas de ellas están implicadas en la vía de la señalización de la insulina. Una de ellas, es PTP1B (proteína tirosina fosfatasa 1B), proteína implicada en la defosforilación del IR, IRS1 o 2, disminuyendo la vía de señalización de la insulina. PTP1B es regulado negativamente, entre otros, por desacetilación mediada por SIRT1, por lo que la activación de SIRT1 favorece la señalización de insulina en ratones con un fenotipo diabético (*Irs2*<sup>-/-</sup>) (12). Por otro lado, el ratón que sobreexpresa SIRT1 en la célula  $\beta$  pancreática (BESTO) muestra una mejora de la tolerancia a la glucosa y un aumento de la secreción de insulina debido a que SIRT1 desacetila e inactiva UCP2, provocando un aumento en la síntesis de ATP, y ello favorece la secreción de insulina (13).

Otra diana activada por desacetilación mediada por SIRT1 es PGC-1 $\alpha$ . En el músculo y en el tejido adiposo marrón produce activación de la termogénesis, lo cual protege frente a la aparición de obesidad y disfunción metabólica (14).

Como conclusión, se plantea la idea del uso de activadores de SIRT1 como el resveratrol en el tratamiento de la diabetes tipo 2, ya que son capaces de disminuir la resistencia a la insulina y favorecen la supervivencia de la

célula  $\beta$  pancreática.

### 1.3. El complejo *tsc1-tsc2* como nexo de integración de señales y activación de la autofagia

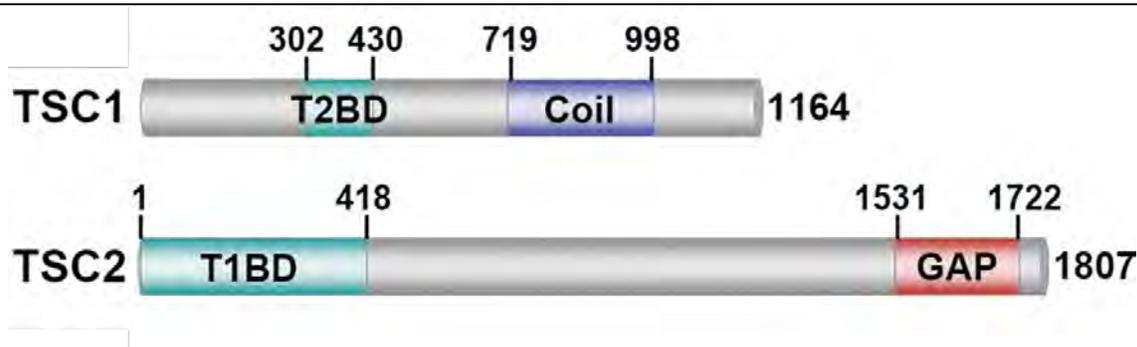
#### 1.3.a. Complejo de esclerosis tuberosa (TSC)

El complejo de esclerosis tuberosa (TSC) es una enfermedad genética hereditaria de carácter autosómico dominante. Alrededor del 85% de los casos de TSC se debe a mutaciones en el gen *TSC1* (gen 1 de la esclerosis tuberosa) o en *TSC2* (gen 2 de la TSC). *TSC1* está localizado en el brazo largo del cromosoma 9 (9q34) (15), y *TSC2* se encuentra en el brazo corto del cromosoma 16 (16p13.3) (16). El resultado de estas mutaciones conduce a la proteína truncada con pérdida de su función. Debido a estas investigaciones, los genes *TSC1* y *TSC2* se clasifican como genes supresores de tumores.

#### 1.3.b. Complejo *TSC1-TSC2*: Estructura proteica y funciones

Los genes *TSC1* y *TSC2* dan lugar a las proteínas TSC1 (hamartina) y TSC2 (tuberina) respectivamente, sin homología entre ellas y muy poca con otras proteínas. Ambas proteínas se asocian formando un complejo heterodimérico denominado TSC1-TSC2.

TSC1 es una proteína de expresión ubicua y está compuesta por 1164 aminoácidos (130 kDa). TSC1 se une y estabiliza a TSC2, bien previniéndolo de su degradación mediada por ubiquitinación. La proteína TSC2 está formada por 1807 aminoácidos (200 kDa), y presenta una región muy conservada y con homología con las proteínas activadoras de GTPasas (GAP) rap1GAP y mSPA1 (17) (Figura 3).



**Figura 3. Estructura y dominios de las proteínas TSC1 y TSC2.** T2BD (dominio de unión para TSC2), T1BD (dominio de unión para TSC1). Figura tomada de (18).

El complejo TSC1-TSC2 regula importantes vías de señalización en función del estado nutricional y energético celular, inhibiendo al complejo 1 de mamífero diana de la rapamicina (mTORC1). Bajos niveles de nutrientes y energía inducen la función GAP del TSC2 sobre Rheb

(homólogo de Ras enriquecido en cerebro), lo que favorece su actividad GTPásica aumentando la conversión de Rheb-GTP a Rheb-GDP, e inactivando a mTORC1 (18) (Figura 4).

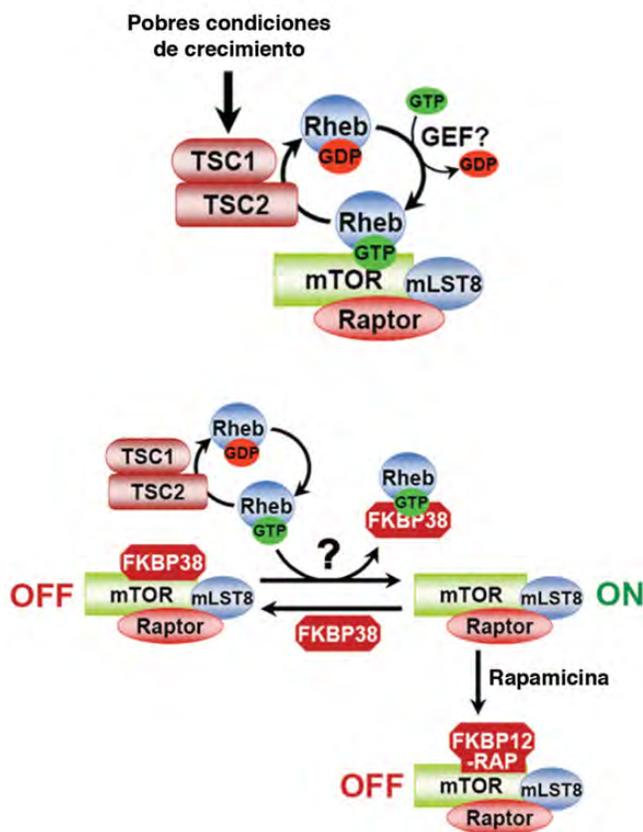


Figura 4. Regulación de mTORC1 mediada por la actividad GAP de TSC2. Figura tomada de (18).

#### 1.4. La vía de mtorc1 y sus funciones

La diana de rapamicina de mamífero (mTOR) es una proteína serina/treonina quinasa de 230 kDa, y es el componente principal de dos complejos multiproteicos mTORC1 y mTORC2. Ambos complejos tienen en común a mLST8 (proteína letal en mamíferos) y DEPTOR (proteína de interacción con mTOR con dominio DEP), ésta última es un inhibidor de mTOR.

Ambos complejos tienen una proteína característica esencial para el ensamblaje de todo el complejo y sus interacciones con otras proteínas reguladoras. En el caso

de mTORC1 es Raptor (proteína reguladora asociada a mTOR) (19). Además mTORC1 contiene otras proteínas reguladoras como es el sustrato de Akt de 40 kDa rico en prolina (PRAS40), cuya activación inhibe a mTOR (Figura 5).

Una de las características fundamentales que diferencian a los complejos de mTOR es su dispar sensibilidad al compuesto que, paradójicamente, les da nombre; la rapamicina. Mientras que mTORC1 es inhibible por rapamicina, mTORC2 es rapamicina-insensible.

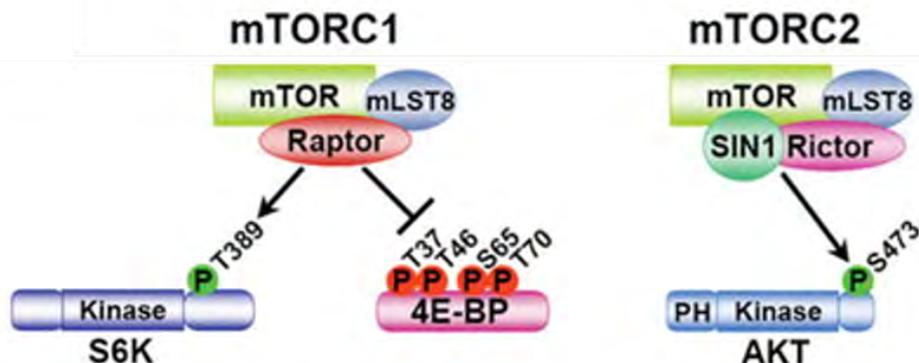


Figura 5. Complejos de mTOR (mTORC1 y mTORC2). Figura tomada (19).

mTORC1 es el regulador principal del crecimiento celular; sensa e integra la disponibilidad de diversos

factores nutricionales y medioambientales: factores de crecimiento, aminoácidos, nivel energético (ATP) y

factores de estrés celular. Sus funciones son acoplar estas señales a una respuesta de crecimiento celular, favoreciendo procesos anabólicos mediante fosforilaciones de diversas dianas, como sería por ejemplo la síntesis lipídica o la traducción (síntesis de proteínas) y limitando algunos procesos catabólicos como la autofagia (20).

En relación con el metabolismo, diferentes estudios han demostrado que la hiperactivación de la ruta mTORC1 se traduce en una desensibilización de la respuesta a la insulina por un mecanismo de retroalimentación negativa, ya que la p70S6K (diana de mTORC1) fosforila en serina (307) a IRS-1, y esta fosforilación impide que los IRS sean fosforilados por el IR en respuesta a la insulina (21).

#### 1.4.a. Importancia de la vía TSC2 / mTORC1 en célula $\beta$

Prueba del gran interés que despertó el papel del complejo TSC1-TSC2 en célula  $\beta$  fue la aparición independiente de 4 modelos animales tejido-específicos en poco más de un año. Existen dos modelos de ratón knock-out de TSC2 específico de célula  $\beta$  ( $\beta$ Tsc2<sup>-/-</sup>). Shigeyama y colaboradores describen la hiperactivación de mTORC1 y un aumento temprano de la masa de célula  $\beta$  por hipertrofia celular, acompañado de hiperinsulinemia e hipoglucemia, además de función secretora aumentada. Sin embargo a partir de las 35 semanas, la masa de célula  $\beta$  disminuye y los animales desarrollan diabetes severa. El tratamiento con rapamicina (inductor de la autofagia) en animales  $\beta$ Tsc2<sup>-/-</sup> impide el fracaso de la masa de célula  $\beta$  (22).

#### 1.5. El sistema ubiquitín-proteasoma, autofagia y mitofagia en el control de calidad citoplásmico

La regulación de la expresión génica ocurre a distintos niveles, desde el control de la transcripción hasta las modificaciones postraduccionales (PTM) que sufren las proteínas. Existe una gran variedad de PTM, algunas de las más importantes son la metilación, la acetilación, la fosforilación, la sumoilación y la ubiquitinación. Es necesario para la supervivencia celular el mantenimiento de un equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación de proteínas.

En la célula existen dos sistemas degradación principales, los cuales tienen como funciones la eliminación de productos que no son útiles para la célula en determinadas situaciones, o cuya acumulación puede ser tóxica; además, los productos de esta degradación son reutilizados para la síntesis de nuevas moléculas o son metabolizados para la obtención de energía. Estos sistemas de degradación son el sistema ubiquitín proteasoma (UPS) y la autofagia.

##### 1.5.a. El sistema ubiquitín-proteasoma (UPS)

La ubiquitinación es un proceso enzimático postraduccionales de las células eucariotas que fue descubierto en el año 1975 por el grupo del Dr. Ciechanover, y consiste en la unión covalente de la ubiquitina (Ub) a otra proteína, lo cual la marcará para su envío al proteasoma 26S, donde será posteriormente degradada.

##### 1.5.b. Autofagia

La autofagia es un proceso fisiológico mediante el cual proteínas u orgánulos citoplasmáticos son conducidos a los lisosomas para su degradación, confiriendo a la célula eucariota una vía de degradación alterativa al sistema ubiquitín-proteasoma.

La primera función de la autofagia que se describió fue la de adaptación al ayuno, sin embargo, es muy importante también en el control de calidad citoplásmico, eliminando proteínas mal plegadas o defectuosas, orgánulos dañados o microorganismos infecciosos; atenuando el estrés de RE (23). Además, favorece la supervivencia celular en situaciones de estrés, ya que permite la obtención de nutrientes y energía a través de la degradación de componentes citosólicos (24).

Existen tres tipos de autofagia fundamentales:

-Macroautofagia (en adelante referida como autofagia): Este proceso comienza con la formación de novo de una cisterna membranosa (proveniente del RE, y otros compartimentos como la membrana externa mitocondrial, membrana plásmica o el aparato de Golgi), que crece en longitud y es denominada fagóforo hasta formar el autofagosoma. El autofagosoma puede recibir vesículas desde los endosomas lo que va provocando la acidificación del fagosoma. Al compartimento resultante se le denomina anfisoma. Como último paso, el anfisoma se fusiona con los lisosomas dando lugar a los autolisosomas, en los que por la acción de las proteasas o catepsinas lisosomales se degrada el material encerrado.

-Microautofagia: En este caso la membrana del lisosoma forma pequeñas invaginaciones que se desprenden de la membrana y quedan en el interior del lisosoma, donde son degradadas. En estas invaginaciones se incorpora material citosólico.

-Autofagia mediada por chaperonas (CMA): Mediante este proceso, la chaperona citosólica (hsc70) reconoce una secuencia específica en las proteínas citosólicas (KFERQ) y las lleva a la membrana lisosomal, donde se introducen en el interior del lisosoma gracias a un transportador localizado en la membrana del lisosoma (LAMP-2A).

Se han identificado hasta ahora 34 proteínas Atg en levaduras algunas de las cuales han sido identificadas sus funciones (25). Modelos animales con autofagia deficiente por delección de un gen crítico, *Atg7*, de forma específica en célula  $\beta$ , muestran una disminución de la masa de célula  $\beta$ , así como del reciclaje basal de orgánulos y proteínas, demostrando su papel clave en el mantenimiento de la masa y la función de la célula  $\beta$  (26). Otros trabajos y resultados previos del grupo demuestran el papel protector de la autofagia en las células  $\beta$  frente a estrés de RE (27).

Se puede considerar que el proceso de la autofagia consta de varias etapas: 1) Fase de nucleación o ensamblaje; 2) Elongación y formación de las vesículas; 3) Fusión de vesículas (autofagosomas); 4) Degradación del contenido (autofagolisosomas). En mamíferos, existen 6 homólogos de *Atg8*, que se pueden subdividir en la familia de la proteína 1 de la cadena ligera 3 (LC3A, LC3B y

LC3C) y la de la proteína asociada al receptor gamma-ácido amino butírico (GABARAP, GABARAPL1 y GABARAPL2) (28). Existen dos formas de LC3, LC3-I es la forma no lipidada y que se encuentra libre en el citoplasma; y LC3-II es la forma lipidada (conjugada con fosfatidiletanolamina) esencial para el proceso de la autofagia y localizada en la membrana de los autofagosomas. La conversión de LC3 es un método muy común para la evaluación experimental de la activación del flujo autofágico. Otras proteínas, entre ellas p62/SQSTM1 (secuestrosoma 1), contienen secuencias que interaccionan con LC3 y sirven como adaptadoras entre estructuras proteínas ubiquitinadas y orgánulos dañados y la maquinaria autofágica.

Debido a que una autofagia defectiva contribuye al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica), se propone a las moléculas activadoras de autofagia o la restricción calórica como potenciales estrategias terapéuticas para atenuar la progresión de dichas enfermedades (29).

#### 1.5.c. Autofagia específica de mitocondrias (mitofagia)

Las mitocondrias juegan un papel esencial en numerosos procesos bioenergéticos en las células eucariotas, proveyendo de energía que se genera a través de la fosforilación oxidativa. Las mitocondrias constituyen una red interconectada de alta plasticidad y dinámica, con un número relativamente constante de las mismas mantenido por un balance entre eventos opuestos de biogénesis mitocondrial y mitofagia. Frente a un daño mitocondrial, se pierde el potencial de membrana mitocondrial y se induce el proceso denominado mitofagia. Las mitocondrias dañadas acumulan una proteína en la membrana externa mitocondrial denominada PINK1 (quinasa 1 inducida por PTEN), la cual recluta a una ubiquitina-proteína ligasa E3 citosólica denominada PARK2/Parkin, que media la ubiquitinación de proteínas mitocondriales. Estas son reconocidas por otras proteínas adaptadoras (p62 y HDAC6) las cuales unen LC3 unido a PE (forma lipidada), iniciando la degradación (30). Este proceso es selectivo, y no ocurre en mitocondrias “sanas”, ya que éstas son capaces de importar PINK1 y degradarlo por la proteasa PARL (proteína romboidea asociada a presenilinas), de una forma dependiente de potencial de membrana, inhibiendo así el proceso de mitofagia (31).

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Líneas celulares y medios de cultivo

Se usó la línea de células  $\beta$  pancreáticas MIN6 originaria de insulinoma murino (Miyazaki *et al.*, 1990), cultivada en DMEM (glucosa 4,5 g/l) y suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 15% y 2-mercaptoetanol 50  $\mu$ M (como agente protector frente al daño oxidativo). Además, a partir de ésta, se generaron otras dos líneas de forma estable MIN6-Scrambled-shRNA y MIN6-

TSC2shRNA mediante infección lentiviral y selección con genética.

También, fueron usadas las células embrionarias de riñón humanas (HEK 293T) y fibroblastos embrionarios murinos (MEFs), cultivados en DMEM (4,5 g/l) y suplementados con FBS 10% y HEPES. Las células MEF Tsc2 -/- así como sus controles MEF Tsc2 +/+ fueron generosamente proporcionadas por Dr. Kwiatkowski (Harvard Medical School, Boston, EE.UU.). Por último, las células MEF Sirt1 -/- así como sus controles MEF Sirt1 +/+ procedían del cultivo primario y fueron generosamente proporcionadas por la Dra. María Monsalve (IIB, CSIC, Madrid).

### 2.2. Técnicas de ADN recombinante

#### 2.2.a. Cultivo de bacterias

Para la producción de ADN plasmídico recombinante se utilizaron bacterias ultracompetentes E.coli XL2-Blue. Las bacterias fueron crecidas en placas Petri con agar bacteriológico 1.5% (p/v) en medio LB, Luria Bertoni: NaCl (10 g/l), triptona (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l). El medio fue autoclavado, y enfriado hasta 55°C para la adición de antibióticos: ampicilina (100  $\mu$ g/ml) o kanamicina (50  $\mu$ g/ml). Entre 20-25 ml fueron vertidos por placa Petri, sobre la cual, una vez solidificado el medio, se sembraron las bacterias por estrías con un asa de Kollé.

Todas las inoculaciones para amplificación de plásmidos provinieron de colonias únicas seleccionadas de placas de agar con antibiótico.

#### 2.2.b. Purificación de plásmidos

Los plásmidos fueron purificados de cultivos bacterianos por el método de la lisis alcalina. Para ello, se utilizó el Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante y usando las soluciones incluidas para obtener de una forma rápida y sencilla y con un alto rendimiento un DNA de gran calidad.

Finalmente, el DNA purificado se deja secar al aire libre durante 5-10 minutos para que se evapore el etanol, y se resuspende en agua destilada, donde se mantiene a 4°C de manera estable hasta su uso.

#### 2.2.c. Experimentos de transfección y co-transfección transitoria

Las células fueron sembradas de manera semi-confluyente, y al día siguiente fueron transitoriamente transfectadas y/o co-transfectadas con diferentes plásmidos usando tres métodos diferentes:

- Lipofección.
- Electroporación.
- Poliaminas.

### 2.3. Análisis de la expresión de proteínas

#### 2.3.a. Western-blot

Las células fueron lavadas 2 veces con PBS frío, colocadas sobre hielo y raspadas con tampón de lisis. El lisado se pasó a tubos eppendorf y tras 5-10 minutos en

hielo y tras agitación fueron centrifugados (15 min, 15,000 × g, 4°C). Se recogió el sobrenadante con el lisado proteico. A continuación, se valoraron las proteínas por el método de Bradford.

Las muestras son desnaturalizadas (3 min, 95°C) y cargados 15-30 µg por muestra en geles de poli(acrilamida). Para el desarrollo de la electroforesis se utilizó el siguiente tampón: Tris-base 25 mM, glicina 190 mM y SDS 0.1% (p/v) pH 8.3, a un voltaje constante de 100-140 v durante 1.5-2 horas. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se transfirieron a membranas de PVDF (polifluoruro de vinilideno) previamente activadas con metanol.

El tampón de transferencia usado fue 25 mM Tris, 192 mM glicina, metanol 20% (v/v). La electrotransferencia fue llevada a cabo con un voltaje constante de 100 v, durante una hora y diez y en frío. Finalizada la transferencia, se bloquearon las membranas en TTBS suplementado con 5% (p/v) de leche en polvo desnatada durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación suave.

Posteriormente se retiró la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo primario diluido en TTBS hasta el día siguiente, en una cámara fría a 4°C, con agitación suave. La lista con todos los anticuerpos primarios y sus diluciones se encuentra en la sección materiales.

Al día siguiente, la membrana se lavó 3-5 veces con TTBS durante una hora en agitación fuerte, tras la cual se incubó con una solución en TTBS de anticuerpo secundario frente a la especie correspondiente en la que se hubiese generado el anticuerpo primario. La incubación con el anticuerpo secundario fue de 1 h a temperatura ambiente en agitación suave. Finalmente, se volvió a lavar con TTBS otras 3-5 veces durante aproximadamente una hora, en agitación fuerte.

Para la detección de los anticuerpos se usó el método de quimioluminiscencia. Las membranas se incubaron con ECL Plus Western Blotting Detection durante 5 minutos, y se revelaron en el ChemiDoc por detección de quimioluminiscencia.

### 2.3.b. Inmunoprecipitación

De los extractos proteicos de cultivos celulares se preparan muestras con una cantidad de proteína uniforme (150-400 µg de proteína) en un volumen final de 500 µl ajustado con tampón de lisis, se añadió el anticuerpo de interés para inmunoprecipitar (1-2 µg de anticuerpo), y se mantuvo toda la noche en rotación a 4°C. Al día siguiente, para quedarse con toda la proteína que se ha unido al anticuerpo, se añadió el extracto proteico 20-30 µl de una mezcla de proteína A al 50% (Roche) con tampón de lisis (1:1, previamente lavada varias veces con el tampón) y se incubaron de 1 a 2 horas a 4°C.

La fase sedimentada (con la proteína A conjugada con la agarosa) se lavó varias veces con 500 µl de tampón de lisis, dejando en un último paso el precipitado lo más seco posible. Después, se añadió el mismo volumen de tampón de Laemmli 2X que el ocupado por la fracción de agarosa. Las muestras se cargan en geles de electroforesis para su detección por western-blot.

### 2.4. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 5. Se utilizó one-way ANOVA para comparación múltiple (Bonferroni's post-test), o bien, para análisis comparativo de dos datos, el t test (unpaired). Como valor de discriminación de diferencias estadísticamente significativas se utiliza  $p \leq 0.05$

### 2.5. Materiales

#### 2.5.a. Listado de anticuerpos primarios

Anticuerpo	Casa comercial (Ref)	Origen	Dilución (Uso)
P-ACC (S79)	Cell Signaling (#3661)	IgG rabbit	1:1000 (WB)
Acetylated-Lysine	Cell Signaling (# 9441)	IgG rabbit	1:1000 (WB); 1:100 (IP)
β-actina (AC-74)	Sigma-Aldrich (A5316)	mAbIgG1 mouse	1:5000 (WB)
Flag	Sigma-Aldrich (F1804)	mAb IgG1 Mouse	1:1000 (WB)
GFP (B-2)	Santa Cruz Biotechnology (sc-9996)	mAb IgG Mouse	1:1000 (WB)
HA	Sigma-Aldrich (H6908)	IgG Rabbit	1:1000 (WB); 1:100 (IP)
LC3B	Cell Signaling (#4108)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
Nitrotirosina	Merck Millipore (#06-284)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
p62/SQSTM1	Progen (GP62)	IgG Guinea pig	1:1000 (WB)
p70S6K	Cell Signaling (#9202)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
PGC-1α (3GS)	Cell Signaling (#2178)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)

Tuberin protein: therapeutic target to activate autophagy and mitophagy avoiding the progression to type 2 diabetes

P-p70S6K (Thr-389)	Cell Signaling (#9205)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
PINK1	Novus Biologicals (BC100-494)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
S6 (5G10)	Cell Signaling (#2217)	mAb Rabbit IgG	1:1000 (WB)
P-S6 (S235/236)	Cell Signaling (#2211)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
SIRT1 (H-300)	Santa Cruz Biotechnology (sc-15404)	IgG Rabbit	1:1000 (WB) 1:100 (IP)
$\alpha$ -Tubulina	Sigma-Aldrich (T6199)	mAb Mouse IgG1	1:5000 (WB)
TSC2	Cell Signaling (#3612)	IgG Rabbit	1:1000 (WB) 1:100 (IP)
TSC2 (N-19)	Santa Cruz Biotechnology (sc-892)	IgG Rabbit	1:100 (IP)
TSC2 (C-20)	Santa Cruz Biotechnology (sc-893)	IgG Rabbit	1:1000 (WB)
Ubiquitina (FK2-H)*	Enzo Life Sci (BML-PW0150)	mAb Mouse IgG1	1:1000 (WB)
V5	Life Technologies (R960-25)	mAb Mouse IgG2	1:1000 (WB)

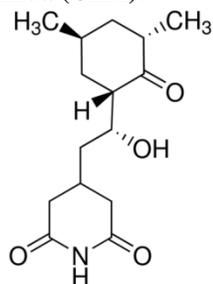
### 2.5.b. Listado de anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Casa comercial (Ref)	Conjugado	Dilución (Uso)
Sheep anti-rabbit	GE Healthcare (NA931V)	HRP	1:5000 (WB)
Sheep anti-mouse	GE Healthcare (NA934V)	HRP	1:3000 (WB)
Rabbit anti-guinea pig	Abcam (ab-6771)	HRP	1:7000 (WB)

### 2.5.c. Reactivos

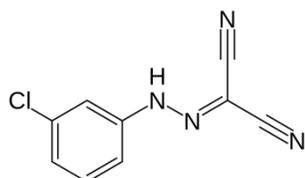
Los agentes farmacológicos usados fueron:

- **Cicloheximida (CHX):**



Es un inhibidor de la síntesis proteica en los eucariotas.  
Solubilidad: Agua. Concentración 6-100  $\mu$ g/ml.

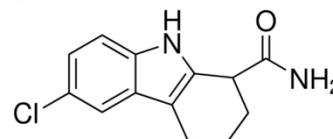
- **Carbonilcianuro m-clorofenil hidrazona**



### (CCCP)

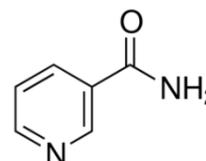
Es un inhibidor químico de la fosforilación oxidativa.  
Solubilidad: DMSO. Concentración 5-20  $\mu$ g/ml.

- **EX-527**



Es un potente y selectivo inhibidor de SIRT1  
Solubilidad en DMSO.  
Concentración de uso: 100 nM.

- **Nicotinamida**



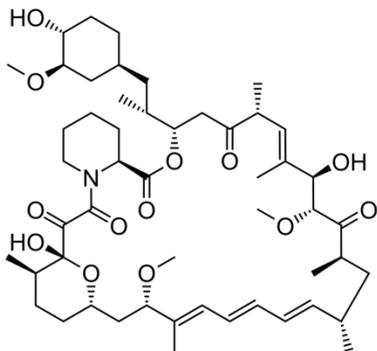
Es un inhibidor alostérico de la actividad de SIRT1 a

altas concentraciones (5mM).

Solubilidad en agua.

Concentración 5 mM.

- **Rapamicina-Sirolimus:**

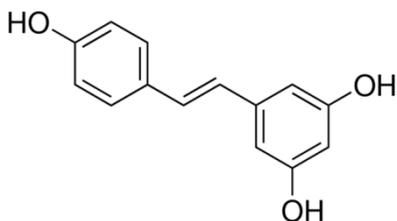


La rapamicina actúa inhibiendo a mTORC1.

Solubilidad en DMSO.

Concentración 20-40 nM.

- **Resveratrol:**



Es un potente activador de SIRT1 y presenta numerosos efectos intracelulares (antioxidante, antiinflamatorio, antienvjecimiento, antitumoral...).

Solubilidad en DMSO. Concentración 25  $\mu$ M-100  $\mu$ M (50  $\mu$ M).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. El estado de acetilación en lisinas de TSC2 modula la vía de mTORC1 y la autofagia

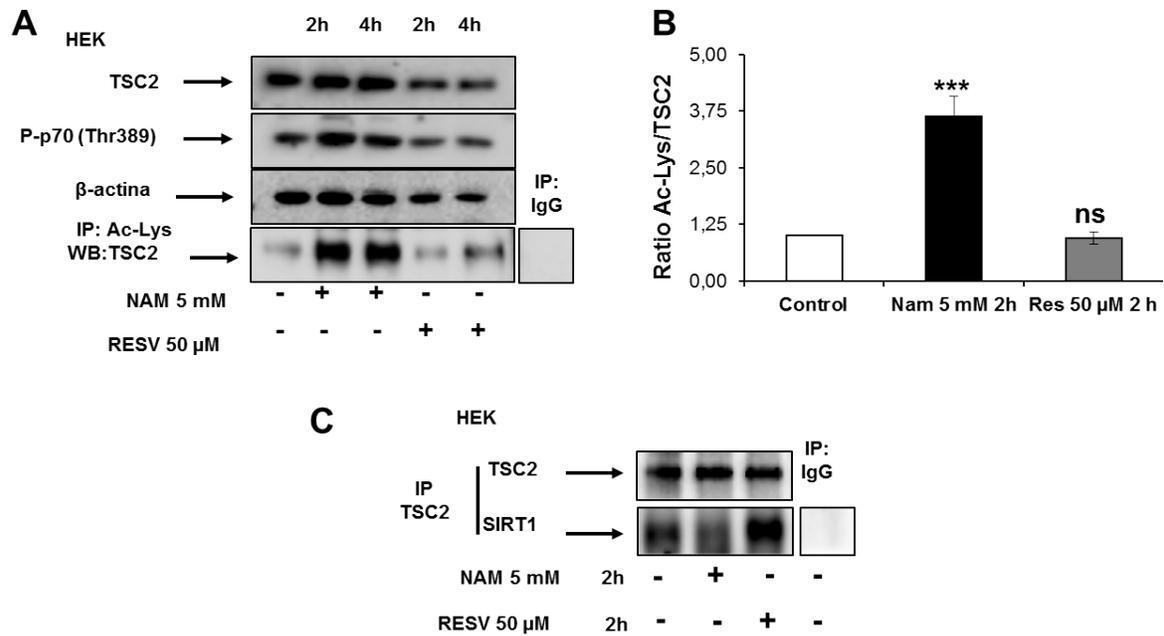
El grupo de Ghosh demostró la interacción de las proteínas SIRT1 y TSC2 en células HeLa, y la modulación de la ruta de mTORC1 (9). Sin embargo, no demuestran

ninguna evidencia de que la proteína TSC2 se acetile, pero sugieren que probablemente ésta pueda sufrir acetilaciones en lisinas, en condiciones de crecimiento y altos niveles de energía, y que esto regule su actividad.

Para elucidar el papel de las sirtuinas en la regulación de mTORC1 vía TSC2, usamos la línea celular de riñón embrionario humano (HEK 293T) y estimulamos con dos moduladores de la actividad desacetilasa de SIRT1, la NAM (inhibidor alostérico) y el RESV (activador) durante 2 y 4 horas. A continuación, recogimos el experimento y realizamos un WB para ver la activación de la ruta de mTORC1, y una IP de las lisinas acetiladas y WB frente a TSC2.

En primer lugar, observamos que la estimulación con NAM (5 mM) aumentó la acetilación en lisinas de TSC2 a todas las horas, e incrementó la fosforilación de la treonina 389 de la p70 (diana de mTORC1), lo cual indica una activación de la ruta de mTORC1. Por otro lado, el tratamiento con RESV (50  $\mu$ M) mantuvo el estado de acetilación de TSC2, y disminuyó la actividad de mTORC1 (Figura 6). Algunos autores defienden que el resveratrol inhibe la ruta mTORC1 debido a que promueve la asociación entre mTOR y DEPTOR (componente inhibitorio de mTOR) e inhibe como consecuencia a mTORC1 (32). Asimismo, RESV activa a la AMPK inhibiendo la vía de mTORC1 por una vía independiente de TSC2, mediante fosforilaciones en la proteína Raptor (Ser 722 y 792), disminuyendo la activación de mTORC1 (33). La asociación física de TSC2 y SIRT1 se demostró mediante inmunoprecipitación de TSC2 y WB frente a SIRT1. Además, encontramos que dicha interacción se vió incrementada en respuesta a RESV (Figura 6).

En el trabajo de Kuo identificaron que la acetil transferasa N-terminal ARD1 interacciona con TSC2, promoviendo su estabilización, conduciendo a una disminución en la señalización de mTORC1 y esto está relacionado con una inhibición del crecimiento de líneas celulares de tumores humanos de mama (34). Esta observación parece que va en contra de nuestros resultados obtenidos, sin embargo, son modificaciones diferentes de TSC2, ya que en el paper de Kuo, ARD1 no afecta al estado de acetilación en lisinas de TSC2.

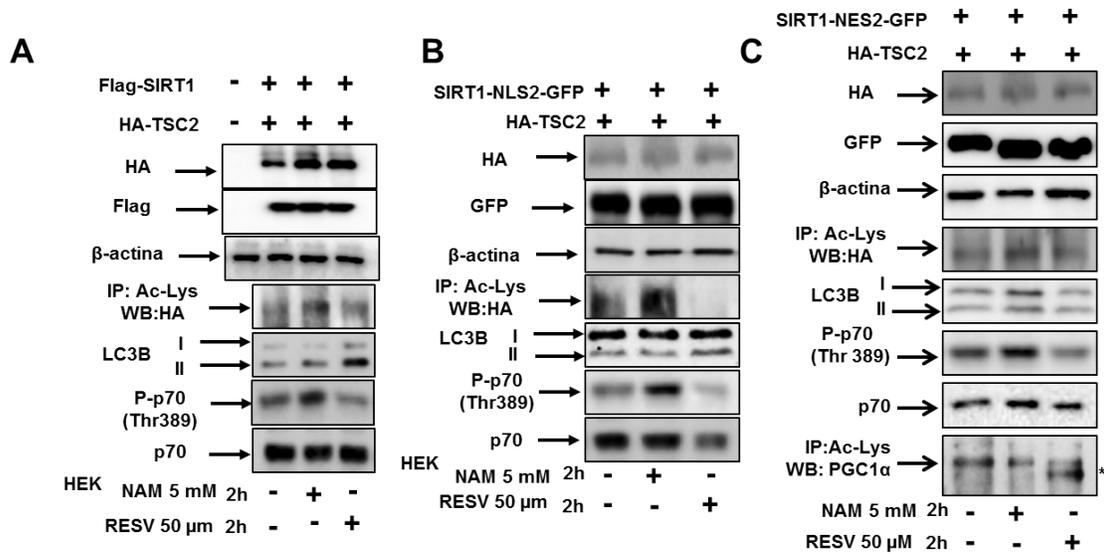


**Figura 6. Modulación del estado de acetilación en lisinas de TSC2 y la regulación de la ruta mTORC1 en respuesta a NAM y a RESV.** (A) Inmunoprecipitación (IP) de las lisinas acetiladas (Ac-Lys) endógenas procedentes de células HEK 293T estimuladas o no con NAM y RESV durante 2 y 4 h, y WB con el anticuerpo de anti-TSC2. Asimismo, se realizaron WB frente a las proteínas P-p70 (T389), TSC2 y  $\beta$ -actina. (B) Cuantificación del ratio de lisinas acetiladas de TSC2 en respuesta a NAM o RESV, representados como la media  $\pm$  la desviación estándar (SD). \*\*\*  $P < 0.001$ ; n.s. sin diferencia significativa. (C) IP del TSC2 endógeno de células HEK 293T en respuesta a NAM y RESV (2h), y WB frente a SIRT1 y TSC2 para ver su asociación física.

Se ha descrito que SIRT1 es una proteína que se encuentra fundamentalmente en el núcleo, aunque presenta un transporte núcleo-citoplasma, gracias al cual puede localizarse también en el citoplasma en respuesta a diferentes estímulos. En su estructura se localizan secuencias de localización nuclear (NLS) y de exclusión nuclear (NES) (11). Sin embargo, TSC2 es una proteína fundamentalmente citoplasmática. Para corroborar estos datos obtenidos con proteínas endógenas, hicimos experimentos de co-transfección de manera transitoria con las proteínas recombinantes HA-TSC2, Flag-SIRT1-WT, SIRT1-WT-GFP, SIRT1-NL2-GFP (de localización exclusivamente citoplasmática) y SIRT1-NES-GFP (de

localización exclusivamente nuclear).

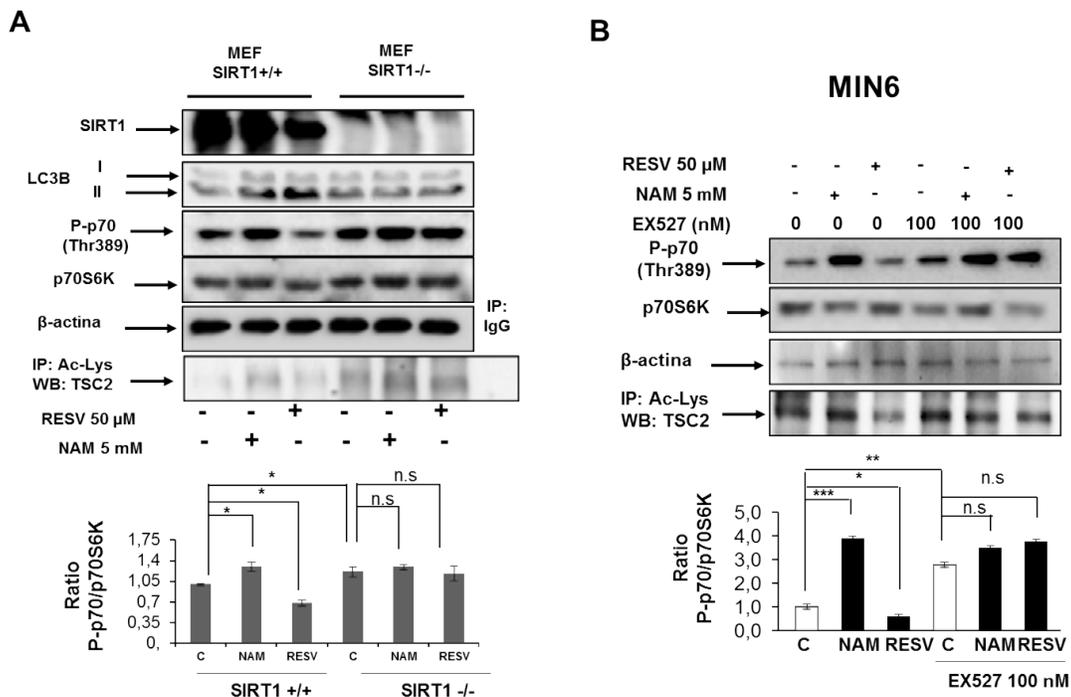
El análisis reveló que la NAM estimuló la vía de mTORC1, no potenció la respuesta autofágica, e incrementó la acetilación en las lisinas de TSC2 en todos los casos. Por otro lado, el resveratrol, inhibió la vía de mTORC1, y evitó (en los casos de SIRT1-WT y SIRT1-NES2) o disminuyó (SIRT1-NLS2) la acetilación de TSC2. Asimismo, RESV indujo la respuesta autofágica en todos los casos, aunque en menor medida en el caso en el que SIRT1 se localizaba predominantemente en el núcleo. Aquí, como control de que el resveratrol había funcionado se realizó una inmunoprecipitación de las lisinas acetiladas y WB frente a PGC1 $\alpha$  (diana de SIRT1) (Figura 7).



**Figura 7. Efectos de la NAM y el RESV sobre el estado de acetilación en lisinas de TSC2, la ruta mTORC1, y la autofagia.** Un día después de la transfección con las proteínas recombinantes HA-TSC2 y Flag-SIRT1 (A), o SIRT1-NLS2-GFP (B), o SIRT1-NES2-GFP (C), las células se cambiaron de medio y fueron sometidas a tratamientos con NAM y RESV durante 2 h. \* Banda inespecífica.

Para confirmar el papel de SIRT1 en el control del estado de acetilación de TSC2, usamos células MEF Sirt1 +/+ y Sirt1 -/-. En los MEF Sirt1 +/+ la NAM estimuló la vía de mTORC1 y aumentó la acetilación de TSC2, mientras que el RESV disminuyó la actividad de mTORC1 y mantuvo el estado de acetilación de TSC2. Por otro lado, se observó que el estado de acetilación de TSC2 y la

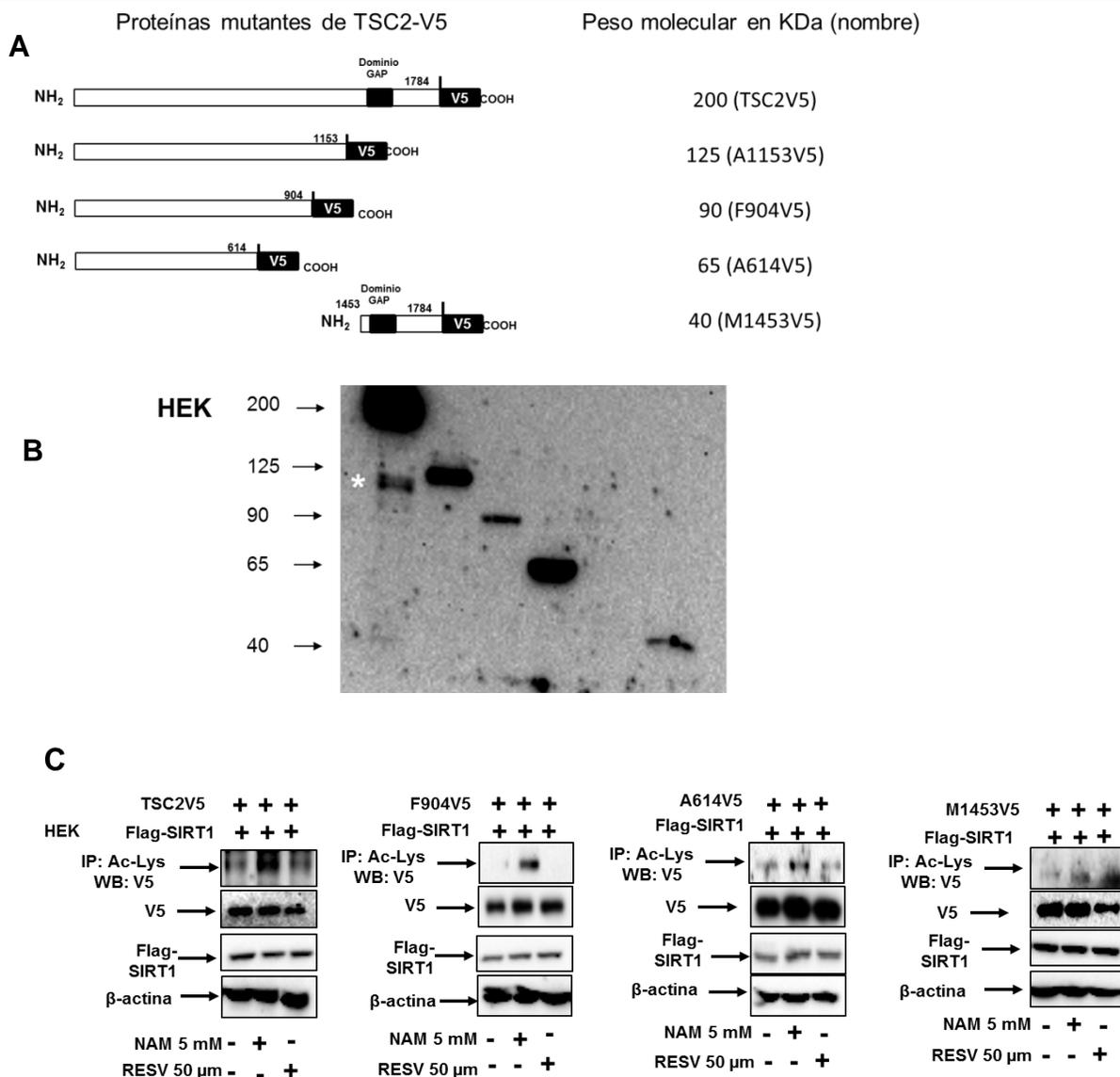
actividad de mTORC1 estaba significativamente aumentada en las células MEF Sirt1 -/-. Por el contrario, los efectos de NAM y RESV sobre la acetilación de TSC2 y la vía de mTORC1 se vieron abolidos en los MEF Sirt1 -/-, así como tras la estimulación con el inhibidor químico de la actividad desacetilasa de SIRT1, el Ex-527 en las células MIN6 (Figura 8).



**Figura 8. La modulación del estado de acetilación de TSC2 y la actividad de la ruta mTORC1 en respuesta a NAM y a RESV es dependiente de SIRT1.** (A) Las células MEF Sirt1 +/+ y Sirt1 -/- fueron estimuladas con NAM y RESV durante 2 h. (B) Las células MIN6 sin y con un pretratamiento de 30 minutos del Ex-527 (100 nM), y a continuación estimuladas con NAM y RESV durante 2 h. Histogramas que representan el ratio P-p70 (T389)/p70total expresados como la media de tres experimentos diferentes ± SD. \*P<0.05; \*\*P<0.01, \*\*\* P<0.001; n.s. sin diferencia significativa.

Lo que nos propusimos a continuación fue determinar la zona de interacción entre SIRT1 y TSC2. Para ello, co-transfectamos las células HEK 293T con las proteínas recombinantes Flag-SIRT1, y diversos constructos recombinantes de TSC2 que contenían diferentes regiones de la proteína fusionados con la etiqueta V5. Al día siguiente se cambió el medio por medio completo, y un día después las células se estimularon con NAM y RESV durante 2h. Se realizaron IP de las lisinas acetiladas seguido por un análisis por WB. Por un lado, la NAM

incrementó, y el RESV disminuyó la acetilación de TSC2 en el constructo completo de TSC2 (TSC2V5), así como en aquellos constructos parciales que contenían la región N-terminal (A1153V5, F904V5 y A614V5). Sin embargo, no observamos cambios en el estado de acetilación de TSC2 en respuesta a NAM y a RESV en el constructo parcial que contenía el dominio GAP y perdía su región N-terminal (Figura 9).



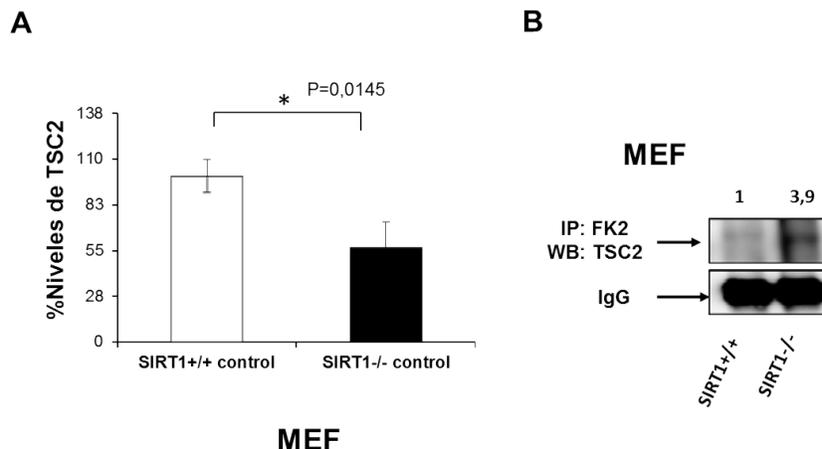
**Figura 9. SIRT1 desacetila a TSC2 por su región N-terminal.** (A) Esquema representativo de los diferentes mutantes de TSC2 unidos a V5, con su respectivo tamaño molecular y su nombre. (B) WB de V5 de todos los mutantes a su correspondiente altura. (C) Las células HEK 293T fueron co-transfectadas y al día siguiente, las células fueron tratadas con NAM o RESV durante 2h. \* Banda inespecífica.

### 3.2. El estado de acetilación en lisinas de TSC2 está relacionado con su estado de ubiquitinación

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar si la acetilación en lisinas de TSC2 jugaba un papel en la estabilidad de esta proteína y en el control de la ruta de mTORC1.

Observamos que los niveles de la proteína TSC2 estaban disminuidos en las células MEF *Sirt1*<sup>-/-</sup> (hiperacetilación de TSC2), en comparación con sus controles (MEF *Sirt1*<sup>+/+</sup>). Además, encontramos un aumento en el grado de unión de ubiquitina con la proteína TSC2 mediante una inmunoprecipitación de la proteína ubiquitina (FK2, que

reconoce las proteínas mono- y poli-ubiquitinadas, pero no la ubiquitina libre), y *western blot* con el anticuerpo que reconoce TSC2 (Figura 10).

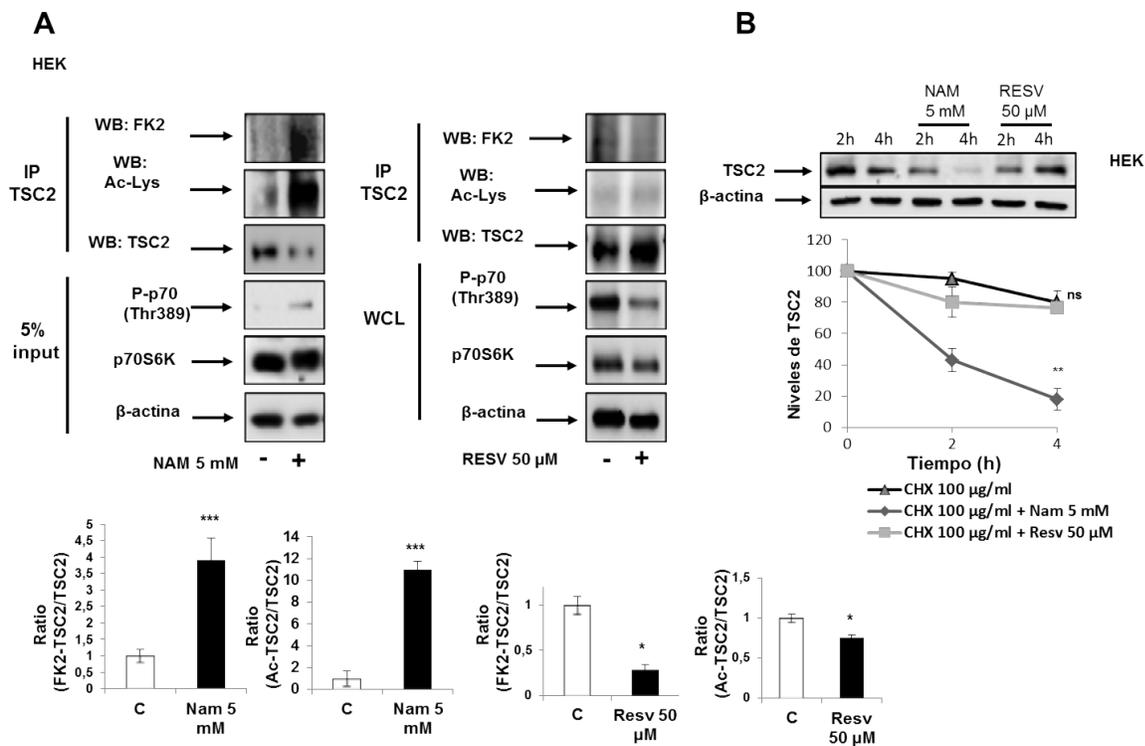


**Figura 10. Menor estabilidad de la proteína TSC2 en las células MEF Sirt1<sup>-/-</sup>.** (A) Cuantificación de los niveles de la proteína TSC2 procedente de blots correspondientes a las células MEF Sirt1<sup>+/+</sup> y Sirt1<sup>-/-</sup>, representados como la media de tres experimentos diferentes  $\pm$  la desviación estándar (SD). \* $P < 0.05$ . (B) Inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-FK2, y WB frente a TSC2 de las células MEF Sirt1<sup>+/+</sup> y Sirt1<sup>-/-</sup>.

Además, sometimos a las células HEK 293T a una estimulación con NAM o RESV. A continuación, analizamos el estado de ubiquitinación de TSC2 mediante un análisis por IP de TSC2 y WB con el anticuerpo anti-FK2. En respuesta a NAM, se incrementó la acetilación y la ubiquitinación de TSC2, favoreciendo su degradación por el sistema ubiquitina- proteasoma. Por el contrario, el tratamiento con RESV redujo la acetilación y la ubiquitinación de TSC2, incrementando la estabilidad de la proteína (Figura 11).

En este contexto, cuando corregimos con la proteína frente a la cual inmunoprecipitamos (TSC2) detectamos una cantidad menor de TSC2 en las células tratadas con NAM, así como unos mayores niveles de TSC2 en los tratamientos con RESV. Estos datos parecen indicar que estos tratamientos afectan a la vida media de TSC2. Para

corroborar esta hipótesis, sometimos a las células HEK 293T a un pretratamiento con cicloheximida (inhibidor de la síntesis proteica), y a continuación, estimulamos con NAM o RESV durante 4 horas. El análisis reveló que los niveles de TSC2 en respuesta a RESV (80-90% a las 4 horas) eran similares a las células control, y significativamente mayores en comparación con NAM (40% a las 2h y 20% a las 4 horas), lo cual indica una correlación directa entre la acetilación de TSC2 y la disminución de la estabilidad o la degradación de la proteína (Figura 11). Es importante tener en cuenta que la vía de mTORC1 debe estar activada en condiciones de crecimiento, y el RESV (mimético de restricción calórica) bloquea la acetilación de TSC2, favoreciendo su estabilización e inhibiendo la vía de mTORC1.



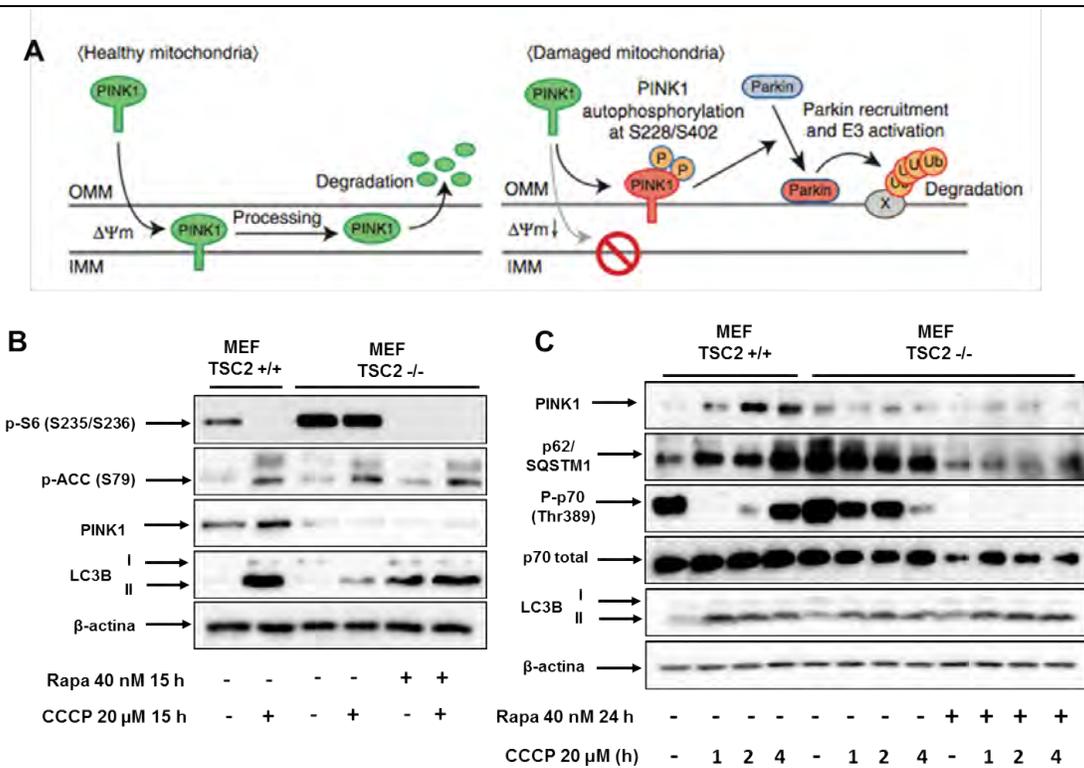
**Figura 11. La acetilación de TSC2 está correlacionada con una mayor ubiquitinación y degradación de la proteína.** (A) Las células HEK 293T fueron sometidas a un tratamiento con NAM o RESV (2h), seguido de una IP de TSC2 y análisis por WB de FK2 y Ac-Lys. Todos los blots son representativos de al menos tres experimentos diferentes, y los correspondientes ratios (FK2/TSC2 y Ac-Lys-TSC2) están representados en los histogramas de barras expresados con la media ± S.D. \*P<0.05; \*\*\* P<0.001. (B) Las células HEK 293T fueron estimuladas con cicloheximida (CHX, 100 μg/ml) durante 30 minutos, y después, tratadas con NAM o RESV (4h). \*\* P<0.01. n.s. sin diferencia significativa.

### 3.3. Papel de TSC2 sobre la activación de la mitofagia en respuesta a un daño oxidativo

A continuación, nos propusimos profundizar en el papel de la ruta TSC2/mTORC1 específicamente en la activación del proceso de mitofagia. Como ya sabemos, las mitocondrias desacopladas son rápidamente marcadas por proteínas de la maquinaria autofágica y degradadas en los autolisosomas. Otro trabajo, esta vez de nuestro grupo (22), evidenció que este modelo ( $\beta$ TSC2<sup>-/-</sup>) presentaba una menor degradación mediada por autofagia de las mitocondrias (mitofagia) en la célula  $\beta$ . Todos estos datos in vivo sugerían que el modelo animal  $\beta$ TSC2<sup>-/-</sup> presentaba un flujo autofágico y mitofágico alterado. Por lo que nos propusimos profundizar en la causa de por qué estaban fallando estos procesos, mediante su análisis in vitro. Para lograr este objetivo, usamos el agente inductor de mitofagia (CCCP) en los MEF TSC2<sup>+/+</sup> y TSC2<sup>-/-</sup>.

En las células MEF TSC2<sup>+/+</sup> en respuesta a CCCP, observamos una respuesta esperada de disminución en la

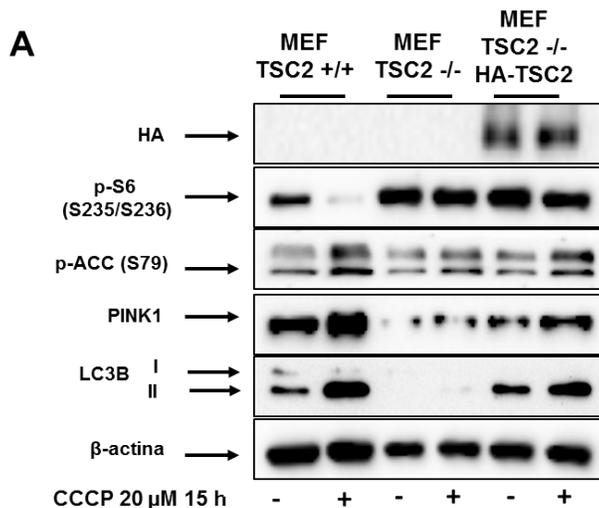
actividad de la ruta mTORC1 y un aumento en la activación de la macroautofagia. Asimismo, estas células eran capaces de acumular PINK1 en respuesta a CCCP. Sin embargo, las células MEF TSC2<sup>-/-</sup> además de presentar un mantenimiento en la actividad de mTORC1 y un impedimento en la activación de la macroautofagia tras un tratamiento con CCCP, también presentaban una incapacidad en la acumulación de la proteína PINK1 tras estimulaciones a diferentes tiempos con CCCP. Curiosamente, el tratamiento con rapamicina en estas células TSC2<sup>-/-</sup> no fue capaz de revertir la acumulación de PINK1 en la membrana mitocondrial, pero si encontrábamos activación de la macroautofagia (aumento de la lipidación de LC3B). Estos resultados sugieren que TSC2 presenta un papel regulador positivo de la expresión génica de Pink1, y que las células deficientes de TSC2 muestran un defecto cuantitativo en la acumulación de PINK1 (Figura 12).



**Figura 12. Defecto en la acumulación de PINK1 en la membrana externa mitocondrial tras la pérdida de potencial mitocondrial en respuesta a CCCP, en los MEF TSC2-/-.** (A) Esquema del modelo de reclutamiento de Parkin tras un daño mitocondrial propuesto en el trabajo de (35) (B-D) Las células MEF TSC2+/+ y TSC2-/- fueron estimuladas con CCCP (20 μM) a tiempos largos (B) y cortos (C), así como la rapamicina (40 nM) en los TSC2-/- . Los blots son representativos de tres experimentos diferentes.

Por último, para recuperar la acumulación de PINK1 se reintrodujo la proteína TSC2 en las células MEF TSC2-/- . Como esperábamos, las células MEF TSC2+/+ en respuesta a CCCP, eran capaces de acumular PINK1, inhibir mTORC1 y activar la autofagia. Por el contrario, se confirmó que el CCCP en las células MEF TSC2-/- no indujo una acumulación de PINK1, ni tampoco inhibió la

ruta de mTORC1, ni provocó una activación de la autofagia. Sin embargo, todos estos efectos se revirtieron al reintroducir la proteína TSC2. Estos resultados nos afirmaron que TSC2 presenta un papel esencial en la acumulación de PINK1, y por lo tanto, en la inducción de la mitofagia dependiente de PINK1 (Figura 13).



**Figura 13. Reacumulación de PINK1 en las células MEF TSC2-/- en las que se ha reintroducido la proteína TSC2.** (A) Análisis de la expresión de la proteína PINK1 tras la reintroducción del plásmido HA-TSC2 en las células MEF TSC2-/- , en condiciones basales y tras un tratamiento con CCCP.

#### 4. CONCLUSIONES

1. La NAM aumenta y el RESV previene de la acetilación en lisinas de TSC2. La acetilación de TSC2 está relacionada con una disminución en la estabilidad de la proteína, favoreciendo la actividad de mTORC1 y la inhibición de la autofagia. De manera contraria, un estado menos acetilado de TSC2 previene de la degradación por el sistema ubiquitín-proteasoma, inhibiendo la vía mTORC1, y activando la autofagia.

2. SIRT1 interacciona por la región N-terminal de TSC2, modulando su estado de acetilación.

3. Los efectos observados por NAM o RESV sobre la modulación de la vía mTORC1 y autofagia son dependientes de TSC2.

4. La hiperacetilación de TSC2, causada por una delección de SIRT1 o una inhibición química de la actividad desacetilasa, conduce a una disminución en la estabilidad de la proteína mediada por un aumento en la ubiquitinación de la misma, y a una hiperactivación de mTORC1.

5. La hiperactivación de la ruta mTORC1 causada por la eliminación de TSC2, resulta en un impedimento en la respuesta autofágica y mitofágica mediada por un daño oxidativo.

6. Las células MEF *Tsc2*<sup>-/-</sup> presentan un defecto cuantitativo en la acumulación de PINK1 en respuesta a CCCP.

7. La reintroducción de la proteína TSC2 en las células carentes de TSC2, produce un aumento en la expresión de la proteína PINK1, y activa la autofagia.

Conclusión final:

La hiperactivación crónica de la vía mTORC1 está implicada en el desarrollo de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, diabetes tipo 2 y cáncer. Por ello, es esencial profundizar en los mecanismos moleculares subyacentes que regulan la actividad de esta vía, para el desarrollo de futuras dianas terapéuticas dirigidas a la estimulación de los mecanismos de defensa ante situaciones de estrés celular. En este contexto, se ha demostrado que la proteína TSC2 juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular: regulación de la vía mTORC1, y activación de la autofagia y mitofagia.

#### 5. ABREVIATURAS

AMPK: Quinasa activada por AMP

IP: Inmunoprecipitación

mTORC1: Complejo 1 diana de rapamicina en mamíferos

NAM: Nicotinamida

OMS: Organización mundial de la salud

PINK1: Quinasa 1 inducida por PTEN

PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

RAPA: Rapamicina

RESV: Resveratrol

TSC1: Proteína 1 del complejo de esclerosis tuberosa o hamartina

TSC2: Proteína 2 del complejo de esclerosis tuberosa o tuberina

WB: *Western blot*

#### 6. REFERENCIAS

1. International Diabetes Federation. Disponible en: (international diabetes federation 2015. [www.idf.org/diabetesatlas](http://www.idf.org/diabetesatlas)).
2. Lorenzo, M. Resistencia a insulina en el músculo esquelético: ejercicio y activación de receptores nucleares como estrategias terapéuticas. En: Ortiz Melón, J.M., Casales Angosto, M. Redes de señalización y estrategias terapéuticas. Real Academia Nacional de Farmacia 2009, pp. 279-308.
3. Lingohr, M.K. Pancreatic beta-cell growth and survival—a role in obesity-linked type 2 diabetes? Trends in Molecular Medicine 2006; 8: 375-384.
4. Masoro, E.J. Overview of caloric restriction and ageing. Mech Ageing Dev 2005; 126: 913-22.
5. McCay, C.M. The effect of retarded growth upon the length of the life span and upon the ultimate body size. J Nutr 1935; 10: 63-79.
6. Omodei, D. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. FEBS Lett 2011; 585: 1537-42.
7. Cantó C, Auwerx J. Calorie restriction: is AMPK a key sensor and effector? Physiology 2011; 26: 214-224.
8. Brooks CL, Gu W. How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? Nat Rev Cancer 2009; 9: 123-128.
9. Ghosh HS, *et al.* SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin. Plos One 2010; 5: e9199.
10. Cantó C. *et al.* AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. Nature 2009; 458: 1056-60.
11. Tanno M, *et al.* Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase SIRT1. J Biol Chem 2007; 282: 6823-32.
12. González-Rodríguez Á, *et al.* Resveratrol treatment restores peripheral insulin sensitivity in diabetic mice in a sirt1-independent manner. Mol Nutr Food Res 2015; 59: 1431-42.
13. Bordone L, *et al.* Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. PLoS Biol 2006; 4: e31.
14. Lagouge M, *et al.* Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. Cell 2006; 127: 1109-22.
15. van Slegtenhorst M, *et al.* Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. Science 1997; 277:805-8.
16. European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium. Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. Cell 1993;

- 75: 1305-15.
17. van Slegtenhorst M, *et al.* Interaction between hamartin and tuberlin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Hum Mol Genet* 1998; 7 : 1053-7.
  18. Huang J, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J* 2008; 412: 179-90.
  19. Kim DH, *et al.* mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002; 26: 163-75.
  20. Kim J, *et al.* AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 132-41.
  21. Shah OJ, Wang Z, Hunter T. Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr Biol* 2004; 14: 1650-6.
  22. Bartolomé A *et al.* Pancreatic  $\beta$ -cell failure mediated by mTORC1 hyperactivity and autophagic impairment. *Diabetes*. 2014; 63:2996-3008.
  23. Murrow L, Debnath J. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annu Rev Pathol* 2013; 8:105-37.
  24. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8: 931-7.
  25. Shpilka T, *et al.* Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biol*. 2011; 12: 226.
  26. Ebato C, *et al.* Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab*. 2008 ; 8: 352-32.
  27. Bartolome A, Guillen C, Benito M. Autophagy plays a protective role in endoplasmic reticulum stress-mediated pancreatic  $\beta$  cell death. *Autophagy*. 2012; 8: 1757-68.
  28. Wild, P. The LC3 interactome at a glance. *Journal of Cell Science* 2014; 127: 3-9.
  29. Ghavami S, *et al.* Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol*. 2014; 112:24-49.
  30. Vives-Bauza C, Przedborski S. Mitophagy: the latest problem for Parkinson's disease. *Trends Mol Med*. 2011; 17: 158-65.
  31. Jin SM, *et al.* Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol*. 2010 ;191: 933-42.
  32. Liu M, Liu F. Resveratrol inhibits mTOR signaling by targeting DEPTOR. *Commun Integr Biol*. 2011; 4: 382-4.
  33. Gwinn DM, *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2008; 30: 214-26.
  34. Kuo HP, *et al.* ARD1 stabilization of TSC2 suppresses tumorigenesis through the mTOR signaling pathway. *Sci Signal* 2010; 3: ra9.
  35. Okatsu K, *et al.* PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nat Commun*. 2012; 3:1016.





## Sesión científica celebrada el 24 de noviembre de 2016 para conmemorar los Premio Nobel 2016 en Fisiología o Medicina y en Química



Juan Ramón Lacadena Calero  
Coordinador de la sesión  
Sesión celebrada el 24 de noviembre de 2016  
e-mail: jrlgbucm@bio.ucm.es

---

### ORDEN DEL DÍA

#### *Presentación:*

---

**“El Premio Nobel 2016 en Fisiología o Medicina”**

**“El Premio Nobel 2016 en Química”**

Excmo. Sr. D. Juan-Ramón Lacadena Calero

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

#### *Ponentes:*

---

**“Autofagia: el sistema de reciclaje y defensa celular que tienen todas nuestras células”**

Dra. Patricia Boya

Centro de Investigaciones Biológicas, CIB-CSIC

**“Las nanomáquinas se crecen con Nobel de Química 2016”**

Dr. Tomás Torres Cebada

Departamento de Química Orgánica, Universidad Autónoma de Madrid

# El Premio Nobel 2016 en Fisiología o Medicina

Juan-Ramón Lacadena Calero

---

Un año más, la Real Academia Nacional de Farmacia se reúne en Sesión Científica para conmemorar los Premios Nobel correspondientes a las especialidades de Fisiología o Medicina y de Química.

## Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2016

El 3 de octubre, la Asamblea Nobel en el Instituto Karolinska decidió otorgar el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2016 al Dr. Yoshinori Ohsumi “por sus descubrimientos de los mecanismos para la autofagia”.

Como señalan Larsson y Masucci, miembros de la Asamblea Nobel en el Instituto Karolinska, en su resumen científico oficial de la investigación galardonada, nos podemos remontar a más de 60 años cuando se iniciaron una serie de descubrimientos sobre la fisiología y estructura celulares que finalizaron con los fenómenos de autofagia celular que hoy nos ocupan. En efecto, en 1955 y 1956, Christian de Duve descubrió que enzimas proteolíticas celulares eran secuestradas en unas estructuras de membrana, hasta entonces desconocidas, que él denominó *lisosomas*. Investigaciones posteriores demostraron que había otras estructuras de membrana que secuestraban porciones de citoplasma. Dado que tales estructuras tenían la capacidad de digerir partes del contenido intracelular, Christian de Duve eligió el término de *autofagia* para denominar tales procesos. Es obvio mencionar aquí que Christian de Duve recibió, junto con Albert Claude y George E. Palade, el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 1974 “por sus descubrimientos relativos a la organización estructural y funcional de la célula”.

A modo de inciso, se puede mencionar en este contexto que otros fenómenos relativos a la organización funcional y estructural de las células han sido merecedoras del galardón Nobel en ocasiones anteriores, como es el caso del *aparato de Golgi* (Golgi y Ramón y Cajal recibieron el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 1906 “en reconocimiento de su trabajo sobre la estructura del sistema nervioso”), de las *ciclinas* y el control del *ciclo celular* (Hartwell, Hunt y Nurse recibieron el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2001 “por sus descubrimientos de los reguladores clave del ciclo celular”), de la *apoptosis* (Brenner, Horvitz y Sulston recibieron el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2002 “por sus descubrimientos sobre la regulación genética del desarrollo de los órganos y la muerte celular programada”) o el *tráfico de vesículas* en las células (Rothman, Schekman y Südhof fueron galardonados con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina 2013 “por sus descubrimientos de la

maquinaria que regula el tráfico de vesículas, un sistema de transporte principal en nuestras células”).

Particularmente este año parecía que los amantes de la Genética íbamos a tener la satisfacción de disfrutar de otro premio Nobel en temas estrictamente genéticos, como bien podría haber sido la “edición genómica”. Pero no ha sido así. No obstante, como una pequeña compensación, a mí, en particular, me ha consolado ver cómo la Genética ha estado presente en la investigación premiada este año porque la metodología de trabajo ha incluido la utilización de mutantes genéticos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En efecto, estudiando miles de levaduras mutantes, el Dr. Ohsumi identificó 15 genes que son esenciales para la autofagia, permitiéndole estudiar la función de las proteínas codificadas por tales genes. Él pudo analizar cómo las señales de estrés inician el proceso de la autofagia celular y el mecanismo por el que las proteínas y los complejos proteicos promueven los diferentes estadios de la formación de los *autofagosomas* a partir de una estructura de doble membrana denominada *fagóforo*. Algo así como las bolsas de la basura con la que las células recogen los desperdicios para llevarlos a los lisosomas donde serán degradados y posteriormente reciclados.

Como señalaba la propia institución Nobel en la nota de prensa que anunciaba el premio, “gracias a Ohsumi y otros que han seguido sus huellas, ahora sabemos que la autofagia controla importantes funciones fisiológicas en las que algunos componentes celulares tienen que ser degradados y reciclados. La autofagia puede proporcionar rápidamente el combustible para la energía y los bloques de construcción para renovar componentes celulares y es, por tanto, esencial para la respuesta celular al ayuno y otros tipos de estrés. Después de la infección, la autofagia puede eliminar a las bacterias y virus que invaden la célula. Además, la autofagia contribuye al desarrollo embrionario y a la diferenciación celular. Las células también usan la autofagia para eliminar proteínas y orgánulos dañados como mecanismo de control de calidad crítico para contrarrestar el efecto del envejecimiento. Fallos en la autofagia han sido relacionados con enfermedades neurodegenerativas de la vejez como el Parkinson, la diabetes tipo 2 o el cáncer.”

Para hablarnos de todo ello contamos con la presencia de la Dra. Patricia Boya que dirige el grupo que estudia las “funciones de la autofagia en la fisiopatología de los organismos” en el Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC en Madrid. Tiene la palabra la Dra. Boya.

# Autofagia: el sistema de reciclaje y defensa celular que tienen todas nuestras células

Patricia Boya

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Biológicas

**ABSTRACT:** The Nobel Prize in Physiology and Medicine of this year 2016 has been awarded to Yoshinori Ohsumi for the discovery of the molecular basis of autophagy, a mechanism present in all eukaryotic cells that allows the degradation and recycling of intracellular components. By studying the baking yeast *Saccharomyces cerevisiae*, he discovered the genes that regulate this process. Today we know the vital importance of autophagy in the physiology of all eukaryotes. Thanks to the discovery of the *Atg* genes, it has been possible to genetically manipulate the process of autophagy and observe the consequences for the proper functioning of the cells in different tissues. In addition, alterations in the autophagy process have been observed in many pathological conditions such as diabetes, neurodegeneration, cancer and infectious diseases. Better understanding of this process is essential to try to find new therapies to treat human diseases.

**RESUMEN:** El premio Nobel de Fisiología y Medicina de este año 2016 ha recaído en Yoshinori Ohsumi del Instituto Tecnológico de Tokio, Japón, por descubrir las bases moleculares del proceso de autofagia, un mecanismo que poseen todas las células eucariotas y que permite la degradación y reciclaje de los componentes celulares. Las investigaciones de este científico en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* permitieron descubrir los genes que regulan este proceso esencial para el correcto funcionamiento celular. Hoy en día sabemos de la importancia vital de la autofagia en la fisiología de todos los eucariotas. Gracias a conocer los reguladores moleculares se ha podido manipular el proceso de autofagia y observar las consecuencias para el funcionamiento de las células en los diferentes tejidos. Además se han observado alteraciones del proceso de autofagia en numerosas patologías como la diabetes, el cáncer y las enfermedades infecciosas. Entender mejor este proceso es esencial para intentar buscar nuevas terapias para tratar las enfermedades humanas.

**Corresponding Author:** pboya@cib.csic.es

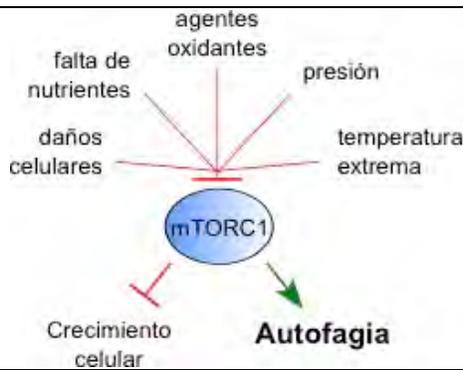
An Real Acad Farm Vol. 82, N° 4 (2016), pp. 445-452

## INTRODUCCIÓN

Las células eucariotas, es decir, con núcleo diferenciado donde reside el material genético o ADN, tienen la capacidad de controlar su propio crecimiento. Así, cuando disponen de nutrientes suficientes y las condiciones ambientales (tejido que las rodea dentro de un organismo pluricelular, agua o suelo en el que residen o medio de cultivo en el laboratorio) son idóneas para su crecimiento, las células activan los procesos de división celular y crecen, tanto en tamaño como en número, para dar lugar a nuevas células hijas. Por el contrario, cuando las células son expuestas a estrés de tipo nutricional (falta de nutrientes), mecánico (presión ejercida sobre la célula), térmico (altas o bajas temperaturas), u oxidativo (desequilibrio en los niveles de agentes oxidantes celulares, derivado de una mala detoxificación celular o de la imposibilidad de reparar los daños producidos por dichos agentes), rápidamente frenan su crecimiento y división con la intención de evitar el daño celular, lo cual podría ser muy perjudicial para la supervivencia de la propia célula y/o del organismo del que forman parte. Esta homeostasis o equilibrio celular está cuidadosamente controlada por un complicado sistema de señalización dentro de la célula. El complejo proteico más importante

dentro de dicho sistema es el complejo mTORC1, el cual percibe los niveles de estrés y decide, mediante la regulación del funcionamiento de otras vías en la célula, si ésta debe frenar su proliferación o puede continuar dividiéndose (**Figura 1**). Una de esas vías celulares controladas por mTORC1 es la vía de autofagia.

Autofagia significa "comerse a sí mismo", y es el proceso por el que las células degradan sus propios componentes cuando no hay suficientes nutrientes para el correcto funcionamiento celular o cuando dichos componentes se dañan a causa de un determinado estrés (1). Por ejemplo, los agentes oxidantes que se forman en la célula y que no son correctamente eliminados pueden producir mutaciones en el ADN que, si no se reparan debidamente, pueden dar lugar a la generación de un cáncer. Por lo tanto la autofagia, además de tener un papel metabólico en respuesta a la escasez de nutrientes, es un importante mecanismo de control de la calidad intracelular. Por este motivo, la vía de autofagia es esencial en nuestras células y, como consecuencia, en nuestro organismo (1).

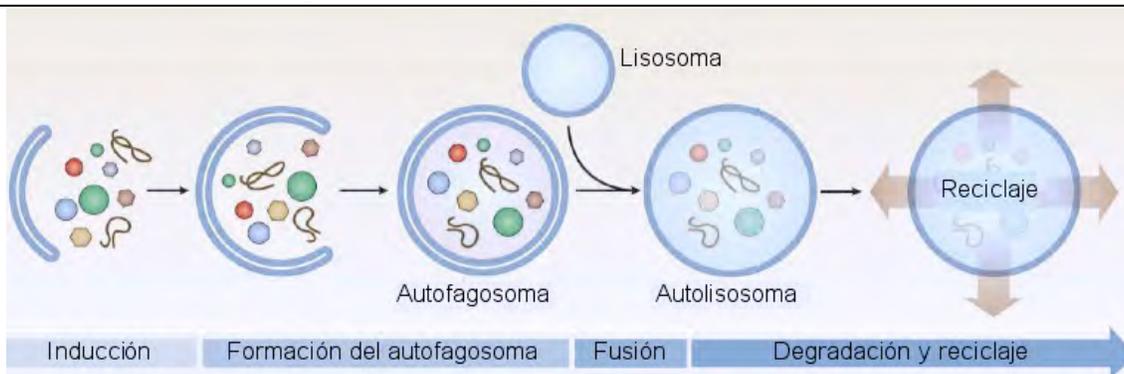


**Figura 1.** La autofagia se activa en condiciones de estrés celular.

**UNA APROXIMACIÓN BÁSICA A LA VÍA DE AUTOFAGIA**

La autofagia está controlada por los genes *Atg* (de la palabra autofagia) de los que a día de hoy se conocen más de treinta. Cada una de las proteína codificadas por estos

genes participa en diferentes pasos dentro de la vía de autofagia. Durante la fase de inducción se forma una membrana lipídica doble que se extiende hasta cerrarse generando un compartimento llamado "autofagosoma" (**Figura 2**). El autofagosoma captura en su interior los componentes dañados, material citoplasmático u orgánulos, que van a ser degradados. Posteriormente, otro compartimento celular denominado "lisosoma" se fusiona al autofagosoma y libera en él enzimas digestivas que serán las responsables de la degradación de todo el material internalizado en el autofagosoma. Dicho material, ya en forma de aminoácidos libres, ácidos grasos o carbohidratos, es finalmente reciclado desde el autolisosoma de vuelta al citoplasma celular, donde puede ser reutilizado para otras funciones. Mediante este mecanismo de reciclaje celular, la célula mantiene su homeostasis metabólica y recicla componentes celulares.

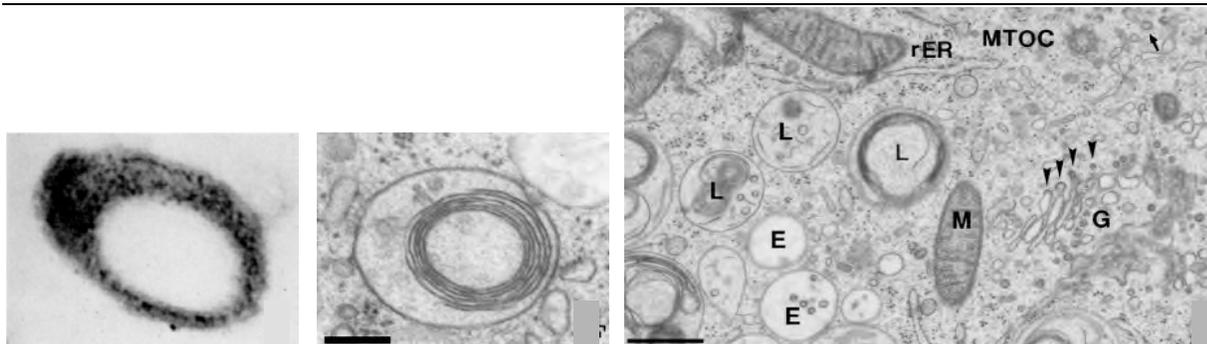


**Figura 2. Fases de la autofagia.** El autofagosoma atrapa los componentes citoplásmicos que son finalmente degradados en el autolisosoma y reciclados de nuevo al citoplasma celular.

**HISTORIA DEL DESCUBRIMIENTO DE LA AUTOFAGIA**

El Dr. Yoshinori Ohsumi ha sido galardonado este año con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina. Ohsumi fue el primero en descubrir los genes *Atg*, aquellos necesarios para el desarrollo de la autofagia. No obstante, la historia de la autofagia se remonta al año 1955, cuando el científico Christian de Duve, también Premio Nobel en 1974, descubrió los lisosomas estudiando el tejido de hígado de rata gracias a la tecnología de microscopía electrónica (2). Los lisosomas son vesículas, en este caso formadas por una membrana lipídica simple, que contienen enzimas hidrolíticas que actúan a pH ácido y son capaces de degradar prácticamente cualquier molécula en la célula (**Figura 3**, panel izquierdo). Hoy en día, el avance

tecnológico nos ha permitido obtener imágenes mucho más exactas del aspecto del lisosoma, así como de otros orgánulos, dentro de la célula (**Figura 3**, paneles medio y derecho). Siete años más tarde, De Duve acuñó el término "autofagia" al proceso por el que los lisosomas degradan material celular (3). Sin embargo, fueron los científicos Arstila y Trump quienes demostraron, mediante métodos bioquímicos, que es en realidad un compartimento de membrana doble sin enzimas hidrolíticas, el autofagosoma, el que se forma en primera estancia para capturar el material citoplasmático (4). Posteriormente, el compartimento, ahora llamado autolisosoma, pasa a tener una sola membrana y degrada, mediante enzimas lisosomales, el material comprendido en su interior (**Figura 2 y 3**).

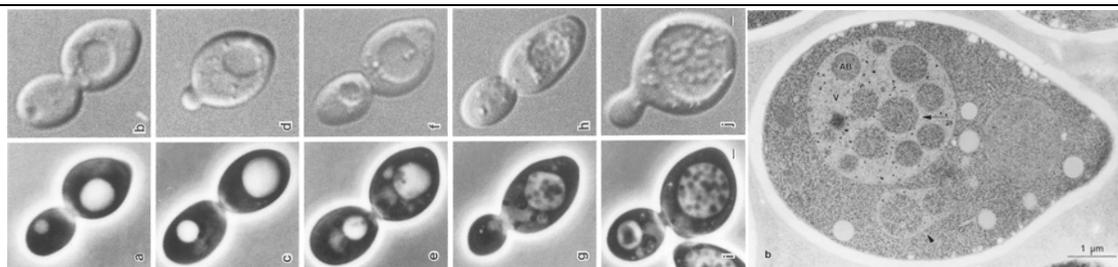


**Figura 3. Morfología de los lisosomas.** A la izquierda, micrografía electrónica de un lisosoma obtenida por Novikoff y colaboradores, 1956 (5) . Se observa una membrana de material denso rodeando una cavidad interna. El panel del medio muestra un lisosoma, visualizado por Murk y colaboradores tras el empleo de la fijación por crioinmovilización y análisis por microscopía electrónica (6). Se aprecia fácilmente el lisosoma de membrana simple con material citoplasmático en su interior, en este caso también membranoso. A la derecha, imagen del mismo trabajo de Murk (6), donde se muestran diferentes orgánulos celulares, entre ellos los lisosomas (L), con diverso contenido citoplasmático.

### CONTRIBUCIONES DE Y. OHSUMI AL ESTUDIO DE LA AUTOFAGIA

El Dr. Y. Ohsumi comenzó sus investigaciones sobre la autofagia en la Universidad de Tokio. Su grupo descubrió que el proceso de autofagia no sólo existe en mamíferos sino también en eucariotas unicelulares como las levaduras. El laboratorio del Prof. Ohsumi había generado mutantes de algunas de estas enzimas degradativas de *Saccharomyces cerevisiae*. Ya por entonces se sabía que los niveles y la actividad de estas enzimas aumentaban en

situaciones de ayuno, por lo que Ohsumi hipotetizó que las células deficientes para estas enzimas tendrían que acumular los componentes celulares secuestrados en los autofagosomas. De este modo, Ohsumi observó cómo tras privar a las levaduras de alimento, en su caso nitrógeno, se acumulaban cuerpos esféricos en el citoplasma para posteriormente acabar en la vacuola, orgánulo hermano del lisosoma de mamíferos (7) (**Figura 4**). Ohsumi llamó a dichas esferas "cuerpos autofágicos".



**Figura 4. Descubrimiento de la autofagia en levaduras.** En el panel de la izquierda se observan cuerpos esféricos acumulándose en la vacuola de levaduras privadas de nitrógeno que carecen de proteasas, o lo que es lo mismo, enzimas que degradan proteínas. A la derecha se muestra una levadura con su vacuola llena de cuerpos autofágicos, los cuales a su vez aparecen repletos de material citoplasmático denso. Imágenes obtenidas del artículo de Takeshige y colaboradores (7).

Una vez que fue capaz de “ver” los autofagosomas, Ohsumi descubrió los genes *atg* al buscar mutantes que no formasen vacuolas autofágicas en situación de ayuno (8). Estos experimentos permitieron encontrar los primeros 15 genes que regulaban el proceso de autofagia, a los que denominaron genes *apg* (de *autophagy*). Todos estos mutantes compartían las mismas alteraciones: no formaban autofagosomas y tenían deficiencias en la degradación de proteínas en situaciones de ayuno. Además no eran capaces de formar esporas, y si se prolongaba el ayuno, morían (8). Estos datos permitieron concluir que la autofagia era una respuesta importante para degradar componentes celulares y mantener la viabilidad en situaciones de privación de nutrientes. En la actualidad estos genes han cambiado de nombre y se llaman genes *atg* seguido de un número. Los quince primeros *atg* son los

mismos 15 genes *apg* que descubrió Yoshinori Ohsumi.

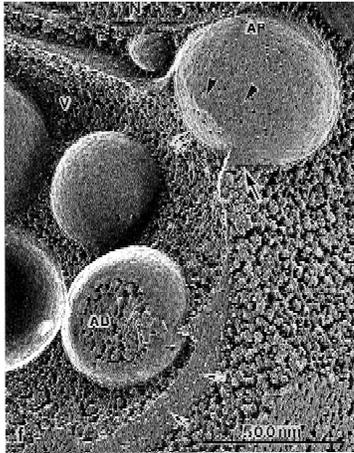
Más tarde, el grupo de Ohsumi confirmó los ensayos bioquímicos previos de Arstila y Trump y publicó la primera evidencia visual de que los autofagosomas, a diferencia de los lisosomas, se componían de una doble membrana (9) (**Figura 5**). De este modo, los cuerpos autofágicos que se encontraban dentro de la vacuola de las levaduras no eran más que el resultado de la fusión entre la membrana externa del autofagosoma y la membrana simple de la vacuola. Como consecuencia, los cuerpos autofágicos previamente descritos son autofagosomas carentes de membrana externa, únicamente formados por una membrana interna simple. Este proceso de fusión de membranas es exactamente igual al que ocurre en células de mamífero entre el autofagosoma y el lisosoma (**Figura 2**).

Cinco años más tarde, el laboratorio del mismo Ohsumi identificó las primeras proteínas involucradas en autofagia en células humanas, demostrando que la vía de autofagia se ha conservado durante toda la evolución, con apenas pequeñas modificaciones desde los eucariotas inferiores (por ejemplo, levaduras) hasta los eucariotas superiores como los animales (10).

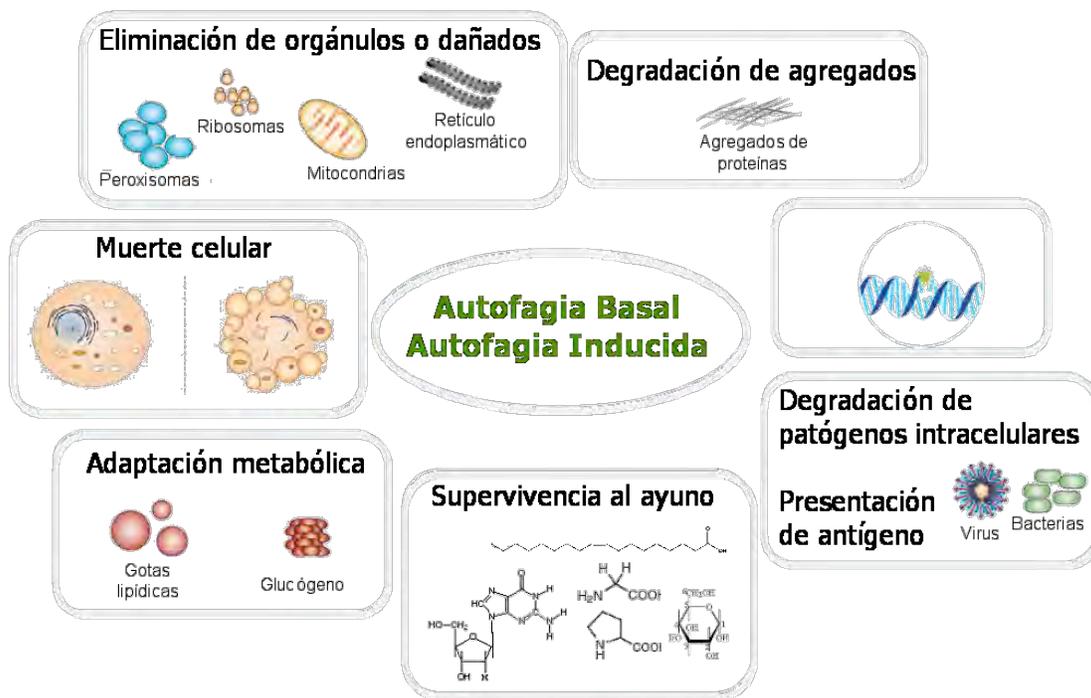
(V) en el interior de una levadura. La flecha grande señala la membrana externa del autofagosoma; la doble flecha, su membrana interna. Se observa también un cuerpo autofágico (AB) dentro de la vacuola (9).

**LA AUTOFAGIA ES ESENCIAL PARA NUESTRAS CÉLULAS**

Todas nuestras celular tienen unos niveles basales de autofagia que se encargan de mantener el citoplasma celular libre de orgánulos que han sufrido daño y proteínas mal plegadas. Esto es particularmente importante en las células posmitóticas (que no se dividen) como las neuronas, donde la “basura celular” no puede ser diluida entre las células hijas en el proceso de división celular. Animales que no tienen autofagia en los precursores neuronales acumulan en el sistema nervioso proteínas dañadas y agregados celulares, lo que tiene importantes consecuencias para el funcionamiento de las mismas (11). Por lo tanto, esta autofagia “basal” es esencial como control de calidad intracelular. Por otro lado, la autofagia se induce a niveles superiores de los basales como consecuencia del estrés celular, lo que permite la supervivencia celular. En la **Figura 6** se resumen las principales funciones de la autofagia.



**Figura 5. Primera demostración morfológica de que el autofagosoma es un compartimento de doble membrana lipídica. Se observa la fusión entre la membrana externa de un autofagosoma (AP) y la vacuola**



**Figura 6: Principales funciones de la autofagia en nuestras células.**

La vía de autofagia controla funciones fisiológicas importantes en nuestro cuerpo. Todo proceso llevado a cabo por nuestro organismo que requiera que ciertos componentes celulares se degraden y reciclen están controlados en última instancia por la autofagia. Por

ejemplo, la autofagia contribuye a la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario, degrada proteínas y orgánulos dañados durante el envejecimiento celular, elimina bacterias y virus patógenos que invaden nuestras células durante un proceso infeccioso, etc. Defectos en

autofagia se han asociado también a unos niveles aumentados de radicales libres de oxígeno contribuyendo al daño al ADN. Por otro lado, es una importante respuesta a alteraciones metabólicas como el ayuno, degradando por ejemplo gotas lipídicas y glucógeno, participando de manera activa en la supervivencia celular de manera que la inhibición de la autofagia en situaciones de estrés como el ayuno incrementa la muerte celular (12).

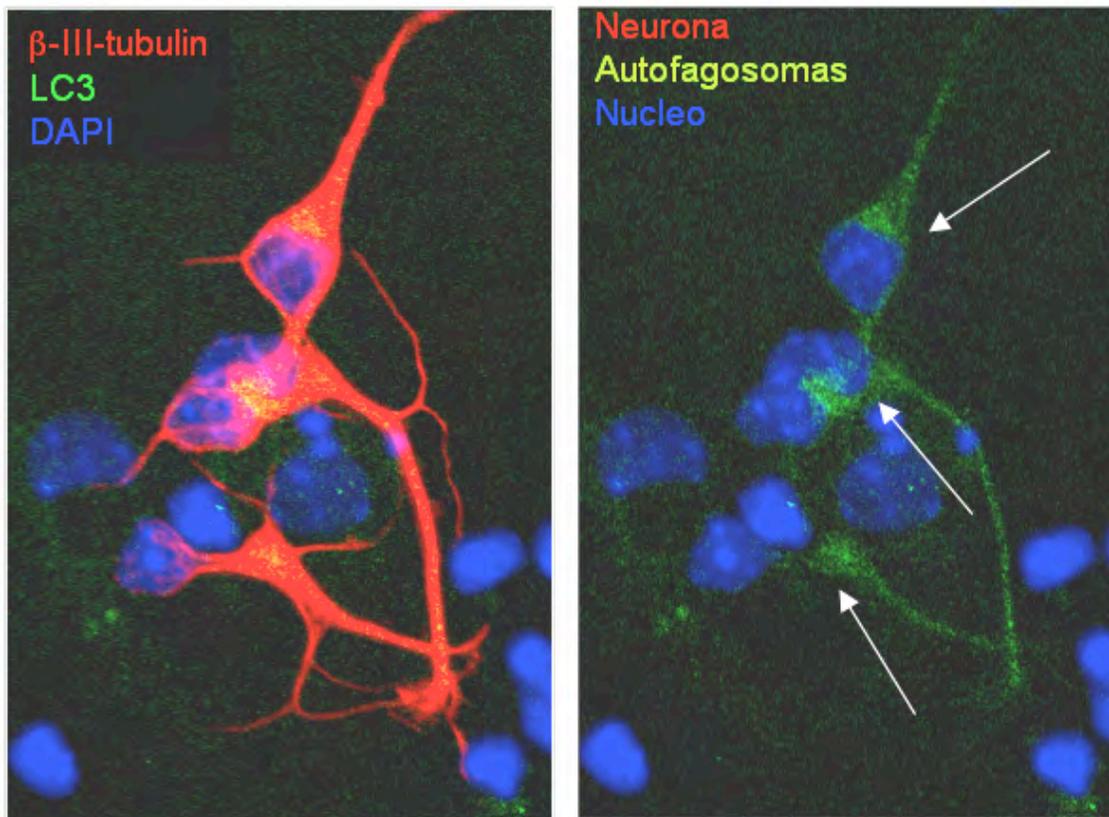
Viendo el papel central que juega la autofagia en la homeostasis celular, no es de extrañar que alteraciones en este proceso tengan importantes consecuencias. Sabemos que enfermedades como el cáncer, la diabetes de tipo 2, las enfermedades neurodegenerativas y otros desórdenes relacionados con la vejez, están vinculadas al mal funcionamiento de la autofagia. A continuación describo brevemente el papel de la autofagia en diferentes procesos celulares y enfermedades humanas.

### DESARROLLO Y DIFERENCIACIÓN

Como descubrió Oshumi, las levaduras que no poseen

autofagia no pueden generar esporas, y mutaciones en otros organismos como la mosca o el gusano generan también alteraciones importantes en el desarrollo y la diferenciación celular. Muchos de los animales carentes de reguladores de autofagia mueren durante el desarrollo embrionario, por lo que se piensa que este proceso puede jugar un papel esencial en la etapa prenatal.

La autofagia es esencial para la diferenciación de muchos tipos celulares como los eritrocitos (células sanguíneas) y adipocitos (células del tejido graso). En relación al sistema nervioso, se ha observado que los niveles de autofagia de neuronas aumentan durante su diferenciación en cultivo (**Figura 7**). Utilizando el marcador de autofagia LC3 (proteína que se une a las membranas externa e interna de los autofagosomas, aquí mostrada en verde) podemos observar que las neuronas (aquí marcadas en rojo) son las células con niveles mayores de autofagia.



**Figura 7: La autofagia aumenta con el proceso de diferenciación celular para generar una neurona.** La neuronas maduras expresan el marcador neuronal  $\beta$ -III-tubulina que hemos marcado en rojo en la fotografía de la izquierda. Los núcleos de las células se han teñido de color azul y los autofagosomas con color verde. En la fotografía de la derecha podemos observar que solo las células rojas, las neuronas, se tiñen también de color verde por lo que presentan elevados niveles de autofagia.

Un déficit total de autofagia es incompatible con la vida, por lo que no ha resultado fácil entender el papel de la autofagia en los tejidos adultos. No obstante, la deficiencia del gen *Atg4B* provoca un déficit parcial de autofagia, por lo que los animales llegan a nacer y pueden ser estudiados. Dichos animales no muestran grandes

defectos aparentes, salvo algunos problemas de vértigo por alteraciones en la generación de los otolitos, partículas minerales situadas en el oído (13). Sin embargo, estos animales son más sensibles a situaciones de estrés en tejidos tan diferentes como el intestino, el pulmón y el sistema nervioso. En los últimos años, la generación de

animales únicamente deficientes en la autofagia de algunos de sus tejidos está permitiendo entender el proceso de autofagia en cada uno de los diferentes tipos celulares. La literatura es extensa, y las conclusiones que se pueden extraer de estos modelos son que la autofagia es importante para la correcta función de todos los tejidos estudiados. Las funciones que realiza la autofagia son de control de la calidad celular y mantenimiento del estado metabólico, así como de respuesta protectora frente a las agresiones (14).

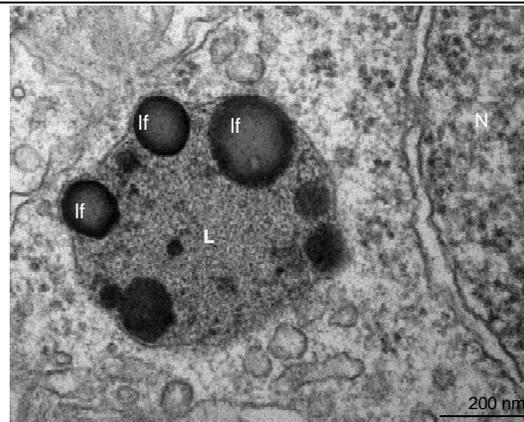
### AUTOFAGIA Y MUERTE CELULAR

Durante muchos años se pensó que la autofagia era un mecanismo de muerte celular, ya que se observaban autofagosomas en las células que se estaban muriendo. Ello llevó incluso a definir la autofagia como un mecanismo de muerte celular, llamada muerte celular de tipo II en contraposición a la muerte celular de tipo I, más conocida como apoptosis. Sin embargo, en estudios posteriores se ha demostrado que la autofagia es un mecanismo de supervivencia celular y que las células presentaban autofagosomas al activar el proceso como mecanismo citoprotector (12). Hoy en día sabemos que la autofagia se activa bajo numerosas situaciones de estrés para mantener la homeostasis celular. Sin embargo, existen algunas situaciones en las cuales una activación exagerada del proceso, por ejemplo en células cultivadas en el laboratorio o en algunas enfermedades neurodegenerativas, sí puede llegar a inducir muerte celular (15).

### ENVEJECIMIENTO CELULAR

Es conocido que el envejecimiento produce alteraciones en las funciones normales de las células, y eso atañe también a la autofagia. Por un lado existen evidencias de que los niveles de algunas proteínas ATG disminuyen con la edad, y por otro lado también sabemos que la actividad de los lisosomas está disminuida en los tejidos envejecidos (16). Como hemos mencionado anteriormente, la autofagia cobra una importancia vital en las células posmitóticas, aquellas que no se dividen, como las neuronas o las células musculares. En estas células los productos tóxicos derivados del metabolismo normal de la célula se acumulan en su interior con el paso del tiempo, ya que no pueden ser divididos entre las células hijas durante el proceso de división celular. Por lo tanto, no es de extrañar que las alteraciones en la autofagia debidas al envejecimiento se manifiesten de manera predominante en el sistema nervioso (11). Nuestros estudios en la retina de animales envejecidos demuestran que, con el paso del tiempo, la retina acumula productos tóxicos y proteínas dañadas debido a una menor actividad de la autofagia. La expresión de los genes *Atg7* y *Becn1*, importantes para la formación del autofagosoma, está disminuida en las retinas de ratones de 2 años de edad (el equivalente a unos 70 años de una persona). Por otro lado, hemos observado que la función de los lisosomas también se encuentra disminuida en estos animales viejos, y que acumulan en su interior lípidos y proteínas que no pueden ser degradados (**Figura 8**). Esos acúmulos van aumentando con el

envejecimiento, lo que provoca que los lisosomas dejen de funcionar correctamente, generándose un círculo vicioso que aumenta con la edad (17).



**Figura 8:** Imagen por microscopía electrónica de un lisosoma (L) en la retina de un animal envejecido de casi dos años de edad, donde se observan los acúmulos de lipofucsina (lf), llamada también el pigmento del envejecimiento.

### PAPEL DE LA AUTOFAGIA EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Las enfermedades neurodegenerativas representan un grave problema económico y social, no sólo para los individuos afectados y sus familias, sino para el conjunto de la sociedad. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas terapias para estas dolencias es en la actualidad una prioridad. Como hemos mencionado anteriormente, un déficit en autofagia tiene importantes consecuencias para las neuronas, produciéndose el acúmulo de proteínas dañadas y componentes celulares alterados. Estas alteraciones llevan a la muerte neuronal y a fenotipos neurodegenerativos graves (11). Por otro lado, estudios realizados en modelos de proteinopatías (enfermedades neurodegenerativas asociadas a la acumulación aberrante de proteínas mutadas) como la enfermedad de Huntington, así como en modelos murinos de la enfermedad de Parkinson y el glaucoma, han demostrado el efecto beneficioso de aumentar la autofagia con fármacos como la rapamicina (18-20). Por otro lado, también se ha demostrado que en algunas situaciones asociadas a alteraciones en los lisosomas, la inducción farmacológica de la autofagia puede ser perjudicial incrementando el daño y la muerte celular, y se postula que en esas situaciones las terapias deben ir enfocadas a restaurar la función lisosomal (21, 22). Queda aún todavía un largo camino por recorrer, pero sin duda es esencial entender mejor el mecanismo molecular del proceso de autofagia para buscar nuevas dianas terapéuticas para las enfermedades neurodegenerativas.

### CÁNCER

Algunos animales deficientes en autofagia tienen mayor incidencia de tumores (23) y se ha demostrado que cierta manipulación genética de ratones genera un defecto en la vía autofágica (24). Del mismo modo, se ha visto que

en muchos tumores humanos la cantidad de determinadas proteínas involucradas en autofagia está enormemente reducida, lo que conlleva a una autofagia ineficiente (25). Esto podría ser debido a que la autofagia, mediante su acción digestiva, limita la posible acumulación de moléculas oncogénicas, como por ejemplo orgánulos en mal estado, agregados proteicos o ADN dañado, que podrían ser tóxicos para la célula y, en última instancia, dar lugar al crecimiento celular tumoral.

Por otro lado, la autofagia también ejerce un papel negativo en la progresión del cáncer, debido a que no sólo conserva la homeostasis de las células sanas, sino que también lo hace en aquellas células que se han transformado de sanas a tumorales. De hecho, las células cancerígenas se encuentran en ambientes poco vascularizados, lo que genera unas condiciones de hipoxia y baja disponibilidad de nutrientes propicias para la activación de la autofagia como mecanismo de supervivencia. A su vez, esta vía puede contrarrestar los efectos tóxicos de ciertos tratamientos quimio- o radioterapéuticos, protegiendo las células que forman los tumores. De esta manera, la autofagia puede ayudar a la supervivencia y progresión de tumores. Una revisión sobre los efectos de la manipulación genética y química de la autofagia en ratones como tratamiento contra el cáncer se puede encontrar en Galluzzi y colaboradores, 2016 (25).

### ENFERMEDADES INFECCIOSAS

La autofagia también actúa contra los microorganismos patógenos que invaden nuestras células durante un proceso infeccioso. Por ejemplo, diversos estudios han demostrado que muchas bacterias patógenas intracelulares, como aquellas causantes de la salmonelosis o la tuberculosis, activan la vía de la autofagia en las células que invaden. Esta activación es la respuesta de la célula a modo de defensa, puesto que termina con la degradación de la bacteria dentro del autolisosoma, convirtiéndose así la autofagia en un mecanismo de inmunidad celular. Del mismo modo, y como describo arriba, la autofagia también puede evitar el desarrollo de ciertos cánceres causados por la infección de agentes infecciosos tales como el virus del papiloma humano (26). Sin embargo, muchas de estas bacterias son capaces de evitar ser atrapadas en autofagosomas y digeridas en autolisosomas mediante complejos mecanismos moleculares que han desarrollado durante la evolución. Hoy en día, los investigadores no sólo buscan nuevos medicamentos capaces de matar a las bacterias que nos infectan sino que tratan de encontrar drogas que induzcan la vía autofágica en nuestras células, y así contrarrestar los mecanismos que emplean las bacterias patógenas para defenderse de ella. Por ejemplo, actualmente se encuentra en estudio la posible terapia contra tuberculosis mediante la aplicación, por vía inhalatoria directa a los pulmones de ratones infectados, de drogas inductoras de autofagia (27).

Pero la lucha célula-patógeno es, aun si cabe, más complicada. Hay bacterias que no sólo se defienden de la degradación por parte de la célula, sino que se aprovechan de la vía autofágica para su propio crecimiento. Este el

caso de bacterias del género *Yersinia*, *Staphylococcus* o *Legionella*, capaces de evitar la fusión del lisosoma al autofagosoma, consiguiendo así crecer dentro del autofagosoma, o incluso de habituarse al contenido ácido del autolisosoma y residir en él. Todo esto hace que la lucha antibacteriana mediante el control de la autofagia celular sea un complejo campo de investigación que sólo acaba de comenzar.

### Diabetes y enfermedades metabólicas

La prevalencia mundial de trastornos metabólicos es una amenaza inmediata para la salud humana. Las características genéticas, los aspectos ambientales y los cambios en el estilo de vida son los principales factores de riesgo que determinan la disfunción metabólica en nuestro cuerpo. Recientemente, evidencias en la literatura han demostrado que los defectos de la maquinaria autofágica se asocian con disfunción de múltiples tejidos metabólicos, incluyendo células  $\beta$  pancreáticas, hígado, tejido adiposo y músculo, y están implicados en trastornos metabólicos como la obesidad y la resistencia a la insulina. La mayoría de los datos sugieren que la autofagia puede ser un mecanismo protector contra la disfunción y la muerte de las células  $\beta$  pancreáticas (28). Sin embargo, el mecanismo preciso de la regulación autofágica y su mecanismo protector contra la muerte celular aún no han sido aclarados. Identificar el papel de la autofagia en la supervivencia o muerte celular durante la progresión a la diabetes es una tarea importante para los investigadores en este campo. Además, el desarrollo de técnicas que permitan la manipulación de la autofagia debería tener un impacto significativo en el desarrollo futuro de abordajes terapéuticos de la diabetes (29).

Dentro de los retos que existen hoy en día en el campo de la autofagia cabe destacar que tenemos que seguir indagando en los mecanismos moleculares que la controlan, con la idea de poder modularla de manera específica en determinados tipos celulares y de ser capaces de hacerlo de manera transitoria y controlada. No cabe duda de que en los próximos años seguiremos viendo un crecimiento de los conocimientos del proceso celular de autofagia..

### REFERENCIAS

1. Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol.* 2013 Jul 1;15(7):713-20.
2. De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J.* 1955 Aug;60(4):604-17.
3. de Duve C. Lysosomes revisited. *Eur J Biochem.* 1983 Dec 15;137(3):391-7.
4. Arstila AU, Trump BF. Studies on cellular autophagocytosis. The formation of autophagic vacuoles in the liver after glucagon administration. *Am J Pathol.* 1968 Nov;53(5):687-733.
5. Novikoff AB, Beaufay H, De Duve C. Electron

- microscopy of lysosomeric fractions from rat liver. *J Biophys Biochem Cytol.* 1956 Jul 25;2(4 Suppl):179-84.
6. Murk JL, Posthuma G, Koster AJ, Geuze HJ, Verkleij AJ, Kleijmeer MJ, et al. Influence of aldehyde fixation on the morphology of endosomes and lysosomes: quantitative analysis and electron tomography. *J Microsc.* 2003 Oct;212(Pt 1):81-90.
  7. Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol.* 1992 Oct;119(2):301-11.
  8. Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1993 Oct 25;333(1-2):169-74.
  9. Baba M, Osumi M, Ohsumi Y. Analysis of the membrane structures involved in autophagy in yeast by freeze-replica method. *Cell Struct Funct.* 1995 Dec;20(6):465-71.
  10. Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, et al. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature.* 1998 Sep 24;395(6700):395-8.
  11. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature.* 2006 Jun 15;441(7095):885-9.
  12. Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini J, Dessen P, Larochette N, et al. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2005;25(3):1025-40.
  13. Mariño G, Fernández AF, Cabrera S, Lundberg YW, Cabanillas R, Rodríguez F, et al. Autophagy is essential for mouse sense of balance. *J Clin Invest.* 2010 July 1;120(7):2331-44.
  14. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008 Jan 11;132(1):27-42.
  15. Denton D, Nicolson S, Kumar S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ.* 2012 2011/11/05;19(1):87-95.
  16. Gomez-Sintes R, Ledesma MD, Boya P. Lysosomal cell death mechanisms in aging. *Ageing Res Rev.* 2016 Mar 3.
  17. Rodriguez-Muela N, Koga H, Garcia-Ledo L, de la Villa P, de la Rosa EJ, Cuervo AM, et al. Balance between autophagic pathways preserves retinal homeostasis. *Ageing Cell.* 2013 Jun;12(3):478-88.
  18. Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet.* 2004 Jun;36(6):585-95.
  19. Dehay B, Bove J, Rodriguez-Muela N, Perier C, Recasens A, Boya P, et al. Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2010 Sep 15;30(37):12535-44.
  20. Rodriguez-Muela N, Germain F, Marino G, Fitze PS, Boya P. Autophagy promotes survival of retinal ganglion cells after optic nerve axotomy in mice. *Cell Death Differ.* 2012 Jun 24;19(1):162-9.
  21. Rodriguez-Muela N, Hernandez-Pinto AM, Serrano-Puebla A, Garcia-Ledo L, Latorre SH, de la Rosa EJ, et al. Lysosomal membrane permeabilization and autophagy blockade contribute to photoreceptor cell death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Cell Death Differ.* 2015 Mar;22(3):476-87.
  22. Serrano-Puebla A, Boya P. Lysosomal membrane permeabilization in cell death: new evidence and implications for health and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2015 Nov 24.
  23. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 1999 Dec 9;402(6762):672-6.
  24. Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev.* 2011 Apr 15;25(8):795-800.
  25. Tang H, Sebti S, Titone R, Zhou Y, Isidoro C, Ross TS, et al. Decreased BECN1 mRNA Expression in Human Breast Cancer is Associated with Estrogen Receptor-Negative Subtypes and Poor Prognosis. *EBioMedicine.* 2015 Mar;2(3):255-63.
  26. Griffin LM, Cicchini L, Pyeon D. Human papillomavirus infection is inhibited by host autophagy in primary human keratinocytes. *Virology.* 2013 Mar 1;437(1):12-9.
  27. Gupta A, Misra A, Deretic V. Targeted pulmonary delivery of inducers of host macrophage autophagy as a potential host-directed chemotherapy of tuberculosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 Jul 1;102:10-20.
  28. Bartolome A, Guillen C, Benito M. Autophagy plays a protective role in endoplasmic reticulum stress-mediated pancreatic beta cell death. *Autophagy.* 2012 Dec;8(12):1757-68.
  29. Stienstra R, Haim Y, Riahi Y, Netea M, Rudich A, Leibowitz G. Autophagy in adipose tissue and the beta cell: implications for obesity and diabetes. *Diabetologia.* 2014 Aug;57(8):1505-16.

# Premio Nobel en Química 2016

Juan-Ramón Lacadena Calero

---

El 5 de octubre de 2016, la Real Academia de Ciencias de Suecia decidió otorgar el Premio Nobel en Química 2016 a Jean-Pierre Sauvage (Universidad de Estrasburgo, Francia), a Sir J. Fraser Stoddart (Northwestern University, Evanston, IL, USA) y a Bernard L. Feringa (Universidad de Groningen, Holanda) “por el diseño y síntesis de máquinas moleculares”.

Como señalaba la nota de prensa de la institución, ellos desarrollaron las máquinas más pequeñas del mundo. El primer paso hacia la síntesis de máquinas moleculares lo dio el Dr. Sauvage en 1983 al conseguir concatenar dos moléculas anulares formando un *catenano*. Un segundo paso lo dio en 1991 Sir J. Fraser Stoddart al sintetizar el *rotaxano* consistente en una molécula en anillo enhebrada sobre una molécula lineal sobre la que se desplazaba a modo de eje o cardán. Los rotaxanos han permitido construir ascensores diminutos y músculos moleculares. Finalmente, en 1999 Bernard Feringa desarrolló un motor molecular consistente en una paleta de rotor que se desplaza continuamente en la misma dirección.

Para exponer lo que significan las investigaciones premiadas, nadie mejor que el Prof. Dr. Tomás Torres Cebada que tiene la palabra.



# Las “nanomáquinas” se crecen con el Nobel de Química 2016

Tomás Torres Cebada

**Corresponding Author:** tomas.torres@uam.es

An Real Acad Farm Vol. 82, N° 4 (2016), pp. 454-459

## 1. INTRODUCCIÓN

Los científicos Jean Pierre Sauvage, de la Universidad de Estrasburgo (Francia), James Fraser Stoddart, de la Universidad de Northwestern (EEUU) y Bernard L. Feringa, de la Universidad de Groningen (Holanda) (**Figura 1**) han sido galardonados con el Premio Nobel de Química 2016 por “*el diseño y la síntesis de las máquinas*

*moleculares*”. Con ello la química alcanza realmente *una nueva dimensión*, y no de una forma figurada, sino de una forma real. Los ahora premiados han desarrollado sistemas moleculares con movimientos controlables, que son capaces de realizar una tarea cuando se les proporciona energía, en definitiva, han fabricado “*las máquinas más pequeñas del mundo*”.



**Figura 1.** Jean Pierre Sauvage, James Fraser Stoddart y Bernard L. Feringa.

La conferencia de Richard Feynman, en 1959, en la Sociedad Americana de Física, que ha pasado a la historia como el punto de partida de la nanotecnología y su famoso: “*There's Plenty of Room at the Bottom*” (*Hay mucho sitio al fondo*), con el que la tituló, toman cuerpo, en el área de la química, a través de este reconocimiento. Feynman destacó entonces las grandes posibilidades que ofrecían la investigación y manipulación del mundo micro- y nanoscópico, y atisbó la posibilidad de la manipulación directa de los átomos como una forma más potente de química sintética que la utilizada en el momento.

La construcción de estas máquinas moleculares se basa en la comprensión y el conocimiento de las fuerzas intermoleculares débiles, que caracterizan la química supramolecular. Interacciones tales como el enlace por puentes de hidrógeno, transferencia de carga y fuerzas de Van der Waals han sido usadas para organizar y dirigir el ensamblado de sistemas moleculares. El creciente interés en la química supramolecular, después de la concesión del premio Nobel de Química en 1987 a Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn y Charles J. Pedersen “*por el desarrollo y el uso de moléculas con interacciones específicas de alta selectividad*”, ha estimulado la investigación en este área. La química supramolecular o la química más allá de la molécula, como definió Jean-Marie Lehn, está basada en el estudio de las interacciones intermoleculares no covalentes y cubre tanto aspectos estáticos, como el reconocimiento molecular, como dinámicos, por ejemplo los fenómenos de extracción y transporte selectivo a través de membranas.

## 2. MÁQUINAS A ESCALA MOLECULAR

Dentro de este marco, los galardonados han extendido el concepto de máquina macroscópica a escala molecular. Una “máquina a escala molecular” puede definirse como el ensamblado de un número dado de componentes moleculares que han sido diseñados para realizar movimientos mecánicos (output) como resultado de una estimulación externa apropiada (input). Las máquinas moleculares también pueden definirse como un subconjunto de dispositivos moleculares (sistemas moleculares funcionales) en el que algún estímulo desencadena un movimiento mecánico controlado de un componente con relación a otro (o de un sustrato respecto a la máquina) que resulta en la realización de una tarea neta.

Al igual que sus equivalentes macroscópicos, una máquina molecular se caracteriza por el tipo de energía suministrada para hacerla trabajar, la naturaleza de los movimientos de sus componentes, el modo en que su funcionamiento puede ser monitorizado y controlado, la capacidad para hacer que repita su funcionamiento de una forma cíclica, la escala de tiempos necesaria para realizar un ciclo completo de movimientos, y el propósito de este funcionamiento. Sin duda, la mejor energía de entrada para hacer trabajar las máquinas moleculares son los fotones y los electrones. Verdaderamente, con reacciones químicas debidamente escogidas, controladas de manera fotoquímica y electroquímica, es posible diseñar y sintetizar máquinas moleculares que produzcan un trabajo.

### 2.1. ¿Para qué hacer máquinas a escala molecular?

Las máquinas moleculares desempeñan un papel crucial en prácticamente todos los **procesos biológicos relevantes**. Por ejemplo, la ATP sintasa es la enzima universal que fabrica ATP a partir de ADP y fosfato mediante el uso de la energía derivada de un gradiente de protones a través de la membrana. También puede revertirse e hidrolizar ATP para bombear protones contra un gradiente electroquímico. La ATP sintasa lleva a cabo tanto su ciclo sintético como hidrolítico por un mecanismo rotatorio y representa el motor rotatorio más pequeño del mundo.

### 2.2. Efectos de la escala en el movimiento

El número de Reynolds (R) es un número adimensional utilizado, entre otras cosas, para caracterizar el movimiento en un fluido, y se puede definir como la relación entre las fuerzas inerciales y las fuerzas viscosas presentes en éste. R relaciona la densidad ( $\rho$ ), viscosidad ( $\mu$ ), velocidad ( $v$ ) y dimensión ( $a$ ) de un objeto en un flujo.

$$R = av \frac{\rho}{\eta}$$

A nivel macroscópico (un nadador, un pez) ( $\geq 10^{-3}$  m),  $R > 100$  domina el término inercial ( $mv$ ) y las fuerzas de viscosidad tienen una importancia variable. Sin embargo a nivel bacteriano ( $10^{-5}$  -  $10^{-7}$  m),  $R \approx 10$  las fuerzas de viscosidad empiezan a dominar y el término inercial no es importante. Pues bien, a nivel molecular (nanomundo) ( $< 10^{-7}$  m),  $R \ll 10$  el término inercial es completamente negligible e impera el Movimiento Browniano (Ruido térmico) (2). A este nivel se requieren nuevos mecanismos para describir el movimiento.

Una partícula suficientemente pequeña como un grano de polen, inmersa en un líquido, presenta un movimiento aleatorio, observado primeramente por el botánico Brown en el siglo XIX. El movimiento browniano pone de manifiesto las fluctuaciones estadísticas que ocurren en un sistema en equilibrio térmico. Tienen interés práctico, porque las fluctuaciones explican el denominado "ruido" que impone limitaciones a la exactitud de las medidas físicas delicadas. El movimiento browniano puede explicarse a escala molecular por una serie de colisiones en una dimensión en la cual, pequeñas partículas (denominadas térmicas) experimentan choques con una partícula mayor.

Una típico motor de proteína consume 100-1000 moléculas de ATP por segundo ( $10^{-16}$ - $10^{-17}$  W), pero sufre los embates de moléculas de agua a temperatura ambiente equivalentes a  $10^{-8}$  W. Esto es como moverse dentro de un huracán!! Entonces, ¿cómo funcionan estas máquinas? Las máquinas moleculares no utilizan la energía para generar movimiento, pero si lo hacen para **rectificar el movimiento browniano**, ya presente.....

Debido a la enorme importancia del movimiento browniano, en cualquier sistema molecular donde  $T > 0$  K,

**producir un movimiento controlado tiene más que ver con el control que con la producción (3).**

En definitiva, algunas de los aspectos que afectan el diseño de la maquinaria molecular serían los siguientes:

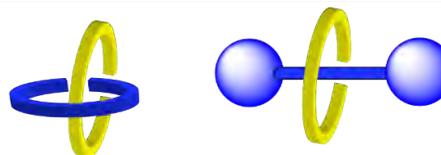
- El cambio en las fuerzas predominantes que gobiernan el nanomundo **imposibilita una extrapolación** del diseño y las funciones de las máquinas macroscópicas.
- Se requiere una fuente de energía (Segunda Ley).
- La energía no se consume para generar movimiento, sino para rectificar el movimiento browniano.
- Para simplificar el problema de la rectificación, se hace necesario restringir los grados de libertad de la máquina molecular.
- Los mecanismos de trabajo de las máquinas moleculares de la naturaleza se basan en la modulación de la fortaleza de fuerzas débiles no covalentes.
- Las máquinas moleculares biológicas trabajan siempre alejándose del equilibrio.

## 3. CONSTRUCCIÓN DE MÁQUINAS A ESCALA MOLECULAR

Dos importantes avances de la tecnología han demostrado ser particularmente útiles para abordar el complejo desafío de la construcción de máquinas a escala molecular. El primero de ellos consiste en el **"entrelazamiento topológico"** o las llamadas **"uniones mecánicas"**, mientras que la segunda estrategia se basa en los **"enlaces insaturados isomerizables"** o "molecular switches". Ambos avances han dado lugar a una amplia gama de estructuras complejas con funciones similares a las de una máquina.

### 3.1. Restricción de movimiento a través del entrelazamiento topológico. Uniones mecánicas

Una parte sustancial de los progresos realizados en la maquinaria molecular tiene sus raíces en la aparición de sistemas moleculares entrelazados por uniones mecánicas. En tales sistemas, las partes individuales no están directamente conectadas ni unidas por enlaces covalentes, pero están inseparablemente entrelazadas a través de, por ejemplo, bucles y tapones (**Figura 2**).



**Figura 2.** a) [2]catenano; b) [2]rotaxano.

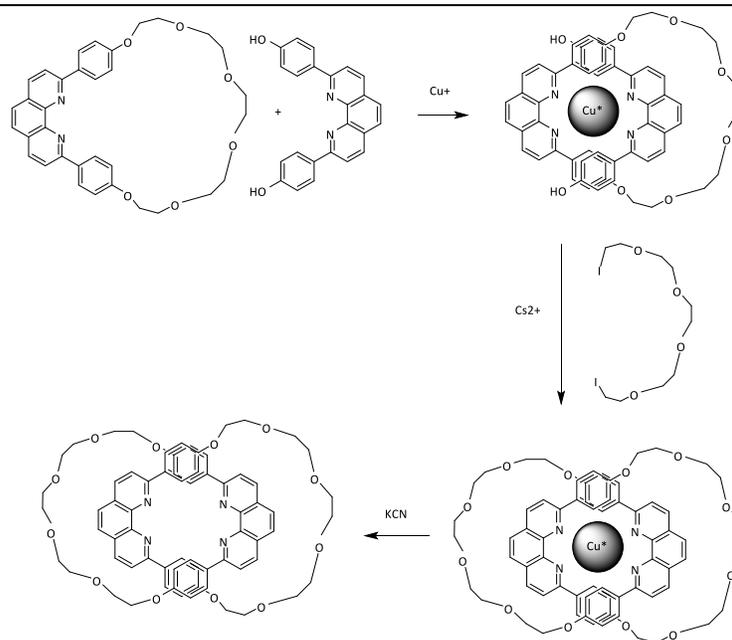
Las partes individuales pueden en principio moverse libremente una respecto a la otra, a pesar de que están confinadas en el espacio debido a sus interconexiones mecánicas mutuas, lo que resulta en estructuras moleculares discretas.

Ambos, catenanos, basados en dos anillos entrelazados, y rotaxanos, basados en un anillo roscado sobre un eje con tapones en cada extremo, se propusieron y sintetizaron en

los años sesenta.

El desarrollo en esta área resultó en una mejor comprensión de los principios necesarios para la formación catenanos y rotaxanos. Sin embargo, a principios de los ochenta el área sufrió un gran avance cuando Jean-Pierre Sauvage introdujo la síntesis con plantilla como una ruta directa para la preparación de catenanos y rotaxanos (4) (**Figura 3**). De esta manera los rendimientos globales pudieron incrementarse drásticamente. La estrategia de síntesis se basa en la coordinación de dos unidades de fenantrolina a un átomo

de Cu (I) (5). De ese modo se consigue un ángulo diedro adecuado entre los componentes que interactúan. En un resto de fenantrolina se introdujo en una unidad macrocíclica de éter-corona y en el otro un fragmento de forma de media luna. El ensamblamiento de los dos componentes en presencia de Cu (I) dio lugar a un complejo con funciones fenólicas perfectamente direccionadas que favorecerían el posterior cierre del ciclo por reacción con un diyododerivado. Por último, la eliminación del ion metálico produce el [2] catenano libre.



**Figura 3.** Síntesis con plantilla de un catenano.

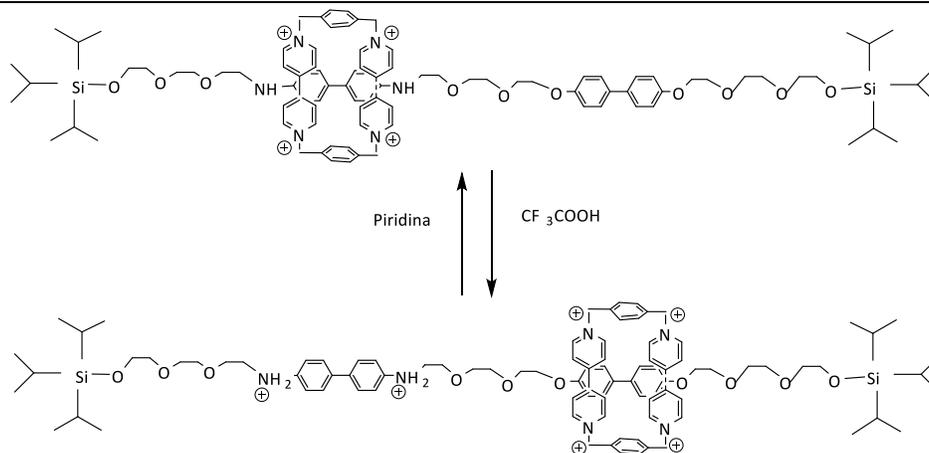
Este descubrimiento marcó un verdadero avance en el área de la maquinaria molecular. Sauvage (6, 7, 8) fue capaz de demostrar posteriormente el potencial de estas estructuras en el denominado isomerismo translacional (9).

El campo dio otro gran salto adelante a principios de los noventa, cuando un claro ejemplo de isomería translacional fue descrito por el grupo de Fraser Stoddart (10). Para ello utilizaron interacciones entre entidades aromáticas ricas en electrones y otras de carácter deficiente. Estos estudios resultaron en el desarrollo de una estructura de paraquat ciclofano (11), que podría ser “enlazada” alrededor de un eje conteniendo dos unidades de hidroquinona distanciadas por un separador. Los extremos del eje fueron bloqueados por grupos voluminosos. De esta manera se obtuvo un [2] rotaxano con un buen rendimiento. El ciclofano-rotaxano resultante podía funcionar como un transportador molecular en el

cual la unidad de paraquat era capaz de moverse entre las dos estaciones derivadas de hidroquinona a lo largo de eje.

Este hecho, junto con la demostración que hizo Sauvage de cambiar de forma reversible un catenano a otro, supuso el inicio de la aplicación de entrelazamiento topológico al desarrollo de la maquinaria molecular.

Posteriormente, los grupos de Sauvage y Stoddart demostraron el movimiento de traslación y rotación controlado externamente en moléculas mecánicamente interconectadas mediante la introducción de asimetría en las estructuras. El grupo de Stoddart (**Figura 4**) introdujo dos unidades dadoras de electrones  $\pi$  diferentes en el eje del rotaxano, en concreto grupos de benzidina y difenol, y pudo demostrar que un anillo de ciclofano bis-paraquat podía moverse entre las dos estaciones tras ciclos electroquímicos de oxidación y reducción o a través de cambios de pH, como fuentes de energía (12).



**Figura 4.** Ejemplo de rotaxano asimétrico.

El grupo Sauvage por su parte diseñó una estructura de catenano con dos sitios de coordinación diferentes en uno de los anillos, en concreto dos unidades de fenantrolina y terpiridina, dejando una única unidad de fenantrolina en el otro anillo (13). La rotación del catenano se producía por ciclos de oxidación y reducción electroquímica del ión de cobre central.

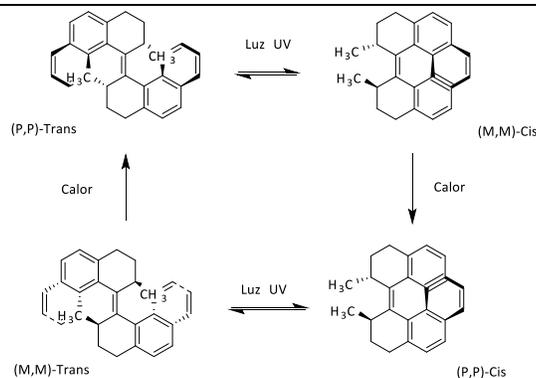
Ya en este siglo, el control químico de la contracción / extensión molecular, que se asemeja a la acción de los músculos en los sistemas vivos, se demostró, por ejemplo, en una estructura de rotaxano topológicamente compleja diseñada por el grupo Sauvage. Al integrar dos funcionalidades de rotaxano mutuamente entrelazadas, se pudo controlar la contracción translacional y la subsiguiente extensión de ca. 2 nm por medio de un estímulo químico (14). Asimismo, actuadores que se asemejaban a músculos, en los que estructuras de rotaxano podían ser controladas para doblar una delgada estructura de un "cantilever" de oro fueron desarrollados por Stoddart (15). Similarmente el mismo grupo desarrolló un dispositivo basado en un rotaxano complejo llamado "elevador molecular" (16).

Por otra parte, el grupo de Stoddart desarrolló dispositivos electrónicos a escala molecular basados en

rotaxanos y catenanos, con la intención de fabricar puertas y memorias de lógica molecular. Estos estudios resultaron en un dispositivo basado en un rotaxano con función de memoria (17). Más recientemente, en 2015, el grupo Stoddart mostró un ejemplo de producción de un gradiente químico usando una estructura de tipo rotaxano (18).

### 3.2. Restricción de movimiento a través de enlaces insaturados isomerizables

A la vez que se producían los avances basados en estructuras mecánicamente entrelazadas, los denominados "enlaces insaturados isomerizables" también han estado en el centro del progreso de las máquinas moleculares. Esta trayectoria ha sido testigo de una serie de importantes aportaciones. Entre ellas, "la rotación unidireccional controlada" (**Figura 5**) marca un avance fundamental en este desarrollo. El primer ejemplo de rotación unidireccional controlada fue descrito por Feringa en 1999 (19). Este motor estaba basado en enlaces dobles isomerizables. Utilizando alquenos estéricamente impedidos y moléculas quirales fue posible obtener una rotación unidireccional a través de varios ciclos de irradiación de luz y relajación térmica.



**Figura 5.** Ejemplo de rotación unidireccional controlada

Este ingenioso diseño representa un salto cualitativo importantísimo en el desarrollo de la maquinaria molecular. Feringa y sus colaboradores abordaron la tarea

fundamental del cambio estructural impulsado por la luz a escala molecular y dieron una solución al desafío del movimiento unidireccional. Durante los años siguientes,

varias generaciones de diseños de motores emanaron del grupo de Feringa, y la frecuencia de rotación se fue aumentando paulatinamente. En 2014, por ejemplo, se demostró que una estructura de motor optimizada giraba con una frecuencia de más de 12 MHz (20). Asimismo, el grupo de Feringa fue capaz de poner en movimiento una estructura de "chasis" compuesta por cuatro motores (a modo de ruedas), que pueden operar en diferentes sentidos de giro, demostrando así la propulsión de un "nanocoche" sobre una superficie (21).



**Figura 6.** David A. Leigh.

Sin el comité Nobel hubiese podido otorgar un cuarto premio, sin lugar a dudas éste habría sido para David A. Leigh de la Universidad de Manchester (**Figura 6**). Leigh, imitando a los ribosomas, ha desarrollado una síntesis peptídica efectuada por una máquina artificial. Así describió en 2013 (22), el diseño, la síntesis y el funcionamiento de una máquina artificial que moviéndose a lo largo de una cadena molecular, recoge los aminoácidos, particularmente colocados, que bloquean su camino, para sintetizar un péptido con una secuencia específica. La estructura química se basa en un rotaxano, un anillo molecular enhebrado a un eje molecular. El anillo lleva un grupo tiolato que iterativamente "engancha" los aminoácidos en el orden de la cadena y los transfiere sobre el mismo macrociclo para dar lugar a la formación de un péptido. Este proceso genera cantidades de miligramos de un péptido con una secuencia fijada y única, confirmada por espectrometría de masas.

Por otra parte, Leigh ha desarrollado distintos aspectos biomiméticos de las máquinas moleculares. Las proteínas de las familias de actina y de tubulina son capaces de auto-ensamblar formando los filamentos de actina y los microtúbulos respectivamente. Sobre estos filamentos, como si fueran raíles, se mueven las proteínas motoras de las familias de la miosina, quinesina y dineína, un tipo de motores moleculares que convierten la energía química de la hidrólisis del ATP en trabajo mecánico. Estas proteínas motoras son responsables de los mecanismos de la contracción muscular, entre otros. Los "caminantes" biológicos basados en ADN, explotan el apareamiento de bases ortogonales y utilizan reacciones de desplazamiento de cadena para controlar la asociación relativa de las partes componentes, y dar lugar al movimiento. Los "caminantes artificiales" aprovechan la reversibilidad de las interacciones no covalentes débiles, así como la robustez

de los enlaces covalentes dinámicos con el fin de transportar fragmentos moleculares a lo largo de superficies (23, 24, 25).

Leigh (26) ha preparado, una molécula pequeña, doblemente funcionalizada en sus extremos, con dos "pies lábiles" A y B que "andan" repetidamente a lo largo de otra molécula mayor, que hace las veces de ruta molecular, y que consta de cuatro puntos de apoyo (1, 2, 3 y 4) sobre los que se produce el "paseo" (**Figura 7**). Todo ello en respuesta a un entorno químico cambiante. Según se produce el avance de la reacción entre los dos componentes, el proceso de unión va a venir dado por los dos pies o extremos A y B que van a ir moviéndose a través de la ruta 1-2-3-4 dependiendo de las condiciones a que se les someta, ácidas o básicas. El extremo A, un grupo hidrazona, en condiciones ácidas va a ser lábil y tendrá capacidad para cambiar de posición, mientras que en condiciones básicas va a quedar bloqueado. El extremo B, un grupo tiol, se comportará a la inversa. La alternancia de estas condiciones va a permitir que el caminante sea capaz de andar, lo que constituye un motor molecular lineal artificial.

Leigh y sus colaboradores también han conseguido recientemente un nuevo motor que consiste en un 2-catenano, con un pequeño anillo orgánico enroscado en torno a otro anillo mayor por el que puede desplazarse a modo de vía (27). El movimiento se produce por difusión entre dos lugares o estaciones. Grupos protectores extraíbles situados en la pista del anillo principal evitan que el pequeño pueda moverse marcha atrás, obligándolo a difundir siempre hacia adelante. El combustible reacciona para añadir o quitar grupos protectores.

#### 4. CONCLUSIONES

La organización Nobel ha reconocido con el galardón el trabajo de muchos químicos, representados por los tres premiados, que han ayudado con su obra al avance de la nanotecnología. Su objetivo era y es "construir máquinas con las dimensiones de la escala nanométrica", emulando a elementos presentes en la naturaleza.

- Es importante destacar el papel que en este campo juega la síntesis orgánica. Se han puesto de manifiesto recientemente magníficos ejemplos de desarrollos sintéticos, así como de procesos de autoensamblado y auto-organización que han permitido la construcción de una variedad de máquinas moleculares artificiales.

- Ahora se sabe cómo controlar el movimiento en arquitecturas moleculares, e incluso cómo se puede utilizarlas para realizar algunas funciones básicas.

- El trabajo sinérgico de los químicos, junto con físicos, biólogos farmacéuticos, médicos, ingenieros, etc. arroja luz sobre los mecanismos de trabajo de las máquinas moleculares biológicas y el establecimiento de los principios básicos del diseño de las artificiales.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

La fuente principal de estudio para la elaboración de este artículo ha sido el documento "The Nobel Prize in

Chemistry 2016 - Advanced Information". *Nobelprize.org*. © Nobel Media AB 2014. Web. 24 Nov 2016. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2016/advanced.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2016/advanced.html), Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2016 Molecular Machines compiled by the Class for Chemistry of the Royal Swedish Academy of Sciences by Olof Ramström.

## 6. REFERENCIAS

1. Feynman RP. There's plenty of room at the bottom. *Eng Sci* 1960; 23: 22-36. *Saturday Rev* 1960; 43: 45-7.
2. Purcell EM. Life at low Reynolds number. *Am J Phys* 1977; 45: 3-11.
3. Astumian RD. Thermodynamics and kinetics of a brownian motor. *Science* 1997; 276 : 917-22.
4. Dietrich-Buchecker CO, Sauvage J-P, Kintzinger JP. Une nouvelle famille de molécules: les métallo-catélanes. *Tetrahedron Lett* 1983; 24: 5095-8.
5. Dietrich-Buchecker CO, Marnot PA, Sauvage J-P. Direct synthesis of disubstituted aromatic polyimine chelates. *Tetrahedron Lett* 1982; 23: 5291-4.
6. Sauvage JP, Weiss J. Synthesis of dicopper(I) [3]catenates: multiring interlocked coordinating systems. *J Am Chem Soc* 1985; 107: 6108-10.
7. Dietrich-Buchecker CO, Sauvage J-P. A synthetic molecular trefoil knot. *Angew Chem Int Ed* 1989; 28: 189-192.
8. Nierengarten J-F, Dietrich-Buchecker CO, Sauvage J-P. Synthesis of a doubly interlocked [2]-catenane. *J Am Chem Soc* 1994; 116: 375-6.
9. Cesario M, Dietrich-Buchecker CO, Guilhem J, Pascard C, Sauvage J-P. Molecular structure of a catenand and its copper(I) catenate: complete rearrangement of the interlocked macrocyclic ligands by complexation. *J Chem Soc Chem Commun* 1985; 244-7.
10. Anelli PL, Spencer N, Stoddart JFA. Molecular shuttle. *J Am Chem Soc* 1991; 113: 5131-3.
11. Odell B, Reddington MV, Slawin AMZ, Spencer N, Stoddart, JF, Williams DJ. Cyclobis(paraquat-p-Phenylene). A tetracationic multipurpose receptor. *Angew Chem Int Ed* 1988; 27: 1547-50.
12. Bissell RA, Córdova E, Kaifer AE, Stoddart JF. A chemically and electrochemically switchable molecular shuttle. *Nature* 1994; 369: 133-7.
13. Livoreil A; Dietrich-Buchecker CO; Sauvage, JP. Electrochemically triggered swinging of a [2]-catenane. *J Am Chem Soc* 1994; 116: 9399-400.
14. Jiménez MC; Dietrich-Buchecker C.; Sauvage J-P. Towards synthetic molecular muscles: contraction and stretching of a linear rotaxane dimer. *Angew Chem Int Ed* 2000; 39: 3284-7.
15. Liu Y, Flood AH, Bonvallet PA, Vignon SA, Northrop BH, Tseng H-R, et al. Linear artificial molecular muscles. *J Am Chem Soc* 2005; 127: 9745-59.
16. Badjić JD, Balzani V, Credi A, Silvi S, Stoddart JFA. Molecular elevator. *Science* 2004; 303: 1845-49.
17. Green JE, Wook Choi J, Boukai A, Bunimovich Y, Johnston-Halperin E, et al. A 160-kilobit molecular electronic memory patterned at 1011 bits per square centimetre. *Nature* 2007; 445: 414-7.
18. Cheng PRS, McGonigal PR, Schneebeli ST, Li H, Vermeulen NA, Ke C, Stoddart JF. An artificial molecular pump. *Nat. Nanotech* 2015; 10: 547-53.
19. Koumura N, Zijlstra RWJ, Van Delden RA, Harada N, Feringa BL. Light-driven monodirectional molecular rotor. *Nature* 1999; 401: 152-5.
20. Vachon, J, Carroll GT, Pollard MM, Mes EM, Brouwer AM, Feringa BL. An ultrafast surface-bound photo-active molecular motor. *Photochem Photobiol Sci* 2014; 13: 241-6.
21. Kudernac T, Ruangsapichat N, Parschau M, Macia B, Katsonis N, Harutyunyan SR, Ernst KH, Feringa BL. Electrically driven directional motion of a four-wheeled molecule on a metal surface. *Nature* 2011; 479: 208-211.
22. Lewandowski B, De Bo G, Ward JW, Pappmeyer M, Kuschel S, Aldegunde MJ, Gramlich PME, Heckmann D, Goldup SM, D'Souza DM, Fernandes AE, Leigh DA. Sequence-specific peptide synthesis by an artificial small-molecule machine. *Science* 2013; 339: 189-93.
23. Von Delius M, Leigh DA. Walking molecules. *Chem Soc Rev* 2011; 40: 3656-76.
24. Pérez EM, Synthetic molecular bipeds. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011; 50: 3359-61.
25. Leigh DA, Lewandowska U, Lewandowski B, Wilson MR. Synthetic molecular walkers. *Top Curr Chem* 2014; 354: 111-38.
26. von Delius M, Geertsema EM, Leigh DA. Synthetic small molecule that can walk down a track. *Nature Chem.* 2010; 2, 96-101.
27. Wilson MR, Sola J, Carlone A, Goldup SM, Lebrasseur N, Leigh DA. An autonomous chemically fueled small-molecule motor. *Nature* 2016; 534: 235-40.



## Información académica

Bartolomé Ribas Ozonas

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia

e-mail: secretaria@ranf.com

---

### SESIONES CIENTÍFICAS

Durante el cuarto trimestre del año 2016, en la sede de la Real Academia Nacional de Farmacia, se han realizado un total de once sesiones científicas, de las cuales seis fueron conferencias, dos mesas redondas, una Jornada Científica “Cátedra Juan Abelló”, una Sesión Conmemorativa de los Premios Nobel 2016 y un acto “In Memoriam” del Ilmo. Sr. D. Pedro Capilla Martínez.

**El 6 de octubre** tuvo lugar la conferencia celebrada en colaboración con la Fundación José Casares Gil de Amigos de la RANF sobre "Cooperación farmacéutica. Una visión africana", a cargo del Dr. Ángel Huéllamo. Ángel Huéllamo es el actual Director de Farmacéuticos Sin Fronteras de España.

Farmacéutico de profesión, ha centrado su carrera profesional en el sector no lucrativo, en concreto las ONGs. Con un postgrado en Gestión y Dirección de Entidades no lucrativas en ESADE ampliado con un curso sobre Liderazgo e Innovación en el sector y un Máster en Promoción y Gestión de estas entidades (Módulo de Identificación, Dirección y Evaluación de Proyectos de Desarrollo), a lo que hay que añadir diferentes cursos siempre relacionados con este sector (captación de fondos, comunicación, marketing...). Todo ello completa su excelente formación académica y social.

En 2012 finaliza los estudios de "Especialista en formación elearning con moodle" por la Universidad Complutense de Madrid.

En diciembre de este año cumple 16 años en la entidad en la que comenzó como voluntario y posterior cooperante en Guatemala. A partir de ahí, al regreso, pasa a ser el Coordinador de Proyectos y Actividades de la entidad, circunstancia que termina con la identificación del Plan de Desarrollo en Ecuador, en el año 2005, fecha en la que es nombrado Director.

Además de la coordinación de los proyectos y actividades desarrollados en la Organización (Campaña de Recogida de Radiografías Inservibles, Campaña de Lotería de Navidad, diferentes proyectos de Cooperación al Desarrollo...), programas como el Banco de Medicamentos F.S.F.E. y el Proyecto de Asistencia Farmacéutica en Cuarto Mundo, ambos con varios premios en su haber, han sido diseñados por él, y desarrollados junto a todo el equipo de trabajo de F.S.F.E. El último proyecto que ha diseñado ha sido la plataforma CDAF 2.0, de la que es administrador y tutor de algunos de los cursos, y el Proyecto Boticarios, actividad mixta de formación e intervención en terreno que supone el mayor proyecto de envío de profesionales farmacéuticos a cooperación desde España.

Actualmente pertenece al grupo estable de la Coordinadora de ONGs que trabaja para fomentar la Transparencia y Rendición de cuentas en las ONGs.

Finalmente indicamos que ha publicado varios artículos en prensa -Correo Farmacéutico, Consejos de Tu Farmacéutico, Revista Española del Tercer Sector y otras. Y ha participado en los libros, como "Elige lo que quieres ser", en el apartado destinado a los estudios de Farmacia, y "Ser farmacéutico", en el apartado del farmacéutico en su papel humanitario. También es autor del cartel ganador de los carteles científicos de Infarma 2013 por el trabajo "Relación entre el perfil social y farmacoterapéutico de los pacientes atendidos en el programa AF4M".

Fue presentado por el Académico de Número, el Excmo. Sr. D. Antonio Monge Vega.

**El 13 de octubre**, la Real Academia Nacional de Farmacia tuvo el honor de celebrar, en colaboración con la Fundación José Casares Gil de Amigos de la RANF, la conferencia sobre "Cáñamo Indiano: conceptos generales, aspectos farmacológicos, toxicológicos y sociales", a cargo del Académico de Número de la RANF el Excmo. Sr. D. Ángel María Villar del Fresno.

**Cátedra Juan Abelló.** Esta Cátedra de la RANF ha programado la impartición de una serie de conferencias y actividades, que se hicieron realidad el 20 de octubre, por la Sección 4ª, cuya Presidenta es la Académica de número la

Excma. Sra. Doña María Teresa Miras Portugal. Con el fin de dar a conocer las investigaciones y avances actuales sobre la especie botánica de uso tan antiguo y tan actual en su proyección farmacológica, terapéutica y social como es el *Cannabis sativa*. Por ello le pareció conveniente a la Sección 4ª de esta Real Academia la intervención de eminentes investigadores, considerados especialistas en la materia, que desarrollasen el estado de sus respectivas investigaciones sobre los distintos aspectos farmacológicos y terapéuticos, y facilitar una visión global, farmacognóstica-farmacológica, del *Cannabis sativa*.

Esta especie es utilizada ampliamente desde tiempos inmemoriales por distintas culturas, pudiéndose decir que ha sido de empleo universal tanto desde el punto de vista terapéutico como placentero.

Tiene principios activos diversos con diferentes propiedades farmacológicas y de ahí sus posibles y múltiples aplicaciones terapéuticas, analgésica, antiemética, etc.

Existe un importante capítulo que lo constituye el uso y abuso como “droga” con una gran controversia social, desde los que pensaban que esta especie vegetal ‘orillaba el camino del infierno’ hasta los que consideraron como libertadora del pecado. Los chinos proclamaban “la planta donadora del deleite o embeleso”. En la actualidad la controversia continúa, prácticamente su comercio y cultivo, sino es con fines científicos o textiles, está prohibido en todo el mundo, aunque existe en muchos países occidentales, es objeto de una fuerte presión social para liberalizar su uso.

**El 20 de octubre**, bajo los auspicios de la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF, esta Real Academia Nacional de Farmacia tuvo el honor de celebrar, la Jornada Científica “Cátedra Juan Abelló”, Jornada de Cannabinoides titulada “Cannabinoides: aspectos farmacológicos y clínicos”.

El acto fue presidido por el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia. Su presentación corrió a cargo del la Excma. Sra. Doña Mª Teresa Miras Portugal, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Actuaron como ponentes los profesores, D. Manuel Guzmán, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la UCM, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Ciencias Biológicas, con el título: “El sistema cannabinoide: un nuevo sistema de comunicación en nuestro organismo”; D. Eduardo Muñoz Blanco, Catedrático de Inmunología, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC) de la Universidad de Córdoba. Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología: “Cannabinoides y Esclerodermia como Enfermedad Autoinmune”; D. José Martínez Orgado, Jefe de Sección de Neonatología. Instituto del Niño y del Adolescente. Hospital Clínico San Carlos: “Cannabinoides y enfermedades neurológicas en pediatría”; y D. Rafael Maldonado López, Catedrático de Farmacología de la Universidad Pompeu Fabra Institucio Catalana de Recerca/estudis avançats- ICREA: “Cannabinoides y dolor”. Cerró la Sesión el Excmo. Sr. D. Juan Abelló Gallo, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

**El 27 de octubre** la Real Academia Nacional de Farmacia, en colaboración con la Fundación José Casares Gil de amigos de la RANF, celebró la Mesa Redonda titulada “Residuos, Contaminación y Salud Ambiental” bajo la Presidencia del Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, y con la coordinación del Excmo. Sr. D. Bernabé Sanz Pérez, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, y contó con los siguientes ponentes: Excmo. Sr. D. Elías Fereres Castiel, Presidente de la Real Academia de Ingeniería, que habló sobre: “La seguridad alimentaria ante el calentamiento global”; y el Excmo. Sr. D. Arturo Romero Salvador, Académico de Numero de las Reales Academias de Ciencias y de Doctores, que nos informó sobre: “Residuos sólidos: fuentes y problemas”.

**El 3 de noviembre** la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación José Casares Gil de amigos de la RANF celebraron la conferencia titulada: "Resistencia a antibióticos: nuevos conceptos en el origen y lucha contra el mayor reto sanitario del siglo XXI", a cargo del Dr. Bruno González Zorn, Profesor Titular de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad Complutense de Madrid. Fue presentado por el Académico de Número, Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández.

El Prof. Bruno González Zorn es un eminente Investigador en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y pertenece al Área de Sanidad Animal desde enero de 2008, en el Departamento de Sanidad Animal que dirige desde noviembre de 2014. Licenciado en Veterinaria en 1995, recibió una beca Erasmus para realizar un año de investigación en la Facultad de Veterinaria de la Justus-Liebig Universität Giessen, Alemania. Realizó su Tesis doctoral, con mención europea como becario del MEC, en el campo de la patogénesis molecular bacteriana defendida en el año 2001, bajo la dirección del Prof. J.A. Vázquez-Boland. En 2002 obtuvo una beca postdoctoral MECD/FULBRIGHT para realizar una estancia postdoctoral en la Unidad de Agentes Antibacterianos del Instituto Pasteur de París del Dr. Patrice Courvalin. Regresó con un contrato Ramón y Cajal del MEC en 2005, manteniendo su vínculo con el Instituto Pasteur hasta 2008. Superó el examen de Habilitación Nacional en Murcia en 2007, además de haber sido acreditado para todos los niveles de profesorado por la ANECA hasta Profesor Titular de Universidad. Obtuvo una plaza de Profesor Titular de Universidad en la UCM en Enero de 2008. Su actividad investigadora se plasma en la autoría de un gran número de publicaciones; y es evaluado por los alumnos muy positivamente en diversos másteres, incluyendo un curso de doctorado en la Universidad de Copenhague. Ha dirigido cinco tesis doctorales, cuatro de ellas europeas, como Director único, de las que tres han recibido el Premio Extraordinario de Doctorado. Comprometido con la innovación docente, organizó el primer Congreso de Docencia en Microbiología de la SEM en 2012 en Madrid, y coordinó la creación con nuevo programa y material didáctico

de la nueva asignatura de Grado Microbiología e Inmunología. Ha participado en dos proyectos de Innovación Docente financiados por la UCM, y participa en los seminarios innovadores de la asignatura de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UCM desde 2011. Asimismo es el investigador principal de un proyecto Marie Curie de la UE en el que se realizan ocho tesis doctorales simultáneamente en distintos países. Participa anualmente en la presentación de trabajos orales en el Congreso de Alumnos de Ciencias Biomédicas, en los que ha recibido varios premios, y ha dirigido un trabajo de fin de carrera de la Universidad de Utrecht, Holanda. Ha formado parte del Consejo de Departamento y Junta de Facultad ya como becario, y ha recibido numerosos cursos de formación para la docencia universitaria. Es el actual Presidente del Grupo de Microbiología Molecular de la SEM, después de haber ejercido de Vocal y Vicepresidente. Es el actual Director de la Unidad de Resistencia a Antibióticos en la UCM y forma parte de varios Comités Europeos, de los que destaca el Comité para la transparencia en el reclutamiento de personal en centros universitarios en la UE o el del programa de la UE Joint Program Initiative JPI de resistencia a antibióticos.

Su conferencia trató sobre como el control de las bacterias con antibióticos ha revolucionado la forma de entender la medicina y la cirugía, y ha permitido el avance de las intervenciones clínicas en todas las especialidades, tanto en seres humanos como en animales. Sin embargo, la utilización de los antibióticos conlleva, irremediablemente, a la selección de mecanismos de resistencia en las bacterias; no solamente en aquellas patógenas, objeto del tratamiento, sino en todas aquellas que contactan con las moléculas antibióticas. La complejidad del proceso se realiza, si tenemos en cuenta que el proceso de selección de bacterias resistentes no se da siquiera únicamente en el seno del propio paciente, sino que las moléculas antibióticas persisten en el ambiente, seleccionando bacterias resistentes al mismo. Todas aquellas bacterias que se van haciendo resistentes a los antibióticos a lo largo de la persistencia de los mismos, son, además, capaces de transmitir aquellos genes de resistencia a antibióticos de forma horizontal a bacterias del mismo y distinto género alrededor de ellas mismas. En la conferencia se expuso esta magnificación ecológica inherente a la molécula antibiótica, y se argumentó cómo estos fenómenos han hecho que, en la actualidad, la resistencia a antibióticos sea la mayor amenaza sanitaria con la que se enfrenta la humanidad actualmente. En esta línea, se planteó cuáles son las líneas de actuación globales, europeas y nacionales dirigidas al control del avance de la resistencia a antibióticos.

**El 10 de noviembre**, La Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación José Casares Gil de amigos de la RANF celebraron la Sesión Pública en la que intervino la Ilma. Sra. Dña. Gloria Frutos Cabanillas, Académica Correspondiente de la RANF, quien pronunció su conferencia titulada: "La Calidad por Diseño: un nuevo paradigma en el desarrollo de medicamentos". Fue presentada por el Académico de Número, el Excmo. Sr. D. Fidel Ortega Ortiz de Apodaca.

**El 14 de noviembre**, la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación José Casares Gil de Amigos de la RANF celebraron la Conferencia titulada: "Determinación de biomarcadores de interés médico-farmacéutico en muestras biológicas. Aplicación de técnicas de preconcentración inmunológicas acopladas a la electroforesis capilar para la obtención de resultados precisos", a cargo del Dr. Norberto A. Guzmán, de EE.UU.

El Dr. Guzman received a B.Sc. degree in Biochemistry (Clinical Biochemistry) from a Joint Undergraduate Program of the University of Concepcion and the University of Santiago, Chile; a M.Sc. Degree in Biochemistry (Cell and Molecular Biology) from the Medical College of Georgia, Augusta, Georgia, U.S.A.; and a Ph.D. degree in Biochemistry (Protein Biochemistry) from a Joint Graduate Program of the University of Medicine and Dentistry of New Jersey-Robert Wood Johnson Medical School (formerly Rutgers Medical School) and Rutgers, The State University of New Jersey, New Brunswick, New Jersey, U.S.A. Dr. Guzman has worked for the last 30 years in academic medical institutions, diagnostic and pharmaceutical companies, including Mount Sinai School of Medicine, Roche Diagnostic Systems, Hoffman-La Roche, and Johnson & Johnson. He is currently the Chief Scientific Officer of a start-up biomedical instrumentation company. Dr. Guzman is the author and co-author of more than 130 scientific publications, including manuscripts, patents and book chapters. He has delivered over 300 oral presentations in Europe, the Americas, the Far East, and Australia. According to Google Scholar Citations, Dr. Guzman's publication citations is reaching 5000 times, having an h-index of 36, and an i-10 index of 65. One publication alone has more than 1200 citations. Seven figures of his publications have appeared on the front cover of prestigious scientific journals and books. He is the recipient of many national and international awards in science and technology innovation. Dr. Guzman is a member of several international scientific organizations. He serves on the editorial board of Electrophoresis (European Journal), and the Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies (American Journal).

Los biomarcadores constituyen un sistema dinámico y poderoso para la monitorización precisa de los estados de salud y enfermedad. Además, son también de gran utilidad en ensayos clínicos para el control de calidad y la eficacia de los productos farmacéuticos. El establecimiento de biomarcadores en el campo médico-farmacéutico ha beneficiado enormemente el diagnóstico precoz de algunas enfermedades, antes de que se manifiesten los primeros síntomas clínicos. Los biomarcadores también ayudan a precisar el pronóstico a medio y largo plazo, además de favorecer el desarrollo de terapias eficaces para la mejora de la calidad de vida de los pacientes. Los avances en la investigación sobre los genes, las proteínas y los metabolitos han facilitado el descubrimiento de nuevos biomarcadores, pero todavía existen importantes problemas técnicos a resolver. El descubrimiento de biomarcadores se ha llevado a cabo tradicionalmente empleando técnicas como la cromatografía en fase líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas (HPLC-MS). Sin

embargo, han sido muy pocos los nuevos biomarcadores aprobados por las agencias reguladoras y que han llegado a ser aplicados en la práctica clínica. Este retraso científico sugiere que aún se necesitan nuevas tecnologías capaces de mejorar los métodos analíticos para acelerar el descubrimiento y la posterior validación. Las principales dificultades presentadas en HPLC-MS están relacionadas con la sensibilidad y la reproducibilidad de los análisis, así como con la complejidad de las muestras biológicas estudiadas. Esto es especialmente crítico en el caso de las proteínas, si se tiene en cuenta el amplio intervalo de concentraciones a las que se encuentran en estas muestras complejas y su gran número de modificaciones estructurales de tipo co- y post-traduccionales. En su conferencia se describieron las características de un instrumento portátil de uso médico-farmacéutico denominado “analyzer de biomarcadores”, basado en el acoplamiento de dos técnicas de gran sensibilidad y poder de separación, la inmunoafinidad y la electroforesis capilar (IACE). Se presentaron ejemplos de aplicaciones bioanalíticas donde los límites de detección, la resolución y reproducibilidad son aspectos esenciales para obtener resultados precisos y fiables, evitando falsos positivos o negativos. Sin duda, la obtención de información temprana, precisa y fiable mediante un panel de biomarcadores es la mejor herramienta para el diagnóstico precoz y el pronóstico acertado de muchas enfermedades, así como para el desarrollo de nuevos tratamientos, monitorizando la efectividad y toxicidad de nuevos fármacos.

Fue presentado por el Presidente de la RANF, Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez.

**El 17 de noviembre**, la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF tuvieron el honor de celebrar la conferencia titulada: "Como alcanzó España los 40 donantes pmp", a cargo de la Dra. Beatriz Domínguez-Gil González, de la Organización Nacional de Trasplantes, quien fue presentada por el Presidente de la RANF, el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez.

Beatriz Domínguez-Gil es especialista en nefrología y doctora en Medicina Interna por la Universidad Complutense de Madrid. Es miembro del equipo médico de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) desde noviembre de 2006. La ONT es una institución de reconocido prestigio internacional por la concepción del denominado Modelo Español de Donación y Trasplante, modelo de índole organizativa que ha permitido a España alcanzar niveles extraordinarios de donación de órganos y tejidos a partir de personas fallecidas. Fundamentalmente implicada en la actividad de cooperación internacional a través de diferentes organismos internacionales, ha participado en numerosas iniciativas enfocadas a la mejora de los modelos organizativos y de la calidad y la seguridad de la donación, la extracción, la distribución y el trasplante de órganos, y a la lucha contra el tráfico de órganos. Como representante por España en el Comité de Trasplantes del Consejo de Europa, Beatriz Domínguez-Gil fue co-autora del Estudio Conjunto del Consejo de Europa y Naciones Unidas sobre Tráfico de Órganos, Tejidos y Células y Trata de Personas con fines de Extracción de Órganos. Las conclusiones de este estudio, presentadas en la sede de la ONU en la ciudad de Nueva York en el año 2009, derivaron en el desarrollo del Convenio del Consejo de Europa sobre la lucha contra el Tráfico de Órganos Humanos, abierto para firma en la ciudad de Santiago de Compostela, en marzo de 2015. Beatriz Domínguez-Gil fue parte del equipo establecido por el Gobierno de España para liderar el desarrollo de la Directiva Europa 2010/53/EU del Parlamento Europeo y del Consejo de 7 de julio de 2010 sobre normas de calidad y seguridad de los órganos humanos destinados al trasplante, Directiva adoptada durante la última presidencia española del Consejo de la Unión Europea. A nivel de la Organización Mundial de la Salud, Beatriz Domínguez-Gil ha liderado el desarrollo de recomendaciones de relevancia internacional, como las reflejadas en la Resolución de Madrid sobre el Progreso hacia la Autosuficiencia en Trasplante de Órganos, publicada en el año 2011. Beatriz Domínguez-Gil es presidenta previa de la Organización Europea de Donación y Coordinación de Trasplantes (EDTCO), sección de la Sociedad Europea de Trasplante de Órganos (ESOT). Es Consejera por Europa de la Sociedad Internacional de Trasplantes (The Transplantation Society) y miembro de su Comité de Ética. Es vocal electo en la Junta Directiva de la Sociedad Española de Trasplantes (SET). Es co-presidenta del Grupo Custodio de la Declaración de Estambul contra el Tráfico de Órganos y el Turismo de Trasplantes, plataforma profesional que promueve prácticas éticas y combate actividades ilícitas en el ámbito de la donación y el trasplante de órganos a nivel global. Es autora de más de 100 publicaciones en revistas científicas nacionales e internacionales y capítulos de libros.

**El 24 de noviembre** tuvo lugar la Sesión Científica Conmemorativa de los Premios Nobel 2016 en Fisiología o Medicina y en Química. La presentación estuvo a cargo del Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero, Académico de Número de la RANF. Sobre el Premio Nobel 2016 en Fisiología o Medicina nos habló la Dra. Patricia Boya, Investigadora Científica, Departamento de Biología Celular y Molecular Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, cuya conferencia trató sobre “Autofagia: el sistema de reciclaje que necesitan todas nuestras células”. Sobre el Premio Nobel 2016 en Química intervino el Prof. Dr. Tomás Torres Cebada, Catedrático de Química Orgánica, Director del Instituto de Investigación Avanzada en Ciencias Químicas, UAM, con la conferencia titulada “Las nanomáquinas” se crecen con el Nobel de Química 2016”

**El 1 de diciembre** la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación José Casares Gil de amigos de la RANF celebraron una jornada científica cuyo título fue "Rejuvenecer: Controlar la vejez". Coordinada por la Dra. María Cascales.

Desde tiempos inmemoriales, el hombre ha intentado encontrar la manera de no envejecer. Un ejemplo de ello fue la búsqueda de “la fuente de la eterna juventud”, fuente legendaria que supuestamente curaba y devolvía la juventud a quien

bebiera de sus aguas o se bañara en ellas. La respuesta socio-económica y sanitaria al rápido envejecimiento demográfico supone uno de los grandes desafíos del siglo XXI. La vejez trae consigo un aumento de la vulnerabilidad y deterioro del organismo, a causa de numerosos agentes que son factores de riesgo para numerosas patologías. Ante las repercusiones que conlleva el aumento de la expectativa de vida de la población, están surgiendo numerosos estudios para retrasar o incluso revertir los fenotipos negativos específicos del envejecimiento. En la actualidad son muchos los grupos que se ocupan de este problema y cada día nos llegan nuevas experiencias que apoyan que el deterioro propio de la vejez se puede retrasar, que solo hay que profundizar en sus causas y combatirlas.

## OTROS ACTOS

**El 25 de octubre** la Real Academia Nacional de Farmacia, la Academia Iberoamericana de Farmacia y el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos tuvieron el honor de celebrar el acto académico IN MEMORIAM del Ilmo. Sr. D. Pedro Capilla Martínez. El acto se celebró en la sede de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Dentro de la Actividad de la Academia, tuvo lugar en la Sede de la Real Academia Nacional de Medicina, **el 22 de noviembre**, la Sesión Científica Conjunta de las Reales Academias de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales; la Nacional de Medicina; la de Ingeniería y la Nacional de Farmacia, cuyo título fue “El Agua en el ámbito de la salud y la calidad de vida”.

El acto comenzó con la bienvenida por parte del Prof. Joaquín Poch Broto, Presidente de la Real Academia Nacional de Medicina, y D. Ángel Simón Grimaldos, Presidente de la “Fundación Aqueae”. Actuaron como ponentes: sobre el tema “El agua como nutriente esencial” el Prof. Manuel Serrano Ríos, Académico de Número y coordinador de la sesión. Sobre el tema “El agua en la transmisión de las enfermedades” disertó el Prof. Gonzalo Piédrola Angulo, Académico de Número de la RANM. Sobre el tema “El agua en que vivimos” intervino el Prof. Miguel Ángel Alario Franco, Académico de Número de la R.A. de Ciencias. Sobre el tema “Un nuevo tratamiento físico del agua” intervino el Prof. César Dopazo García, Académico de Número de la R.A. de Ingeniería. Y sobre “Derecho a la vida, derecho al agua” disertó el Prof. Federico Mayor Zaragoza, Académico de Número de la RANF y de la de Medicina. Finalmente sobre “El agua: de hulla blanca a oro azul” el Prof. Francisco González de Posada, Académico de Número de la R.A. de Medicina y Correspondiente de la RANF.

En cuanto a los honores recibidos por nuestros Académicos de Número, destacamos que la Excm. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal, fue investida Doctora Honoris Causa por la Universidad Católica San Antonio de Murcia el 11 de octubre, y el Excmo. Sr. D. Joan Guinovart Cirera que será investido Dr. Honoris Causa por la Universidad Andrés Bello, de Chile.

La Universidad Autónoma Gabriel René Moreno de Santa Cruz de la Sierra (Bolivia) en el seno de las primeras jornadas Académicas de Facultades de Farmacia y Bioquímica, los Decanos y Autoridades Académicas representantes de todas las Facultades de Farmacia y Bioquímica de las Universidades Públicas Bolivianas, acordaron por unanimidad designar al Excmo. Sr. D. Benito del Castillo García, Asesor externo para la armonización de sus planes de estudio futuros.

La Excm. Sra. Dña. María José Alonso Fernández, ha sido recientemente elegida para formar parte de la Academia Nacional de Medicina de Estados Unidos.

La Fundación Lilly reconoce carreras profesionales extraordinarias dentro del mundo de la investigación, así como sus méritos personales. En esta ocasión, a propuesta de la Real Sociedad Española de Química se ha decidido otorgar el galardón correspondiente a la especialidad de Química a la Excm. Sra. María Vallet Regí, Académica de Número y Catedrática de Química Inorgánica de la Universidad Complutense de Madrid. Actualmente, esta experta y eminente científica dirige el Grupo de Investigación de Biomateriales Inteligentes (GIBI) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), que forma parte del Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (I+12) y del Instituto de Magnetismo aplicado UCM-RENFE-CSIC. Con la entrega de estas distinciones, la Fundación Lilly demuestra, una vez más, su apuesta por apoyar y reconocer la labor de la I+D en Biomedicina en España, ha asegurado el doctor José Antonio Sacristán, Director de la Fundación Lilly. Asimismo, la Dra. María Vallet Regí ha sido elegida Fellow de la "American Institute for Medical and Biological Engineering" (AIMBE) de EE.UU, que reconoce a aquellas personas del mundo académico, industrial y de asociaciones profesionales, que se distinguen por su aportación a la sociedad en medicina e ingeniería biológica. Para pertenecer a ese instituto es necesario estar en el primer 2% de las respectivas áreas de conocimiento y que voten favorablemente el ingreso más del 80% de los Fellows. Enhorabuena a María Vallet Regí y a todos los acabados de citar, por su trabajo, dedicación y esfuerzo en beneficio de la sociedad española y la humanidad.

**El pasado 15 de diciembre**, en Junta General Extraordinaria, la Real Academia Nacional de Farmacia eligió al Excmo. Sr. D. Pedro Guillén García, como nuevo Académico de Honor electo. Asimismo, se concedió la Medalla Carracido de Oro a la Excm. Sra. Dña. María Cascales Angosto y la Medalla Carracido de Plata a la Ilma. Sra. Dña. María Carmen de la Rosa Jorge.

Bartolomé Ribas Ozonas, Académico Secretario de la RANF.





PUBLICACIONES ELECTRÓNICAS DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA