

**DISCURSO DE RECEPCIÓN  
DEL ACADÉMICO ELECTO EXCMO. SR. DR.  
D. Luis Franco Vera**

**DISCURDO DE CONTESTACIÓN  
DEL ACADÉMICO NUMERARIO EXCMO. SR. DR.  
D. Antonio Llombart Bosch**

*Leídos el 9 de marzo de 2010*  
VALENCIA

**DISCURSO DE RECEPCIÓN DEL ACADÉMICO ELECTO**

**Excmo. Sr. D. Luis Franco Vera**

*Enfermedades huérfanas. Un punto de encuentro entre la Medicina Clínica, la Biomedicina y la Bioética*

EXCMO. SR. PRESIDENTE,  
EXCMOS. E ILMOS. SRES. ACADÉMICOS,  
SEÑORAS Y SEÑORES,  
AMIGOS TODOS:

RESULTA DIFÍCIL expresar las emociones que me embargan en el momento de ocupar esta tribuna, especialmente porque, como suele ser habitual, se mezclan sentimientos contrapuestos que pueden dar a mis palabras iniciales un cierto tono agrídulce. Estoy aquí, Señoras y Señores Académicos, porque me habéis elegido para ocupar el sillón que fuera de D. Eduardo Primo Yúfera. Así, a mi alegría por el honor que me hacéis al entrar a formar parte de esta docta Corporación se une el pesar de que tal circunstancia haya sido posible por el fallecimiento de un gran hombre.

Puede parecer ocioso que hable de la categoría humana y profesional de D. Eduardo ante quienes la conocéis perfectamente por haber compartido con él tantos afanes. Pero si no lo hiciera, quienes oyeran este discurso o quienes en algún momento pudieran leer su texto pensarían que, o bien los méritos de D. Eduardo no eran del calibre que insistentemente muestran sus registros biográficos, o bien que quien ahora habla no los apreciaba. Y si lo primero sería una tremenda injusticia, lo segundo supondría una inmensa equivocación. Ciertamente, los méritos del Prof. Primo Yúfera, en todos los órdenes, no por sabidos dejan de ser dignos de recuerdo y encomio y, en lo que a mí respecta, mi admiración, respeto y cariño por D. Eduardo, que jamás he dejado de manifestar, no sólo no se han apagado tras aquel 28 de octubre en que nos dejó, sino que siguen creciendo.

Si he hecho referencia a la categoría humana y a la profesional del Prof. Primo Yúfera, es porque tengo el convencimiento de que la verdadera sabiduría no se apoya solamente en los cimientos del saber científico, sino que ha de anclarse también en la hombría de bien; la bondad y la excelencia intelectual han de ser inseparables, han de ir de la mano, para que el sabio no sea un ser deforme, admirable quizá por su inteligencia, pero no por sus cualidades humanas.

A raíz del fallecimiento de D. Eduardo, tuve ocasión de recordar cómo, hace ya muchos años, el Prof. Pedro Laín Entralgo señalaba que en la antigüedad clásica, cuando se quería describir la condición técnica de un experto, se empleaba una fórmula habitual que consistía en anteponer a la definición de su pericia el apelativo genérico “vir bonus”, hombre bueno. Así, el orador sería “vir bonus dicendi peritus”, el médico “vir bonus medendi peritus” y así sucesivamente (Lain Entralgo, 1961). Huelga decir que esta fórmula es plenamente aplicable a D. Eduardo.

Teniendo presentes todas las anteriores consideraciones, gustosamente asumo la tarea de glosar la figura de mi ilustre predecesor, sabiendo que vuestra comprensión sabrá suplir lo que mi limitación no acierte a decir.

En nuestra época, caracterizada por la inmediata y exhaustiva difusión de la información, es fácil conocer el currículum de cualquier personaje. No intento, por consiguiente, descubrir ninguna novedad si digo que el Prof. Primo fue autor de 215 artículos de investigación, de 15 libros, de 130 informes y escritos de divulgación, de 44 monografías y artículos de revisión, que dirigió 69 tesis doctorales y que pronunció 150 conferencias y discursos. Pero sí me parece oportuno destacar que el análisis de esas publicaciones, además de reflejar su altura científica, pone de manifiesto que su cultivo de la ciencia estuvo siempre presidido por un hondo sentido social. Sus primeras investigaciones, tras obtener la licenciatura en Ciencias Químicas en la Universidad de Valencia en 1941 y el doctorado en la de Madrid en 1944, se centraron en el estudio de productos agrícolas, como el arroz y la naranja, tan queridos por todos los valencianos y tan característicos de su región de adopción. En 1952 se trasladó a Basilea, para trabajar con el Prof. Reichstein, Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1950 por sus investigaciones sobre la estructura y efectos biológicos de las hormonas de la corteza adrenal, que culminó con el aislamiento de la cortisona.

La experiencia adquirida en Basilea le sirvió para mejorar su propia investigación, pero movido por ese sentido social al que antes aludía, se embarcó en una ingente tarea de promoción de la investigación. Así, inició en 1954 la andadura del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de Valencia, como un centro dependiente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, del que Primo era miembro desde 1950. Sólo quien haya vivido esa época de la ciencia española puede hacerse idea del entusiasmo y entrega que hacían falta entonces para abordar con éxito una empresa de esas dimensiones. Pero D. Eduardo lo logró y ese centro, del que fue primer presidente, ha dado origen a dos institutos de excelencia en los que se ha formado una pléyade de investigadores y han dado prestigio y reconocimiento mundial a la ciencia española.

Y también por ese sentido social, Eduardo Primo Yúfera fue un apasionado de la docencia universitaria; no le bastaba con saber, sino que veía necesario transmitir a otros sus conocimientos. Y así, después de haber sido Profesor Adjunto de Química Orgánica en la Universidad de Valencia, en 1964 obtuvo la cátedra de Bioquímica y Química Agrícola en la naciente Universidad Politécnica de Valencia, de modo que D. Eduardo impulsó también decididamente no sólo la andadura de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, sino de la entera Universidad, de la que llegó a ser Vicerrector de Investigación.

Otro claro exponente de su sentido social es que siempre supo imprimir a su investigación un sesgo aplicado, sin que ello mermase en absoluto la calidad. De esta manera, si se recorre su currículum se observa una sucesión de líneas de investigación siempre punteras, pero también siempre entroncadas con las necesidades del momento: alimentación humana y nutrición, aprovechamiento de residuos agrícolas, prevención de adulteraciones, para concentrarse en los últimos años de su vida científica en la lucha contra las plagas agrícolas. Buen reflejo de ello es el tema que eligió para su discurso de ingreso en esta Corporación el 25 de enero de 1977: “La deficiencia proteica en la alimentación de la humanidad. Un reto a la Ciencia y Tecnología de Alimentos”.

Investigación y magisterio docente: esas fueron las dos pasiones científicas del Prof. Primo Yúfera. Y eso explica que supiera compaginarlas sin rehuir los compromisos que su valía profesional y humana le reclamaban: Vicepresidente (1967-1974) y Presidente (1974-1977) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Presidente del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Vicepresidente de la Unión Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, etc.

Eduardo Primo Yúfera fue generoso con la ciencia y con la sociedad, dedicándoles lo más granado de su esfuerzo profesional. Y, tanto la comunidad científica como la sociedad reconocieron, ya en su vida, ese esfuerzo. Entre 1950, año en el que recibió el Premio Juan de la Cierva hasta 2001, en que consigue el Premio Rey Jaime I, son 9 los premios con que la comunidad científica intentó recompensar su ingente tarea científica. A ellos habría que sumar otras distinciones, como el doctorado Honoris causa por la Universidad Jaime I de Castellón, la Gran Cruz de Alfonso X el Sabio o la Gran Cruz de la Orden al Mérito Civil o su designación como Académico Correspondiente de la Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, su ingreso en 1978 en la Real Academia de Cultura Valenciana y en 2002 en la Real Academia Nacional de Farmacia.

Podría continuar, y la relación de méritos de D. Eduardo no haría sino aumentar la admiración por él. Pero basten estos botones de muestra, tomados aquí y allá de su extenso currículum para hacer ver que no estoy hablando de un científico corriente ni, muchísimo menos, de uno que se dedicara a acaparar distinciones a costa de no se sabe qué componendas. No; un currículum como el de D. Eduardo no puede ser de ningún modo el resultado de influencias extracientíficas.

Ya veis, Señoras y Señores, cómo sin desviarnos un ápice de la objetividad de un currículum vitae ha resultado un tejido de ciencia, de humanidad y de prestigio. Pero decía al principio que en el Prof. Primo Yúfera la calidad científica y la hombría de bien iban de la mano, y es hora ya de esbozar algunas pinceladas en esta línea. Temo que al estar trazadas por una mano torpe como la mía no estén a la altura debida. Pero pueden estar seguros de que, las deficiencias no se deberán a falta de cariño por D. Eduardo. Tuve la fortuna de conocerle en 1979, año en el que ambos fuimos profesores en un curso organizado por la Universidad Internacional Menéndez Pelayo en Santander. La diferencia entre los dos era abismal: D. Eduardo era desde hacía tiempo una personalidad en la Bioquímica; yo un todavía reciente Profesor Agregado en la Universidad Complutense. En otro caso me habría sentido cohibido al tener que compartir la docencia con una persona de su altura. Pero la sencillez de D. Eduardo hizo que me sintiera totalmente relajado, de forma que de esas jornadas en el Palacio de la Magdalena guardo un recuerdo imborrable.

Dos años más tarde, ya catedrático, me incorporé a la Universidad de Valencia, de modo que mis oportunidades de tratarle fueron más y más frecuentes. Tuve el honor de compartir con él muchos tribunales de tesis y otras actividades, a través de lo cual fue creciendo mi admiración y respeto por D. Eduardo que, pienso que no es pretencioso decirlo, me honró con su amistad. Aunque mi investigación tuvo escasos contactos con la suya, siempre le encontré disponible para ayudarme. Al mismo tiempo fui capaz, en muchas ocasiones, de apreciar su categoría humana, porque la científica ya la había captado mucho antes. Por solo citar un ejemplo, puedo remontarme a septiembre de 2001. Se celebraba en Valencia el XXIV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular y los miembros del comité organizador acordamos unánimemente proponer a don Eduardo como presidente de honor. Cuando me puse en contacto con él para rogarle que aceptara la designación, me contestó con su afecto habitual y con agradecimiento, mientras decía, más o menos: “Pero, ¿por qué me proponéis a mí? ¡Si sólo soy un aficionado a la Bioquímica!” Y no lo decía por falsa modestia; sus palabras dejaban traslucir la auténtica sencillez de quien, tras una larga vida de fructífera entrega a la ciencia, sólo se considera, sinceramente, un principiante.

Hace un momento hablaba de que D. Eduardo se concentró en una de sus pasiones, la lucha contra las plagas agrícolas, en los últimos años de su vida científica. Podía haber dicho simplemente “en los últimos años de su vida”, porque buena muestra de su laboriosidad fue el que continuó trabajando hasta que su corazón no resistió más. Aún recuerdo una de mis últimas conversaciones con él —sería el año 2005—, sentados en sendas banquetas de su laboratorio, al que seguía dedicando todos los días un buen rato. Fue la suya una vida plena de logros científicos, una vida que acabó bien exprimida, cuando ya no podía dar más de sí. Y con todo, su amor a la ciencia no le impidió dedicarse de modo ejemplar a su familia y a tantas otras causas nobles.

Decía al principio que mis palabras iniciales tendrían un cierto tono agridulce. Pero ahora veo con claridad que debo rectificar esas mis primeras reflexiones. En mi rápida semblanza del Prof. Primo Yúfera he omitido algo fundamental: D. Eduardo era un hombre profundamente cristiano y los creyentes sabemos que la vida no acaba con la muerte. Por eso, aunque mi presencia en esta tribuna sea posible por su fallecimiento, estoy cierto de que no se nos ha ido para siempre. Somos humanos y es lógico que sintamos su ausencia física, pero el convencimiento de que ha alcanzado ya un galardón infinitamente mayor que los que recibió en vida debe trocar nuestra pena en alegría. No tenemos, pues, motivo para consideraciones tristes.

Pido disculpas ahora si, aunque lo haya hecho con total sinceridad, no he sabido glosar certeramente la figura de ese gran hombre al que, por vuestra decisión, Señoras y Señores Académicos he de suceder desde el día de hoy en esta Corporación. De intento hablo de suceder y no de sustituir, porque honestamente pienso que D. Eduardo es insustituible. Estoy seguro, no obstante, que cuento con la comprensión y simpatía de todos, de modo que, a donde no llegue mi capacidad, llegará vuestro apoyo para que consiga proceder de una forma que no desdiga en demasía de mi ilustre predecesor ni sirva de vergüenza a cuantos me otorgasteis vuestra confianza al votar mi candidatura, a quienes de todo corazón doy las gracias en este momento. De modo muy especial, quiero hacer patente mi agradecimiento a los doctores Comín Ferrer, Llombart Bosch y Viña Ribes que me hicieron el inmerecido honor de proponerme para ocupar la vacante.

Pienso que la mejor forma de materializar mi agradecimiento es comprometerme, ya desde este momento, a prestar mi colaboración más entusiasta a las tareas de esta Real Academia, compromiso que formalmente expreso con todas las veras de mi ser. Soy consciente de que la primera tarea que he cumplir es, precisamente, la que ahora estoy comenzando a hacer. El ingreso requiere un discurso cuyo tema elige el beneficiario y la tarea no es sencilla. Es evidente que debe versar sobre un tema acorde con la competencia de esta Corporación. El ámbito de mi investigación, desde hace ya muchos años, es el estudio del material genético de eucariotas; más concretamente, el del papel funcional de sus modificaciones epigenéticas. Sería fácil, pues, centrar mi discurso en ese tema y, de hecho, en más de una ocasión *llevaré el agua a mi molino*, pero estoy convencido de que una Real Academia debe desempeñar una función más de integración que de especialización. Esta es a todas luces necesaria, aunque sólo lo fuera en la misma medida en que el progreso científico impide el saber enciclopédico. Por otro lado, con palabras de Ferraz, “el superespecialista, encerrado en su dominio, ignora a veces otros campos e incluso el significado de la ciencia en el contexto de la existencia humana. El científico no alcanza entonces una clara conciencia de su puesto en la sociedad” (Ferraz, 1982).

Es cierto que se han dado —y que aún se dan— esas tremendas dicotomías que hace ya 50 años señaló Snow (1959) entre las “dos culturas”: por una parte, la ciencia y la tecnología y, por otra, separadamente, las actividades altamente creativas, pero menos cuantitativas, como el arte y la poesía. Pero la especialización no tiene por qué encerrar al científico en sus dominios de tal modo que llegue a perder la conciencia de su puesto en la sociedad. No; se puede decir con Bronowski (1968) que “la vida humana es una vida social y no hay ciencia que no sea en parte una ciencia social”. Ciencias y humanidades no se oponen; es más, se complementan. Bien lo sabéis todos los profesionales de la Medicina a quienes me dirijo, pues es una gloriosa tradición de las ciencias médicas el haber ido siempre de la mano de las humanidades. No sólo porque en la historia de la Medicina se encuentren tantos ejemplos de hombres y mujeres que han brillado simultáneamente en ambas facetas, sino porque al ser el hombre sujeto y objeto de las ciencias médicas, resulta prácticamente imposible desentenderse de lo humano en el ejercicio de vuestra profesión. Si el humanismo se puede caracterizar por otorgar al conocimiento integral del ser humano y a la exaltación de sus valores una importancia basililar, es en la Medicina donde el humanismo incide más plenamente, se integra mejor en el terreno científico.

Recientemente se han alzado algunas voces alertando del riesgo que puede suponer la creciente tecnificación de la Medicina en la pérdida de su esencial componente humanista. Pero pienso que el temor ante ese posible riesgo es infundado. Como decía el Prof. Esteban Santiago, «de un buen médico suele decirse que tiene “ojo clínico”, esa mirada sagaz, mezcla de intuición, experiencia y saber profundo de las cosas, además de la ciencia médica que se le supone; el médico con buen “ojo clínico” abarca de un solo golpe la enfermedad y el enfermo» (Santiago, 1998). Por mucho que se tecnifique la Medicina, el buen profesional nunca dejará de reconocer la persona del enfermo como algo que trasciende el caso clínico que estudia.

En los últimos años, esa línea de investigación que decía he venido cultivando se ha centrado decididamente en problemas que entran de lleno en el campo de la Biomedicina, que el Vocabulario Científico y Tecnológico de la Real Academia de Ciencias define como el “estudio del diagnóstico, la etiología, la terapéutica y los mecanismos de las enfermedades utilizando los conceptos y los métodos de la bioquímica, las biología molecular y celular, la genética y los campos afines”. Pienso que el profesional de la Biomedicina tiene un riesgo adicional en esa integración humanista a la que me vengo refiriendo. Esto es así porque quien se dedica a la Biomedicina no tiene, como tiene el clínico, el contacto directo con el enfermo. Pero, parafraseando a Santiago, se podría decir que para él el “ojo clínico” —llamémoslo así— le debe hacer ver que detrás de las moléculas o de los instrumentos que maneja hay seres humanos que, independientemente de su condición de sanos o enfermos, son poseedores de una inalienable dignidad, y así puede ser también humanista. Puede ver que detrás de su trabajo diario hay personas a quienes puede ayudar con su conocimiento científico. De este modo, también la Biomedicina puede contribuir al progreso integral de la sociedad. Lo hará, como la Medicina clínica, si se desempeña en servicio de los demás, no en beneficio propio ni, por descontado, en perjuicio de la humanidad. Y es que si bien la ciencia, en abstracto, podría considerarse como algo éticamente neutro, no lo es el ejercicio científico, como actividad humana que es. Felizmente, asistimos a un incremento notable en el interés por el estudio ético de los problemas relacionados con la actividad médica o biomédica, hasta el punto que ha surgido una nueva y pujante disciplina, la Bioética, que tiende a hacer cada vez más humana esa actividad.

Espero disculpéis esta aparente disgresión en el momento en que iba a declarar el tema de mi discurso. He dado a entender que renunciaba a hacerlo desde una perspectiva de especialización sin más y estoy cierto de que todos habéis captado entre líneas los tres puntos de apoyo de ese trípode sobre el que quiero desarrollar mi discurso: la Biomedicina, la Medicina Clínica y la Bioética. Cual si de tres círculos distintos se tratara, se puede decir que no son independientes, ni siquiera tangentes. Están interpenetrados, se solapan, presentan áreas comunes. Prácticamente en todos los problemas médicos encontraremos ese solapamiento y es hora ya de desvelar que a uno de ellos, el de las enfermedades huérfanas, voy a dedicar mis próximas reflexiones. Si al hacerlo invado en algún momento el área de especialidad de quienes me escuchan, espero consideren benignamente los errores u omisiones en que pueda incurrir, en aras de esa función integradora que, como decía hace un momento, pienso que debe desempeñar una Real Academia.

## Enfermedades huérfanas

### Concepto

En la bibliografía se encuentra una cierta ambigüedad terminológica a la hora de referirse a las enfermedades huérfanas y a otros conceptos relacionados. Por ese motivo, es conveniente comenzar estableciendo la terminología que se va a utilizar a lo largo de este discurso, que coincide con la recomendada por el Parlamento Europeo.<sup>1</sup> En primer lugar, cabe hablar de **enfermedades raras**,<sup>2</sup> entendiéndose como tales aquéllas que tienen una baja frecuencia o aparecen raramente en la población. Para ser considerada como rara, una enfermedad debe afectar sólo a una proporción limitada de la población total, que en la Unión Europea se determina como menos de 1 de cada 2.000 ciudadanos. En Estados Unidos se considera rara una enfermedad cuando afecta a 7 o menos personas de cada 10.000 y en Japón la cifra se sitúa en 2,5 casos por 10.000 ciudadanos. Estas proporciones pueden parecer escasas, pero hay que tener en cuenta que, como se comentará más adelante, el listado de enfermedades raras abarca entre 5.000 y 7.000, lo que implica que pueden sufrir una u otra de las enfermedades raras un porcentaje elevado de la población mundial. Se estima, por ejemplo, que 1 de cada 15 habitantes de la Unión Europea padece alguna enfermedad rara.<sup>3</sup>

Hay que añadir otra precisión: hay enfermedades —que podrían llamarse muy raras— que afectan a una tasa mucho menor de ese 1 de cada 2.000 que se mencionaba antes. Por ejemplo, algunas sólo afectan a una de cada 100.000 personas e incluso hay enfermedades padecidas sólo por unos centenares de personas en todo el mundo. Si, según datos de la Federación Española de Enfermedades Raras (FEDER), el número total de personas que las padecen en España puede rondar los 3 millones, se estima que hay unas 80 personas afectadas por el síndrome de Apert<sup>4</sup> y sólo 6 pacientes del síndrome de Joubert,<sup>5</sup> por citar dos enfermedades de baja o bajísima incidencia.

Por otro lado, se habla de **enfermedades desatendidas**<sup>6</sup> para referirse a aquéllas que, como las enfermedades infecciosas tropicales por ejemplo, afectan a habitantes del tercer mundo y reciben poca atención por la investigación y por la industria farmacéutica que, en su inmensa mayoría, se concentran en los países desarrollados. Su incidencia puede revestir características de epidemia y ser en algunos

<sup>1</sup> *Flash* terminológico nº 98, de 8 de junio de 2006 ([www.europarl.europa.eu](http://www.europarl.europa.eu))

<sup>2</sup> En inglés, rare diseases.

<sup>3</sup> Datos de “Enfermedades raras: el conocimiento de esta prioridad de la salud pública”, informe elaborado en 2005 por EURORDIS, European Organisation for Rare Diseases ([www.eurodis.org](http://www.eurodis.org))

<sup>4</sup> El síndrome de Apert se caracteriza por craneosinostosis y acrocefalia. Si la craneosinostosis no se corrige tempranamente mediante cirugía, aparece hipertensión intracraneal, retraso mental, edema de papila, ceguera y pérdida de la visión por atrofia óptica.

<sup>5</sup> El síndrome de Joubert es una enfermedad neurológica congénita que implica una malformación del mesencéfalo y del cerebelo con agenesia o hipoplasia del verjmmis y cisterna magna pequeña. Cursa con ataxia retraso mental y apraxia.

<sup>6</sup> *Neglected diseases* en la literatura anglosajona.

casos muy importante. Las dos terceras partes de la humanidad pueden estar en riesgo de contraer una u otra de estas enfermedades y, de hecho, según la OMS uno de cada seis habitantes del planeta las padecen. No obstante, sigue siendo proporcionalmente escasa la consideración que se les presta y de ahí procede su designación como enfermedades desatendidas.<sup>7</sup>

Finalmente, cabe hablar de las **enfermedades huérfanas**,<sup>8</sup> concepto que a menudo se confunde con el de enfermedades raras. La *orfandad* se refiere a la falta de *adopción* por parte de la investigación o de la industria farmacéutica. De este modo, el concepto de enfermedad huérfana se establece en una categoría distinta del de las enfermedades raras. Una enfermedad huérfana puede serlo por su escasa incidencia, que dificulta la realización de estudios epidemiológicos y que supone una falta de aliciente para la industria farmacéutica (Campos-Castelló, 2001), pero también por estar confinada en regiones de escasos recursos económicos y de bajo potencial de investigación.

Entendidas así las enfermedades huérfanas me propongo centrar mi discurso en algunos aspectos generales de ellas y en algunos ejemplos concretos. En primer lugar, es evidente que se trata de una cuestión donde la Biomedicina y la Medicina Clínica han de ir de la mano. En el caso de las enfermedades huérfanas de escasa incidencia, su conocimiento científico es limitado y los métodos de diagnóstico a menudo difíciles. Por otra parte, la escasez, cuando no la ausencia, de medicamentos y, en su caso, de instrumental adecuados coloca al clínico en una difícil posición. Son buenas razones —y se podrían encontrar bastantes más— para afirmar que tanto la Biomedicina como la Medicina Clínica tendrán mucho que decir si se quiere luchar contra estas enfermedades. Muchas veces el gran problema está en ese condicional, “si se quiere luchar”. Y es evidente que la Bioética tiene también mucho que decir. ¿Quién no descubre la falta de solidaridad como otra de las causas que dificultan el tratamiento de estas enfermedades? Acaba de quedar enunciado ese trípode, Biomedicina, Medicina Clínica, Bioética, sobre el que decía antes quería apoyar mi disertación.

Ciertamente, esa confluencia de los tres círculos —Medicina Clínica, Biomedicina y Bioética— a que antes me refería se da en prácticamente todas las áreas relacionadas con la salud humana, pero en mi opinión, la solidaridad nos debe inclinar a prestar un interés preferente a los más desprotegidos. Pienso que en este sentido, queda justificado el centrar nuestra atención en las enfermedades huérfanas. Si la investigación básica de su etiología resulta por tantos aspectos un tema apasionante, si, desde el punto de vista clínico, los intentos de mejorar los medios de diagnóstico, la terapia o al menos el tratamiento de las enfermedades huérfanas constituye un reto capaz de ilusionar a todo buen profesional, las consideraciones éticas que se acaban de hacer constituyen un innegable valor añadido. Quien se ocupa de estudiar, de curar o, al menos, de paliar los efectos de una enfermedad huérfana, no sólo está trabajando, como todo profesional de las ciencias médicas, para sus semejantes, sino que, además, lo hace para los más desprotegidos y, por tanto, para los sujetos prioritarios de una acción solidaria.

## Enfermedades huérfanas y medicamentos huérfanos

El concepto de medicamento huérfano se establece de una forma análoga al de enfermedades huérfanas. El Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España lo define como “aquél destinado a la prevención, diagnóstico o tratamiento de enfermedades raras o de enfermedades graves más comunes, pero que difícilmente sería comercializado por falta de perspectivas de venta una vez en el mercado”.<sup>9</sup> Es evidente que en esta definición encajan los medicamentos que, aunque tuvieran un número elevado de usuarios, su empleo se vería dificultado, cuando no impedido, por la escasa capacidad adquisitiva de los pacientes, pertenecientes de ordinario a países pobres. Son numerosos los autores que entienden en este sentido amplio el concepto de medicamento huérfano (véase, por ejemplo, Davies, 1983; Iribarne, 2003). Se ha llamado la atención sobre la conveniencia de elaborar una clasificación de los medicamentos huérfanos atendiendo a su potencialidad comercial y a la disponibilidad de otros tratamientos adecuados (Badyal, 2006), pero se trata realmente de una tarea nada fácil.

<sup>7</sup> A veces, el adjetivo *neglected* se ha traducido al castellano hablando de enfermedades *olvidadas, abandonadas o ignoradas* pero tanto la OMS como la Organización Panamericana de la Salud recomiendan la designación que aquí se emplea.

<sup>8</sup> *Orphan diseases* en inglés.

<sup>9</sup> Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Rueda de prensa (26 de febrero de 2008), con motivo del Primer Día Europeo de Enfermedades Raras.

Si una característica de los medicamentos huérfanos es su difícil comercialización por las razones que se acaban de apuntar, es evidente que su producción tropieza con importantes problemas económicos. A esta dificultad se suma, en el caso concreto de las enfermedades raras, la dificultad de llevar a cabo ensayos clínicos estadísticamente relevantes por el número limitado de afectados, problema que ha sido revisado por Lagakos (2003) y al que se aludirá al término de este discurso. Es indudable que todas estas cuestiones plantean problemas éticos de singular importancia, que incluyen componentes de solidaridad a nivel internacional en el caso de las enfermedades desatendidas. En el último capítulo del presente discurso se prestará atención a estos problemas.

En Estados Unidos el Congreso aprobó en 1983 el *Orphan Drug Act*, ley que trata de incentivar el desarrollo de medicamentos destinados a prevenir, diagnosticar o tratar las enfermedades raras. En la Unión Europea, se aprobó en 1999 el Reglamento Europeo sobre Medicamentos Huérfanos<sup>10</sup> y, dentro de la Agencia Europea del Medicamento se creó un grupo específico de trabajo, el COMP (*Committee for Orphan Medicinal Products*) para revisar las solicitudes de asignación de la designación de medicamento huérfano. También Australia, Taiwan y Japón tienen programas similares para el desarrollo de medicamentos huérfanos. En líneas generales, los incentivos que se ofrecen a la industria farmacéutica implican el mantenimiento de un monopolio del producto durante 10 años, financiación para los ensayos clínicos, algunos beneficios fiscales y el compromiso de no aprobar otro medicamento para la misma indicación si no aporta un beneficio considerable a los enfermos.

Antes de 1983 sólo existían 7 fármacos adecuados para tratar enfermedades huérfanas (Iribarne, 2003). Como consecuencia de esas medidas de protección, en el siglo pasado se aprobó ya la comercialización de más de 200 medicamentos huérfanos (Schieppati *et al.*, 2001) y entre los años 2000 y 2007 se han autorizado 44 medicamentos huérfanos en la Unión Europea y 78 en Estados Unidos.<sup>11</sup> En otro orden de cosas, el Senado de España, en su sesión de 20 de febrero de 2007, aprobó una serie de medidas sanitarias, educativas y sociales para contribuir a un adecuado tratamiento de los afectados por enfermedades raras y para mejorar sus condiciones de vida.<sup>12</sup>

Tanto en Estados Unidos como en Europa, han sido las asociaciones de afectados las que han impulsado el avance de la legislación que favorece el desarrollo de medicamentos huérfanos. En Europa se fundó en 1997 EURORDIS (*European Organisation for Rare Diseases*)<sup>13</sup> y son numerosas las asociaciones nacionales. En España, por ejemplo, FEDER (Federación Española de Enfermedades Raras) agrupa a más de 140 asociaciones nacionales, que cubren los intereses de afectados por más de 900 enfermedades. La presión social ha sido positiva en cuanto que muchos laboratorios farmacéuticos han incluido líneas de desarrollo de medicamentos huérfanos, e incluso han aparecido algunos laboratorios dedicados fundamental o exclusivamente a esos fármacos. Pero hay que señalar una carencia: al estar localizadas todas esas asociaciones en países desarrollados, los medicamentos comercializados tienen como indicación el tratamiento o diagnóstico de enfermedades raras. Por ejemplo, ninguno de los 44 medicamentos huérfanos aprobados en Europa está indicado para enfermedades desatendidas. He aquí otra cuestión de acuciante trascendencia ética que se tratará en su momento.

## Algunos ejemplos de enfermedades huérfanas

Como se viene comentando, las enfermedades huérfanas abarcan tanto enfermedades raras, como enfermedades desatendidas. Las primeras son extraordinariamente numerosas. Por ejemplo, Orphanet,<sup>14</sup> base de datos europea coordinada por el INSERM francés, contiene información sobre 5768 enfermedades. La mayoría de ellas, en torno al 80%, son de origen genético, siendo frecuentes las que poseen un claro componente epigenético. Con algunas excepciones, no hay una clara prevalencia relativa a las áreas geográficas o grupos étnicos. Una gran mayoría de las enfermedades raras se manifiesta durante la infancia y muchas de ellas causan la muerte antes de la adolescencia.

<sup>10</sup> Reglamento (CE) n° 141/2000 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 1999, sobre medicamentos huérfanos. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* 2000, L18, 115.

<sup>11</sup> Fuentes:

Unión Europea: <http://www.emea.eu.int/htms/human/comp/azcompsumop.htm>

USA: <http://www.fda.gov/orphan/index.htm>

<sup>12</sup> Boletín Oficial de las Cortes Generales. Senado. Núm. 659, p. 1 (23 de febrero de 2007).

<sup>13</sup> <http://www.eurordis.org>.

<sup>14</sup> <http://www.orpha.net>

Por el contrario, las enfermedades desatendidas son relativamente poco numerosas, aunque cada una de ellas afecte a una población muy extensa. Las más típicas son las enfermedades infecciosas tropicales, que afectan a numerosos países de África, América y Asia. Las deficientes condiciones higiénicas asociadas a la pobreza son factores importantes en la etiología de estas enfermedades. Las infecciones pueden ser de origen parasitario, bacteriano o vírico. Las más frecuentes son las helmintiasis y las tripanosomiasis y, entre las enfermedades de origen bacteriano, el tracoma y la lepra. Se estima que en su conjunto causan entre 500.000 y 1.000.000 muertes anuales, pero hay que tener en cuenta que muchas de ellas producen una incapacidad permanente. La tuberculosis, la malaria y el síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida, aunque sean enfermedades infecciosas que afectan mayoritariamente al tercer mundo, no se incluyen dentro de las enfermedades desatendidas, ya que se ha incrementado mucho la financiación de su investigación y tratamiento. No obstante, su extensión sigue planteando inquietantes problemas. Por sólo citar un ejemplo, la *Pacific Health Summit*, celebrada en junio de 2009 en Seattle, se dedicó monográficamente a tratar de la tuberculosis y la revista *Nature* dedicó un editorial, que llevaba el sugerente título de *Orphan Giant*,<sup>15</sup> a algunos aspectos de la reunión. Puede destacarse la alarmante cifra de portadores de *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la enfermedad, que se eleva a un tercio de la población mundial. De ellos, se calcula que el 10% llegará a desarrollar la enfermedad. Pero, en mi opinión, es necesario que este discurso no se quede en consideraciones generales sobre las enfermedades huérfanas, por interesantes que tales consideraciones sean. No puedo olvidar que la Academia que hoy benévolamente me acoge tiene como misión principal el estudio y la investigación de las ciencias médicas y afines. Estudio e investigación son sinónimos de labor intelectual profunda y ello me mueve a presentarles, con la mayor profundidad que mis limitaciones permitan, algunos rasgos del estado actual de estas enfermedades. Ante la evidente imposibilidad de abarcar tan numeroso conjunto de enfermedades, me limitaré a tres. Permítanme, Señoras y Señores Académicos, que en esa elección, como mencionaba al inicio de mi discurso, *lleve el agua a mi molino*. Mi vida científica, como la de todo universitario, abarca la investigación y la docencia. La primera, como anotaba antes, se ha centrado en las modificaciones epigenéticas de la cromatina; la actividad docente, en la Bioquímica, con especial énfasis en los mecanismos por los que se controla el metabolismo. ¿Se me puede disculpar, pues, si he elegido como ejemplos de enfermedades raras una enfermedad epigenética, el síndrome de Beckwith-Wiedemann, y otra enfermedad de etiología más compleja, la ataxia-telangiectasia, en la que la organización de la cromatina tiene un importante papel? Y para elegir la enfermedad desatendida, sólo una por ser el repertorio de ellas más reducido que el de las enfermedades raras, me he inclinado por la enfermedad de Chagas. Si suplicaba su indulgencia al proponerme hablar de enfermedades epigenéticas, más he de hacerlo ahora cuando planteo mi intención de tratar de una enfermedad infecciosa. Soy consciente de que con ello, por utilizar un dicho popular, intento *vender miel al colmenero*, pero ocurre que las posibles terapias eficaces para la enfermedad de Chagas, hasta ahora inexistentes, se apoyarían en las peculiaridades del metabolismo del parásito y en su control. Espero que esta circunstancia sirva de disculpa a mi atrevimiento. Y, como quiera que un planteamiento racional de las enfermedades epigenéticas arranca de consideraciones básicas sobre la estructura del material genético eucariótico y su modificación, a tales extremos dedicaré las próximas páginas.

## **Epigenética y enfermedad**

### **Estructura de la cromatina; concepto de Epigenética**

La descripción de la estructura de doble hélice del DNA (Watson y Crick, 1953a) y de sus implicaciones funcionales (Watson y Crick, 1953b) constituyen los dos trascendentales artículos que sentaron las bases moleculares de la Genética moderna e hicieron posible que el propio Crick (1958) formulara el *dogma central* de la Biología Molecular, según el cual la información genética contenida en el DNA determina la estructura de las proteínas en un proceso en que el RNA desempeña un papel intermediario. Hoy en día, gracias a un ingente trabajo realizado por miles de investigadores, se conocen con extraordinario detalle los mecanismos que aseguran la transmisión de la información genética. El desciframiento del código genético, por citar un importante ejemplo, permitió conocer, dada la secuencia de un gen, la estructura

<sup>15</sup> *Nature* 459,1034



primaria de la proteína codificada.<sup>16</sup> El imparable progreso de las técnicas de análisis y secuenciación del DNA permite en la actualidad detectar mutaciones en un determinado gen y, en el caso de enfermedades monogénicas, establecer un diagnóstico mucho antes de que se presenten los síntomas de la enfermedad.

Pero es evidente que ese conocimiento, aún siendo de enorme importancia, no basta. Un sencillo ejemplo puede poner de manifiesto esa insuficiencia. El cuerpo humano adulto está formado por entre 10 y 100 billones de células que pertenecen a 250 tipos celulares distintos. Todas ellas derivan del cigoto inicial y poseen, en principio, el mismo genoma. Los alrededor de 30.000 genes del organismo humano se hallan presentes en todas sus células, pero es evidente que cada una expresa una combinación singular de ellos que la hace pertenecer a uno de esos 250 tipos diferentes. La situación viene a ser semejante, si vale la comparación, a la de esas pantallas formadas todas ellas por el mismo número de luces en las que según se enciendan unas u otras se leen cada una de las letras del alfabeto. Evidentemente la situación real es mucho más compleja que la del ejemplo anterior, porque en vez de unas decenas de luces hay unos 30.000 genes y en vez de resultar las 27 letras del alfabeto castellano han de resultar 250 tipos celulares.

¿Qué es lo que hace que se exprese en cada tejido una singular y específica combinación de sus genes? La respuesta inmediata es que los diferentes mecanismos de regulación permiten la expresión génica selectiva y específica. Pero la comprensión de esos mecanismos de regulación no constituye, ni de lejos, una tarea fácil. Es cierto que los trabajos pioneros realizados en procariotas (Jacob y Monod, 1961) sentaron las bases de la regulación génica, pero habrían de pasar aún muchos años hasta que se empezara a vislumbrar el alcance de la regulación genética en eucariotas. En los albores de la Biología Molecular, a mediados del siglo XX, ya se sabía que el DNA se encontraba en estos organismos formando un material complejo, denominado cromatina, en el que unas proteínas básicas, las histonas, eran sus principales acompañantes. La primitiva idea de que las histonas serían represores específicos de la expresión génica abrió las puertas a la caracterización de este grupo de proteínas, para encontrar que sólo hay cinco clases de ellas que, con la nomenclatura actual, se designan como H1 (o su equivalente, H5, en algunos tipos celulares), H2A, H2B, H3 y H4. Esta limitada heterogeneidad y la extraordinaria conservación evolutiva de las histonas —puesta de manifiesto por primera vez con la secuenciación de H4 (DeLange *et al.* 1969a, 1969b)— hizo pensar que las histonas más que represores serían simplemente proteínas estructurales. Esta consideración abrió el camino al estudio de la estructura de la cromatina.

Los primeros resultados experimentales obtenidos mediante difracción de rayos X de fibras de cromatina se interpretaron suponiendo que la cromatina estaría formada por una superhélice continua de DNA, mantenida de alguna forma, que nunca llegó a definirse con precisión, por la interacción con las histonas. A partir de 1973, se obtuvieron nuevos datos que comenzaron a inclinar la balanza en favor de una organización discontinua de la cromatina.

Esos datos procedían tanto de experimentos bioquímicos (Hewish y Burgoyne, 1973), como de observaciones al microscopio electrónico (Olins y Olins, 1974) y dieron paso a la aceptación del modelo nucleosomal para la estructura de la cromatina (Kornberg, 1974). Actualmente se sabe que un nucleosoma consta de una partícula núcleo y un DNA espaciador. Éste es de longitud variable, pero todas las partículas núcleo de todas las células eucarióticas son idénticas. Están constituidas por un octámero de histonas —dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4— alrededor del cual se enrollan 147 pares de bases de DNA describiendo una superhélice. Tras varios intentos infructuosos, se llegó a conocer con precisión la estructura del octámero de histonas, gracias al trabajo del grupo de Moudrianakis (Arents *et al.*, 1991) que, incluso llegó a predecir cuál sería el recorrido del DNA por la superficie del octámero (Arents y Moudrianakis, 1993). Cuando, años más tarde, la difracción de rayos X de cristales de partículas núcleo permitió describir con una resolución de 2,8 Å la estructura de la partícula núcleo (Luger *et al.*, 1997) se comprobó que las predicciones del grupo de Moudrianakis eran esencialmente correctas.

Desde esa fecha, ha aumentado precisión con la que se conoce la estructura de la partícula núcleo, especialmente en lo que se refiere a la trayectoria del DNA (Richmond y Davey, 2003; Ong *et al.* 2007), pero siguen siendo muy numerosos los interrogantes que se plantean a la hora de describir cómo se pliegan los filamentos de nucleosomas hasta lograr el grado de compactación requerido para empaquetarse en el núcleo celular o el grado aún mayor que implica la organización de los cromosomas metafásicos (véase, por ejemplo, Daban y Bermúdez, 1998; Dorigo *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2006; Eltsov *et al.*, 2008). En cualquier caso, es evidente que la organización de la cromatina supone un

<sup>16</sup> Se puede encontrar una breve revisión acerca de la historia del descubrimiento del código genético en Franco (2008).

obstáculo para la funcionalidad nuclear, ya que el DNA debe mantenerse accesible para el desarrollo de múltiples procesos. Por sólo citar uno de ellos, piénsese que la transcripción exige que la RNA polimerasa recorra una de las cadenas del DNA, lo que, a su vez, implica que ambas cadenas se separen. Esta separación constituye una tarea formidable si el DNA está enrollado alrededor de los octámeros de histonas y los filamentos de nucleosomas superenrollados sobre sí mismos. Además, para que la RNA polimerasa actúe, se requiere el concurso de numerosas proteínas: factores transcripcionales basales, activadores, coactivadores, mediadores, etc., que han de interactuar bien con secuencias específicas del DNA, bien con otros factores.

¿Qué acontecimientos hacen posible que la RNA polimerasa pueda acceder a un gen para transcribirlo a pesar del obstáculo que supone la organización de la cromatina? Y esta pregunta enlaza con la que se formuló más arriba, ¿cómo se seleccionan los genes que en un momento dado se tienen que transcribir en una célula? Con un ejemplo muy gráfico, Peterson y Laniel (2004) comparan la compactación de la cromatina nuclear a la de unos 15.000 km de espaguetis que tuvieran que encerrarse dentro de un balón de baloncesto y, cual si fuera pequeño ese problema, el de la transcripción de un gen sería comparable al de encontrar y recorrer un par de centímetros dentro de esa ingente masa. Para dar una respuesta, pues, a esas preguntas, no basta el conocimiento *genético*, es decir, el aportado por la secuencia de los genes, porque la de un gen concreto es común en todas las células del organismo y en unas no se transcribe, mientras que en otras lo hace; y en éstas, no lo hace continuamente. Ha de haber alguna información superpuesta a la genética que determine esa selectividad transcripcional. Esa información superpuesta es la información *epigenética*. Epigenética es un término acuñado hace alrededor de 70 años por Conrad Waddington, que la definió como «la rama de la Biología que estudia las interacciones causales entre los genes y su entorno que conducen a la existencia del fenotipo» (Waddington, 1942). Como esas interacciones modifican la estructura del material genético sin producir cambios en la secuencia del DNA, alternativamente se suele definir la Epigenética como «el estudio de los cambios —hereditarios o, al menos, potencialmente heredables— experimentados por el material genético y no debidos a alteraciones en la secuencia del DNA» (Jiang *et al.*, 2004).

Lo que caracteriza a una determinada célula, lo que la encuadra dentro de un tipo celular es su proteoma, el conjunto de sus proteínas constituyentes. Éste, a su vez, viene determinado por su transcriptoma, es decir, por el conjunto de los RNA mensajeros característicos de esa célula. Y son, en definitiva, los factores epigenéticos los que hacen posible que, teniendo el mismo genoma todas las células de un organismo humano —con la evidente excepción de los linfocitos B y T—, tengan un transcriptoma y un proteoma específico del tipo a que pertenecen. Si se tiene en cuenta que el DNA genómico se encuentra en un entorno definido por la estructura de la cromatina, el genotipo puede dar lugar al fenotipo solamente a través del epigenotipo. En este contexto Jiang *et al.* (2004) han comparado certeramente el epigenotipo con las variaciones del tipo de letra que pueden añadirse a un texto primario. Llegados a este punto, es inmediato preguntarse cuáles son esos factores epigenéticos. En líneas generales, puede decirse que son dos: los que, sin alterar su secuencia como queda dicho, repercuten directamente en el DNA y los que afectan a los otros componentes de la cromatina.

## Modificación epigenética del DNA

El único factor epigenético que modifica directamente el DNA en mamíferos es la metilación del carbono 5 del anillo de citosina en los dinucleótidos simétricos CpG (Bird, 2002), modificación que afecta a una pequeña proporción —algo superior al 1%— de los restos de ácido citídico (Vanyushin *et al.*, 1970), pero que implica que el 70-80% de los dinucleótidos CpG están metilados (Ehrlich, 1982). El grupo metilo se incorpora a partir de la S-adenosilmetionina, el donador universal de estos grupos, en una reacción enzimática catalizada por las DNA-metiltransferasas (Bird, 2002), cuyas propiedades, en líneas generales, se describirán más adelante.

El primer indicio de un posible papel de la metilación de citosina en el control de la expresión génica se obtuvo al encontrar, en células sincronizadas, que la mayoría de la metilación del DNA tiene lugar durante la fase S, una etapa en que la síntesis de RNA es mínima, mientras que la metilación es despreciable durante las fases G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, en las que la transcripción es máxima (Volpe, 1976).

En las células normales la metilación del DNA ocurre fundamentalmente en las secuencias repetitivas, incluido el DNA satélite, que no se transcriben (véase la revisión de Robertson, 2005). De hecho, hace tiempo que, gracias a los estudios sobre la inactivación del cromosoma X humano, se sabe que existe una relación causal entre metilación de DNA y silenciamiento de genes (Mohandas *et al.*, 1981). Pero para comprender el significado real de la metilación de DNA hay que considerar que la distribución de los dinucleótidos CpG en el genoma de los vertebrados no ocurre al azar, puesto que existen unas regiones, denominadas *islas CpG*, en las que la presencia de estos dinucleótidos es mucho más abundante. Estas regiones se encuentran preferentemente en los extremos 5' del 60% de los genes humanos y su patrón de metilación difiere sustancialmente del de la media del genoma. Mientras que la presencia de citosina metilada en el conjunto del genoma es proporcional a la abundancia de CpG, la mayoría de las islas CpG, por ejemplo las que se encuentran en los promotores de genes constitutivos (Li y Bird, 2006), no están metiladas. Por el contrario, la metilación de las islas CpG se relaciona con la represión transcripcional (Goll y Bestor, 2005).

Se han descrito dos tipos de mecanismos mediante los cuales la metilación del DNA provoca la represión transcripcional. El primero implica la inhibición del reclutamiento de factores transcripcionales por la metilación del DNA (Bird, 2002). El segundo, más complejo, se puso de manifiesto gracias a unos decisivos experimentos realizados en 1998, en los que se comprobó que existe una relación entre metilación de DNA y desacetilación de histonas (Eden *et al.*, 1998). Más adelante se mencionará que, mientras que la acetilación de histonas está relacionada con la activación transcripcional, la desacetilación lo está con la represión. En ese momento, se comentarán las bases de este segundo mecanismo por el que la metilación del DNA conduce a la represión de la transcripción.

¿Cómo se produce la metilación del DNA en los sitios requeridos? La respuesta tiene un elemento relativamente fácil de contestar y otro en el que aún se presentan problemas muy importantes pendientes de solución. El primero hace referencia a las enzimas de las que depende la metilación de las citosinas en el DNA. Desde hace tiempo se sabe que existen dos tipos fundamentales de DNA metiltransferasas (DNMT). La enzima DNMT1 cataliza la metilación de CpG cuando en la hebra complementaria del DNA se encuentra metilada la citosina, como sugirió inicialmente Bestor (1992) y fue comprobado posteriormente por Pradhan *et al.* (1999). De esta manera, DNMT1 es capaz de metilar un DNA previamente hemimetilado y, por tanto, tiene la función de mantener el estado de metilación de un DNA tras la replicación. Por el contrario, DNMT3A y DNMT3B son metiltransferasas *de novo*, que catalizan la incorporación de restos metilo en dinucleótidos CpG cuyas pareja en la hebra complementaria no está metilada (Okano *et al.*, 1999). La naturaleza de las enzimas capaces de convertir la 5-metilcitosina en citosina, es decir, de desmetilar el DNA, sigue siendo objeto de controversia, pero hoy en día se sabe que tanto DNMT3A como DNMT3B poseen actividad de DNA desmetilasa *in vitro* y se acepta que pueden actuar también *in vivo* (Kim *et al.*, 2009). De hecho, recientemente se ha puesto de manifiesto la existencia de una rápida metilación-desmetilación de DNA en lugares específicos de promotores concretos (Métivier *et al.*, 2008; Kangaspeska *et al.* 2008). Estos resultados, junto con los datos iniciales de Volpe (1976) que se acaban de comentar, sólo se explican por la existencia de DNA desmetilasas, para las cuales incluso se ha descrito un posible mecanismo (Ooi y Bestor, 2008).

Está claro, pues, que el estado de metilación del DNA depende de la actividad relativa de las DNA metiltransferasas y desmetilasas y que su mantenimiento en la división celular es posible gracias a la acción de la DNMT1, pero los mecanismos que aseguran la especificidad de los sitios de metilación, aunque se han discutido ampliamente (Bird, 2002; Li y Bird, 2006) siguen presentando muchos puntos oscuros. Recientemente se ha descrito que DNMT1 a su vez se regula por metilación de una de sus lisinas (Wang *et al.*, 2009), lo que establece un complejo diálogo entre la modificación del DNA y la modificación de proteínas, diálogo al que será preciso aludir más adelante.

## Modificación de histonas

La existencia de una modificación de las histonas que tiene lugar después de la traducción se puso de manifiesto en 1964, cuando se encontró que las histonas pueden modificarse reversiblemente por acetilación, una reacción que afecta a algunas cadenas laterales de lisina con la conversión del grupo amino, cargado positivamente a pH fisiológico, en un resto de acetamida, carente de carga eléctrica (Allfrey *et al.*, 1964). Aunque existen otras modificaciones de histonas, la acetilación se ha estudiado profusamente y ha sido objeto de la investigación de nuestro laboratorio durante bastantes años. Espero

se me disculpe por ello si la descripción de la acetilación de histonas queda un tanto hipertrofiada en este discurso.

En la primera aparición en escena de la acetilación de histonas (Allfrey et al., 1964), se postuló ya que la reacción podría facilitar la transcripción. La sospecha, que se mantuvo viva sin pruebas directas durante mucho tiempo, se basaba en una idea errónea. Las lisinas acetilables se encuentran mayoritariamente en las colas N-terminales de las histonas, que, por su elevado contenido de aminoácidos básicos, se presumía eran los puntos fundamentales de unión al DNA en el nucleosoma. Aunque a muy baja fuerza iónica las colas pueden unirse realmente al DNA nucleosomal (Ballestar y Franco, 1997), las interacciones histona-DNA tienen lugar a través de residuos básicos situados en la región globular del octámero de histonas (Arents y Moudrianakis, 1993; Luger et al., 1997). El avance en el conocimiento de la estructura de la cromatina ha dado paso a la idea de que la disminución de la carga positiva de las colas de las histonas desestabiliza no el nucleosoma, sino las estructuras de orden superior, en las que participan las colas N-terminales de las histonas. Así pues, aún con un fundamento distinto, sigue en pie la idea inicial de que la acetilación de histonas puede aliviar los impedimentos que la organización de la cromatina supone para la transcripción.

El estado de acetilación de las histonas depende de la actividad relativa de dos tipos de enzimas de acción contraria: las histona acetiltransferasas (HATs) y las histona desacetilasas (HDACs). Las primeras catalizan la incorporación de restos acetilo a partir de la acetil-coenzima A. Las segundas hacen posible el restablecimiento de la amina primaria original mediante la eliminación hidrolítica de acetato. Existen HATs citoplasmáticas, que se encargan de la acetilación de histonas recién sintetizadas, particularmente H4, como paso previo a su transporte al núcleo y posterior ensamblaje en la cromatina (Ruiz-Carrillo *et al.*, 1975; Allis *et al.*, 1985). Son las que inicialmente se denominaron HAT-B en contraposición a las enzimas nucleares, las HAT-A (Garcea y Alberts, 1980). Naturalmente, el papel de acetilar las histonas en relación con la activación génica —ese papel ya sospechado por los descubridores de esta modificación covalente, pero de demostración huidiza— se adjudicó con toda lógica a las HAT-A.

Pero la actividad nuclear en la que está implicada la estructura de la cromatina no se limita a la transcripción, sino que también incluye la sustitución de histonas por protaminas durante la espermiogénesis, la sustitución de histonas canónicas por variantes, los cambios estructurales requeridos para la replicación o para la recombinación y, en general, todos los procesos nucleares que necesiten una reorganización de la cromatina. En todos esos casos se observaron cambios en la acetilación de histonas (Csordas, 1990) que, por tanto, parece jugar papeles importantes además de activar la transcripción.

En 1988, un investigador austriaco, Peter Loidl, a la vista de esa multiplicidad de papeles relacionados con la acetilación de histonas, llamó la atención sobre el hecho de que en un nucleosoma, distribuidos entre las ocho moléculas de histonas internas, hay 28 residuos de lisina potencialmente acetilables.<sup>17</sup> Es obvio que el número de posibilidades resultantes es elevadísimo. Si se pudiera distinguir de alguna manera entre la acetilación de uno u otro de los residuos de lisina, una determinada combinación de acetilaciones podría servir de señal para la realización de un proceso, mientras que otra combinación serviría para indicar que se ha de realizar otro. La hipótesis era atractiva. La acetilación, además de su presunta función como desestabilizadora de las interacciones iónicas entre las histonas y el DNA podría servir, con palabras del propio Loidl, como «una señal precisa para la inducción o mantenimiento de ciertos rasgos estructurales de la cromatina, aunque el mecanismo molecular por el que actúa la acetilación aún se desconozca» (Loidl, 1988).

Naturalmente, la hipótesis de la señalización no implicaba que todas las posibles combinaciones de acetilación en un nucleosoma tuvieran un sentido funcional, pero, al exigir que algunas de ellas lo tuvieran, tenía una consecuencia inmediata: requería que la acetilación de histonas ocurriera con especificidad de histona, pero también con especificidad de sitio. La razón de esta especificidad se debía encontrar en las enzimas responsables de mantener un determinado estado de acetilación. De esa manera comenzó a pensarse que debían existir múltiples HATs-A y HDACs, si debían presentar especificidad de histona y de sitio y si las funciones de la acetilación de histonas eran tan variadas.

Varios laboratorios se embarcaron en la aventura de poner de manifiesto esta multiplicidad. El nuestro, que había comprobado ya la especificidad de histona de una enzima de plantas (Sendra *et al.*,

<sup>17</sup> Ese era el número de lisinas acetilables admitidos en aquellas flechas. Hoy en día se sabe que son más numerosas las dianas de modificación, y que no se limitan a las colas N-terminales de las histonas.

1986), fue el primero en demostrar la existencia de múltiples enzimas tipo A, con diferente especificidad de histona, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (López-Rodas *et al.*, 1989; 1991a). La publicación de los resultados fue seguida pronto por la constatación de la presencia de varias actividades HAT en vegetales (López-Rodas *et al.*, 1991b; Georgieva *et al.*, 1991) y en otros organismos. Al mismo tiempo, se desarrolló el estudio sobre las HDACs, cuya multiplicidad se demostró por vez primera en plantas (Sendra *et al.*, 1988).

La especificidad de sitio de las HATs se pudo también comprobar por medio de dos metodologías alternativas: el uso de anticuerpos específicos de sitio (véase Turner, 1995, para una revisión inicial) y la secuenciación (Thorne *et al.*, 1990; Mingarro *et al.*, 1993; Sobel *et al.*, 1994; Boggs *et al.*, 1996). La especificidad de sitio de las HDACs es metodológicamente más difícil de estudiar y ordinariamente ha de hacerse por medios indirectos (Clemente *et al.*, 2001).

Una vez que se demostró la existencia de múltiples actividades de HAT y HDAC el interés de los investigadores se centró en la caracterización de los genes que las codifican, con el convencimiento de que, de esa manera, se podría avanzar considerablemente en la comprensión de las funciones de la función de la acetilación de histonas. El primer gen clonado fue el de una HAT tipo B (Kleff *et al.*, 1995), pero poco después, el grupo de Allis empleando una estrategia original que implicaba el ensayo de la actividad enzimática en los propios geles de poliacrilamida usados para la separación electroforética (Brownell and Allis, 1995), aislaron el gen que codifica una HAT tipo A del ciliado *Tetrahymena*. Los resultados fueron particularmente interesantes, ya que la secuencia del gen puso de manifiesto que la enzima era homóloga a Gcn5p, un conocido coactivador transcripcional de *Saccharomyces cerevisiae* (Brownell *et al.*, 1996). Ese mismo año, en el laboratorio de Schreiber se consiguió también la clonación del primer gen de una HDAC (Taunton *et al.*, 1996). En este caso, se trató de una enzima de mamíferos, pero también presentaba homología con una proteína de levadura, el represor Rpd3p. De esta manera, se consiguió, de un modo definitivo, establecer un nexo causal entre acetilación-desacetilación de histonas y activación-represión de la transcripción. Se cerró así, de forma contundente, una ininterrumpida serie de sospechas y pruebas indirectas. Pero además, como tantas veces ha ocurrido en la historia de la Ciencia, la obtención de un resultado singular disparó de modo cooperativo la investigación, que se expande cual si de un muelle comprimido se tratara. En el caso presente, los hallazgos de Allis y Schreiber actuaron como un catalizador, que aceleró la búsqueda de nuevos genes de HATs y HDACs.

No tendría sentido detallar aquí la historia de la identificación de estos nuevos genes, que sucedió de forma rápida a la clonación de los primeros. En excelentes revisiones se han recogido esas investigaciones (Sternier y Berger, 2000; Roth *et al.*, 2001; Kimura *et al.*, 2005; Vetting *et al.*, 2005; Fukuda *et al.*, 2006; Hildmann *et al.*, 2007) y a ellas se remite al lector interesado. Baste decir que a los 10 años de la clonación del primer gen de una HAT, se habían caracterizado ya 13 HATs y 18 HDACs de mamíferos (Kimura *et al.* 2005; Hildmann *et al.*, 2007).

Las HATs se pueden agrupar en varias familias atendiendo a la homología de sus secuencias. La familia más estudiada es la que agrupa a las enzimas homólogas a Gcn5. Se denomina la familia GNAT (Gcn5-related *N*-acetyltransferase) y a ella pertenecen también otras enzimas que transfieren restos acetilo a sustratos distintos de las histonas, como las aminoglicósido *N*-acetiltransferasas bacterianas, implicadas en la resistencia a antibióticos (Vetting *et al.*, 2005). La familia MYST, llamada así por las iniciales de los miembros fundadores de la familia (MOZ, YBF2/SAS3, SAS2, Tip60), comprende HATs de mamíferos, de *Drosophila*, de levadura, etc. (Kimura *et al.*, 2005). Una tercera familia está constituida por p300 y CBP, dos proteínas de elevada similitud y función intercambiable (Roth *et al.*, 2001). Por otro lado, algunos factores transcripcionales generales, como TAF<sub>II</sub>145 de levadura y su análogo humano TAF<sub>II</sub>250 poseen actividad HAT y, junto con las enzimas de la familia GNAT, tienen la particularidad de aceptar también factores transcripcionales eucarióticos como sustratos (Imhof *et al.*, 1997), lo que sugiere que la acetilación reversible puede actuar como un mecanismo general de modulación de la actividad de varios componentes de la maquinaria transcripcional. En este sentido, se planteó hace ya tiempo la posibilidad de que las cascadas de acetilación desempeñen un importante papel en la regulación celular (Kouzarides, 2000). Finalmente, una quinta familia de HATs es la formada por enzimas, como SRC-1 y ACTR humanas, que están asociadas con receptores hormonales nucleares, y se conocían como coactivadores transcripcionales (Roth *et al.*, 2001).

La cristalización de varias HATs ha permitido el estudio de su estructura. Los primeros datos disponibles se centraron en miembros de la familia GNAT (Dyda *et al.*, 2000), y permitieron sentar las bases estructurales de la especificidad de estas enzimas (Clements *et al.*, 2003; Poux y Marmorstein, 2003), así como profundizar en su mecanismo cinético y molecular (Roth *et al.*, 2001). Esta investigación se ha extendido a enzimas de otras familias (Yan *et al.*, 2003; Tang *et al.* 2008; Liu *et al.*, 2008).

También las HDACs se pueden agrupar en diversas familias atendiendo a su homología de secuencia. La clasificación más aceptada las agrupa en cinco clases: 1, 2a, 2b, 3 y 4. Con la excepción de las HDACs de la clase 3, que requieren NAD<sup>+</sup>, todas necesitan Zn<sup>2+</sup> (Hildmann *et al.*, 2007). Los estudios estructurales con las HDACs comenzaron con un cierto retraso, pero han alcanzado un nivel equivalente (Finnin *et al.* 2001; Vannini *et al.* 2004; Guo *et al.* 2007a; Bottomley *et al.* 2008; Dowling *et al.*, 2008; Fickner, 2009). Es más, han servido para diseñar inhibidores de las HDACs que, como se verá más adelante, poseen un notable interés farmacológico.

Una de las estrategias que se intentaron emplear para clonar los genes de HATs y HDACs fue el aislamiento de las enzimas por métodos bioquímicos. Las dificultades que se encontraron en los procesos de purificación se consideraron como un indicio de que esas actividades enzimáticas se encontraban asociadas a otras proteínas con posible papel regulador. Los datos obtenidos tras la caracterización de HATs y HDACs demostraron que esa sospecha inicial era reflejo de una situación real. Tanto HATs como HDACs están implicadas en una compleja red de interacciones con otros muchos componentes celulares. Cuando se estaba llegando a esa idea, Johnson y Turner (1999) apuntaron que el complejo entramado de las enzimas implicadas en la acetilación de histonas recordaba al que se había encontrado previamente con respecto a las proteína quinasas, proteína fosfatasa y proteínas reguladoras asociadas.

El tiempo demostró que la apreciación de Johnson y Turner era correcta. Tanto HATs como HDACs se encuentran asociadas a muchas proteínas que determinan su especificidad, modulan su actividad y dirigen las actividades enzimáticas a las regiones requeridas de la cromatina. De hecho, unas y otras enzimas poseen dominios funcionales que las capacitan para interactuar con otras muchas proteínas reguladoras (Kouzarides, 1999). Por ese motivo, los componentes de un complejo pueden ser variables de un organismo a otro, e incluso, de una célula a otra. No tendría sentido, pues, hacer una extensa revisión de la naturaleza de estos complejos. Baste decir que se han descrito 12 tipos de complejos en los que participan HATs de la familia GNAT y 8 cuyo componente catalítico pertenece a la familia MYST (Lee y Workman, 2007). Algunos de ellos poseen un elevado número de subunidades, como el TIP60 humano, que contiene 19 proteínas además de la HAT, o el SAGA de levadura, que contiene 18. Por el contrario, otros son muy simples, como el SAS de levadura, que sólo contiene dos proteínas adicionales (Lee y Workman, 2007).

Desde un punto de vista histórico, la acetilación de histonas es la modificación que más se ha estudiado, pero no es desde luego la única que ocurre. La metilación de lisinas se descubrió al mismo tiempo que la acetilación (Allfrey *et al.*, 1964), pero su estudio se dejó pronto de lado por dos razones. La primera es que esta modificación no altera la carga de las cadenas laterales y esta circunstancia física se había considerado relevante, como se ha comentado, para interpretar sus posibles implicaciones funcionales. Por otro lado, aunque la existencia de enzimas capaces de catalizar la metilación de proteínas se descubrió relativamente pronto, hasta hace pocos tiempo no se ha puesto de manifiesto la presencia de enzimas competentes para la eliminación de grupos metilo, por lo que, durante muchos años se consideró a la metilación de histonas como una modificación irreversible y, por tanto, difícilmente relacionada con un papel regulador. Como consecuencia de esas circunstancias hasta bien entrada la década de 1990 no comenzó a estudiarse sistemáticamente la metilación de histonas. En una de las primeras revisiones sobre el tema aún se ponía en duda la existencia de histona desmetilasas y se postulaba que la metilación de residuos específicos de lisina en las colas de las histonas era una marca epigenética estable que dirigía funciones biológicas particulares, que abarcarían desde la regulación transcripcional hasta el ensamblaje de la heterocromatina (Rice y Allis, 2001).

Pero en menos de 8 años la visión de la metilación de histonas ha cambiado radicalmente. Actualmente se sabe que la metilación puede ocurrir en residuos de lisina, catalizada por las HMT (*histone methyl transferases*), y que en esos residuos se puede llegar a un estado de trimetilación. Los residuos de arginina también pueden mono- y dimetilarse —de modo simétrico o asimétrico— en reacciones catalizadas por PRMT (*protein methyl transferases*). En 2004 se caracterizó una histona desmetilasa capaz de eliminar los grupos metilos de la dimetil-lisina (Shi *et al.*, 2004); en 2006 se identificó otra enzima que revierte la trimetilación (Cloos *et al.*, 2006) y a partir de ese año se consiguió

describir la estructura terciaria de histona desmetilasas (Chen *et al.*, 2006; Ng *et al.*, 2007). Las excelentes revisiones publicadas recientemente (véase, por ejemplo, Cloos *et al.*, 2008) hacen innecesaria una descripción detallada de los mecanismos de metilación y desmetilación de histonas.

Además de la acetilación y la metilación, las histonas pueden modificarse reversiblemente mediante fosforilación, ubicuitilación y sumoilación (Bernstein *et al.*, 2007). En nuestro laboratorio se describió por vez primera que las histonas H2A, H2B y H3 son sustratos *in vitro* para la modificación por poliaminación catalizada por la transglutaminasa (Ballestar *et al.*, 1996). Aunque otros autores encontraron indicios que sugieren que la histona H2B también es sustrato *in vivo* (Piredda *et al.*, 1999), hasta ahora no se ha podido demostrar la reversibilidad de la reacción y se desconoce si juega un papel funcional.

Como se había supuesto desde el descubrimiento de esta modificación de histonas y se corroboró tras la clonación de los genes de HATs y HDACs, la acetilación está relacionada con la activación transcripcional (Franco, 2000), mientras que la metilación puede desempeñar un doble papel. El primer indicio sobre esta funcionalidad dual de la metilación de histonas se obtuvo en 2001, cuando se describió que la histona H3 metilada en su lisina 4 es especialmente abundante en las regiones transcritas del *locus Mat* de *Schizosaccharomyces pombe*, mientras que la metilación en la lisina 9 de esa misma histona ocurre fundamentalmente en las regiones heterocromáticas de ese *locus* (Noma *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos desde entonces, no han hecho sino confirmar este papel bifuncional de la metilación de histonas. Así, la metilación en la lisina 4 de H3 y en las argininas 17 de H3 y 3 de H4 está relacionada con la activación de la transcripción, mientras que la metilación de las lisinas 9 y 27 de H3 y 20 de H4 se relaciona con la represión o silenciamiento de genes (Peterson y Laniel, 2004; Martin y Zhang, 2005).

En realidad, esta diferencia de comportamiento funcional entre las metilaciones en distintos aminoácidos de las histonas es consecuencia de una característica de la modificación de histonas que había sido prevista por Allis unos años antes. Este autor había emitido en 2000 la hipótesis del ‘código de las histonas’, según la cual “una múltiple modificación de histonas, que actúa de un modo combinatorio o secuencial, especifica funciones singulares subsiguientes” (Strahl y Allis, 2000). La hipótesis de Strahl y Allis recuerda a la que Loidl había postulado en 1988, que ya ha sido mencionada anteriormente. Si entonces Loidl proponía que la acetilación podía introducir una señalización en las histonas, Strahl y Allis extendieron esa posibilidad a las otras modificaciones de las histonas, a su temporalidad y a la combinación entre ellas.

Los datos experimentales disponibles en el momento de emitir la hipótesis eran muy limitados e inciertos, pero pronto se fueron acumulando resultados en su apoyo y hoy se admite que existe un *código epigenético*, por utilizar la terminología de Turner (2000), que no se contrapone, sino que se superpone al código genético inscrito en el DNA, poniendo de manifiesto las potencialidades contenidas en los restantes componentes de la cromatina. En realidad, no sólo las modificaciones de las histonas, sino también la metilación del DNA, formarían parte de este código epigenético.

Un código, para que sea funcional, debe poder interpretarse. Para leer el código epigenético harán falta moléculas capaces de distinguir unas modificaciones de otras. Era, pues, lógico que Strahl y Allis, tras enunciar su hipótesis, se plantearan dos preguntas, que constituyen otros tantos epígrafes de su artículo: “How is the histone code read?” y “Who reads the code?” (Strahl y Allis, 2000). Las respuestas iniciales tenían que ser, por fuerza, provisionales, pero el tiempo ha confirmado que estaban bien encaminadas. Hoy se sabe que existen determinados módulos en las proteínas capaces de interactuar específicamente con acetil-lisina o metil-lisina. Son los conocidos, respectivamente, como bromodominios o cromodominios (Marmorstein, 2001), que se encuentran presentes en muchas proteínas que interactúan con la cromatina, entre las que se encuentran las propias HATs (Roth *et al.*, 2001).

Una particularidad del código epigenético es la interrelación entre las diversas modificaciones de histonas y del DNA. Existe un extenso *diálogo* entre unas modificaciones y otras. Por ejemplo, la metilación del DNA está relacionada con la desacetilación de histonas, gracias a la existencia de proteínas capaces de reconocer la metilcitosina y que, a su vez, reclutan histona desacetilasas (véase, por ejemplo, Ballestar *et al.*, 2001). Esta interrelación es especialmente importante, por cuanto es la causa del silenciamiento de los genes cuyos promotores están hipermetilados y, además de participar en el reclutamiento de la proteína no histona HP1 para la formación de regiones heterocromáticas (Fischle *et al.*, 2003; 2005), está implicada en la represión de genes supresores de tumores, que tanta importancia tiene en el desarrollo del cáncer (Vaissière *et al.*, 2008). Además de estas relaciones entre las

modificaciones de histonas y las del DNA se ha descrito una extensa red de intercomunicaciones entre las diversas modificaciones que puede sufrir una misma histona (Zhang y Reinberg, 2001) y también las que existen entre las modificaciones de una histona y las de otra del mismo o distinto nucleosoma (Fingerman *et al.*, 2008). Evidentemente, todas estas intercomunicaciones son posibles gracias a los módulos de reconocimiento de las modificaciones a los que se ha aludido antes.

## Remodelación de la cromatina

Acaba de apuntarse que la acetilación de histonas introduce una marca que, según las todavía inciertas reglas del código epigenético, puede interpretarse por diversos componentes de las maquinarias implicadas en los procesos nucleares. Pero, además, la hiperacetilación generalizada de un determinado *locus* genético hace que se pierda la estructura compacta de la cromatina (García-Ramírez *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2001). Si bien esta alteración estructural es un requisito necesario, no es suficiente para que se produzcan los diferentes procesos, como la transcripción, replicación, recombinación, etc. en los que la cromatina actúa como sustrato. En el caso concreto de la transcripción, en nuestro laboratorio describimos una situación ilustrativa: el tratamiento con metil-tioadenosina, que inhibe la expresión del gen *MAT2A* inducida en un cultivo primario de hepatocitos por el factor de crecimiento de hepatocitos, conduce al mismo tiempo a la hiperacetilación de H4 en el promotor de dicho gen (Latasa *et al.*, 2001). La acetilación, por más que sea necesaria para que se dé la transcripción, no es suficiente. La explicación es obvia: la acetilación general de la cromatina no elimina los nucleosomas y éstos obstaculizan tanto el ensamblaje del complejo de preiniciación como el avance de la RNA polimerasa. La estructura nucleosomal, en efecto, representa un obstáculo, no sólo para el ensamblaje de la maquinaria transcripcional sino, en general, para el desarrollo del conjunto de operaciones nucleares. Para que éstos se lleven a cabo, es preciso eliminar, desplazar o alterar la estructura de los nucleosomas. Este es el proceso que se denomina *remodelación de la cromatina*.

Las investigaciones sobre remodelación comenzaron en el inicio de la década de 1990, cuando se descubrió que las mutaciones en el gen *SWI2/SNF2*<sup>18</sup> de levadura afectaban la estructura de la cromatina y podían revertirse mutando las histonas o disminuyendo genéticamente su cantidad (Hirschhorn *et al.*, 1992). Por consiguiente, el producto del gen, Swi2p/Snf2p, debía actuar contrarrestando el obstáculo que representan las histonas para la transcripción. Algo después se demostró que tanto Swi2p/Snf2p como su homólogo humano poseían actividad de ATPasa dependiente de DNA y podían reorganizar *in vitro* la estructura de la cromatina (Côté *et al.*, 1994; Kwon *et al.*, 1994). La necesidad de ATP es evidente: la estructura del nucleosoma es tan estable, que su alteración ha de ser un proceso endérgico. Se abrió de este modo una puerta al estudio de las relaciones entre estructura y función de la cromatina, que, junto con la que abrió el conocimiento de las modificaciones de las histonas, hizo posible el espectacular despegue de la investigación en cromatina que tuvo lugar a mediados de los años 90 y que sigue creciendo a ritmo exponencial.

Consecuencia de ese auge en la investigación fue la rápida caracterización de otros sistemas de remodelación, que, al igual que los implicados en la modificación de histonas, son operativos en forma de complejos. No es necesario incidir aquí en la descripción de la naturaleza y propiedades de estos complejos, que han sido objeto de varias recientes revisiones (véase, por ejemplo, Racki y Narlikar, 2008; Clapier y Cairns, 2009). Simplemente, puede decirse que la remodelación de la cromatina y la modificación de histonas son como dos caras de la misma moneda, puesto que se exigen mutuamente. Por ejemplo, las ATPasas de remodelación de la familia SWI/SNF poseen un bromodominio, mientras que las de la familia Mi-2 tienen en su estructura un cromodominio (Kingston y Narlikar, 1999), lo que permite que los correspondientes complejos se recluten sobre regiones específicamente modificadas de la cromatina. La remodelación de la cromatina se considera, con pleno derecho, uno más de los mecanismos epigenéticos, ya que, sin alterar la secuencia del DNA, modula la expresión de su información, sea ocultando con nucleosomas secuencias que deban ser accesibles para una determinada función nuclear, sea en el sentido contrario.

<sup>18</sup> Se habían identificado, por una parte, el gen SW12, implicado en el intercambio (*switching*) del tipo sexual de levadura y, por otra, el gen SNF2 (*sucrose non fermenting*), cuya mutación inhibe la expresión del gen SUC2, que codifica la invertasa y es necesario para el catabolismo de la sacarosa. Tras su clonación, se comprobó que se trataba de un único gen, que comenzó a denominarse con ambos nombres, ya acuñados por el uso.



## RNA no codificante

A medida que ha ido avanzando la secuenciación de genomas eucarióticos se han observado dos hechos. Por una parte, la abundancia de regiones que no codifican proteínas aumenta en complejidad con la evolución, mientras que el número de genes con información para proteínas se mantiene relativamente constante (Mattick, 2004; Taft *et al.*, 2007). En segundo lugar, la comparación de las secuencias genómicas con las de fragmentos cortos de secuencias de cDNA<sup>19</sup> ha permitido apreciar que existen abundantes RNAs no codificantes, que se suelen designar con la abreviación ncRNA. Ya en 2003 se propuso que esos RNAs podían desempeñar un importante papel en la regulación de la expresión génica (Mattick, 2003) y en los años posteriores se han acumulado datos que corroboran esa propuesta, de modo que hoy se acepta que los ncRNAs pueden desempeñar un papel en la estructura y función de la cromatina, con lo que constituyen un factor epigenético adicional a los considerados hasta ahora.

Particular interés revisten los RNAs pequeños, asociados al sistema de interferencia de RNA (RNAi). Este sistema, que se vislumbró en plantas como un mecanismo de defensa frente a virus y, en general, frente a la invasión por parte de material genético exógeno, posee una función mucho más general, como demostraron Fire y Mello, que obtuvieron por ello el premio Nobel de Medicina o Fisiología en 2006 (Fire *et al.*, 1998). El sistema RNAi es capaz de convertir RNA de doble cadena en fragmentos pequeños, de unos 20 nucleótidos, denominados siRNA (*small interfering RNA*) y miRNA (*micro RNA*). Los miRNAs poseen numerosas funciones reguladoras. Pueden alterar la estabilidad del mRNA o provocar su destrucción, con los consiguientes resultados en el control de la traducción, pero también, a través de su interacción con regiones del genoma asociadas con la oncogénesis, pueden actuar a modo de supresores de tumores o de oncogenes (Zhang *et al.*, 2007). Está también demostrado el papel de los siRNAs en el establecimiento de la heterocromatina (Martienssen y Moazed, 2006).

El modo de acción de los miRNAs y siRNAs en la cromatina se debe a su capacidad de interaccionar, por una parte con el DNA debido a la complementariedad de bases, por otra con numerosas proteínas, entre las que se encuentran enzimas modificadoras de las histonas y componentes de complejos de remodelación (Mehler, 2008). Esta es la base de su consideración como factores epigenéticos, aunque muchos aspectos de la función de estos ncRNAs se desconozcan todavía.

## Impronta genómica

Hasta la década de 1980 se admitía implícitamente que las dos copias, paterna y materna, de los cromosomas autosómicos eran funcionalmente equivalentes. Pero esta idea cambió como consecuencia de los ya clásicos estudios realizados con embriones de ratón (Barton *et al.*, 1984; McGrath y Solter, 1984), que dieron origen al descubrimiento de la impronta genómica.<sup>20</sup> La impronta genómica se puede definir como un fenómeno epigenético en el cual la actividad de un gen se modifica reversiblemente en función del sexo del progenitor que lo transmite. Da lugar a una expresión diferenciada de los alelos paterno y materno en un *locus* diploide. Algunos genes se expresan sólo cuando se heredan por línea materna y otros cuando lo hacen por línea paterna. En cierto modo se puede decir que los genes sometidos a impronta “recuerdan” su origen parental. En el hombre y en el ratón se estima que el número de esos genes es sólo de 80-100, pero la mayoría de ellos tienen funciones importantes, tanto en el crecimiento y en la diferenciación embrionaria y fetal, como en el crecimiento y función de la placenta. Por tanto, del funcionamiento correcto de estos genes depende, en muchos casos, la viabilidad fetal y, al menos, el progreso normal de la gestación. Por otro lado, también varios genes sometidos a impronta están relacionados con el desarrollo del sistema nervioso central y su funcionamiento normal asegura las correctas funciones cognitivas.<sup>21</sup>

La causa de la distinta expresión de los dos alelos es epigenética. Li *et al.* (1993) identificaron la metilación del DNA en unas regiones concretas como una de las causas de ese marcaje diferencial, pero posteriormente se ha encontrado que las modificaciones epigenéticas de las histonas también pueden provocar la impronta de determinados genes (véase, por ejemplo, Umlauf *et al.*, 2004). Esas secuencias modificadas epigenéticamente, contiguas a los genes, se conocen como regiones de control de impronta (ICR, *imprinting control regions*).

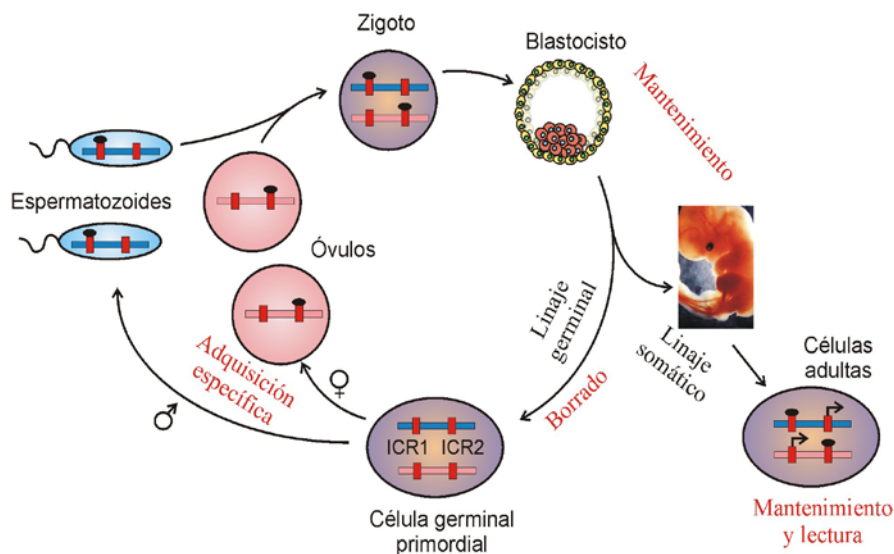
<sup>19</sup> Estas secuencias se conocen con las siglas EST, *expressed sequence tag*. Existen bases de datos de ESTs.

<sup>20</sup> El término inglés *genomic imprinting* se traduce aquí como impronta genómica.

<sup>21</sup> Mientras no se advierta lo contrario, las ideas recogidas en este apartado están adaptadas del artículo de Arnaud y Feil (2005).

La impronta genómica varía de forma sustancial lo largo del ciclo vital y en la figura 1 se esquematiza este proceso. Se señalan, como rectángulos rojos, dos ICRs arbitrarias, ICR1 e ICR2, sobre un hipotético cromosoma. Las improntas se señalizan como pequeñas elipses negras en la parte superior de las ICRs. ICR1 tiene una impronta de origen paterno, mientras que la de ICR2 deriva de la madre. El cromosoma heredado de la madre está coloreado en rosa, mientras que el paterno aparece en azul. Las improntas se adquieren durante el desarrollo de la línea germinal a partir de las células primordiales germinales, que no están marcadas. Tras la fecundación esas improntas se mantienen durante el desarrollo embrionario y fetal de los linajes somáticos hasta llegar intactas a los tejidos adultos. Su reconocimiento da lugar a la expresión monoalélica selectiva de los genes controlados por ambas ICRs. Por el contrario, durante el desarrollo de las células de la línea germinal la impronta se borra y así los genes de las células primordiales germinales están desprovistos de impronta.

Los mecanismos por los que se producen los fenómenos antedichos, esquematizados en la figura 1, son complejos y aquí sólo se presenta un breve resumen de ellos, limitado, además, al caso concreto de que la impronta se realice por metilación del DNA, ya que este caso es el que interesa en relación con la enfermedad de Beckwith-Wiedemann, que se ha elegido como ejemplo. En la adquisición de la impronta están implicadas DNA metiltransferasas de la familia DNMT3, concretamente la denominada DNMT3L (Aapola *et al.*, 2002), pero en el caso de la impronta de origen materno es también importante DNMT3A (Hata *et al.*, 2002), de la que se ha hablado anteriormente. El mecanismo por el que la impronta se realiza de un modo específico del sexo no se conoce aún con precisión.



**Figura 1.** Representación esquemática del mecanismo de impronta genómica. Se señalan, como rectángulos rojos, dos regiones internas de control (ICR) arbitrarias, ICR1 e ICR2, sobre un hipotético cromosoma. Las improntas se señalizan como pequeñas elipses negras en la parte superior de las ICRs. ICR1 tiene una impronta de orígenes paternos, mientras que la de ICR2 deriva de la madre. El cromosoma de origen materno está coloreado en rosa, mientras que el paterno aparece en azul. Las improntas se adquieren, de modo específico dependiente del sexo, durante el desarrollo de la línea germinal y se mantienen tras la fecundación a lo largo del desarrollo embrionario y fetal hasta llegar intactas a los tejidos adultos. Durante el desarrollo de las células de la línea germinal la impronta se borra.

Una vez adquirida la impronta, se mantiene, tras la fecundación, a lo largo del desarrollo de las líneas somáticas. Aunque también hay aspectos oscuros en el mecanismo de tal mantenimiento, está claro que interviene la DNMT1 que, como se ha comentado anteriormente, es capaz de metilar la cadena no modificada del DNA hemimetilado. Más interrogantes se plantean en cuanto al proceso de borrado durante el desarrollo de las células de la línea germinal.

La impronta tiene que “leerse”, es decir, tiene que existir un mecanismo de reconocimiento de la marca correspondiente. No se plantean problemas especiales cuando la ICR coincide con el promotor de un gen, ya que operan los mecanismos que se han esbozado en la sección anterior. Pero en el caso frecuente de que la ICR no coincida con el promotor, los mecanismos de reconocimiento son más complejos y pueden implicar ncRNAs. También puede ocurrir que las ICRs actúen como aisladores, es decir, como elementos que, por delimitar dos regiones con diferente estructura de la cromatina, dejan a un gen fuera de la influencia de otros elementos, por ejemplo potenciadores, que normalmente le afectarían. Un caso concreto de este mecanismo se comentará al tratar del síndrome de Beckwith-Wiedemann.

## Enfermedades epigenéticas

Desde hace mucho tiempo se conoce la existencia de enfermedades genéticas. Es fácil comprender que algunas mutaciones pueden dar lugar a un fenotipo alterado que tenga consecuencias patológicas. Pero, habida cuenta de la influencia de los factores epigenéticos en la expresión de los genes, se puede concluir que el fenotipo puede también resultar alterado como consecuencia de errores epigenéticos. No obstante, las lesiones epigenéticas son más difíciles de delimitar que las genéticas; mientras que es fácil precisar la naturaleza y alcance de un error genético, las alteraciones del epigenotipo son más difíciles de advertir y la predicción de sus consecuencias puede ser imposible *a priori*.

Un caso paradigmático de la influencia de factores epigenéticos en la patología es el descrito por Korenke *et al.* (1996). Dos hermanos gemelos monozigóticos poseían la misma mutación en el gen *ALD*, un gen localizado en el cromosoma X, cuya defectuosa expresión causa la adrenoleucodistrofia. Se trata de una enfermedad rara, que se caracteriza primariamente por la progresiva y letal degeneración neurológica, provocada por la pérdida de mielina. Uno de los hermanos desarrolló los síntomas típicos de la enfermedad, mientras que el otro permaneció sano. Al describir el caso, los autores concluyeron que “algunos factores no genéticos podían ser importantes para los diferentes fenotipos adrenoleucodistróficos”. El progreso en el estudio de las modificaciones epigenéticas, ha confirmado la interpretación de Korenke *et al.* (1996) y ha permitido apuntar las causas del comportamiento diferencial de los dos hermanos. Hoy se sabe, por ejemplo, que los gemelos monozigóticos, a pesar de su idéntico genoma, desarrollan a lo largo de su vida claras diferencias epigenéticas, tanto en la metilación del DNA, como en la modificación de las histonas (Fraga *et al.*, 2005a), que pueden dar lugar a un patrón disimilar de expresión génica.

Para explicar mejor esta cuestión, un ejemplo fácil, apoyado en muchas de las cuestiones descritas en este capítulo, puede ayudar a centrar el alcance de los cambios epigenéticos. Supóngase que en una célula normal el gen A debe expresarse, mientras que el B ha de permanecer silencioso. Es natural que el promotor de A se encuentre hipometilado y, teniendo en cuenta lo comentado al tratar de la modificación de histonas, es también razonable que las histonas de los nucleosomas que cubren el gen se encuentren hiperacetiladas, con lo cual el gen adoptará una conformación abierta. También es lógico que estén metiladas la lisina 4 de H3 y las argininas 17 de H3 y 3 de H4, ya que todas estas son marcas que, según el código de las histonas, corresponden a genes transcripcionalmente activos. Por el contrario, es probable que el promotor de B esté hipermetilado, con lo que se habrán reclutado histona desacetilasas que mantendrán al gen en un estado de hipacetilación, con una conformación condensada.

También será lógico encontrar en el gen B las marcas características de genes silenciados, como son las metilaciones en las lisinas 9 y 27 de H3. Posiblemente, todas estas modificaciones del DNA y de las histonas definirían el epigenotipo de la célula en cuanto se refiere a los genes A y B. Pero un error en las maquinarias enzimáticas que se encargan de mantener el epigenotipo mencionado puede alterar el fenotipo de la célula. Por ejemplo, una hipermetilación errónea del promotor de A, puede conducir al silenciamiento de este gen, como una deficiente metilación del promotor de B puede conducir a su expresión. Aunque no sea fácil predecir las consecuencias de estas alteraciones, puede admitirse que cambios epigenéticos pueden dar lugar a patrones aberrantes de expresión génica. Si el gen A fuera un supresor de tumores y el gen B un oncogén, las alteraciones epigenéticas que se acaban de apuntar conducirían a la expresión del segundo y al silenciamiento del primero, con la consiguiente transformación neoplásica.

¿Tienen realmente lugar alteraciones como las que se acaban de postular? La respuesta es afirmativa, aunque no se den todas las circunstancias que, a modo hipotético, se han apuntado. La primera evidencia experimental se obtuvo cuando se comprobó la existencia de cambios en la metilación del DNA en algunos casos de cáncer (Feinberg y Vogelstein, 1983). Desde entonces se han acumulado muchos datos sobre la activación por hipometilación de genes promotores de crecimiento (Feinberg, 2007). El silenciamiento epigenético por hipermetilación también está documentado, especialmente en las etapas tempranas de la progresión tumoral (Baylin y Jones, 2006). La alteración de la metilación del DNA es, pues, un mecanismo epigenético de transformación neoplásica, pero, además, otras marcas epigenéticas están asociadas con los procesos tumorales. Por ejemplo, se ha descrito la pérdida de acetilación en la lisina 16 de la histona H4 y la deficiente trimetilación de la lisina 20 de la misma histona. Estas marcas epigenéticas están asociadas a la hipometilación de secuencias repetitivas de DNA (Fraga *et al.*, 2005b).

Aunque las alteraciones epigenéticas estén presentes en muchos tipos de cáncer, el conjunto de enfermedades que se pueden catalogar como epigenéticas cubre un amplio espectro. En primer lugar, hay que señalar que se puede hablar de enfermedades epigenéticas *puras* y de enfermedades *mixtas* genéticas-epigenéticas (Zoghbi y Beaudet, 2006). Las primeras se deben tan sólo a un defecto en la introducción de marcas epigenéticas. Un caso típico es el de las enfermedades relacionadas con defectos en la impronta genómica. Como se ha descrito en la sección anterior, en cada generación las marcas específicas del progenitor deben borrarse, restablecerse y mantenerse a lo largo del desarrollo. Esto hace que los *loci* sujetos a impronta sean vulnerables a errores. Y como el mantenimiento del epigenotipo no está asegurado por tantos mecanismos de control como el del genotipo, el resultado es que las alteraciones epigenéticas pueden surgir con más probabilidad que las genéticas. Se desarrollará en el capítulo siguiente el ejemplo de una enfermedad epigenética pura, el síndrome de Beckwith-Wiedemann, debido a errores en la transmisión de la impronta genómica.

Las enfermedades mixtas genéticas-epigenéticas se deben a una mutación genética que tiene efectos epigenéticos en *trans* o en *cis*. La etiología de las primeras consiste en que una mutación genética afecta a la función de una proteína que se encarga de introducir o distinguir una marca epigenética. Por ejemplo, una mutación en la proteína MeCP2, que se reconoce las citosinas metiladas en las islas CpG y recluta las histona desacetilasas, es la causa fundamental del síndrome de Rett<sup>22</sup> (Amir *et al.*, 1999), pero también se han descrito enfermedades por mutación de enzimas que modifican histonas e incluso por alteraciones en los sistemas de remodelación de la cromatina (Ausió *et al.*, 2003; Ko *et al.*, 2008). Cuando se dice que la mutación genética tiene efectos en *cis*, se entiende que la mutación afecta a una región no codificante del DNA, pero que tiene importancia en la organización de la cromatina y, por tanto, en la transcripción de uno o varios genes. Ejemplos típicos de estas enfermedades son las talasemias, que se deben a mutaciones en la región de control que regula la organización de la cromatina de los genes de las globinas (Zoghbi y Beaudet, 2006). Finalmente, se dan casos de enfermedades causadas por un defecto genético que afecta a un proceso complejo en el que intervienen modificaciones epigenéticas. Esas enfermedades se encuentran en el límite de las que se pueden considerar enfermedades epigenéticas. Un caso de estas enfermedades complejas, con implicaciones epigenéticas, es el de la ataxia-telangiectasia, que se ofrece más adelante como ejemplo.

De la misma manera que se puede hablar con toda propiedad de enfermedades epigenéticas, desde hace algunos años se ha comenzado a hablar de *terapia epigenética*, término acuñado por Baylin y Jones (2006). Si muchas enfermedades epigenéticas tienen como causa una aberrante metilación del DNA o una modificación errónea de histonas, un medicamento que corrigiera esos defectos moleculares podría llamarse legítimamente un *medicamento epigenético*. Hasta ahora se han utilizado fundamentalmente inhibidores de la metilación del DNA y de la desacetilación de histonas, con los que se han llegado a hacer numerosos ensayos clínicos. En el momento de redactar estas líneas hay 20 ensayos clínicos activos que utilizan inhibidores de histona desacetilasas para tratar tumores y policitemia y para eliminar el virus de la inmunodeficiencia humana latente. Otros 20 ensayos clínicos activos están encaminados a reducir la hipermetilación del DNA.<sup>23</sup>

<sup>22</sup> El síndrome de Rett es una enfermedad neurodegenerativa ligada al cromosoma X. Sus primeras manifestaciones en niñas tienen lugar después de los 6 meses de edad y comprenden deficiencia mental severa, ataxia, microcefalia y pérdida progresiva del uso de las manos, que realizan movimientos repetitivos y descontrolados.

<sup>23</sup> Datos tomados de [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) el 24 de agosto de 2009.

## El síndrome de Beckwith-Wiedemann: una enfermedad epigenética típica

### *Manifestaciones clínicas del síndrome de Beckwith-Wiedemann*

El síndrome de Beckwith-Wiedemann constituye un excelente modelo para estudiar la impronta genómica, la existencia de fenotipos discordantes con un único genotipo y las contribuciones genéticas al desarrollo de tumores embrionarios. En 1963 J. Bruce Beckwith en una reunión de la *Western Society for Pediatric Research* celebrada en Los Angeles presentó una comunicación titulada “*Extreme cytomegaly of the adrenal fetal cortex, omphalocele, hyperplasia of kidneys and pancreas, and Leydig-cell hyperplasia: another syndrome?*”, en la que describía un posible nuevo síndrome, con los síntomas característicos del sobrecrecimiento. Un año más tarde, Hans-Rudolph Wiedemann, de forma independiente, describió el mismo síndrome en tres hermanos.<sup>24</sup> Desde entonces, la enfermedad se conoce con el nombre de síndrome de Beckwith-Wiedemann, en honor de sus dos descubridores.

El síndrome de Beckwith-Wiedemann afecta a uno de cada 12.000 nacidos vivos (Cohen, 2005). Los síntomas principales son macroglosia, macrosomia, defectos de la pared abdominal, como el onfalocele, citomegalia de la corteza adrenal, hiperplasia de la células de Leydig, displasia de la médula renal, visceromegalia hiperplástica y hemihiperplasia. Además, se caracteriza por la predisposición al cáncer infantil. Otras anomalías minoritarias asociadas con el síndrome de Beckwith-Wiedemann son hipoglucemia neonatal, nevus flammeus, y alteraciones en la gestación, como el engrosamiento de placenta o cordón umbilical y polihidramnios. Esta última circunstancia está relacionada con la elevada proporción de partos pretérmino en el caso de niños afectados por el síndrome de Beckwith-Wiedemann, así como de la hipertensión frecuentemente padecida por sus madres durante la gestación (Wangler *et al.*, 2005). Los pacientes del síndrome de Beckwith-Wiedemann que llegan a la edad adulta siguen teniendo un elevado riesgo de cáncer, pero además, a veces, se ponen de manifiesto otras alteraciones, como disfunción testicular (Greer *et al.*, 2008).

La predisposición a los tumores merece un comentario adicional. Aunque los datos varían mucho de unos autores a otros (véase, por ejemplo, la revisión de Rump *et al.*, 2005), se acepta que el 7,5% de los enfermos contraen algún tipo de tumor (Cohen, 2005), si bien el riesgo es muy diferente según el subgrupo molecular en el que se encuadre la enfermedad, como se discutirá más adelante. Tras un estudio exhaustivo, Lapunzina (2005) concluyó que de un total de 115 tumores malignos detectados en enfermos del síndrome de Beckwith-Wiedemann, el mayoritario era el tumor de Wilms (43%), seguido del hepatoblastoma (20%) y, a más distancia, del carcinoma adrenocortical, rabdomiosarcoma y neuroblastoma. El carcinoma adrenocortical es raro en la población normal, con una prevalencia estimada de 4-12 por millón, pero entre los enfermos del síndrome de Beckwith-Wiedemann es significativamente mucho más abundante (Soon *et al.*, 2008). Entre los tumores benignos se encuentran fundamentalmente quistes y adenomas de glándulas adrenales, pólipos de vejiga y fibroadenoma de mama (Lapunzina, 2005).

### *Etiología molecular*

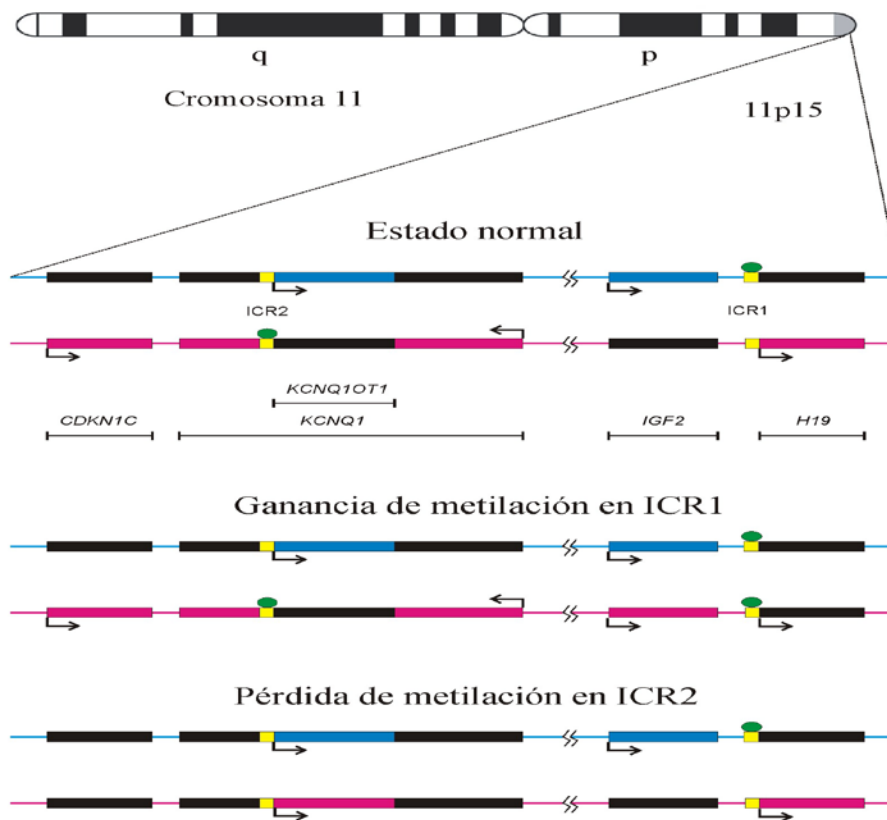
Los síntomas del síndrome de Beckwith-Wiedemann que se han mencionado no se presentan en todos los individuos afectados. Es más, mientras que algunos fallecen en el periodo perinatal, otros llegan a la edad adulta. Esta variabilidad fenotípica sugiere que se trata de una enfermedad compleja desde un punto de vista genético, suposición confirmada por la existencia de casos de gemelos monozigóticos discordantes (Cohen, 2005). Los primeros estudios genético-moleculares del grupo de Weksberg permitieron concluir que el síndrome de Beckwith-Wiedemann es un desorden multigénico causado por alteraciones en los genes reguladores del crecimiento localizados en el cromosoma 11p15 (Li *et al.*, 1998). Pero las alteraciones moleculares en 11p15 se han observado sólo en un 75-80% de los individuos afectados, por lo que se puede concluir que otros *loci* genómicos están también implicados en la etiología del síndrome (Bliet *et al.*, 2009).

La figura 2 muestra un mapa esquemático del cromosoma 11p15, en el que se incluyen sólo los genes relacionados con el síndrome de Beckwith-Wiedemann.<sup>25</sup> Yendo desde el centrómero hacia el telómero, el primer gen que interesa considerar es *CDKN1C*, también conocido como *p57<sup>KIP2</sup>*, que codifica un inhibidor de una quinasa dependiente de ciclinas. La acción de la proteína codificada es, por tanto, de inhibidor del

<sup>25</sup> Tanto el mapa, como la descripción que sigue, se basa en los datos recogidos en las revisiones de Lucifero *et al.* (2004), Weksberg *et al.* (2005;2009) y Feinberg (2007).

crecimiento y, en este sentido, se puede decir que *CDKN1C* es un gen supresor de tumores. El siguiente gen, *KCNQ1*, codifica una subunidad de una canal de potasio regulado por voltaje; se transcribe en el sentido telómero-centrómtero. *KCNQ1OT1* se encuentra en el interior de *KCNQ1* y se transcribe en sentido contrario (hacia el telómero). Su promotor se encuentra situado en un intrón de *KCNQ1* y el gen codifica un RNA no traducible, antisentido del mRNA de *KCNQ1*, con lo que su expresión anula la aparición del producto de *KCNQ1*. Todos estos genes, junto con otros que no son relevantes para entender la etiología molecular del síndrome de Beckwith-Wiedemann, constituyen el dominio 2 de 11p15. Este dominio posee una ICR en el extremo 5' del gen *KCNQ1OT1*.

El dominio 1, situado en el extremo telomérico del *locus*, contiene dos genes relevantes para el síndrome de Beckwith-Wiedemann. El gen *IGF2* codifica un factor de crecimiento fetal relacionado con la insulina y el gen *H19*, situado en el extremo distal del *locus*, codifica un ncRNA que puede actuar como supresor de tumores, puesto que regula la traducción del mensajero de *IGF2*. Además, en 3' de *H19* se encuentran elementos potenciadores requeridos para la expresión de *IGF2*. La expresión de los genes *IGF2* y *H19* está regulada de forma coordinada por la ICR del dominio, situada justo en 5' de *H19*. Esta ICR, en adelante llamada ICR1, es simultáneamente el sitio de unión de CTCF, una proteína aisladora que impide la intercomunicación de *IGF2* con sus elementos potenciadores. Cuando ICR1 no está metilada se transcribe el gen *H19*, pero al unirse CTCF, el gen *IGF2* permanece silente. Por el contrario, si ICR1 está metilada no se transcribe *H19*, ya que las proteínas que reconocen metilcitosina reclutan histona desacetilasas. Pero a la ICR1 metilada no puede unirse CTCF, con lo que se establece la comunicación entre *IGF2* y sus potenciadores y este gen se transcribe.

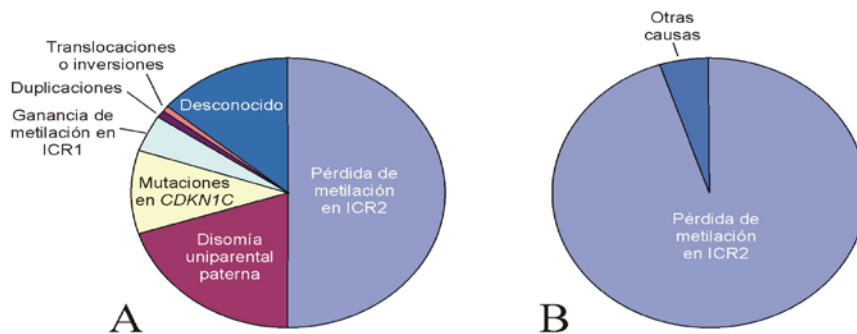


**Figura 2.** Mapa esquemático del cromosoma 11p15 humano. Solo se representan los genes que están relacionados con la aparición del síndrome de Beckwith-Wiedemann. A la izquierda se encuentra el dominio 2, controlado por la región interna de control ICR2, que contiene los genes *CDKN1C*, *KCNQ1OT1* y *KCNQ1*. A la derecha, en la región subtelomérica, se encuentra el dominio 1, controlado por ICR1, con los genes *IGF2* y *H19*. Arriba se representa el estado normal del locus en los cromosomas paterno (superior) y materno (inferior). Los genes expresados aparecen coloreados, de azul o rosa, mientras que en negro se representan los genes que no se expresan. Más abajo se recoge el estado del locus en dos situaciones patológicas que conducen a la aparición del síndrome. En todos los casos, las ICR se representan en amarillo y las elipses verdes sobre ellas denotan la metilación del DNA en ellas. Las flechas acodadas en los genes expresados indican el inicio y la dirección de la transcripción.

Como se aprecia también en la figura 2, en la copia paterna del *locus* se encuentra metilada la ICR1, mientras que la ICR2 lo está en la copia materna. Como consecuencia de esta impronta, en el dominio 1 se expresa el alelo materno de *H19*. Por otro lado, al estar metilada ICR1 en la copia paterna, la proteína CTCF no se une a esa secuencia y los elementos potenciadores 3' pueden actuar, con la consiguiente expresión del alelo paterno de *IGF2*. La presencia simultánea del regulador, producto de *H19*, controla la expresión del factor de crecimiento IGF2, lo que asegura, en situaciones normales, un crecimiento controlado durante el desarrollo fetal y neonatal.

La ICR2, por el contrario, está normalmente metilada en la copia materna y desmetilada en la paterna. Para comprender el alcance de esta impronta, hay que tener en cuenta que ICR2 se encuentra en el promotor de *KCNQ1OT1*, por lo que al estar desmetilada el gen se transcribe y el ncRNA producido anula la expresión del gen *KCNQ1*, pero también la de los genes situados inmediatamente aguas arriba en este dominio (Arnaud y Feil, 2005). En consecuencia, de los genes *KCNQ1* y *CDKN1C* sólo se expresa el alelo materno.

Como recoge la figura 3A, en el 50% de los pacientes del síndrome de Beckwith-Wiedemann se da una pérdida esporádica de metilación en ICR2 (Weksberg *et al.*, 2009), lo que da lugar a la ausencia total de *KCNQ1* y *CDKN1C* (Fig. 2). La desaparición de esta última proteína, que como se ha dicho antes actúa como inhibidora del crecimiento, es la causante de los síntomas de sobrecrecimiento, como la macroglosia y el onfalocelo; produce también un cierto riesgo, ordinariamente bajo, de tumoración, y no aparece el tumor de Wilms. Otro defecto epigenético de la impronta es la adquisición de metilación en la ICR1 materna, que se da entre el 2 y el 7% de los pacientes del síndrome (Fig. 3A). En este caso, se expresan tanto el alelo materno como el paterno de *IGF2* y la ausencia simultánea del regulador producido por *H19* conduce a la presencia de una cantidad extra de IGF2 (Fig. 2). Por este motivo, los individuos que presentan este defecto epigenético tienen un riesgo muy elevado de padecer un tumor pediátrico, especialmente el de Wilms.



**Figura 3.** Causas moleculares del síndrome de Beckwith-Wiedemann (A) Individuos concebidos por fecundación natural. (B) Individuos concebidos mediante técnicas de reproducción asistida.

Antes se ha comentado que el síndrome de Beckwith-Wiedemann tiene varias causas. Además de las de origen epigenético que se acaban de apuntar y que dan cuenta de la mayoría de los casos, aproximadamente en un 20% de los pacientes (Fig. 3A) se ha encontrado una alteración cromosómica, una disomía uniparental paterna que afecta a la región 11p15.5 (Cooper *et al.*, 2005). Aunque en estos pacientes se transcribe el alelo materno de *H19*, la presencia de las dos copias paternas activas de IGF2 (Fig. 2) provoca también un elevado riesgo de tumores.

Además de los errores de metilación y de las alteraciones cromosómicas, en un 10% aproximadamente de los casos la etiología del síndrome de Beckwith-Wiedemann es una mutación en el gen *CDKN1C* que conduce a la ausencia de un producto funcional (Fig. 3A). Estos enfermos desarrollan, pues, síntomas parecidos a los de la pérdida de metilación en ICR2 (Fig. 2), aunque la frecuencia de desarrollos neoplásicos es considerablemente menor. Presentan también la diferencia evidente de que suelen presentar una historia familiar debido al componente genético. Finalmente, en una proporción mínima de enfermos los defectos observados en el cromosoma 11p15.5 se deben a duplicaciones, translocaciones o

inversiones. El restante 13-15% de casos de etiología desconocida hasta el momento se debe seguramente a la ya mencionada implicación de otros *loci* genómicos que se acaba de describir (Bliet *et al.*, 2009).

En resumen, el síndrome de Beckwith-Wiedemann es una enfermedad de etiología heterogénea, aunque mayoritariamente afecte a la expresión de un conjunto reducido de genes. La implicación mayoritaria de alteraciones en la impronta genómica permite que habitualmente se clasifique dentro de las enfermedades epigenéticas. De hecho, su estudio ha permitido notables avances en la comprensión de los mecanismos involucrados en la impronta genómica.

### *El síndrome de Beckwith-Wiedemann y la reproducción asistida*

Además de servir de modelo para la investigación de mecanismos epigenéticos, el estudio del síndrome de Beckwith-Wiedemann ha permitido profundizar en aspectos de la reprogramación epigenética en las etapas iniciales del desarrollo embrionario al establecer una conexión entre su manipulación y las variaciones en la impronta genómica.

En 2002 se publicó el primer estudio clínico que sugería la existencia de una conexión entre las técnicas de reproducción asistida y un síndrome causado por defectos en la impronta genómica, concretamente el síndrome de Angelman<sup>26</sup> (Cox *et al.*, 2002). Un año más tarde se planteó la misma sugerencia en relación al síndrome de Beckwith-Wiedemann (DeBaun *et al.*, 2003; Gicquel *et al.*, 2003; Maher *et al.*, 2003). Como se trata, sin duda, de una cuestión de hondo interés científico y social, puesto que entre el 1 y el 3% de los nacimientos en países desarrollados se produce actualmente tras el empleo de técnicas de reproducción asistida, se ha investigado profusamente en los años transcurridos desde entonces y el tema ha sido objeto de numerosas revisiones (Allen y Reardon, 2005; Amor y Halliday, 2008; Arnaud y Feil, 2005; Hazout *et al.*, 2008; Lucifero *et al.*, 2004; Maher, 2005; Manipalviratn, 2009; Paoloni-Giacobino, 2007; Shiota y Yamada, 2005; Weksberg, 2005; 2009; Wrenzycki *et al.*, 2005).

Es evidente que una revisión exhaustiva de los resultados obtenidos a lo largo de estos años estaría aquí fuera de lugar, pero vale la pena señalar algunos de los datos publicados. Si bien las sugerencias iniciales publicadas en 2003 sobre la conexión entre el síndrome de Beckwith-Wiedemann y las técnicas de reproducción asistida se habían basado en un número relativamente pequeño de casos, un año más tarde Halliday *et al.* (2004) publicaron un extenso estudio de caso y control en el que compararon 14.894 niños nacidos mediante técnicas de reproducción asistida con 1.316.500 nacidos tras concepción natural. Frente a los 37 casos de síndrome de Beckwith-Wiedemann detectados entre estos últimos (frecuencia del 0,00281%) entre los primeros encontraron 4 casos (0,0269%), una proporción 9 veces superior a la de la población general. En general, se han descrito tres estudios de cohorte entre 2005 y 2007. En dos de ellos no se detectó ningún caso de síndrome de Beckwith-Wiedemann entre 6.052 y 16.280 niños nacidos tras fecundación asistida, mientras que en el tercero se detectó un caso entre 1.524 nacidos. Por el contrario, en los 7 estudios realizados entre 2003 y 2007 entre pacientes del síndrome de Beckwith-Wiedemann se ha encontrado que entre el 2,9 y el 10,8% fueron concebidos mediante técnicas de reproducción asistida (véase la revisión de Manipalviratn *et al.*, 2009). Parece claro, pues, que hay una correlación entre la utilización de técnicas de reproducción asistida y la aparición del síndrome de Beckwith-Wiedemann.

En los casos en que se ha estudiado, se detecta que la mayoría de los defectos moleculares que presentan los niños nacidos con síndrome de Beckwith-Wiedemann tras fecundación asistida corresponden a pérdida de la impronta en la ICR2, igual que ocurre en la mayoría de los casos esporádicos pero, como se recoge en la figura 3B, con una frecuencia mucho mayor, que llega a encontrarse en torno al 95% (Weksberg *et al.*, 2009). De hecho, la reciente detección de los niveles de metilación del DNA, por secuenciación tras tratamiento con bisulfito, en 25 pacientes del síndrome de Beckwith-Wiedemann concebidos por fecundación asistida ha revelado que 24 de ellos presentan pérdida de impronta en ICR2. No obstante, el fenotipo de esos pacientes es algo diferente del de los que tienen hipometilada la ICR2 tras concepción natural. Este diferente fenotipo está asociado a una metilación diferencial en otros *loci*, que ocurre con más frecuencia en los niños concebidos por técnicas de reproducción asistida (Lim *et al.*, 2009).

<sup>26</sup> El síndrome de Angelman es un desorden neurológico que provoca retraso mental, ataxia, y muy frecuentemente microcefalia, convulsiones, hiperactividad y risa incontrolada.



Surge inmediatamente la pregunta sobre cuál puede ser la causa de la mayor frecuencia de errores de impronta en los nacidos mediante técnicas de reproducción asistida. Éstas implican la manipulación de múltiples procesos relacionados con la concepción, desde la estimulación hormonal de la producción de gametos hasta la transferencia de embriones al útero, pasando por la maduración de oocitos *in vitro*, la utilización de espermatozoides inmaduros, la inyección intracitoplásmica de espermatozoides, el cultivo *in vitro* de los embriones y la criopreservación de gametos o de embriones. Los resultados experimentales, mayoritariamente obtenidos con modelos animales por razones éticas, han puesto de manifiesto que en prácticamente todas las etapas de las técnicas de reproducción asistida pueden producirse alteraciones en la metilación del DNA. Se han observado, por ejemplo, defectos en la metilación en embriones cultivados *in vitro*, frecuentemente en dependencia del medio de cultivo. Concretamente, en embriones de ratón, la expresión del gen *H19*, sujeto a impronta igual que en humanos, depende del medio de cultivo de los embriones. También se ha observado una relación entre la superovulación inducida hormonalmente, la maduración *in vitro* de oocitos, la inyección intracitoplásmica de esperma y el estado de la impronta que afecta al gen *H19* (Manavalviratn *et al.*, 2009).

Se han propuesto varias posibles causas moleculares de esas diferencias. Por ejemplo, el cultivo *in vitro* de embriones puede afectar la expresión de las DNA metiltransferasas o su migración al núcleo (Thompson y Williams, 2005). También puede ocurrir que la alteración de la duración del ciclo celular en los embriones cultivados *in vitro* interfiera con la normal reprogramación epigenética, o que el DNA se desmetile espontáneamente durante el cultivo (De Rycke *et al.*, 2002). Finalmente, se ha postulado también que la concentración de metionina en el medio de cultivo de los embriones puede ser crítica (Niemitz y Feinberg, 2004).

Por último, cabe mencionar que se han propuesto varias posibilidades por las que la inyección intracitoplásmica de esperma puede producir defectos en la concepción (Allen *et al.*, 2005). De todos modos, hay que resaltar que, a pesar de que algunos datos iniciales, obtenidos al estudiar el síndrome de Angelman, parecían indicar una mayor frecuencia de defectos asociada al empleo de la inyección intracitoplásmica de esperma, no se ha demostrado que esta técnica de reproducción asistida tenga una influencia diferencial en la aparición del síndrome de Beckwith-Wiedemann (Paoloni-Giacobino, 2007).

#### *Tratamiento del síndrome de Beckwith-Wiedemann*

El tratamiento del síndrome de Beckwith-Wiedemann ordinariamente implica las atenciones médicas y quirúrgicas para el mantenimiento de los pacientes. En algunos casos se recomienda la cirugía para corregir el onfalocele o, cuando se presentan serias dificultades de respiración, apnea del sueño, etc., derivados de la macroglosia, se aconseja la glosoplastia (Narea-Matamala *et al.*, 2008), que también evita la aparición posterior de complicaciones maxilofaciales. Es importante el diagnóstico temprano, a ser posible prenatal, para que desde una perspectiva multidisciplinar se puedan abordar los diversos problemas que aparecen en el periodo neonatal. Por ejemplo, si no se corrigiera a tiempo, la hipoglucemia severa que puede presentarse en los primeros días de vida, provocaría daños neurológicos. El diagnóstico prenatal se suele hacer tras la detección ecográfica de macrosomia, macroglosia y onfalocele. Recientemente se ha discutido la validez del onfalocele aislado como criterio de diagnóstico prenatal (Wilkins-Haug *et al.*, 2009).

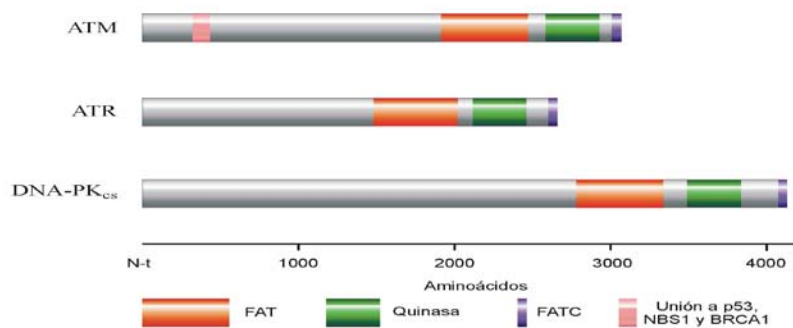
Los métodos de diagnóstico neonatal se han discutido ampliamente en la literatura especializada y sería superfluo recogerlos aquí. Una vez diagnosticado el síndrome y corregidas las anomalías que se dan en el período neonatal, es precisa una vigilancia continua para prevenir la aparición de desarrollos neoplásicos. Aunque los protocolos varían de unos centros a otros, siempre se emplean técnicas de diagnóstico por imagen y detección de alfa fetoproteína (Weksberg, 2009). Superados los primeros años de vida, normalmente el pronóstico es bueno y no se requiere un tratamiento especial, salvo los habituales controles para prevenir la aparición de alteraciones neoplásicas.

## La ataxia-telangiectasia: una enfermedad compleja con un componente epigenético

### Introducción; el descubrimiento del gen ATM

El primer caso que hoy se identificaría como ataxia-telangiectasia se describió hace más de 80 años (Syllaba y Henner, 1926), pero la enfermedad no se caracterizó de una forma concreta hasta unos 30 años más tarde, cuando Boder y Sedgwick (1958) le asignaron el nombre con que actualmente se conoce. El fenotipo clínico estaba ya definido en la década de 1980, aunque su causa molecular no comenzó a comprenderse hasta mediados de la década de 1990. La ataxia-telangiectasia es una enfermedad autosómica recesiva, con una incidencia que inicialmente se estimó en un caso por cada 40.000 nacimientos, cifra que en la actualidad se ha ajustado a aproximadamente a uno de cada 300.000 nacimientos, aunque varía ligeramente de unos países a otros (Bott *et al.*, 2006). Es una enfermedad multisistémica, que se caracteriza fundamentalmente por la aparición temprana de síntomas neurológicos, como una ataxia progresiva, que irremediamente conduce a la pérdida de la capacidad motora en la adolescencia. Es también característica la manifestación temprana de telangiectasia oculocutánea. Tanto la ataxia cerebelar como la telangiectasia permiten habitualmente diagnosticar la enfermedad antes de los tres años de edad. Pero aparte de estas manifestaciones, que dan nombre a la enfermedad, aparecen más tardíamente síndromes extra-piramidales, neuropatías periféricas y otras anomalías, aparentemente no relacionadas, como una elevada susceptibilidad a enfermedades bronquiopulmonares, y a tumores, especialmente linfoides, pero también de mama. Estas dos últimas consecuencias de la enfermedad son de interés, puesto que la principal causa de muerte entre los pacientes de ataxia-telangiectasia es la insuficiencia respiratoria y la segunda viene representada por los tumores (Bott *et al.*, 2006). Además, suelen presentarse otras anomalías como radiosensibilidad, apraxia ocular y diabetes resistente a insulina (Lavin, 2008). Las pruebas de laboratorio ponen también de manifiesto la elevación del nivel de  $\alpha$ -fetoproteína, inmunodeficiencia asociada a la disminución de IgA, IgE e IgG2, acortamiento de telómeros e inestabilidad cromosómica (Ball y Xiao, 2005).

Las autopsias realizadas pusieron de manifiesto, a partir de 1994, la presencia de atrofia cerebelar en los enfermos de ataxia-telangiectasia. Aunque varios de los síntomas fenotípicos están relacionados con la degeneración cerebelar, durante bastante tiempo el amplio abanico de manifestaciones clínicas de la enfermedad supuso un reto importante a los investigadores. Y es precisamente a mediados de la década de 1990 cuando, como se ha apuntado antes, comienzan a conocerse las causas de la ataxia-telangiectasia. En realidad, 10 años antes se había producido un importante hallazgo: en pacientes de la enfermedad se daba una deficiente reparación de las roturas producidas en el DNA (Cornforth y Bedford, 1985). Pero fue en 1995 cuando se consiguió clonar el gen responsable de la ataxia-telangiectasia (Savitsky *et al.*, 1995), del que sólo se sabía que estaba localizado en el cromosoma 11q (Gatti *et al.*, 1988). Teniendo en cuenta que la enfermedad se produce por mutaciones en él, el gen se conoce con las siglas *ATM*, *ataxia telangiectasia mutated*. *ATM* codifica una proteína quinasa relacionada con la PI3 quinasa quinasa (Savitsky *et al.*, 1995), lo que ha permitido encajarla dentro de la familia PIKK. *ATM* es una proteína grande, de 3056 aminoácidos (Figura 4). El dominio catalítico se encuentra en su región C-terminal. Abarca unos 300 aminoácidos, como en todas las quinasas de la familia de las PIKK. Los sustratos, además de interaccionar con el centro activo, se unen también a un dominio, situado en el extremo N-terminal, que se denomina SBS (*substrate binding site*). Se trata de un dominio esencial, puesto que su delección inactiva la proteína *ATM*. En la zona central de la proteína se encuentra un dominio, denominado FAT por las iniciales de las proteínas en que se ha descrito (FRAPP-*ATM*-TRRAP) y en el extremo C-terminal hay un dominio FATC, común a las proteínas que poseen en dominio FAT. Este dominio tiene interés porque en él se encuentra la lisina 3016, que puede ser acetilada por la histona acetiltransferasa Tip60 (Sun *et al.*, 2007). Además de esta modificación covalente, *ATM* puede autofosforilarse en tres residuos de serina. Todas estas modificaciones son importantes, puesto que modulan la actividad de *ATM*. Finalmente, *ATM* contiene una cremallera de leucina (McKinnon, 2004; Lavin, 2008).



**Figura 4.** Esquema de la estructura de quinasas de la familia PIKK. Se representan las quinasas implicadas en la reparación del DNA: ATM, ATR y DNA-PCcs. La numeración de los residuos contados a partir del extremo N-terminal se recoge en la escala. Los diferentes dominios compartidos se indican en la parte inferior.

En 1998 se identificó la proteína supresora de tumores p53 como el primer sustrato de la quinasa ATM<sup>27</sup> y desde entonces se han encontrado muchos sustratos de esa quinasa, muchos de los cuales son también reguladores del ciclo celular (McKinnon, 2004). Merece la pena destacar que una variante de la histona H2A, la denominada H2AX, es también un sustrato de la actividad quinasa de ATM. Más aún, la fosforilación tiene lugar en respuesta a dobles roturas en el DNA (Burma *et al.*, 2001). Este hecho dio la pista definitiva para entender la función de la quinasa ATM y, en consecuencia, del papel de su mutación en el desarrollo de la ataxia-telangiectasia. Puesto que ese papel se centra fundamentalmente en la reparación de las roturas dobles del DNA, como las que se producen por efecto de la radiación ionizante, en las líneas siguientes se pasará revista a los mecanismos de reparación del DNA.

### La reparación del DNA

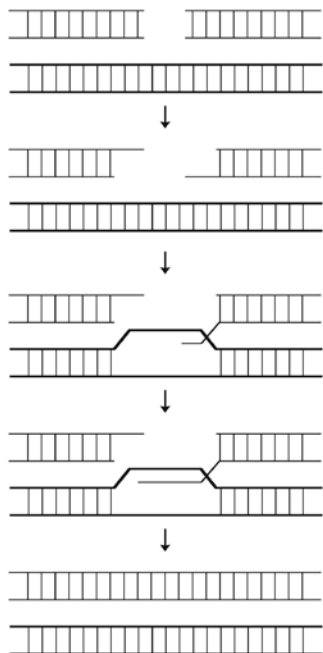
Dado su papel de portador de la información genética, el mantenimiento de la integridad estructural del DNA es esencial para la supervivencia de las especies. No es extraño, pues, que los organismos posean numerosos mecanismos de defensa ante los ataques que, por efecto de diversos agentes, pueda sufrir el DNA. En general, esos mecanismos se pueden agrupar en dos grandes tipos: los que reparan el daño sufrido y los que impiden la progresión del ciclo celular hasta que la reparación se haya efectuado o, en caso negativo, conducen a la apoptosis de la célula. La proteína quinasa ATM está implicada en los mecanismos de reparación, por lo que la breve revisión contenida en este apartado se centra en esos mecanismos.

Se calcula que diariamente se producen decenas de miles de roturas simples en el DNA humano debidos mayoritariamente a la acción de las especies reactivas del oxígeno. Con una frecuencia mucho menor, se producen roturas dobles, pero éstas son mucho más perjudiciales, ya que pueden producir reorganización cromosómica, senescencia, muerte celular o tumores (Czornak *et al.*, 2008). En los mamíferos existen dos formas principales de reparar las roturas dobles: la reparación por recombinación homóloga (HR) y la reparación por unión no homóloga de extremos (NHEJ, *nonhomologous end joining*). HR utiliza una hebra homóloga no dañada de DNA de la cromátida hermana como molde para una DNA polimerasa, con lo que la hebra dañada se repara con total fidelidad. Evidentemente, este sistema de reparación sólo es posible una vez que el DNA se ha replicado, es decir, está limitado a las fases S tardía o G<sub>2</sub> del ciclo celular.

En la figura 5 se esquematiza el proceso de HR. Una vez que se ha producido un corte en ambas cadenas del DNA, la cromátida dañada se empareja homológamente con la hermana. Se eliminan algunos nucleótidos de los extremos 3' a ambos lados de la rotura, lo que genera extremos protuberantes. Se abre la doble hélice de la cromátida intacta y los extremos protuberantes se aparean con la cadena

<sup>27</sup> Este y otros detalles históricos sobre la función de ATM se pueden encontrar en la revisión de Lavin (2008)

complementaria de la cromátida intacta. La DNA polimerasa extiende estos extremos utilizando como molde la cadena intacta y, finalmente, la DNA ligasa sella la mella final. El proceso se repite para ambas cadenas dañadas, con lo que, al final, los nucleótidos perdidos como consecuencia de la rotura se han restablecido y el DNA dañado recupera su secuencia original. Por el contrario, NHEJ puede operar en todas las fases del ciclo celular y se limita a ligar, sin necesidad de una hebra molde, extremos del DNA roto que, con frecuencia, no son compatibles (McKinnon y Caldecott, 2007). En consecuencia, la ruta NHEJ de reparación es esencialmente mutagénica (Williams *et al.*, 2007).



**Figura 5.** Esquema de la reparación del DNA por recombinación homóloga. El DNA de la cromátida dañada se representa con líneas de trazo fino, mientras que el de la cromátida hermana aparece con trazo grueso. Sólo se representan los procesos que ocurren en el DNA y no aparecen las proteínas que intervienen en la reparación. Véase el texto para más detalles.

En el esquema de la figura 5 se recogen tan sólo los acontecimientos que tienen lugar en el DNA. Pero los mecanismos de reparación son extremadamente complejos. El hecho de que se hayan identificado más de 700 proteínas implicadas en ellos a través de recientes análisis proteómicos (Matsuoka *et al.*, 2007) da una idea inicial de esa complejidad. Sin hacer un desarrollo exhaustivo, que estaría fuera de lugar, en las líneas siguientes se comenta la participación de algunas de esas proteínas.

Todos los mecanismos de reparación requieren la acción de una proteína quinasa de la familia PIKK. La ruta NHEJ utiliza fundamentalmente una proteína quinasa dependiente de DNA, conocida como DNA-PK<sub>cs</sub>,<sup>28</sup> mientras que ATM y una tercera quinasa relacionada, ATR (*ataxia telangiectasia* y *Rad3-related*), participan tanto en el mecanismo HR como en el NHEJ. La asociación de ATM con la reparación de roturas dobles explica el hecho de que en los años 60 se pusiera de manifiesto que los enfermos de ataxia-telangiectasia eran hipersensibles a las radiaciones ionizantes (por ejemplo, rayos X y rayos g) y con que algo más tarde se comprobara que esa sensibilidad se mantenía en las células aisladas de pacientes (Lavin, 2008), ya que ambos tipos de radiaciones producen roturas dobles en el DNA. En la figura 4 se puede observar la homología entre estas proteínas quinasa, que catalizan la fosforilación de una amplia gama de proteínas. De esta forma se inicia la ruta de transducción de la señal de daño en el DNA que conduce a la detención del ciclo celular, a la iniciación de la reparación del DNA y, si ésta no es posible, a la muerte programada de la célula (Abraham, 2003).

En el mecanismo HR, el más complejo de los sistemas de reparación, uno de los sustratos de ATM es MRN (MRE11-RAD50-NBS1), un complejo muy conservado que actúa no sólo en la reparación del DNA, sino también en el mantenimiento de los telómeros y de la integridad cromosomal. El complejo MRN es esencial para la supervivencia de los mamíferos; la pérdida de cualquiera de los genes que codifican sus proteínas resulta letal en ratones y, en humanos, mutaciones en esos genes conducen a otras enfermedades raras, como el síndrome de Nijmegen, muy relacionadas sintomáticamente con la ataxia-telangiectasia (Czornak *et al.*, 2008). MRE11 es una proteína de peso molecular 81.000, que posee

<sup>28</sup> Las siglas hacen referencia a la denominación inglesa *DNA-protein kinase catalytic subunit*. Ordinariamente, estas quinasa se presentan asociadas a otras proteínas no enzimáticas. De ahí la precisión *catalytic subunit*.

actividad de fosfodiesterasa en el extremo N-terminal, capaz de actuar como exonucleasa 3'-5', y dos dominios de unión a DNA, uno en el centro y otro en la región C-terminal. NBS1 es una proteína de 95 kDa, con tres regiones funcionales. En la región N-terminal tiene dominios que pueden interactuar con la histona H2AX fosforilada y en la región C-terminal posee un dominio capaz de interactuar con ATM (Kobayashi *et al.*, 2002). La actividad de NBS1 también se regula por modificación covalente. En su estado acetilado es inactiva, mientras que cuando se desacetila por acción de la histona desacetilasa SIRT1, adquiere la capacidad de ser sustrato de ATM. La forma fosforilada de NBS1 puede a su vez parar la progresión del ciclo celular y activar ATM (Yuan y Seto, 2007), con lo que se genera un bucle de activación que favorece el reclutamiento de la maquinaria requerida para la reparación del DNA. Por su parte, RAD50 es una molécula de la familia SMC (*structural maintenance of chromosomes*). En el centro posee un motivo Cys-X-X-Cys, que actúa como un gancho de zinc y permite, a modo de bisagra, que la molécula adopte forma de V. En ambos extremos, N- y C-terminal existen unos motivos con actividad de ATPasa, unidos al motivo Cys-X-X-Cys a través de dos largos dominios en los que hay dos hélices enrolladas sobre sí mismas (Williams *et al.*, 2007). En el estado basal, RAD50 y MRE11 forman en general un complejo parcial y se encuentran como un heterotetrámero, formado por dos moléculas de cada componente. Este complejo parcial adopta una estructura bipartita, con una cabeza globular, formada por MRE11 y los dominios ATPasa de RAD50, mientras que la V formada por los dominios helicoidales se proyecta fuera de la región globular (Hopfner *et al.*, 2002).

Se admite que precisamente el complejo MRN, al menos en su forma parcial, junto con la proteína de replicación A (RPA)<sup>29</sup> son las entidades encargadas de detectar las roturas dobles en el DNA, ya que, aunque el papel de la quinasa ATM es extremadamente importante, los componentes de MRN pueden unirse a las regiones rotas del DNA sin la participación de ATM (Lavin, 2007). De todas formas, todos los procesos ocurren de un modo extremadamente rápido; ATM, que ya está unida en parte a la cromatina aún en ausencia de daño en el DNA (Kim *et al.*, 2008), se detecta en los lugares de rotura 60 s después de producirse ésta (Czornak *et al.*, 2008), con lo que resulta difícil asegurar el orden secuencial de los acontecimientos. MRE11, a través de sus dominios de unión al DNA, se une a los extremos rotos, con lo cual los otros componentes del complejo MRN se sitúan en la región a reparar. El reclutamiento de ATM implica la inducción de un cambio de conformación, seguido de la autofosforilación de ATM en la serina 1981 y de la disociación de los dímeros inactivos que forma esta proteína en su estado basal, es decir, en células sin roturas dobles de DNA (Czornak *et al.*, 2008). La proteína fosfatasa PP2A coimmunoprecipita con ATM en el estado basal (Goodarzi *et al.*, 2004), lo que dificulta la autofosforilación. Su disociación, concomitante con la monomerización de ATM, hace posible el mantenimiento del estado fosforilado. Parece que estos procesos de disociación están ayudados por la interacción con NBS1 y requieren la acetilación de la lisina 3016 de ATM. No hay consenso total sobre la necesidad de la autofosforilación de serina 1981 para la activación de ATM, pero la idea más extendida es que se trata de un proceso necesario (Iijima *et al.*, 2008).

La actividad quinasa de ATM continúa su propia autofosforilación en las serinas 367 y 1893 (Kozlov *et al.*, 2006), así como la modificación de otros sustratos, como p53, con la consiguiente parada del ciclo celular. Pero no puede olvidarse que todas estas reacciones no ocurren en el DNA desnudo, sino que transcurren en un contexto de estructura de cromatina. Precisamente, uno de los sustratos claves de la actividad quinasa de ATM es, como se ha comentado anteriormente, la variante de histona H2AX, que se fosforila en la serina C-terminal. No obstante, recientemente se ha comprobado que otras quinasas, como DNA-PK<sub>cs</sub>, son también capaces de fosforilar H2AX de una forma específica de tejido (Koike *et al.*, 2008a; 2008b). La forma fosforilada de H2AX, que se conoce como gH2AX, aparece a lo largo de más de una megabase en torno al sitio de rotura en cuestión de segundos (Rogakou *et al.*, 1998). La función de gH2AX es esencial para que se reparen adecuadamente las roturas del DNA, puesto que ratones H2AX<sup>-/-</sup> muestran una deficiente reparación, con la consiguiente inestabilidad genómica (Zha *et al.*, 2008) y sus timocitos presentan abundantes aberraciones cromosómicas (Bassing *et al.*, 2003). Los ratones que carecen simultáneamente de H2AX y ATM mueren en la etapa embrionaria (Zha *et al.*, 2008).

La fosforilación de H2AX no es la única modificación de histonas relacionada con la rotura del DNA, puesto que recientemente se ha descrito que las radiaciones ionizantes inducen un incremento en la acetilación de la lisina 14 de H3 (Kim *et al.*, 2008). Por otro lado, la interacción de ATM con la cromatina, tanto antes como después de la rotura del DNA, está modulada por la proteína no histona HMGN1

<sup>29</sup> RPA es la principal proteína SSB (*single strand binding*) que actúa también en la replicación y en la recombinación, gracias a su selectiva unión al DNA monocatenario.

(Gerlitz y Bustin, 2009). Esta proteína pertenece a la subfamilia HMG capaz de interactuar con nucleosomas y es típica su presencia en regiones de cromatina activa (Bustin *et al.*, 1995). Como no se observa acumulación de HMGN1 en las zonas de rotura, lo más probable es que esa proteína no histona participe en la distribución de ATM en la totalidad del núcleo (Kim *et al.*, 2008). La pérdida de HMGN1 o la anulación de su capacidad de unirse a los nucleosomas reduce la actividad quinasa de ATM y, por otro lado, el tratamiento con tricostatina A y butirato, inhibidores de la actividad HDAC, hace desaparecer el requerimiento de HMGN1 para la activación de ATM, lo que sugiere que esta proteína no histona afecta la activación de la quinasa regulando los niveles de acetilación de histonas (Kim *et al.*, 2008). El nexo causal entre ambos fenómenos está aún por determinar.

En una línea parecida, otra muestra de la implicación de la estructura de la cromatina en la reparación es la activación observada de la actividad HDAC como efecto de la radiación ionizante. Como consecuencia de los trabajos de Guo *et al.* (2007b), se admite que la activación de ATM, que conduce a la inhibición del complejo Cdk2/Cdc2, provoca finalmente la desfosforilación y consiguiente activación de la proteína fosfatasa PP1c. Esta fosfatasa forma parte de un complejo represor con HDAC1 y pRb, que modula la actividad de varios factores transcripcionales. Al activarse, cataliza la desfosforilación de HDAC1, que queda libre para interactuar con otras proteínas y así modular la actividad transcripcional de diversos genes.

Finalmente, como era de esperar por la multifacética participación de la estructura de la cromatina en la reparación, se ha encontrado una interrelación entre ATM y los componentes del complejo MRN, de una parte, y los complejos de remodelación por otra. La cuestión, que ha sido revisada recientemente por Iijima *et al.* (2008), ha cobrado interés con el descubrimiento de que la deficiencia en complejos de remodelación de cromatina produce hipersensibilidad a agentes genotóxicos (Vissers *et al.*, 2008). En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* interviene el complejo RSC, que aparece asociado a los sitios de rotura del DNA por su capacidad de interactuar con MRE11. A su vez, la ATPasa de RSC es necesaria para el ensamblaje de la maquinaria de reparación en los sitios de rotura. Posiblemente, la estructura nucleosomal impide este ensamblaje, toda vez que, como se ha apuntado anteriormente, son muy numerosos los factores proteicos que intervienen.

La remodelación de la cromatina asociada a la reparación también se ha documentado recientemente en mamíferos, en los que se da también una extensa ubicuitinación de la histona H2A durante la reparación. Incluso se ha descrito la existencia de una cooperación entre la acetilación de H2AX y la ubicuitinación de esta variante para hacer posibles los cambios estructurales que de experimentar la cromatina durante el proceso de reparación (Ikura *et al.*, 2007). Pero a pesar de todos los datos mencionados, que ponen de manifiesto el trascendental papel de gH2AX, su función exacta no se conoce aún. Hay consenso en que funciona acumulando en el lugar preciso, más que reclutando, las proteínas necesarias para la reparación (Czornak *et al.*, 2008). Entre estas proteínas, además de los componentes del complejo MRN y RPA, se encuentran, entre otras, RAD51, RAD52, RAD54, BRAC1 y BRAC2. La actividad exonucleasa 3' de MRE11 procesa los extremos rotos del DNA dejando una cadena sencilla protuberante, a la que se une RPA. De este modo se impide la acción ulterior de la actividad exonucleasa. RAD51 sustituye entonces a RPA formando un filamento de nucleoproteína al que se unen RAD52 y RAD54, que participan en la interacción con la cromátida hermana. Mientras tanto, el complejo MRN mantiene unidos los extremos rotos del DNA, con la ayuda de las proteínas mencionadas anteriormente, así como de otros factores proteicos, lo que permite la actuación de la DNA polimerasa y de la ligasa que completan el proceso de reparación (Czornak *et al.*, 2008).

La reparación NHEJ es más sencilla. Aunque puede actuar ATM, ya se ha comentado que la actividad quinasa típica de este mecanismo es DNA-PK<sub>cs</sub>, que forma complejo con subunidades no catalíticas como Ku70 y Ku80. También es importante la acción del complejo MRN en el mantenimiento de la proximidad entre los extremos rotos del DNA, lugar donde se reclutan también otras proteínas como XLF y Artemis (Iijima *et al.*, 2008).

En resumen, se puede concluir que los mecanismos de reparación del DNA, absolutamente esenciales para la supervivencia de las células, requieren la actuación de una numerosa cohorte de proteínas, cuya exacta función en muchos casos se desconoce todavía. Aunque en líneas generales la finalidad de tales mecanismos se comprende fácilmente, cuando se analizan a nivel molecular, la complicada interrelación de todos los factores que intervienen hace a veces perder la visión de conjunto. Por utilizar una sencilla

analogía, se podría decir que la disección molecular de los mecanismos de reparación que aquí, aunque sólo esbozada, se ha presentado, equivale a contemplar un gran mosaico con unos potentes binoculares. Sería posible describir con precisión la forma y color de cada una de las teselas, pero se estaría perdiendo la visión de conjunto, no se podría contemplar la belleza de la obra de arte. Y el control de la reparación del DNA es tan complejo como un mosaico que tuviera millares y millares de teselas. Sólo combinando la precisión que da el estudio molecular con las aproximaciones funcionales se podrá llegar, en su momento, a contemplar el conjunto, sin duda bello en su complejidad, de los mecanismos de reparación.

En cualquier caso, es claro que la reparación exige una ruta de señalización que se inicia por una quinasa, ATM en gran parte de los casos, y que tiene su reflejo final en la estructura de la cromatina por la fundamental actuación de gH2AX y por las exigencias que comporta en cuanto a la remodelación de la propia cromatina, sin dejar de lado la participación de enzimas modificadoras de histonas. En este sentido, la ataxia-telangiectasia, originada por una deficiencia en ATM, puede clasificarse como una enfermedad epigenética en el sentido amplio *del término*.

### *Fisiopatología de la ataxia-telangiectasia*

En apartados anteriores se ha visto cómo la ataxia-telangiectasia está provocada por mutaciones en el gen *ATM*. Estas mutaciones, que afectan a cualquier región del gen (Kulkarni y Wilson, 2008), pueden ser de múltiples tipos, como cambios de fase de lectura que conducen a una terminación prematura, errores en el ajuste, mutaciones puntuales que introducen codones de parada, etc. (Lavin *et al.* 2007) y ordinariamente conducen a la aparición de formas truncadas de ATM. En cualquier caso, tienen como consecuencia la ausencia de una quinasa ATM funcional, con lo que la reparación de DNA es defectuosa. En este momento, es pertinente preguntarse: ¿qué relación existe entre este defecto molecular y la aparición de la sintomatología propia de la enfermedad? En algunos casos, la respuesta es inmediata. Es evidente que una deficiente reparación de las roturas dobles del DNA debe provocar hipersensibilidad a las radiaciones ionizantes. Pero en la mayoría de los demás casos, la respuesta no es tan evidente y exige un análisis más detallado, que se esboza en el presente apartado.

Por su especial relevancia, cabe mencionar en primer lugar la principal manifestación de la enfermedad, es decir, el fenotipo neurológico. Como acertadamente han apuntado Shiloh y sus colaboradores (Biton *et al.*, 2008), la mayor parte las investigaciones sobre el papel de ATM en la reparación del DNA a lo largo del ciclo celular —que se han resumido en los apartados anteriores— se han realizado con células en cultivo. Pero en las células postmitóticas, como las neuronas, los mecanismos implicados en el control del ciclo celular pueden ser irrelevantes. Por otro lado, algunos datos sugerían que la localización de ATM en neuronas humanas era mayoritariamente citoplasmática (Oka y Takashima, 1998), lo que arrojaba otra duda sobre la auténtica implicación de la mutación de ATM en la aparición del fenotipo neurológico característico de la ataxia-telangiectasia. Estas razones movieron al grupo de Shiloh a investigar cuidadosamente la cuestión y, como resultado de sus trabajos concluyeron que ATM es realmente una proteína nuclear, y que en células del SNC humano y de ratón la reparación de las roturas dobles del DNA depende de ATM (Dar *et al.*, 2006; Biton *et al.*, 2006; 2007).

No obstante, hay que tener en cuenta que el desarrollo del sistema nervioso tiene lugar a través de ciclos reiterativos de proliferación, diferenciación —que incluye migración— y maduración. En todos estos procesos la reparación del DNA es importante; incluso en las células maduras, que se encuentran permanentemente en G<sub>0</sub>, el estrés oxidativo aumenta el riesgo de roturas dobles en el DNA, que deben repararse habida cuenta de la elevada tasa de transcripción de estas células. Por razones obvias, la reparación por el mecanismo HR está limitada a los ciclos de proliferación, mientras que el mecanismo NHEJ opera a lo largo de todos los ciclos (Katyal y McKinnon, 2007). A la luz de esta consideración, los resultados del grupo de Shiloh que se acaban de apuntar sugieren la posibilidad de que ATM desempeñe un papel importante en los mecanismos NHEJ en las células del SNC.

Pero hay que contemplar aún otra posibilidad. Los mecanismos por los que una célula puede dirigirse a la apoptosis después de sufrir una rotura en su DNA no están del todo claros, aunque algunas observaciones ponen de manifiesto el papel de ATM. Por ejemplo, en ratones *ATM<sup>-/-</sup>* se observa resistencia a la apoptosis inducida por radiaciones ionizantes en diversas regiones del SNC en desarrollo, incluido el cerebelo. La apoptosis dependiente de ATM tiene lugar en embriones de ratón sometidos a irradiación g sólo en las células postmitóticas presentes en la zona subventricular neuroepitelial. Curiosamente, la

deficiencia de ATM no impide la apoptosis inducida por la radiación en células multipotentes presentes en la zona ventricular que está en proliferación. A diferencia de lo que sucede en los normales, en los ratones *ATM*<sup>-/-</sup> la sobreexpresión de p53 coincide con la muerte celular, lo que sugiere que la apoptosis dependiente de ATM en el SNC está mediada por p53. Por otro lado, la autofosforilación de ATM tiene lugar, en respuesta a señales apoptóticas, como el tratamiento con estaurosporina, aún en ausencia de rotura en el DNA (Schou *et al.*, 2008). El conjunto de estas observaciones sugiere que ATM, además de actuar en la reparación, puede funcionar en un mecanismo de control de la apoptosis, que eliminaría las neuronas que han sufrido un daño importante en el DNA (Biton *et al.*, 2008). En resumen, se puede concluir que la idea inicial según la cual el fenotipo neurológico de la ataxia-telangiectasia se origina por la deficiencia de ATM es correcta.

La predisposición a distintos tipos de cáncer entre los pacientes de ataxia-telangiectasia es una obvia consecuencia de la deficiencia de ATM. Como se ha comentado en la sección anterior, las mutaciones en el gen *ATM* pueden conducir a deficiencias en la reparación de DNA y a una notable inestabilidad genómica. La relación entre una deficiente reparación del DNA y el cáncer, admitida sin fisuras en la actualidad, comenzó a establecerse cuando Cleaver observó que fibroblastos aislados de pacientes de *xeroderma pigmentosum*, una enfermedad hereditaria relacionada con el cáncer, presentaban defectos en la reparación del lesiones inducidas en el DNA por irradiación con luz ultravioleta (Cleaver, 1968).

La función múltiple de ATM, que se acaba de esbozar en relación con el papel de su deficiencia en el fenotipo neurodegenerativo de la ataxia-telangiectasia, permite catalogar al gen *ATM* entre los supresores de tumores. Hasta tal punto es así, que una reciente revisión lleva el sugerente título de “Tumorigenesis and neurodegeneration: two sides of the same coin?” (Staropoli, 2008). En ella se considera al gen *ATM* como paradigma de esa función dual, la neurodegeneración y la génesis de tumores. En este sentido, cabe señalar que se ha encontrado una significativa correlación entre el silenciamiento epigenético del gen *ATM* por hipermetilación de su promotor y la aparición de carcinomas de cabeza y cuello (Ai *et al.*, 2004).

La mayoría de los tumores que presentan los pacientes de ataxia telangiectasia son, como se ha comentado antes, hematológicos y de mama. De hecho, desde 2006 se admite que las mutaciones en el gen *ATM* se pueden considerar como marcadores de la predisposición al cáncer de mama (Renwick *et al.*, 2006) y en la actualidad se incluye *ATM*, junto con los genes *CHEK2*, *BRIP1* y *PALB2*, entre aquellos cuya mutación confiere un riesgo intermedio de cáncer de mama (Turnbull y Rahman, 2008) o incluso elevado en función del historial familiar (Byrnes *et al.*, 2008). Otros tipos de cáncer son mucho menos frecuentes en los enfermos de ataxia-telangiectasia. Por ejemplo, hasta la fecha sólo se han descrito 3 casos de carcinoma hepatocelular, con la particularidad de que en el último descrito se ha encontrado en el paciente la sorprendente concentración de alfafetoproteína sérica de 100.000 ng/ml (Patil y Patil, 2009). La relación entre el defecto de ATM y la aparición del resto de las manifestaciones fenotípicas de la enfermedad no es tan evidente como en el caso del cáncer. No obstante, se ha apuntado que la roturas del DNA, con el consiguiente estrés oxidativo asociado a ellas, puede dar cuenta de todas esas manifestaciones (Lavin, 2008).

### *Tratamiento de la ataxia-telangiectasia*

La ataxia-telangiectasia es, hoy por hoy, una enfermedad incurable y no existen tampoco medios para prevenir el desarrollo de la enfermedad. No obstante, es posible aliviar algunos de los síntomas asociados con la inmunodeficiencia y con la alteración de la función bronquiopulmonar, pero hasta ahora no se ha conseguido evitar la predisposición al cáncer ni la neurodegeneración.

Hace 10 años se encontró que el metabolismo de los fosfolípidos en células de pacientes de ataxia-telangiectasia era menos activo que lo normal y que la incorporación de mioinositol en los fosfoinosítidos era bajo (Yorek *et al.*, 1999), lo que hizo sospechar que tanto la alteración de algunas rutas de señalización, como una deficiente biogénesis de membranas podría estar en la base de algunos de los síntomas de la enfermedad. Con esta idea, se inició un ensayo clínico para estudiar los efectos del tratamiento con mioinositol sobre las funciones neurológica e inmune en pacientes de ataxia-telangiectasia. El ensayo tuvo el mérito de ser el primero encaminado al tratamiento de la enfermedad, pero no fue lo suficientemente extenso como para obtener resultados concluyentes.

Posteriormente se han iniciado otros ensayos clínicos, algunos de los cuales están aún en desarrollo. Dos de ellos, están encaminados a investigar la mejora de los síntomas neurológicos de los pacientes de



ataxia-telangiectasia. Uno emplea baclofen, que se administra actualmente para tratar la espasticidad y el otro se propone determinar la eficacia de la amantadina, un fármaco que se usa actualmente para el tratamiento de síndromes extrapiramidales y para aliviar la fatiga que suele acompañar a la esclerosis múltiple.<sup>30</sup> Se han cerrado ya los ensayos encaminados a evaluar la utilidad terapéutica de tratamientos continuados con antioxidantes con el fin de retardar la disfunción de linfocitos y neuronas cerebelares. Aunque estos ensayos, y otros que combinan la administración de antioxidantes con la de inhibidores de la poli(ADP-ribosa) polimerasa, no hayan dado resultados satisfactorios, tienen un interés potencial, discutido por Lavin *et al.* (2007), y es posible que se mejoren los protocolos en un futuro próximo. Finalmente, y aunque se trate de resultados preclínicos, parece que el uso del antioxidante 5-carboxi-1,1,3,3-tetrametil-lisoindolin-2-iloil reduce la muerte celular de las células de Purkinje en animales con ATM deficiente (Chen *et al.*, 2003).

Mención aparte merecen los ensayos de terapia génica y el empleo de células troncales. Los intentos de terapia génica han tenido en cuenta el hecho de que, como se ha comentado antes, en el 80% de los pacientes de ataxia-telangiectasia se observan formas truncadas de ATM. En consecuencia, los intentos de restablecer la funcionalidad del gen *ATM* deberán conseguir que se pueda continuar la traducción a través del codón de terminación espúreo o que se oculte el sitio de ajuste críptico. Evidentemente, como las mutaciones son habitualmente distintas en cada paciente, en cada caso habrá que diseñar la estrategia adecuada. Hasta ahora ha habido dos aproximaciones al problema, con resultados positivos en fase preclínica (Lai *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2007), aunque las dificultades inherentes a la terapia génica hacen difícil predecir si estas investigaciones podrán tener reflejo clínico.

En una ocasión se ha intentado mejorar los síntomas neurológicos de la ataxia-telangiectasia mediante el implante de células troncales. La intervención se realizó con un niño homocigótico para una mutación puntual en el gen *ATM*. El paciente había sido tratado previamente en Israel, para corregir la inmunodeficiencia asociada a la enfermedad. A la edad de 9 años se le sometió a un implante de células troncales derivadas de cerebro fetal en un hospital de Moscú. Los implantes se repitieron dos veces más, cuando el niño tenía 10 y 12 años, respectivamente. A la edad de 13 años fue llevado de nuevo a un hospital de Tel Aviv por padecer frecuentes e intensas jaquecas. El estudio mediante resonancia magnética nuclear reveló la presencia de una lesión infratentorial y otra lesión intradural en la cauda equina, a nivel de la vértebra L4. Fue intervenido quirúrgicamente de esta última lesión y, tras la biopsia correspondiente, se comprobó que era un tumor glioneural y, tras un completo análisis, el equipo de Rechavi, que se hizo cargo del tratamiento en Israel, comprobó que las células tumorales derivaban de al menos dos donantes (Amariglio *et al.*, 2009). Este caso, que es el primero documentado en esta línea, pone de manifiesto que, además de las reservas éticas que han de hacerse a estos tratamientos, el riesgo de desarrollo de tumores tras la implantación de células troncales de origen embrionario o fetal no es infundado.

## Una enfermedad desatendida: la enfermedad de Chagas

### Antecedentes

En los primeros meses de 1909 un brote de malaria amenazó con paralizar las obras de una importante línea férrea en el estado de Minas Gerais (Brasil). Con ese motivo, Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934), un médico discípulo del pionero de la medicina brasileña Oswaldo Cruz, fue enviado a la región. Allí se encontró con una nueva patología que provocaba numerosas muertes por insuficiencia cardíaca. Los nativos denominaban a esa enfermedad, desconocida por la ciencia médica hasta entonces, “baticum”, una onomatopeya que trataba de reproducir el sonido de los latidos del corazón en los enfermos. Uno de los ingenieros del ferrocarril llamó la atención a Chagas sobre la extraordinaria abundancia de unos insectos, que los nativos llamaban *barbeiros* por su hábito de picar a las personas en la cara. Chagas examinó al microscopio varios de estos insectos y detectó la presencia en su intestino de un tripanosoma hasta entonces desconocido. Asignó a la nueva especie el nombre de *Schizotrypanum cruzi*, en clara referencia a su maestro. Como Chagas estaba familiarizado con las enfermedades tropicales, como la malaria y la fiebre amarilla, en las que un insecto era el vector del agente causal, se dedicó a buscar qué enfermedad podía estar causada por su recién descubierto tripanosoma. Unas

<sup>30</sup> Información obtenida de [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), con fecha 19 de agosto de 2009.

semanas más tarde tuvo que examinar a una niña que presentaba un extraño edema parpebral periorbital unilateral; el análisis microscópico de su sangre mostró la presencia del mismo tripanosoma presente en los insectos. De esa manera, Chagas completó un trabajo sin precedentes en la ciencia médica. En pocos meses había descubierto una nueva enfermedad, el agente infeccioso causal y el vector que lo transmitía (Chagas, 1909), para comprobar después que la enfermedad contraída por la niña era la misma que provocaba la insuficiencia cardíaca. El extraordinario y encomiable trabajo de su descubridor hizo que dos veces, en 1913 y 1921 fuera formalmente nominado para el premio Nobel de Medicina o Fisiología, aunque no lo consiguió en ninguna de las dos ocasiones. La tripanosomiasis americana recibe el nombre de enfermedad de Chagas en honor de su descubridor y su agente causal se conoce actualmente como *Trypanosoma cruzi*.

## El parásito de la enfermedad de Chagas y su transmisión

*Trypanosoma cruzi* es un protozoo flagelado muy parecido estructural y funcionalmente a *Trypanosoma brucei* el agente infeccioso de la enfermedad del sueño, o tripanosomiasis humana africana. Sin embargo, sus hábitats son muy diferentes, como también lo son los mecanismos de su transmisión. Los vectores de *T. cruzi* son chinches de la subfamilia Triatominae, mientras que *T. brucei* se transmite por dípteros del género *Glossina* (la conocida mosca tsetse).

Los protozoos de la familia Tripanosomatidae tienen un complejo ciclo vital (revisado recientemente por De Souza, 2008), que se desarrolla en dos huéspedes: el vector invertebrado y el mamífero infectado. En lo que respecta a *T. cruzi*, los vectores se encuentran ampliamente distribuidos en México, América Central y América del Sur, donde recibe varios nombres populares además del mencionado anteriormente: chinche hocicona por el aspecto de su proboscis, escarabajo besador, chinchorro y benchuca. La especie descrita por Chagas correspondía a *Panstrongylus megistus*, pero el vector más común es *Triatoma infestans*. Entre las 140 especies de Triatominae conocidas,<sup>31</sup> que abarcan 15 géneros, otros vectores son *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasiliensis* y *Triatoma sordida*.

Cuando el insecto succiona sangre de un mamífero infectado, sea humano, sea un animal salvaje, el parásito, en forma de tripomastigota, pasa al tracto digestivo del vector, en el cual se transforma sucesivamente en esferomastigotas y epimastigotas, los cuales se fijan a las células intestinales de *T. infestans* y allí se convierten en los tripomastigotas, altamente infecciosos. Tras succionar sangre de un mamífero, los vectores tienen el hábito de defecar sobre su piel, en la que junto con las heces depositan los tripomastigotas. Estos pasan a infectar al huésped, por varios procedimientos, entre los que el más frecuente es la endocitosis a través de la conjuntiva o de células de la propia piel. En las vesículas endocíticas del mamífero comienza una nueva etapa del ciclo vital de *T. cruzi*, que se convierten en unas formas redondeadas llamadas amastigotas. Cuando la vesícula endocítica se abre, los amastigotas comienzan a dividirse, hasta que se convierten de nuevo en tripomastigotas. Tras esta conversión, las células infectadas se rompen, liberando los tripomastigotas al espacio intercelular, desde el que pueden infectar nuevas células o pasar a la sangre del huésped (De Souza, 2002).

Desde un punto de vista molecular, se ha avanzado considerablemente en el mecanismo de la infección por *T. cruzi* y se han caracterizado muy bien las diferentes enzimas del parásito que intervienen en el proceso infeccioso y que incluyen varias proteasas, *trans*-sialidasas, peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa, así como otras proteínas del parásito y del huésped. Algunas de estas enzimas son esenciales para la infección. Por ejemplo, se ha comprobado que las *trans*-sialidasas constituyen un claro factor de virulencia en *T. cruzi*, puesto que el fenotipo invasivo está restringido a las poblaciones que expresan esas enzimas y hay una clara correlación entre el nivel de expresión de la enzima y la patogenicidad de las diversas estirpes del parásito. De la misma manera, se han realizado estudios genómicos para caracterizar los genes de *T. cruzi* implicados en la infección. Todas estas investigaciones, que se han revisado recientemente (Villalta *et al.*, 2008), tienen un gran interés potencial a la hora de diseñar nuevos métodos terapéuticos, como se verá más adelante.

La vía de contagio que se ha expuesto es la más frecuente (80% de los casos), pero también se han descrito vías de contagio no vectorial, como la transmisión transplacentaria madre-feto, la transmisión oral, al ingerir alimentos contaminados por las heces de un insecto vector, o la transfusión de sangre infectada (Barret *et al.*, 2003).

<sup>31</sup> La clasificación de la familia Triatominae es complicada y sólo se puede abordar con seguridad mediante métodos moleculares (Mas-Coma y Bargues, 2009)

La diferenciación celular del parásito le hace capaz de adaptarse a los diferentes hábitats en los que se desarrolla su complejo ciclo vital —tracto intestinal del insecto vector, sangre o células del huésped—, en los que la disponibilidad de oxígeno y de nutrientes es muy diversa. Alternativamente, la adquisición de una nueva forma puede preparar adecuadamente al parásito para sobrevivir en el siguiente entorno. Los mecanismos de regulación que determinan la transición de una forma a otra de *T. cruzi* no se conocen con precisión. Recientemente se han descubierto los mecanismos de diferenciación de *T. brucei*, en los que la variación de temperatura desempeña un papel importante (Dean *et al.*, 2009). El tiempo dirá hasta qué punto las investigaciones realizadas con *T. brucei* pueden ayudar al conocimiento del desarrollo de *T. cruzi*.

Desde el punto de vista de la Biología Celular, la forma más estudiada de *T. cruzi* es el epimastigota, ya que puede cultivarse fácilmente en el laboratorio. Su morfología microscópica se ha estudiado profusamente, hasta el punto que *T. cruzi* fue uno de los primeros organismos unicelulares a los que se aplicó la microscopía electrónica en el inicio de la década de 1950 (véase la revisión de De Souza, 2008a). Quizá el detalle estructural más interesante de *T. cruzi* y de otros tripanosomas, sea la existencia de un orgánulo subcelular más o menos redondeado, de unos 0,7  $\mu\text{m}$  de diámetro y de matriz homogénea. Inicialmente se pensó que eran análogos a los peroxisomas de mamíferos,<sup>32</sup> pero en 1977 se descubrió que la mayoría de las etapas de la glicolisis del tripanosoma, en vez de ocurrir en el citosol, tienen lugar en tales orgánulos, lo que condujo a denominarlos glicosomas (Opperdoes y Borst, 1977). Aunque el descubrimiento se realizó en *T. brucei*, pronto se extrapoló a *T. cruzi*, en el que se encuentran unos 50 glicosomas por célula (Soares y De Souza, 1988).

La glicolisis tiene, además, algunas particularidades en los tripanosomas. Por ejemplo, en condiciones anaerobias, *T. cruzi* regenera el  $\text{NAD}^+$  gastado en la reacción de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa mediante la reducción de dihidroxiacetona fosfato a glicerol 3-fosfato y aprovecha éste para producir ATP por fosforilación a nivel de sustrato mediante la reacción de la glicerol quinasa. Como han observado Michels *et al.* (2006), la compartimentación de la glicolisis en los glicosomas es imprescindible para que transcurra la reacción en ese sentido, ya que es termodinámicamente desfavorable en condiciones estándar y sólo cuando la concentración de ADP y glicerol 3-fosfato son elevadas, puede tener lugar para la formación de ATP. Estas circunstancias, que no se dan en el citosol, son precisamente las del glicosoma. Otra ventaja de la compartimentación de la glicolisis se ha puesto de manifiesto gracias a los estudios de modelización de Bakker *et al.* (1997). Para comprender su alcance, hay que tener en cuenta que, en todos los organismos, la formación de ATP en la segunda parte de la glicolisis tiene un cierto efecto autocatalítico sobre esta ruta, que consume ATP en las etapas de fosforilación. Este efecto produciría un aumento tóxico de los intermediarios de no ser por la retroinhibición que ejerce la glucosa-6-fosfato sobre la hexoquinasa. Pero en *Trypanosoma* esta retroinhibición no se da (Nwagwu y Opperdoes, 1982), por lo que en principio, cabría esperar una acumulación tóxica de hexosa fosfatos. Sin embargo, la compartimentación de la glicolisis evita esta acumulación. La razón estriba en que la velocidad de la hexoquinasa y de la fosfofructoquinasa está controlada por la relación ATP/ADP, que en el glicosoma es ordinariamente baja y permite que la concentración de glucosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato se mantenga dentro de unos límites relativamente estrechos. Por el contrario, la relación ATP/ADP del citosol haría que se incrementasen las concentraciones de esos fosfatos de hexosa hasta poner en peligro la estabilidad de la célula. El modelo predice que aunque, de no existir compartimentación, el flujo glicolítico no variaría apreciablemente, pero se produciría una acumulación tal de hexosa fosfatos que pondría en peligro la estabilidad osmótica de la célula (Bakker *et al.*, 2000a), provocando lo que se ha dado en llamar una *turbo-explosión* (Teussink *et al.*, 1998). Recientemente, los resultados predichos por el modelo se han comprobado experimentalmente. Mediante una tecnología de RNA de interferencia se han obtenido tripanosomas deficientes en la proteína PEX14, necesaria para la entrada de proteínas en el glicosoma. De esta manera, al no poder importar las enzimas requeridas, el glicosoma pierde su operatividad y la glicolisis se realiza fundamentalmente en el citosol. En estas condiciones, se observa experimentalmente un gran incremento tóxico de glicerol-3-fosfato cuando *Trypanosoma* se cultiva en presencia de glicerol (Haanstra *et al.*, 2008). Aunque los parámetros cinéticos necesarios para construir el modelo se tomaron de las enzimas de *T. brucei*, y los experimentos se realizaron con esa especie, los resultados son, seguramente, extrapolables a *T. cruzi*.

Entre otras varias, estas que se acaban de comentar son ventajas de la compartimentación de la glicolisis y, tanto en condiciones anaerobias como aerobias, la existencia de los glicosomas facilita la

<sup>32</sup> Los peroxisomas inicialmente se designaron microcuerpos.

adaptación de *Tripanosoma* a las diversas situaciones a lo largo de su desarrollo (Michels *et al.*, 2006).

La enfermedad de Chagas es endémica en parte de México, en Centroamérica y en Sudamérica, con la excepción de regiones de la selva amazónica y el cono Sur. Aunque los datos son algo confusos, hay consenso en que la enfermedad se encuentra en recesión. A finales de la década de 1980 el número de infectados era de 20 millones<sup>33</sup> y los últimos datos arrojan una cifra de entre 10 (Schofield *et al.*, 2006) y 15 millones (Pinto Dias *et al.*, 2008). Han disminuido también otros parámetros epidemiológicos, como el número de países afectados y personas en riesgo, que han pasado de 21 y 100 millones, respectivamente, en 1990 a 18 y 28 millones en 2006 (Pinto Dias *et al.*, 2008). No obstante, su extensión sigue representando un importante problema sanitario, social y humano, ya que el número de muertes anuales debidas a la enfermedad de Chagas se cifra entre 45.000 y 50.000 (Dubner *et al.* 2008). Como se verá más adelante, la miocardiopatía crónica chagásica supone la principal causa de muerte en las personas infectadas y, en las áreas en que la enfermedad es endémica, un significativo porcentaje del total de los fallecimientos de adultos se deben a ese motivo. Un reciente estudio estadístico revela que en 2006 sólo en el Estado de São Paulo (Brasil) se produjeron 1198 muertes debidas a la miocardiopatía chagásica, lo que supone casi un 8% de los fallecimientos debidos a causas cardiovasculares y un 0,5% del total de defunciones. Por otro lado, un significativo porcentaje del total de las cardiopatías, que en algunos casos supera el 20%, es de etiología chagásica (Bocchi *et al.*, 2009). Pero hay que tener en cuenta que Brasil se encuentra entre los países sudamericanos con menor incidencia global de la enfermedad de Chagas (1,3% del total de la población), mientras que en Bolivia la enfermedad llega a afectar al 20% de los habitantes (Dubner *et al.*, 2008).

El aumento de las migraciones está extendiendo la enfermedad de Chagas a otras áreas geográficas (Guhl *et al.*, 2000). En países como Estados Unidos (Bern *et al.*, 2007) o Suiza (Jackson *et al.*, 2008) se considera ya una enfermedad emergente y, en nuestro país, a tenor de las recientes pruebas realizadas en Barcelona, un elevado porcentaje de los inmigrantes procedentes de zonas de riesgo han resultado seropositivos (Manzardo *et al.*, 2008). La ausencia de vectores en estas áreas geográficas minimiza los riesgos de contagio, que quedan prácticamente limitados a los casos de transfusión de sangre, razón por la cual en Estados Unidos se realizan ya controles sistemáticos en las donaciones (Bern *et al.*, 2007). Pero, evidentemente, aunque el riesgo para la población sana sea mínimo, se plantean importantes problemas asistenciales con la población infectada.

Todos los datos aportados en el presente apartado justifican sobradamente tanto la clasificación de la enfermedad de Chagas como una enfermedad huérfana según la definición aportada anteriormente, como el interés humano y científico de su estudio.

## Patología y diagnóstico de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas comienza por una etapa asintomática de incubación, que puede ir seguida de tres fases con diferentes manifestaciones clínicas: una aguda; una latente, también asintomática, que puede tener una duración variable o incluso prolongarse de por vida; finalmente, aproximadamente en el 25% de los casos, se entra en una fase crónica, en la que se manifiestan la mayor parte de las disfunciones anatómicas o fisiológicas que pueden producir un desenlace fatal.

La etapa de incubación, en caso de contagio a través de un insecto vector, dura entre 7 y 10 días y se caracteriza por la invasión de las células humanas —mediante el mecanismo detallado más arriba— por el parásito en su fase de tripomastigota. Si la vía de infección es la transfusión de sangre contaminada, el periodo de incubación puede llegar a ser de un mes, ya los parásitos circulantes tienen menor capacidad de invadir las células humanas.

La fase aguda, que se define como aquella en que es posible detectar el parásito en sangre, comienza a los 6-10 días tras la infección y tiene una duración de entre 1 y 3 meses (Puigbó *et al.*, 1977). Sólo en un 5% de los casos, normalmente en niños que viven en regiones donde la enfermedad es endémica, se observan manifestaciones clínicas en forma de miocarditis aguda, que de ordinario es reversible (Dubner *et al.*, 2008). En la mayoría de los casos, entre los síntomas clínicos, que han revisado Barret *et al.* (2003), se encuentran fiebre, una lesión típica (chagoma) en el lugar de ataque del insecto vector, dolor muscular,

<sup>33</sup> Datos de la Organización Mundial de la Salud, recogidos en “Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert Committee”. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 811, 1195 (1991)

hepatomegalia, esplenomegalia y edema subcutáneo localizado o generalizado. Cuando la infección ha tenido lugar a través de la conjuntiva, aparece el signo de Romaña, un característico edema parpebral unilateral que facilita la detección temprana de la enfermedad. La detección de los parásitos en sangre es también fácil en esta etapa. En algunos casos es posible detectar anomalías en el electrocardiograma (Rassi *et al.* 2000).

Terminada la fase aguda, entre 8 y 12 semanas después de la infección inicial, se entra en la fase latente, asintomática, que se hace crónica en la mayoría de los infectados (entre el 70 y el 85%). Sin embargo, un 15-30% de los afectados, especialmente varones de entre 20 y 45 años, desarrollan la fase crónica de la enfermedad con manifestaciones clínicas típicas (Barret *et al.*, 2003), lo que puede suceder entre 10 y 30 años después de haberla contraído (Dubner *et al.*, 2008).

La fase crónica asintomática, que de ordinario se conoce como indeterminada, puede detectarse por pruebas serológicas, pero no aparecen manifestaciones radiológicas o electrocardiográficas. Hay otras formas crónicas de enfermedad de Chagas, con claras manifestaciones clínicas, que a veces se clasifican de acuerdo con los síntomas principales que se manifiestan en la exploración clínica. El síntoma predominante en la fase crónica de la enfermedad de Chagas es la miocardiopatía sobre la que se han publicado excelentes revisiones recientes que cubren los aspectos principales del diagnóstico (Acquatella, 2008; Blum *et al.*, 2008; Dubner *et al.*, 2008; Yacoub *et al.*, 2008). Pueden resultar de especial interés para los especialistas de los países en que la enfermedad de Chagas se encuentra en situación emergente, ya que habitualmente tratan pocos pacientes diagnosticados. En cuanto a los mecanismos de patogénesis de la miocardiopatía chagásica sigue habiendo numerosos interrogantes y se discute si la causa principal es de origen autoinmune o inflamatorio. En apoyo del primer tipo de mecanismos está el hecho de que algunos anticuerpos frente a proteínas de *T. cruzi* dan reacción cruzada con proteínas de corazón, como la cadena pesada de la miosina (Bilate y Cunha-Neto, 2008). Pero la implicación del TGF- $\beta$  en la patogénesis de la miocardiopatía chagásica (Araújo-Jorge *et al.*, 2008) es una indicación de la importancia de los procesos inflamatorios. Posiblemente, ambas causas no sean excluyentes.

En un proyecto recientemente resumido por Roggero *et al.* (2009), se han utilizado ratones —el mejor modelo animal para la investigación de la enfermedad de Chagas (Buckner, 2008)— para examinar el efecto de los glucocorticoides endógenos en el desarrollo de la enfermedad. El incremento de los niveles de corticosterona que se observa como consecuencia de la infección con *T. cruzi* se interpreta como un mecanismo de defensa ante la producción excesiva de citoquinas proinflamatorias. Además, el empleo de animales desprovistos de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) ha permitido comprobar que el TNF- $\alpha$  desempeña un papel complejo en la patogénesis de la enfermedad de Chagas. El conjunto de estos resultados pone de manifiesto que la protección frente a la infección y sus consecuencias requiere un complejo equilibrio entre la respuesta endocrina y la formación de citoquinas.

En la enfermedad de Chagas, aparecen además manifestaciones extracardiacas. Algunas de ellas, como las tromboembolias derivan del potencial riesgo embólico de las alteraciones cardiacas. Pero otras manifestaciones tienen una patogénesis diversa y mal conocida. Por ejemplo, se dan visceromegalias, mayoritariamente de esófago y colon. La esofagopatía chagásica se caracteriza por una dilatación esofágica que puede llegar a ser de más de 10 cm (Herbella *et al.*, 2008).

## Tratamiento y control de la enfermedad de Chagas

El tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas en la actualidad depende fundamentalmente de dos medicamentos, el benznidazol y el nifurtimox. El más antiguo de ellos, el nifurtimox, es un nitrofurano tripanocida, que actúa fundamentalmente sobre la forma circulante de *T. cruzi*. El benznidazol se puso en el mercado 10 años más tarde, en la década de 1970, y es un nitroimidazol, también tripanocida. Como en el caso del nifurtimox, su uso está indicado especialmente durante la fase aguda de la enfermedad y no hay consenso sobre la eficacia de estos dos medicamentos durante la fase crónica (Coura y De Castro, 2002; Urbina y Docampo, 2003; Jannin y Villa, 2007). De todas formas, en noviembre de 2004 se inició un ambicioso ensayo clínico encaminado a comprobar si el tratamiento prolongado (60 días) con benznidazol previene la progresión de la miocardiopatía en pacientes de enfermedad de Chagas. El estudio, dirigido por el Population Health Research Institute (Hamilton, Canadá) y el Instituto Dante Pazzanese de Cardiología (São Paulo, Brasil), implica a 75 centros sanitarios

radicados en los países con mayor incidencia de la enfermedad y cuando se complete, a finales de 2010 o principios de 2011, habrá contado con la participación de unos 3.000 pacientes (Dubner *et al.*, 2008). En cualquier caso, ambos medicamentos presentan importantes efectos secundarios, por lo que la relación entre beneficio y riesgo es baja (Urbina y Docampo, 2003) y se hace necesario disponer de nuevos fármacos más eficaces.

Teniendo en cuenta que muchas veces la enfermedad de Chagas se diagnostica durante la fase crónica, cuando los pacientes presentan síntomas cardíacos o gastrointestinales, y que en esa etapa la quimioterapia actual es deficiente, son importantes las medidas terapéuticas que tienden a mejorar la calidad de vida de los pacientes mediante el alivio de las complicaciones sintomáticas. Es frecuente acudir a inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, a b-bloqueantes o anticoagulantes en casos de fibrilación auricular, aparte de las medidas dietéticas habituales. El uso de antiarrítmicos, como la amiodarona, o la implantación de marcapasos resulta aconsejable en determinados casos, así como el trasplante cardíaco en situaciones extremas (Barret *et al.*, 2003; Dubner *et al.*, 2008). En enero de 2006 se inició en Brasil un ensayo clínico (fase III) para determinar si la implantación de células troncales autólogas, aisladas de médula ósea, puede mejorar el estado de pacientes de miocardiopatía, seguido por el aumento de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo.<sup>34</sup> El ensayo pretende extenderse a un total de 300 pacientes y, de tener éxito, puede resultar beneficioso no sólo para afectados por la enfermedad de Chagas, sino también para otros pacientes de miocardiopatías.

Por su parte, el tratamiento de la esofagopatía chagásica avanzada es frecuentemente quirúrgico. A este respecto, vale la pena hacer notar que la experiencia adquirida en diversos centros brasileños en el tratamiento quirúrgico de pacientes de la enfermedad de Chagas ha permitido aportar datos valiosos para la cirugía general de esófago, en particular para el tratamiento de la acalasia idiopática (Herbella *et al.*, 2008).

Aunque el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas sea todavía deficiente, la incidencia de la enfermedad disminuye claramente, como se ha comentado antes. El aumento de medidas higiénicas y los éxitos obtenidos en el control de la plaga de insectos vectores han sido, sin duda, las causas determinantes de esta disminución, aunque la erradicación total parece difícil, habida cuenta de la diversidad de reservorios. El uso de un modelo matemático ha permitido a Massad (2008) pronosticar que en los próximos 50 años el número de personas afectadas en Brasil puede descender de las 750.000 actuales a un valor que oscila entre 100.000 y 250.000. De todas formas, de acuerdo con Pinto Dias *et al.* (2008), es preciso concluir que la situación no debe producir un excesivo optimismo.

Es evidente, pues, que no bastan las medidas actuales para erradicar la enfermedad de Chagas y que hacen falta progresos farmacológicos para continuar la lucha contra ella. Para una mayor eficacia, es evidente que los medicamentos que en el futuro se desarrollen deben ser tripanocidas o impedir la infección por *T. cruzi*. Afortunadamente, son muchas las aproximaciones que en la actualidad se están llevando a cabo para lograr un decisivo avance en la quimioterapia antichagásica y a ellas se dedican los párrafos siguientes.

Un nuevo medicamento antiparasitario debería poseer las siguientes características:

- Posibilidad de administración oral, puesto que un medicamento parenteral puede presentar dificultades para tratamientos prolongados en áreas con recursos limitados.
- Administración en una dosis diaria. Esta característica, además de facilitar el uso habitual por los pacientes, asegura una suficiente presión sobre el parásito que aumente la eficacia del tratamiento y dificulte la aparición de resistencias.
- Toxicidad baja, puesto que el inconveniente fundamental para el uso masivo del nifurtimox y del benznidazol radica en sus numerosos efectos secundarios.
- Uso seguro en niños y en mujeres en edad reproductiva, que constituyen dos importantes grupos de riesgo en las áreas afectadas por la enfermedad.
- Costo reducido, para hacer más fácil su empleo en las zonas afectadas, que son mayoritariamente de escasos recursos económicos.
- Estabilidad térmica, puesto que su uso se concentrará en las zonas tropicales en las que la enfermedad está extendida.

Una primera aproximación, habitual en Farmacología, es la búsqueda de moléculas relacionadas con las de conocida actividad terapéutica, con el fin de encontrar otras que, igualando o mejorando su

<sup>34</sup> Datos tomados de [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), con fecha 26 de diciembre de 2008.

actividad, presenten menos efectos secundarios. Como se ha comentado antes, el benzimidazol es un imidazol y se conoce la actividad antifúngica de diversos imidazoles y triazoles. Estos compuestos actúan como inhibidores de la esteroil 14-desmetilasa, una enzima de la ruta de biosíntesis de esteroides, y se aplican en el tratamiento de infecciones fúngicas, por ejemplo, de la candidiasis. La enzima de *Candida albicans* sólo tiene un 39% de identidad con la humana, por lo que se han encontrado bastantes inhibidores específicos de la esteroil-14-desmetilasa de *C. albicans*, que tienen poco efecto sobre la enzima humana. La enzima equivalente de *T. cruzi*, es aún menos similar a la humana y, curiosamente, a pesar de que sólo tiene un 28% de identidad con la de *Candida*, los imidazoles y triazoles activos antifúngicos, por ejemplo, cetoconazol, itraconazol y posaconazol tienen también actividad frente a *T. cruzi* (Buckner, 2008), en algunos casos con una sorprendente efectividad. Por ejemplo, ensayos *in vitro* han puesto de manifiesto que el posaconazol es activo frente a la forma de epimastigota de *T. cruzi* con un IC<sub>50</sub> de 0,014 mM y frente a los amastigotas intracelulares con IC<sub>50</sub> de 0,00025 mM (Benaim *et al.*, 2006). El uso de este triazol en ratones infectados con *T. cruzi* SC-28 permite un 100% de cura en la fase aguda de la enfermedad, con un 100% de supervivencia (Molina *et al.*, 2000). Naturalmente, estos datos son muy favorables en comparación con los obtenidos con nifurtimox o benzimidazol, pese a lo cual sólo se han realizado ensayos clínicos con los menos eficaces cetoconazol e itraconazol y los resultados no han cubierto las expectativas (Buckner, 2008). La investigación en esta línea se centra actualmente en la potenciación de las sinergias que pueden darse entre estos compuestos y los tripanocidas convencionales o bien en el desarrollo de nuevos triazoles más específicos frente a *T. cruzi*.

Otra vía de investigación posible en Farmacología es la realización de rastreos en búsqueda de la posible acción frente a una patología concreta de moléculas cuya eficacia se ha demostrado con otras patologías. Así, se ha llegado a mostrar que determinados antitumorales ejercen acción contra tripanosomas patogénicos y, recientemente, tras un exhaustivo estudio ultraestructural, se ha puesto de manifiesto que estos agentes inducen la muerte de *T. cruzi* por un mecanismo en cierto modo similar a la apoptosis observada en eucariotas pluricelulares (Menna-Barreto *et al.*, 2009).

Por otro lado el aumento del conocimiento del parásito a nivel molecular ha permitido el diseño de variadas aproximaciones con potenciales posibilidades terapéuticas. Una vía de acceso para el diseño de nuevos fármacos consiste en la identificación previa de una diana (proceso, enzima, sistema de transporte, etc.) apropiada para buscar después sus inhibidores. Evidentemente, para que el diseño tenga éxito la validación de la diana es fundamental. Recientemente se ha propuesto un protocolo para esta validación en el caso de enfermedades parasitarias (Neres *et al.*, 2008), aunque varios de sus aspectos serían de aplicación en otros casos. En forma de preguntas, este protocolo se puede expresar:

—¿Ofrecen las propiedades bioquímicas del parásito una base racional suficientemente fuerte para planear un modo de intervención?

—¿Tiene el parásito alguna alternativa que le permita sobrevivir al ataque?

—Esas propiedades bioquímicas, ¿son específicas del parásito, o las comparte también el huésped?

—Si la diana se bloquea (inhibiendo la expresión de su gen o por medio de anticuerpos), ¿se afecta la patología?

—¿Existen algunos medicamentos que actúen sobre dianas parecidas en enfermedades más o menos similares?

—Los inhibidores conocidos de la diana, ¿afectan adecuadamente a la patología?

La búsqueda de las dianas terapéuticas se basa en la consideración de las propiedades singulares de *T. cruzi*, que se han comentado antes. Los criterios de Neres *et al.* (2008) que se acaban de exponer no se han aplicado en todos los casos que se refieren a continuación.

En primer lugar se han buscado dianas relacionadas con el mecanismo de infección. Por ejemplo, la cruzipaina es una cisteín-proteasa lisosomal del parásito implicada en la invasión de las células del huésped por la forma tripomastigota de *T. cruzi* (Villalta, *et al.*, 2008), lo que ha dado lugar a la investigación de inhibidores de cisteín-proteasas como potenciales agentes terapéuticos (Doyle *et al.*, 2008).

La *trans*-sialidasa, como se ha comentado antes, está íntimamente relacionada con el proceso invasivo de las células del huésped por parte de *T. cruzi*. La aplicación de los criterios mencionados más arriba, permite concluir que se trata de una diana farmacológica adecuada. De hecho, se han investigado más de 40 posibles inhibidores de la enzima de *T. cruzi*, aunque no se ha encontrado ninguno lo suficientemente potente para permitir una aplicación eficaz (Neres *et al.*, 2008). Sin embargo, el conocimiento de la estructura del centro activo de la enzima por estudios de difracción de rayos X (Buschiazzi *et al.*, 2002) puede permitir el diseño racional de nuevos inhibidores potenciales.

Otra línea de investigación es la que se centra en aspectos del metabolismo redox de *T. cruzi*, que son distintos de los del huésped. Por ejemplo, la tripanotiona ( $N^1$ ,  $N^8$ -bis(glutacionil)espermidina) reemplaza en el tripanosoma al glutatión en la mayoría de las reacciones de intercambio tiol-disulfuro. Se conoce la ruta de biosíntesis y se sabe que el mantenimiento del estado reducido de la tripanotiona es posible gracias a la existencia de una reductasa que emplea NADPH como coenzima (revisado por Irigoín *et al.*, 2008). Esta reductasa es una prometidora diana farmacológica y se han descrito ya algunos inhibidores (Krauth-Siegel *et al.*, 2005). Recientemente se está investigando una estrategia que combina la inhibición de este metabolismo oxidativo de *T. cruzi* con la presencia en éste de cruzipaina. Se trata del diseño de profármacos, es decir, moléculas inactivas que, por la acción de algunas enzimas del parásito, se convierten en principios activos. Chung y sus colaboradores (revisado en Chung *et al.*, 2008) han construido profármacos de nitrofurazona, un inhibidor de la tripanotiona reductasa, y de primaquina, que induce estrés oxidativo en el parásito. Estos derivados sólo se convierten en las moléculas activas por acción de la cruzipaina de *T. cruzi*, por lo que no son nocivos para el huésped. Hasta el momento, sólo se ha ensayado la eficacia de estos profármacos en cultivos de *T. cruzi*.

Una línea incipiente de investigación en la búsqueda de nuevos fármacos para la enfermedad de Chagas se apoya en las diferencias epigenéticas que se observan entre los tripanosomas y la mayoría de los eucariotas. Aunque la mayor parte de los datos se han obtenido con *T. brucei*, la secuencia de las histonas y, sobre todo, sus lugares de modificación son diferentes de los encontrados en el hombre (Janzen *et al.*, 2006). Dada la trascendencia de la información epigenética, las peculiaridades de los tripanosomas se han apuntado como una posible vía de actuación terapéutica (Sullivan *et al.*, 2006).

Posiblemente, la línea de investigación más prometidora en la búsqueda de nuevos fármacos tripanocidas sea el aprovechamiento de las peculiaridades que supone la compartimentación de la glicolisis en los glicosomas. Ya se ha apuntado antes la importancia que este fenómeno tiene para la supervivencia del parásito en las diversas situaciones que encuentra a lo largo de su ciclo vital, pero ahora se trata de considerar si esa compartimentación, que no existe en las células del huésped, puede aprovecharse para inhibir la glicolisis de *T. cruzi*, con la consiguiente muerte del parásito, sin afectar esa esencial ruta en el huésped. La idea es atractiva y no es de extrañar que se haya dedicado un gran esfuerzo, primero a la identificación de dianas que puedan tener interés terapéutico, y luego a la búsqueda de posibles inhibidores. En este sentido cabe señalar que la búsqueda de una diana adecuada para atacar el sistema glicolítico de tripanosomas ha constituido una de las primeras aplicaciones prácticas del análisis del control metabólico, una vía de aproximación racional al estudio del control de las rutas metabólicas. El análisis del control metabólico (revisado en Fell, 1997) permite determinar un parámetro, el coeficiente de control de flujo, cuyo valor indica el peso que cada elemento del sistema — enzima o transportador — tiene en el control del flujo metabólico de una ruta determinada. Uno de los principales puntos de partida del análisis del control metabólico es que el control está normalmente compartido por varias y aún muchas enzimas o transportadores y los resultados experimentales han puesto de manifiesto que en la mayoría de las rutas metabólicas se cumple esa amplia distribución de elementos controladores. Desde un punto de vista farmacológico no es útil dirigir la búsqueda de inhibidores a una enzima cuyo coeficiente de control de flujo sea muy pequeño, pero tampoco debe pensarse que sólo una enzima sea responsable de un determinado flujo metabólico. Las consecuencias farmacológicas de los hallazgos del análisis del control metabólico se han revisado adecuadamente (Cascante *et al.*, 2002; Cornish-Bowden y Cárdenas, 2003) y deberían tenerse en cuenta la hora de un diseño racional de fármacos.

Volviendo a la inhibición de la glicolisis de tripanosomas, cabe reseñar que los estudios iniciales (revisados por Bakker *et al.*, 2000b) pusieron de manifiesto que los mayores coeficientes de control de flujo correspondían al sistema de transporte de glucosa al tripanosoma y a las enzimas aldolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. El perfil del control de flujo de estas enzimas es precisamente contrario al que se puede predecir para los eritrocitos humanos (Schuster y Holzhütter, 1995). Una vez identificadas las dianas adecuadas, la investigación ha continuado con la búsqueda de inhibidores potenciales. También en este caso se ha aplicado un criterio que con frecuencia se olvida: son más eficaces los inhibidores acompetitivos o no competitivos que los competitivos, aunque éstos sean de más fácil diseño. La razón, que ha sido debidamente argumentada (Cornish-Bowden y Cárdenas, 2003) estriba en que, de utilizar un inhibidor



competitivo —salvo en el caso en que se una de un modo prácticamente irreversible, la acumulación del sustrato de la enzima inhibida acabaría por revertir el efecto del inhibidor, con poca o ninguna influencia final sobre el flujo de la ruta. Por el contrario, el uso de un inhibidor acompetitivo puede disminuir acentuadamente el flujo y elevar sustancialmente la concentración intracelular del sustrato de la enzima inhibida. Ambos efectos pueden conducir finalmente a la muerte de la célula.

Con estos criterios, Aronov *et al.* (1999) diseñaron una serie de inhibidores de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. Se basaron para ello en las estructuras de las enzimas de *T. brucei* y de *Leishmania mexicana* (Vellieux *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1995) y buscaron potenciales inhibidores que se unieran a la parte del centro activo que interacciona con la adenina del NAD<sup>+</sup>. De este modo, encontraron que la adición de sustituyentes en el carbono 2' de la ribosa y en el nitrógeno 6 de la adenosina consigue que la eficacia inhibitora sobre la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa sea muy elevada. El ensayo de este compuesto frente a la forma intracelular de *T. cruzi* muestra que la inhibición del crecimiento del parásito se produce con un IC<sub>50</sub> de 5 mM, mientras que las células humanas no se afectan ni con una concentración de 40 mM. Evidentemente, estos experimentos abren una puerta a la aplicación terapéutica de estos derivados de adenina, que son también eficaces frente a *T. brucei* y frente a *Leishmania*. Desgraciadamente, no se han comenzado ensayos clínicos en esta línea.

## Consideraciones éticas

### Bioética y solidaridad

Comentaba al inicio de este discurso que la solidaridad nos debe inclinar a prestar un interés preferente a los más desprotegidos y realmente los pacientes de enfermedades huérfanas pueden considerarse desprotegidos en muchos aspectos. Es por ello pertinente iniciar estas consideraciones éticas por una reflexión en torno a la solidaridad. Se suele decir que solidaridad es la adhesión a la causa o a la empresa de otro y, frente a las interpretaciones reduccionistas que apoyan exclusivamente ese concepto en simples razones de simpatía hay que insistir en que la solidaridad tiene un fundamento ontológico. El hombre ocupa un puesto singular con respecto a los demás organismos vivos, ya que no está ontológicamente subordinado a ninguno de ellas. Dicho con otras palabras, el hombre no puede tomarse nunca como algo con valor de medio para alcanzar otra meta. El hombre es un *fin en sí mismo*, tiene un carácter final *en sí*. El traslado de esta consideración al contexto presente, obliga a considerar al *otro* no sólo como un miembro de la especie humana, sino también como un fin en sí mismo. Tanto la negación de su estatuto ontológico, el considerarlo —aunque sea implícitamente— *otra cosa* en vez de *otro*, como la consideración de que el otro es un fin *para mí* y no en sí mismo pervierten la relación con los demás e impiden la existencia de una auténtica solidaridad (Franco, 2001).

Basar la solidaridad en un fundamento ontológico obliga a ponerse en el lugar del otro, sea quien sea, no por razones de simpatía o de proximidad, sino simplemente porque es una persona y, como tal, poseedor de una dignidad inalienable. Saber ponerse en el lugar del otro, cuando el otro es un desconocido paciente de la enfermedad de Chagas o del síndrome de Beckwith-Wiedemann exige un ejercicio de imaginación. Alejandro Casona en *La Barca sin Pescador* pone en boca de Ricardo, el protagonista, las siguientes palabras: “Un día sabemos que va a morir un pescador en una aldea del Norte, y nos encogemos de hombros. Otro, leemos que en un frente de guerra han caído treinta mil hombres, y seguimos tomando el café tranquilamente, porque aquellas treinta mil vidas no son para nosotros, más que una cifra. Y no es que tengamos duro el corazón, no. Es la imaginación la que tenemos muerta” (Casona, 1945). Me gustaría, pues, que estas consideraciones éticas se apoyaran tanto en la realidad clínica y biomédica de las enfermedades huérfanas que, a través de tres ejemplos concretos, hemos venido contemplando, como en la imaginación para colocarnos en el lugar del paciente o de sus allegados. Campos-Castelló (2001) en el artículo antes mencionado, cita las siguientes palabras del padre de un paciente: “Las enfermedades raras no son importantes hasta que tienes una”. Ojalá la solidaridad nos lleve a adherirnos a la causa de los pacientes de una enfermedad huérfana, como si la padeciéramos nosotros mismos. Toda compasión que no se ajuste a ese sentido etimológico del término no pasaría de ser un simple sentimentalismo.

## Ética de la atención de las enfermedades huérfanas

La desaparición de todas las enfermedades es un objetivo inalcanzable, pero la sanidad debe tender a él de forma asintótica. Para ello no basta con poner todos los medios para curar las enfermedades, es necesario tratar de prevenirlas y, mientras, procurar evitar al máximo el sufrimiento de los pacientes. Las enfermedades huérfanas no pueden ser una excepción. Por eso, además de las medidas terapéuticas que se están aplicando —que se han descrito en los casos concretos que han servido como ejemplo en este discurso—, se realizan denodados esfuerzos para prevenirlas.

En lo que se refiere a las enfermedades raras, el campo de batalla para lograr un tratamiento adecuado se centra muchas veces en la detección temprana y en un diagnóstico precoz certero. Vale la pena reseñar el esfuerzo que muchos equipos biomédicos están realizando en este sentido. Se puede mencionar, por ejemplo, el siguiente párrafo tomado de una publicación realizada por un grupo de la Universidad de Chile en referencia al síndrome de Beckwith-Wiedemann: “La investigación se orienta a la mejora de las técnicas de diagnóstico prenatal, que permitirán la preparación de un equipo médico multidisciplinar para tratar las patologías con las que estos pacientes nacen” (Narea-Matamala *et al.*, 2008). Por desgracia, en otros casos se hace un uso negativo de estas mejoras técnicas, como cuando señala un autor: “Las anomalías genéticas severas presentan pocas dificultades éticas y habitualmente justifican el aborto” (Gross, 2002), medida que incluso se contempla en el caso de enfermedades que tienen un tratamiento razonable (Gross, 2002; Kotzot, 2008). ¿Será necesario incluir el aborto provocado en el listado de los males huérfanos?

Es evidente que las enfermedades huérfanas presentan peculiaridades que aconsejan una atención bioética singular. Las dificultades que encuentran los pacientes de enfermedades raras se deben fundamentalmente a retrasos en el diagnóstico, falta de acceso a una atención médica adecuada y falta de posibilidades terapéuticas convenientes. Según datos recogidos por Schieppati *et al.* (2008), para el 25% de los pacientes transcurrieron más de 5 años hasta ser diagnosticados correctamente. Antes del diagnóstico final, el 40% de ellos fue diagnosticado de modo incorrecto. De estos, el 16% sufrió una intervención quirúrgica innecesaria, y el 33% no recibió un tratamiento médico adecuado. Sobre la ausencia de medicamentos adecuados en muchos casos se hará una reflexión independiente más adelante. A estos graves inconvenientes hay que añadir que las enfermedades raras constituyen con frecuencia una carga económica difícil de soportar por el paciente o por su familia por el elevado costo de los medios asistenciales o terapéuticos y por los desplazamientos exigidos a veces por la dispersión de los centros especializados en el tratamiento. Pero, además, a estas dificultades materiales habría que añadir el componente psicológico aportado por la rareza de la enfermedad, que puede conducir a sentirse desplazado, olvidado. La conclusión obvia es que las enfermedades raras no pueden considerarse como faltas de importancia.

Fernandez (2007), refiriéndose al caso de pacientes con cánceres infrecuentes, pero en un contexto que obviamente se puede extrapolar a todos los pacientes de enfermedades raras, apunta el enorme reto ético de cómo hacer frente a esas dificultades contando con la necesaria limitación de los recursos sanitarios. No es fácil la toma de decisiones cuando se trata de elegir entre el tratamiento de una enfermedad o el de otra, el que beneficia a niños enfermos o el destinado a los pacientes ancianos. En primer lugar, decidir cuántos recursos —humanos, económicos, etc.— se deben invertir en el tratamiento de enfermedades huérfanas constituye un complicado dilema ético. Otro tanto puede decirse a la hora de decidir cómo se deben distribuir esos recursos entre las diferentes enfermedades.

Gericke *et al.* (2005) han presentado una aportación al estudio de estos dilemas basándose en el paradigma de los cuatro principios —autonomía, no maleficencia, beneficencia y justicia— de la Bioética principialista (Beauchamp y Childress, 2001). Los autores de dicho trabajo obtienen algunas conclusiones valiosas, como el rechazo del utilitarismo, o la aplicación del concepto de no-abandono cuando se trata de estudiar las enfermedades raras. No obstante, la experiencia diaria muestra que los dilemas éticos no se han resuelto, quizá porque, como los mismos autores advierten, el establecimiento de prioridades para la distribución de recursos en materia de salud sigue sin abordarse con la suficiente frecuencia por la Bioética académica (Gericke *et al.*, 2005). Al término de este discurso se apuntará una posible forma de abordar esos dilemas, aunque es preciso advertir que no se puede dar una solución total, sino tan sólo una vía para hacerlo.

En cuanto a las enfermedades desatendidas, los interrogantes planteados a la hora de tratar la distribución de recursos presentan facetas únicas y también se ha intentado abordarlos desde la perspectiva de la Bioética principialista (Gericke *et al.*, 2005; Oprea *et al.*, 2009). En general, se puede decir que la comunidad científica ha prestado adecuada atención al estudio básico de tales enfermedades y, por otra parte, se han hecho esfuerzos individuales muy notables para mejorar la asistencia médica de los pacientes. No obstante, dado el elevado número de éstos, no bastan las iniciativas aisladas por meritorias que sean, como las que tantas ONGs llevan a cabo, para dar una solución al problema. A pesar de todo, la carencia de medicamentos sigue representando un grave problema en el tratamiento de estas enfermedades. Así pues, las enfermedades desatendidas presentan puntos en común con las enfermedades raras, pero poseen rasgos característicos, derivados de la condición habitual de pobreza de los pacientes que dificultan su erradicación. Concretamente, es preciso tomar medidas higiénicas que muchas veces exceden de la capacidad de los profesionales de la salud y requieren la participación de numerosos agentes sociales, así como una toma de conciencia por parte de la comunidad política que, en la mayor parte de las ocasiones trasciende las competencias de un gobierno nacional.

Afortunadamente, se observa en los países desarrollados una general sensibilización ante el problema de las enfermedades desatendidas, que puede dar frutos concretos en los próximos años. En muchos casos, todavía se trata de una atención motivada por las consecuencias que la globalización y el incremento de los flujos migratorios pueden tener en la emergencia de enfermedades nuevas en los propios países desarrollados. Pero, de cualquier modo, el estudio de estos problemas conllevará innegables beneficios para la lucha contra las enfermedades desatendidas. Simplemente el hecho de que se trate de ellas en los países desarrollados facilita la toma de conciencia sobre los problemas de estas enfermedades. Un ejemplo es la segunda conferencia del GID (Groupe Interacadémique pour le Développement), una asociación de Academias de Ciencias creada por iniciativa de la Académie des Sciences Francesa y a la que pertenece la Real Academia de Ciencias española, ha tenido lugar en Roma el pasado mes de octubre, organizada por la Accademia Nazionale dei Lincei. La Conferencia se ha dedicado al tema “Ciencia y salud en los países mediterráneos” y ha analizado entre otras cuestiones la epidemiología de las enfermedades infecciosas y emergentes.

La lucha contra las enfermedades desatendidas requerirá, sin duda, un abordaje transnacional. Sólo así se conseguirá afrontar la tremenda realidad de que sólo el 10% de la investigación médica se dedica a atender problemas de salud que implican al 90% de los enfermos de todo el mundo.<sup>35</sup> Con otras palabras, es preciso cerrar lo que se ha dado en llamar la brecha 10/90 o, con palabras de Luna (2005), el *infamous gap*, la brecha infame. Más adelante habrá ocasión de retornar a estas consideraciones globalizadoras.

Una cuestión ética adicional que se plantea en el caso de las enfermedades huérfanas es la de delimitar la investigación clínica de la investigación básica. El tema fue planteado por Parker *et al.* (2004) a propósito de las enfermedades genéticas. Señalaban estos autores un caso concreto en el que el diagnóstico se complica y requiere la participación, no sólo de genetistas clínicos, sino también de especialistas en investigación básica. El examen inicial de las muestras tomadas al paciente no acaba de ser concluyente, pero meses más tarde, un investigador básico identifica un cambio potencialmente patogénico en el DNA. Para asegurar el mecanismo por el que aparece esa alteración genética se hace preciso analizar el DNA de los padres del paciente. Delimitar si esa investigación es clínica o básica es importante desde un punto de vista ético, teniendo en cuenta el alcance del consentimiento del paciente y, en este caso, de sus familiares, a la hora del destino que se da a las muestras tomadas. En otras palabras, ¿ha de calificarse el proceso de simple práctica clínica o de investigación básica? El tratamiento de una forma o de otra influye necesariamente en el protocolo que se emplee para el consentimiento informado por parte del paciente y, en su caso, para la autorización del proceso por parte de los comités éticos correspondientes. Parker *et al.* (2004) hicieron algunas recomendaciones para facilitar el avance de una investigación a todas luces necesaria. Tales recomendaciones se podían resumir en una palabra: flexibilidad. Recientemente Ponder *et al.* (2008) han publicado un estudio retrospectivo en el que ha entrevistado a 78 miembros de 52 familias investigados en búsqueda de un posible defecto genético hereditario. El objetivo de las entrevistas era dilucidar el conocimiento que tenían las personas implicadas sobre el proceso de la investigación genética. La mayoría de ellas eran conscientes de que se estaba realizando un estudio genético y aceptaban su participación basándose en la confianza que tenían

<sup>35</sup> Global Forum for Health Research. The 10/91 Report on Health Research 2001-2002. Ginebra, 2002

en el personal médico, más que en la materialidad de un consentimiento. Para la mayoría de los entrevistados, el estudio era una prolongación de los cuidados clínicos del paciente. Apoyándose en estos resultados, Ponder *et al.* (2008) recomiendan también flexibilidad a la hora de calificar y/o aprobar los protocolos empleados. Salvando las diferencias, la delimitación entre práctica clínica e investigación puede extrapolarse a otras enfermedades raras, en las que puede ocurrir con frecuencia que el diagnóstico se complique y requiera la participación de múltiples especialistas, así como la utilización de las muestras tomadas con una orientación imprevista a la hora de obtener el consentimiento informado del paciente.

### **Medicamentos huérfanos: ¿un problema exclusivamente económico?**

El período de desarrollo de un medicamento oscila entre 10 y 14 años y el costo de este proceso se sitúa entre 180 y 360 millones de euros. Es lógico que el laboratorio farmacéutico aspire a recuperar la inversión y a tener unos beneficios razonables, de los que depende su propia existencia y, con ella, la posibilidad de extender las aplicaciones terapéuticas de sus productos. Evidentemente, es imposible vender mucho y en poco tiempo si los destinatarios del fármaco son poco numerosos o si, aún siéndolo, su nivel adquisitivo es bajo. Por eso, sería una ligereza culpar exclusivamente a la industria farmacéutica de la falta de *adopción* de las enfermedades huérfanas con vistas a la puesta en el mercado de medicamentos adecuados.

Las leyes que, como se ha dicho antes, se han elaborado en algunos países desarrollados para regular la producción de medicamentos huérfanos incluyen, de una manera o de otra, subvenciones a la industria farmacéutica, de modo que, hoy por hoy, el dinero público es esencial. Pero evidentemente se plantea aquí un problema de difícil solución, ya que en cierto modo enfrenta el bien individual con el bien común. A nivel individual está claro que el médico no debe escatimar recursos para tratar a sus enfermos. El compromiso hipocrático le llevará a defender a toda costa los intereses de su paciente. Pero cuando el problema planteado obliga a tomar macrodecisiones, a nivel colectivo, puede surgir el conflicto entre unos intereses y otros. Por elevados que sean los recursos sanitarios de una comunidad, es obvio que son limitados, aunque las organizaciones humanitarias y los diversos donativos procedentes de la iniciativa privada contribuyan a aumentar los recursos dedicados a financiar la sanidad y, en el caso presente, la producción de medicamentos huérfanos. El dinero empleado en el tratamiento de una enfermedad puede implicar que otra quede sin atención. ¿Qué criterios éticos pueden solucionar los dilemas que se plantean al respecto? Parece claro que no debe cederse a la presión social. No sería ético dedicar fondos al tratamiento de una enfermedad y no de otra simplemente porque los pacientes de la primera hayan logrado constituir un lobby que defienda sus intereses. Son, por tanto, muy numerosos los estudios que se han publicado tratando de dar una solución al problema.

Para esta toma de decisiones, que tiene vertientes económicas y sanitarias, sin olvidar el componente ético, se han adaptado diversas herramientas, basadas en el análisis económico. No es éste el lugar de desarrollar extensamente estos análisis, pero para advertir plenamente el alcance de los problemas planteados puede valer la pena esbozar el análisis más frecuente, el denominado de costo-efectividad.

Un método de análisis económico habitual para la toma de decisiones a propósito de una determinada intervención es el de costo-beneficio, que se basa en la comparación del valor monetario de los gastos totales y el de los beneficios obtenidos o esperados de esa intervención. Si bien el modelo puede servir en muchos aspectos, tiene evidentes dificultades si se quiere aplicar a un problema sanitario. Es posible, por supuesto, valorar en términos monetarios los gastos de todo tipo que implica una determinada acción encaminada a mejorar la salud, pero, aunque muchos lo han intentado, convertir en equivalente monetario los resultados es prácticamente imposible. En la salud y, en general, en la mejora de la calidad de vida, hay múltiples aspectos difíciles, cuando no imposibles, de traducir en dinero.

Por esa dificultad, es bastante corriente emplear el análisis costo-efectividad como herramienta para ayudar en la toma de decisiones en materia de sanidad. El cálculo de costos, incluidos los costos futuros, se realiza más o menos del mismo modo que en un análisis económico convencional. Para el cálculo de la efectividad, es evidente que no basta determinar la mortalidad evitada, como tampoco basta determinar la prolongación de la vida sin tener en cuenta las condiciones en que ésta se produzca. Se ha introducido una magnitud que mide los años de vida prolongados por el tratamiento, corregidos por su calidad. En la literatura anglosajona se expresa esa magnitud con el acrónimo QALY (*quality-adjusted life years*) y en la española es frecuente hablar de “años de vida ajustados por calidad” (AVAC). Es evidente que es en la

determinación de esta magnitud donde radican las dificultades del análisis costo-efectividad. El concepto de calidad de vida es muy difícil de objetivar por razones intrínsecas, ya que puede tener una carga subjetiva muy importante en función de múltiples parámetros, materiales y espirituales, de cada enfermo. Además, aún dando por bueno el modo de determinar la efectividad, no basta con establecer sin más la relación costo/efectividad y elegir la operación de menor cociente. Cuando se trata de comparar el avance esperado para un nuevo tratamiento en comparación con el ya existente, se suele determinar la relación entre la diferencia en costos y la diferencia en efectividad, lo que algunos autores denominan análisis incremental. Los responsables de la política sanitaria establecen entonces un umbral para esta relación, de modo que se acepta una operación nueva cuando no se supera ese umbral.

El *National Institute for Health and Clinical Excellence* (NICE), una organización independiente con base en el Reino Unido que se ocupa de orientar sobre la promoción de la salud y sobre la prevención y tratamiento de la enfermedad, ha adoptado el análisis de costo-efectividad para la evaluación de la conveniencia de diversos tratamientos sanitarios. Entre otras cosas, NICE se basa en que el utilitarismo no tiene prácticamente nada que ofrecer para erradicar las desigualdades en materia sanitaria, principio plenamente aceptable. La Organización Mundial de la Salud ha alabado públicamente las ideas que presiden el desarrollo de la actividad de NICE. En lo que se refiere al desarrollo de medicamentos, aunque no ha hecho una declaración pública al respecto, se estima que establece entre £20.000 y £30.000 por AVAC el umbral para el análisis incremental. Varios países miembros de la Unión Europea han adoptado el método de análisis preconizado por NICE.

No obstante, aún reconociendo el esfuerzo que ha supuesto la elaboración de este modelo de análisis, puede objetarse, siguiendo a Arnesen y Nord (1999), que la valoración de la vida humana en dependencia del estado de salud, en vez de asignar a todas un valor independiente de las limitaciones funcionales, es cuestionable. Recientemente se han levantado otras críticas al sistema propuesto por NICE, a propósito de su posible falta de transparencia y otros defectos que han llevado a Schlander (2008) a concluir que queda aún un largo camino que recorrer hasta llegar a una propuesta plenamente admisible.

Si la toma de decisiones en materia de salud presenta serias dificultades éticas, el caso de los medicamentos huérfanos es especialmente delicado. Por utilizar la terminología que se viene empleando en los últimos párrafos, se puede decir que los costos de producción de un medicamento huérfano son siempre *inefectivos*. El costo por AVAC en este caso puede superar los 150.000 €, una cifra muy superior al umbral fijado por NICE, aunque el Consejo social de esta organización asume que la financiación de estos medicamentos debe apoyarse, puesto que ayudaría a conformar una sociedad más humana. La aceptación o no de este tratamiento excepcional ha planteado un extenso debate. Algunos autores, como McCabe, son partidarios de no establecer un régimen especial de protección de estos medicamentos (McCabe *et al.*, 2005; 2006; 2007), mientras que otros autores defienden que, si se cumplen algunos requerimientos, los pacientes reciban la ayuda suficiente para los medicamentos o tratamientos raros (Drummond *et al.*, 2007; 2009) e incluso excepcionalmente raros (Burls *et al.*, 2005; Hughes *et al.*, 2005).

La diversidad de opiniones se pone de manifiesto también a la hora de decidir, por parte de las autoridades sanitarias, el apoyo de los medicamentos raros o muy raros. Aunque en general hay un consenso favorable al apoyo, se observan diferencias, por ejemplo, entre la política de los diversos miembros de la Unión Europea. Es ilustrativo el ejemplo de la laronidasa un preparado enzimático para el tratamiento de la mucopolisacaridosis tipo I, cuyo costo anual por paciente supera los 600.000 €. El precio del medicamento se reembolsa al 100% al paciente en Alemania, Austria, Dinamarca, España, Finlandia, Francia, Irlanda, Polonia, Portugal y Suecia. En Bélgica se subvenciona totalmente, pero se ha de decidir la conveniencia caso por caso. En Grecia, se reembolsa al paciente sólo el 75% del costo, en Italia y Luxemburgo se subvenciona totalmente pero sólo para uso hospitalario y, finalmente, en el Reino Unido la política de reembolso varía de una región a otra (Hughes *et al.*, 2005).

Si se plantean numerosas incertidumbres a la hora de la financiación de los medicamentos huérfanos destinados a enfermedades raras o muy raras, son más numerosas las sombras que se observan cuando se trata de los medicamentos indicados para enfermedades desatendidas, como denunciaba en 2001 la ONG Médicos sin Fronteras. Entre otras cosas, señalaban las serias dudas que la industria farmacéutica tenía sobre si estos fármacos estaban cubiertos por la legislación sobre medicamentos huérfanos.<sup>36</sup> La Unión Europea aclaró algo más tarde que los medicamentos dirigidos a las enfermedades tropicales podían

<sup>36</sup> Médicos Sin fronteras. *Fatal Imbalance. The Crisis in Research and Development for Drugs for Neglected Diseases*. Ginebra: Médecins Sans Frontières Access to Essential Medicines Campaign and Drugs for Neglected Diseases Working Group, 2001

designarse como huérfanos si reunían todos los criterios de la regulación.<sup>37</sup> Pero a pesar de ello, como se ha comentado más arriba, ninguno de los 44 medicamentos huérfanos aprobados entre 2002 y 2007 por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) está destinado a enfermedades desatendidas. El análisis de las solicitudes presentadas a esta Agencia para obtener la designación de “producto medicinal huérfano”, una situación que implica sólo una autorización previa para iniciar el desarrollo de un medicamento o protocolo destinado a la terapia o diagnóstico de una enfermedad huérfana, permite también obtener resultados reveladores. El estado de las decisiones desde el inicio de la actuación de EMA hasta agosto de 2009 indica que, de las 652 solicitudes presentadas, han obtenido una evaluación positiva 641, es decir, el 98,3%. Este dato puede parecer muy positivo, y en efecto lo es en cuanto que implica un interés, al menos inicial, por apoyar el desarrollo de fármacos huérfanos. Pero si se revisa con detalle el listado, se puede observar que de las 652 solicitudes sólo ha habido 2 orientadas hacia la malaria y 4 para el tratamiento de la tuberculosis, enfermedades ambas que, como se ha comentado anteriormente, se encuentran en el límite de lo que se puede llamar realmente desatendidas. Más aún, una de las dos solicitudes de designación como huérfano de un tratamiento contra la malaria, forma parte de las 11 rechazadas, y una de las razones de denegación aducidas en el informe es que “el tratamiento se propone primariamente para el tratamiento de la malaria en regiones de África donde la enfermedad es endémica”. A enfermedades propiamente desatendidas, concretamente a la leishmaniasis, se refieren sólo 2 de las solicitudes aprobadas, justamente el mismo número de las admitidas para el tratamiento de la alopecia.<sup>38</sup> Puede observarse del análisis de estos datos que, si queda un camino largo por recorrer en el campo de los medicamentos huérfanos, en el caso de las enfermedades desatendidas la situación es verdaderamente preocupante y reclama una urgente toma de conciencia para que las aspiraciones a una mayor solidaridad internacional no se queden en el terreno de los meros deseos ineficaces.

Así pues, a la pregunta con que se iniciaba esta sección sobre si el problema de los medicamentos huérfanos es exclusivamente económico, habría que responder con un rotundo no, por más que encontrar la vía para dar una solución no sea cuestión ni mucho menos trivial.

### **La problemática ética de los ensayos clínicos en las enfermedades huérfanas**

El estudio de los ensayos clínicos desde una perspectiva bioética ha atraído la atención de los especialistas desde hace mucho tiempo y están, en general, bien establecidos los requisitos que ha de cumplir un ensayo clínico para que sea éticamente aceptable. En primer lugar, un ensayo clínico debe estar bien diseñado desde un punto de vista científico, de acuerdo con el principio “lo que no es científico, no es ético” (Franco, 1996). Una de las características fundamentales para el diseño científicamente correcto de un ensayo clínico es que el tamaño y selección de la población de estudio sean adecuados para que los resultados sean estadísticamente significativos. Este requisito plantea dificultades en el estudio de las enfermedades raras, ya que puede ser imposible reunir una población suficientemente amplia para llevar a cabo un ensayo clínico aleatorizado, incluso si se realiza en varios centros. Hace ya casi 15 años, Lilford *et al.* (1995) analizaron desde un punto de vista estadístico las peculiaridades de los ensayos clínicos llevados a cabo en el caso de enfermedades raras y establecieron criterios, basados en la estadística bayesiana, para agrupar varios ensayos realizados con poblaciones reducidas y poco después uno de los autores del trabajo, junto con otros colegas, añadió razones de tipo ético y pragmático para justificar esa postura (Edwards *et al.*, 1997). Posteriormente, Halpern *et al.* (2002) propusieron que los ensayos clínicos de baja potencia estadística sólo pueden ser aceptables desde un punto de vista ético en el caso de enfermedades raras si los investigadores tienen planes explícitos para incluir sus resultados, junto con los de ensayos similares, en un meta-análisis prospectivo. Aunque el artículo de Halpern *et al.* suscitó una cierta polémica en la revista en que se publicó (*Journal of American Medical Association*),<sup>39</sup> ninguna de las réplicas se refería a la conclusión relevante al propósito de este discurso, es decir, no parece haber dudas de que el desarrollo de ensayos clínicos con baja potencia estadística es admisible en el caso de enfermedades raras. Recientemente se han revisado los medios que pueden permitir la

<sup>37</sup> Comisión europea. Comunicación de la Comisión sobre la Regulación (EC) N° 141/2000 sobre productos médicos huérfanos. Diario Oficial de la Unión Europea 2003; C178:2

<sup>38</sup> Los datos precedentes están tomados de la página web de la Agencia Europea del Medicamento, <http://www.emea.europa.eu/htmls/human/orphans/opinions.htm>, con fecha 4 de agosto de 2009

<sup>39</sup> Las cartas sobre el artículo original y la réplica a las mismas de los autores, publicadas en 2002, se encuentran en *J. Am. Med. Assoc.* 288, 2118-2119

obtención de un tamaño óptimo de la muestra en el caso de que sea difícil disponer de pacientes suficientes. La solución propuesta se basa en un diseño secuencial en cuanto al período de realización del ensayo y puede permitir que las enfermedades raras, incluso las infantiles, reciban un tratamiento adecuado al proyectar un ensayo clínico (van der Lee *et al.*, 2008).

Los ensayos clínicos relativos a enfermedades desatendidas también requieren una consideración ética, aunque en este caso los problemas no derivan de la falta de potenciales candidatos a seleccionar, sino más bien de la escasez de medicamentos para tratar dichas enfermedades. En este caso, algunos autores, a nuestro juicio, acertadamente, consideran éticamente aceptable la realización de ensayos clínicos de no-inferioridad o de equivalencia en el caso de enfermedades desatendidas, cuando se puede esperar la disminución de efectos secundarios nocivos. Por ejemplo, ante el rechazo total de Garattini y Bertele' (2007) a los ensayos clínicos no-inferioridad o de equivalencia por razones éticas, Menten y Boelaert (2008) argumentaron que hay casos en que puede admitirse éticamente un ensayo con esa finalidad. Utilizaron como ejemplo el caso de la tripanosomiasis africana y el de la leishmaniasis visceral, pero se podría haber empleado igualmente el ejemplo de la enfermedad de Chagas. Se trata en todos los casos de enfermedades para las que los únicos medicamentos empleados, además de no poseer una eficacia grande, producen daños colaterales en ocasiones graves. El ensayo clínico de un fármaco, para el que no se espera una eficacia mayor de curación, pero con el que se pueden disminuir los riesgos o facilitar la administración, a todas luces perseguiría un objetivo digno de ser investigado.

### Hacia una solución global

En las líneas precedentes se ha puesto de manifiesto que los numerosos intentos de elaborar unas pautas para prestar la debida atención a las enfermedades huérfanas no han sido concluyentes cuando se han basado exclusiva o mayoritariamente en criterios economicistas. A pesar de los innegables avances que se han producido con otras vías de aproximación, por ejemplo mediante la aplicación de los postulados principalistas (Gericke *et al.*, 2005), los problemas siguen en pie y son especialmente acuciantes cuando se trata de enfermedades desatendidas, que afectan a una parte considerable de la humanidad. En varios puntos a lo largo de este discurso se ha esbozado la necesidad de llegar a una solución global, en la que la solidaridad humana se haga presente y procure disminuir el sufrimiento de las personas que padecen enfermedades huérfanas. Ante problema de tal magnitud, en el que se ha tropezado con tantas dificultades, sería pretencioso —e incluso irresponsable— por mi parte intentar dar una respuesta que lo resolviera. Permítaseme, pues, que me limite a aportar algunas reflexiones, con la esperanza de que, junto con las de tantas personas de buena voluntad, sirvan siquiera para dar un paso en el camino hacia una solución justa y, por tanto, plenamente humana.

Esa solución, cualquiera que pueda ser, atañe a toda la comunidad humana, no sólo a los afectados por las enfermedades huérfanas y al personal sanitario que los tiene a su cargo. La solidaridad humana, de la que hemos hablado, se debe traducir en que los problemas, los sufrimientos de cualquier ser humano, se encuentre donde se encuentre, sean también nuestros. Por tanto, es preciso que la comunidad científica contribuya también a la búsqueda de soluciones. Pero me gustaría insistir en que esa búsqueda debe hacerse con una perspectiva de globalidad. Si están cayendo tantas fronteras políticas, económicas y comerciales, ¿qué razón habría para que se mantuvieran esas fronteras a la hora de compartir conocimientos científicos, potencialidad de investigación, especialmente en materia de salud, y recursos?

Soy consciente de que hablar de compartir recursos puede chocar con el egoísmo, con la tendencia a la individualidad que, en mayor o menor medida, a todos nos amenazan. Buena cosa será para dominarlos que intentemos hacer ese ejercicio de imaginación, de ponernos en el lugar de los otros al que antes aludía, intentando no excluir a nadie de ese conjunto de *otros*. No se trata de plantear disyuntivas artificiales que pretendan elegir entre los pacientes de esta o aquella enfermedad a la hora de prestarles la asistencia debida; no se trata de enfrentar las enfermedades raras con las enfermedades desatendidas; no se trata de detraer fondos destinados al cuidado de los enfermos de un país para dedicarlos a los de otro. Eso equivaldría a transgredir esa sentencia popular que condena el *desvestir a un santo para vestir a otro*. No; se trata de vestir a los dos. Es obvio que ni una persona, ni una colectividad, ni una organización aislada por poderosa que sea, pueden hacer frente a la totalidad de los problemas sanitarios de la humanidad, a pesar de los muchos esfuerzos que, afortunadamente se están llevando a cabo en esta línea. Hace falta una solución global que, de un modo u otro, involucre a todos.

Acabo de mencionar que se están llevando a cabo muchos esfuerzos para superar esas barreras sanitarias que aún existen. Limitándonos a iniciativas realmente transnacionales, pueden bastar dos o tres ejemplos de ellos. En 2003 se fundó la iniciativa “Medicamentos para Enfermedades Desatendidas” (DNDi, Drugs for Neglected Diseases) constituida por cinco organismos públicos de investigación —la Fundación Oswaldo Cruz de Brasil, el Indian Council of Medical Research, el Kenya Medical Research Institute, el Ministerio de Sanidad de Malasia y el Instituto Pasteur francés—, la Organización Mundial de la Salud a través de su programa de investigación en enfermedades tropicales y la ONG Médicos sin Fronteras. La iniciativa ha desarrollado el más amplio programa de I+D para enfermedades parasitarias y ha hecho posible ya la implementación de tres nuevos tratamientos para enfermedades desatendidas. Por su parte, Global Network for Neglected Tropical Diseases agrupa a dos institutos universitarios de investigación en enfermedades tropicales y a 4 organizaciones sin ánimo de lucro en un intento de conseguir fondos para tratar enfermedades desatendidas.

La aspiración de todos a una adecuada atención sanitaria se ha recogido en innumerables textos legales. La Constitución Española, por ejemplo, establece en su artículo 43, 1: “Se reconoce el derecho a la protección de la salud”. Y la Declaración Universal de Derechos Humanos, en su artículo 25, 1 dice: “Toda persona tiene derecho a un nivel de vida adecuado que le asegure, así como a su familia, la salud y el bienestar, y en especial la alimentación, el vestido, la vivienda, la asistencia médica y los servicios sociales necesarios”. El artículo 28 de esa misma Declaración va más allá, por cuanto pretende garantizar que ese derecho se pueda reclamar a nivel global: “Toda persona tiene derecho a que se establezca un orden social e internacional en el que los derechos y libertades proclamados en esta Declaración se hagan plenamente efectivos”.

Quizá en este momento se puede preguntar, ¿no basta que en estos y en otros muchos textos legales se garantice el derecho a la salud, contando incluso con la cooperación internacional? Para contestar a esta pregunta pueden ser adecuadas unas recientes palabras del Papa Benedicto XVI: “Se aprecia con frecuencia una relación entre la reivindicación del derecho a lo superfluo, e incluso a la transgresión y al vicio, en las sociedades opulentas, y la carencia de comida, agua potable, instrucción básica o cuidados sanitarios elementales en ciertas regiones del mundo subdesarrollado y también en la periferia de las grandes ciudades. Dicha relación consiste en que los derechos individuales, desvinculados de un conjunto de deberes que les dé un sentido profundo, se desquician y dan lugar a una espiral de exigencias prácticamente ilimitada y carente de criterios. La exacerbación de los derechos conduce al olvido de los deberes. Los deberes delimitan los derechos porque remiten a un marco antropológico y ético en cuya verdad se insertan también los derechos y así dejan de ser arbitrarios. Por este motivo, los deberes refuerzan los derechos y reclaman que se los defiendan y promuevan como un compromiso al servicio del bien. En cambio, si los derechos del hombre se fundamentan sólo en las deliberaciones de una asamblea de ciudadanos, pueden ser cambiados en cualquier momento y, consiguientemente, se relaja en la conciencia común el deber de respetarlos y tratar de conseguirlos”.<sup>40</sup>

Efectivamente, “los deberes delimitan los derechos” y es preciso tener en cuenta esos deberes de todos con respecto a todos para no conculcar los derechos de los demás. Un reciente artículo editorial, publicado por invitación en el *Canadian Medical Association Journal*, terminaba con las siguientes palabras: “Estas decisiones [las referentes al tratamiento de las enfermedades raras] tienen que hacerse contemplando las responsabilidades del médico, la viabilidad económica, la igualdad de oportunidades y nuestras obligaciones globales, pero enfocando claramente a la persona individual ante cada uno de nosotros” (Fernández, 2007).

Mirar a cada persona individual: esa idea puede marcar el camino hacia una solución, que se nos antoja lejana, pero es posible, del problema de conjugar nuestros deberes con los derechos de los demás. Por centrarnos en la línea de este discurso, deberes y derechos en el ámbito de la sanidad, en el de las enfermedades huérfanas. Entre nuestros deberes sin duda está ese prescindir de la reivindicación del derecho a lo superfluo y, ¿quién no podría señalar varias y aún muchas actuaciones superfluas en el gasto sanitario? Mirar a cada persona es mirar a su inalienable dignidad, sea sano o paciente de una enfermedad rara, muy rara u olvidada, dignidad que reclama nuestra cooperación. Este es el prisma con el que la Bioética de inspiración personalista contempla los problemas, teniendo en cuenta que cada persona tiene una cierta dimensión de totalidad, que no debe quedar eclipsada, sino reforzada, por su pertenencia a una comunidad. Como escribe Burgos: “La afirmación de la centralidad de la persona como

<sup>40</sup> Benedicto XVI, Carta Enc. *Caritas in veritate*, n° 43, 2009.



*sujeto social* permite al personalismo crear un punto de anclaje y de referencia entre los extremos del individualismo liberal y los colectivismos. Lo radicalmente importante, no es ni la sociedad en cuanto tal ni el individuo egoísta, sino la persona en relación con los demás. La sociedad es, fundamentalmente, un entramado de relaciones comerciales, educativas, de bienestar y salud, etc., que debe estar al servicio de las personas concretas, no de anónimas fuerzas colectivas. Pero la persona, por su parte, no debe ser un mero receptor egoísta de los beneficios que le reportan esas relaciones, sino que debe poner su esfuerzo al servicio de los demás. Éste es el núcleo central sobre el que se funda la doctrina personalista de la relación del hombre con la sociedad” (Burgos, 2000).

¿Es una utopía pensar que la humanidad puede llegar un día a vivir estos ideales? No lo será, si nos enfrentamos de verdad con nuestros deberes cara a los demás. Entonces podremos decir con Chesterton, “nunca pude admitir una utopía que no me deje la libertad que yo más estimo: la de obligarme”.

## Conclusión

He de terminar; no debo abusar más de vuestra paciencia. Al inicio de mi discurso agradecía a los miembros de esta Corporación la confianza que en mí depositaron al elegirme y con otros agradecimientos quiero terminar. Soy plenamente consciente de que si el hecho de que esté hoy ocupando esta tribuna se debe a vuestra benevolencia, también se debe a la imprescindible contribución de tantas personas. Contribución tan importante que eclipsa los pocos méritos personales que pudiera exhibir. Es de justicia que agradezca a mis padres su cariño, su dedicación, su guía constante y, ¿por qué no decirlo?, su exigencia, que tanto contribuyó a mi formación. Mis profesores, tanto en mi etapa escolar como en la universitaria, merecen también mi más hondo agradecimiento. Permítaseme destacar entre mis excelentes profesores universitarios a D. Enrique Gutiérrez Ríos y a D. Manuel Lora Tamayo, de quienes aprendí tantos hábitos científicos y humanos y a un ilustre valenciano, D. Enrique Costa Novella, miembro de la Real Academia Nacional de Medicina, que me animó a iniciar la carrera universitaria cuando, al término de mi periodo de licenciatura dudaba aún qué camino seguir.

Pero deseo hacer una mención especial de mi maestro, el Prof. Ángel Martín Municio, que me introdujo en el apasionante campo de la Bioquímica, orientó mis primeros pasos investigadores al dirigirme la tesis doctoral y me honró con su magisterio y con su amistad hasta su prematura muerte.

Mis colaboradores, tanto en mi etapa madrileña, como en la valenciana, han sido muchísimo más que compañeros de trabajo: han sido quienes han hecho posible las cosas buenas que pueda haber en mi investigación y sobre todo, han sido amigos. A mis colaboradores actuales, Maribel Rodrigo, Gerardo López Rodas y Natalia Sacilotto, y a José Luis Rodríguez, Elena Georgieva y Andrés Gagete, que lo fueron hasta hace poco, debo una mención muy especial.

A todos, muchas gracias.

## Epílogo

Durante el tiempo en que he estado en el uso de la palabra,

—4.800 personas han fallecido en todo el mundo. 1.500 de estas muertes se han debido a la pobreza y a sus consecuencias.

—63 personas han muerto a causa de enfermedades desatendidas, 4 de ellas por la enfermedad de Chagas.

—170 personas han contraído leishmaniasis y 5 han fallecido a causa de ella.

—134 personas han fallecido a causa de la tuberculosis y 78 por la malaria.

—18 personas han contraído lepra y una ha fallecido por esta enfermedad.

—24 personas han muerto por esquistosomiasis.

—13 niños han fallecido por obstrucción intestinal causada por helmintiasis.

—Se han producido 3.900 abortos, 10 de ellos en España.

—Han nacido 400 niños con enfermedades raras de origen genético.

—Otros 100 niños de los que acaban de nacer contraerán alguna enfermedad rara a lo largo de su vida.

—El sistema sanitario español ha gastado en cada uno de nosotros 14 céntimos de euro. Quizá nos parezca una cifra exigua, pero es la cantidad de que dispone un ciudadano de Etiopía para gastar en sanidad durante 20 días.

—Cerca de 11.500 niños han llegado al mundo.

Ojalá estas cifras, si mis torpes palabras no han servido para ello, nos hagan a todos más conscientes del grave problema humano que representan las enfermedades huérfanas y hagamos de nuestro mundo un espacio adecuado para que esos niños puedan crecer sanos, física y espiritualmente.

## Bibliografía

- Aapola, U., Liiv, I. y Peterson, P. (2002) Imprinting regulator DNMT3L is a transcriptional repressor associated with histone deacetylase activity. *Nucleic Acids Res.* **30**, 3602-3608.
- ABRAHAM, R. T. (2003) Checkpoint signaling: epigenetic events sound the DNA strand-breaks alarm to the ATM protein kinase. *BioEssays* **25**, 627-630
- ACQUATELLA, H. (2008) Predicción de insuficiencia cardiaca y mortalidad por miocardiopatía crónica chagásica. Una enfermedad nueva en España. *Rev. Esp. Cardiol.* **61**, 105-107.
- AI, L., VO, Q. N., ZUO, C., LI, L., LING, W., SUEN, J. Y., HANNA, E., BROWN, K. D. Y FAN, C.-Y. (2004) Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) gene in head and neck squamous cell carcinoma: Promoter hypermethylation with clinical correlation in 100 cases. *Canc. Epidemiol. Biomark. Prev.* **13**, 150-156.
- ALLEN, C. Y REARDON, W. (2005) Assisted reproduction technology and defects of genomic imprinting. *BJOG* **112**, 1589-1594.
- ALLFREY, V. G., FAULKNER, R. Y MIRSKY, A. E. (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **51**, 786-794.
- ALLIS, C. D., CHICOINE, L. G., RICHMAN, R. Y SCHULMAN, I. G. (1985) Deposition-related histone acetylation in micronuclei of conjugating *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 8048-8052.
- Amariglio, N., Hirshberg, A., Scheithauer, B. W., Cohen, Y., Loewenthal, R., Trakhtenbrot, L., Paz, N., Koren-Michowitz, M., Waldman, D., Leider-Trejo, L., Toren, A., Constantini, S. y Rechavi G. (2009) Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med.* **6**, e1000029.
- AMIR, R. E., VAN DEN VEYVER, I. B., WAN, M., TRAN, C. Q., FRANCKE, U. Y ZOGHBI, H. Y. (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet.* **23**, 185-188.
- AMOR, D. J. Y HALLIDAY, J. (2008) A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. *Hum. Reprod.* **23**, 2826-2834.

- ARAÚJO-JORGE, T. C., WAGHABI, M. C., SOEIRO, M. N. C., KERAMIDAS, M., BAILLY, S. Y FEIGE, J.-J. (2008) Pivotal role for TGF- $\beta$  in infectious heart disease: The case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequent Chagasic myocardial pathology. *Cytok. Growth Fact. Rev.* **19**, 405-413.
- ARENTS, G., BURLINGAME, R. W., WANG, B. C., LOVE, W. E., Y MOUDRIANAKIS, E. N. (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 10148-10152.
- ARENTS, G. Y MOUDRIANAKIS, E. N. (1993) Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10489-10493.
- ARNAUD, P. Y FEIL, R. (2005) Epigenetic deregulation of genomic imprinting in human disorders and following assisted reproduction. *Birth Def. Res. (Part C)* **75**, 81-97.
- ARNESEN, T. Y NORD, E. (1999) The value of DALY life: problems with ethics and validity of disability adjusted life years. *BMJ* **319**, 1423-1425.
- ARONOV, A. M., SURESH, S., BUCKNER, F. S., VAN VOORHIS, W. C., VERLINDE, C. L. M. J., OPPERDOES, F. R. HOL, W. G. J. Y GELB, M. H. (1999) Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 4273-4278.
- AUSIÓ, J., LEVIN, D. B., DE AMORIM, G. V., BAKKER, S. Y MACLEOD, P. M. (2003) Syndromes of disordered chromatin remodeling. *Clin. Genet.* **64**, 83-95.
- BADYAL, D. (2006) Letter. *Indian J. Pharmacol.* **38**, 299-300.
- BAKKER, B. M., MICHELS, P. A. M., OPPERDOES, F. R. Y WESTERHOFF, H. V. (1997) Glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei* can be understood in terms of the kinetics of the glycolytic enzymes. *J. Biol. Chem.* **272**, 3207-3215.
- BAKKER, B. M., MENSONIDES, F. I. C., TEUSINK, B., VAN HOEK, P., MICHELS, P. A. M. Y WESTERHOFF, H. V. (2000a) Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 2087-2092.
- BAKKER, B. M., WESTERHOFF, H. V., OPPERDOES, F. R. Y MICHELS, P. A. M. (2000b) Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. *Mol. Biochem. Parasitol.* **106**, 1-10.
- BALL, L. G. Y XIAO, W. (2005) Molecular basis of ataxia telangiectasia and related diseases. *Acta Pharm. Sin.* **26**, 897-907.
- BALLESTAR, E., ABAD, C. Y FRANCO, L. (1996) Core histones are glutaminyl substrates for tissue transglutaminase. *J. Biol. Chem.* **271**, 18817-18824.
- BALLESTAR, E. Y FRANCO, L. (1997) Use of the transglutaminase reaction to study the dissociation of histone N-terminal tails from DNA in nucleosome core particles, *Biochemistry* **36**, 5963-5969.
- BALLESTAR, E., PILE, L. A., WASSARMAN, D. A., WOLFFE, A. P. Y WADE, P. A. (2001) A *Drosophila* MBD family member is a transcriptional corepressor associated with specific genes. *Eur. J. Biochem.* **268**, 5397-5406.
- BARRETT, M. P., BURCHMORE, R. J. S., STICH, A. LAZZARI, J. O., FRASCH, A. C., CAZZULO, J. J. Y KRISHNA, S. (2003) The trypanosomiases. *Lancet* **362**, 1469-1480.
- BARTON, S. C., SURANI, M. A. Y NORRIS, M. L. (1984) Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* **311**, 374-376.
- BASSING, C. H., SUH, H., FERGUSON, D. O., CHUA, K. F., MANIS, J., ECKERSDORFF, M., GLEASON, M., BRONSON, R., LEE, C. Y ALT, F. W. (2003) Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell* **114**, 359-370.
- BEAUCHAMP, T. L. Y CHILDRESS, J. F. (2001) Principles of Biomedical Ethics. Oxford University Press, Oxford.
- BENAÏM, G., SANDERS, J. M., GARCIA-MARCHAN, Y., COLINA, C., LIRA, R., CALDERA, A. R., PAYARES, G., SANOJA, C., BURGOS, J. M., LEON-ROSSELL, A., CONCEPCION, J. L., SCHIJMAN, A. G., LEVIN, M., OLDFIELD, E. Y URBINA, J. A. (2006) Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J. Med. Chem.* **49**, 892-899.
- BERN, C., MONTGOMERY, S. P., HERWALDT, B. L., RASSI JR, A., MARIN-NETO, J. A., DANTAS, R. O., MAGUIRE, J. H., ACQUATELLA, H., MORILLO, C., KIRCHHOFF, L. V., GILMAN, R. H., REYES, P. A., SALVATELLA, R. Y MOORE, A. C. (2007) Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States. A systematic review. *J. Am. Med. Assoc.* **298**, 2171-2181.

- Bernstein, B. E., Meissner, A. y Lander, E. S. (2007) The mammalian epigenome. *Cell* **128**, 669-681.
- BESTOR, T. H. (1992) Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *EMBO J.* **11**, 2611-2617.
- BILATE, A.M. B. Y CUNHA-NETO, E. (2008) Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* **50**, 67-74.
- BIRD, A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6-21.
- BITON, S., DAR, I., MITTELMAN, L., PEREG, Y., BARZILAI, A. Y SHILOH, Y. (2006) Nuclear ataxia-telangiectasia mutated (ATM) mediates the cellular response to DNA double strand breaks in human neuron-like cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 17482-17491.
- BITON, S., GROPP, M., ITSYKSON, P., PEREG, Y., MITTELMAN, L., JOHE, M., REUBINOFF, B. Y SHILOH, Y. (2007) ATM-mediated response to DNA double strand breaks in human neurons derived from stem cells. *DNA Repair (Amst.)* **6**, 128-134.
- BITON, S., BARZILAI, A. Y SHILOH, J. (2008) The neurological phenotype of ataxia-telangiectasia: Solving a persistent puzzle. *DNA Repair (Amst.)* **7**, 1028-1038.
- BLIEK, J., VERDE, G., CALLAWAY, J. MAAS, S. M., DE CRESCENZO, A., SPARAGO, A., CERRATO, F., RUSSO, S., FERRAIUOLO, S., RINALDI, M. M., FISCHETTO, R., LALATTA, F., GIORDANO, L., FERRARI, P., CUBELLIS, M. V., LARIZZA, L., TEMPLE, I. K., MANNENS, M. M., MACKAY, D. J. Y RICCIO, A. (2009) Hypomethylation at multiple maternally methylated imprinted regions including PLAGL1 and GNAS loci in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **17**, 611-619.
- BLUM, J. A., ZELLWEGER, M. J., BURRI, C. Y HATZ, C. (2008) Cardiac involvement in African and American trypanosomiasis. *Lancet Infect. Dis.* **8**, 631-641.
- BOCCHI, E. A., GUIMARÃES, G., TARASOUTSHI, F., SPINA, G., MANGINI, S. Y BACAL, F. (2009) Cardiomyopathy, adult valve disease and heart failure in South America. *Heart* **95**, 181-189.
- BODER, E. Y SEDGWICK, R. P. (1958). Ataxia-telangiectasia; a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. *Pediatrics* **21**, 526-554.
- BOGGS, B. A., CONNORS, B., SOBEL, R. E., CHINAULT, A. C. Y ALLIS, C. D. (1996) Reduced levels of histone H3 acetylation on the inactive X chromosome in human females. *Chromosoma* **105**, 303-309.
- BOTT, L., THUMERELLE, C., CUVELLIER, J. C., DESCHILDRE, A., VALLEE, L. Y SARDET, A. (2006) Ataxie-télangiectasie: de la clinique à la physiopathologie. *Arch. Pediat.* **13**, 293-298.
- BOTTOMLEY, M. J., LO SURDO, P., DI GIOVINE, P., CIRILLO, A., SCARPELLI, R., FERRIGNO, F., JONES, P., NEDDERMANN, P., DE FRANCESCO, R., STEINKÜHLER, C., GALLINARI, P. Y CARFI, A. (2008) Structural and functional analysis of the human HDAC4 catalytic domain reveals a regulatory structural zinc-binding domain. *J. Biol. Chem.* **283**, 26694-26704.
- BRONOWSKI, J. (1968) *The common sense of science*. Penguin Books, Harmondsworth, U. K.
- BROWNELL, J. E. Y ALLIS, C.D. (1995) An activity gel assay detects a single, catalytically active histone acetyltransferase subunit in *Tetrahymena* macronuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 6364-6368.
- BROWNELL, J. E., ZHOU, J., RANALLI, T., KOBAYASHI, R., EDMONSON, D. G., ROTH, S. Y. Y ALLIS, C. D. (1996) *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**, 843-851.
- BUCKNER, F. S. (2008) Sterol 14-demethylase inhibitors for *Trypanosoma cruzi* infections, en *Drug Targets in Kinetoplastid Parasites*, (MAJUNDER, H. K., ed.), pp. 61–80. Landes Bioscience, Austin, Texas.
- BURGOS, J. M. (2000) El personalismo. Palabra, Madrid.
- BURLS, A., AUSTIN, D. Y MOORE, D. (2005) Commissioning for rare diseases: view from the frontline. *BMJ* **331**, 1019-1021.
- BURMA, S., CHEN, B. P., MURPHY, M., KURIMASA, A. Y CHEN, D. J. (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* **276**, 42462-42467.
- BUSCHIAZZO, A., AMAYA, M. F., CREMONA, M. L., FRASCH, A. C. Y ALZARI, P. M. (2002) The crystal structure and mode of action of trans-sialidase, a key enzyme in *Trypanosoma cruzi* pathogenesis. *Mol. Cell* **10**, 757-768.

- BUSTIN, M., TRIESCHMANN, L. Y POSTNIKOV, Y. V. (1995) The HMG-14/17 chromosomal protein family: architectural elements that enhance transcription from chromatin templates. *Semin. Cell Biol.* **6**, 247-255.
- BYRNES, G. B., SOUTHEY, M. C. Y HOPPER, J. L. (2008) Are the so-called low penetrance breast cancer genes, *ATM*, *BRIP1*, *PALB2* and *CHEK2*, high risk for women with strong family histories? *Breast Canc. Res.* **10**, 208.
- CAMPOS-CASTELLÓ, J. (2001) Medicamentos huérfanos y enfermedades huérfanas. *Rev. Neurol.* **33**, 216-220.
- CASCANTE, M., BOROS, L. G., COMIN-ANDUIX, B., DE ATAURI, P., CENTELLES, J. J. Y LEE, P. W.-N. (2002) Metabolic control analysis in drug discovery and disease. *Nat. Biotech.* **20**, 243-249.
- CASONA, A. (RODRÍGUEZ ÁLVAREZ, ALEJANDRO) (1945) La barca sin pescador, en *Obras Completas de Alejandro Casona*. Aguilar, Madrid, 1969.
- Chagas, C. (1909) Nova Tripanosomiase humana. Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico da nova entidade morbida do homen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1**, 159-218.
- CHEN, P., PENG, C., LUFF, J., SPRING, K., WATTERS, D., BOTTLE, S., FURUYA, S. Y LAVIN, M. F. (2003) Oxidative stress is responsible for deficient survival and dendritogenesis in Purkinje neurons from ataxia-telangiectasia mutated mutant mice. *J. Neurosci.* **23**, 11453-11460.
- CHEN, Y., YANG, Y., WANG, F., WAN, K., YAMANE, K., ZHANG, Y. Y LEI, M. (2006) Crystal structure of human histone lysine-specific demethylase 1 (LSD1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 13956-13961.
- CHUNG, M. C., FERREIRA, E. I., SANTOS, J. L., GIAROLLA, J., RANDO, D. G., ALMEIDA, A. E., BOSQUESI, P. L., MENEGON, R. F. Y BLAU, L. (2008) Prodrugs for the treatment of neglected diseases. *Molecules* **13**, 616-677.
- CLAPIER, C. R. Y CAIRNS, B. R. (2009) The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 273-304.
- CLEAVER, J. E. (1968) Defective DNA repair replication in xeroderma pigmentosum. *Nature* **218**, 652-656.
- CLEMENTE, S., FRANCO, L. Y LÓPEZ-RODAS, G. (2001) Distinct site specificity of two pea histone deacetylase complexes. *Biochemistry* **40**, 10671-10676.
- CLEMENTS, A., POUX, A. N., LO, W. S., PILLUS, L., BERGER, S. L. Y MARMORSTEIN, R. (2003) Structural basis for histone and phosphohistone binding by the GCN5 histone acetyltransferase. *Mol. Cell.* **12**, 461-473.
- CLOOS, P. A. C., CHRISTENSEN, J., AGGER, K., MAIOLICA, A., RAPPSILBER, J., ANTAL, T., HANSEN, K. H. Y HELIN, K. (2006) The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature* **442**, 307-311.
- CLOOS, P. A. C., CHRISTENSEN, J., AGGER, K. Y HELIN, K. (2008) Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Gen. Develop.* **22**, 1115-1140.
- COHEN, M. M. JR. (2005) Beckwith-Wiedemann syndrome: historical, clinicopathological, and etiopathogenetic perspectives. *Pediatr. Dev. Pathol.* **8**, 287-304.
- COOPER, W. N., LUHARIA, A., EVANS, G. A., RAZA, H., HAIRE, A. C., GRUNDY, R., BOWDIN, S. C., RICCIO, A., SEBASTIO, G., BLIEK, J., SCHOFIELD, P. N., REIK, W., MACDONALD, F. Y MAHER, E. R. (2005) Molecular subtypes and phenotypic expression of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **13**, 1025-1032.
- CORNFORTH, M. N. Y BEDFORD, J. S. (1985) On the nature of a defect in cells from individuals with ataxia-telangiectasia. *Science* **227**, 1589-1591.
- CORNISH-BOWDEN, A. Y CÁRDENAS, M. L. (2003) Metabolic analysis in drug design. *C. R. Biologies* **326**, 509-515.
- CÔTÉ, J., QUINN, J., WORKMAN, J. L. Y PETERSON, C. L. (1994) Stimulation of *GAL4* derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* **265**, 53-60.
- COURA, J.R. Y DE CASTRO, S. L. (2002) A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **97**, 3-24.
- COX, G.F., BURGER, J., LIP, V., MAU, U. A., SPERLING, K., WU, B. L. Y HORSTHEMKE, B. (2002) Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 162-164.
- CRICK, F. H. C. (1958) On protein synthesis. *Symp. Soc. Exptl. Biol.* **12**, 138-163.

- CSORDAS, A. (1990) On the biological role of histone acetylation. *Biochem. J.* **265**, 23-38.
- CZORNAK, K., CHUGHTAI, S. Y CHRZANOWSKA, K. H. (2008) Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair. *J. Appl. Genet.* **49**, 383-396.
- DABAN, J. R. Y BERMÚDEZ, A. (1998) Interdigitated solenoid model for compact chromatin fibers. *Biochemistry* **37**, 4299-4304.
- DAR, I., BITON, S., SHILOH, Y. Y BARZILAI, A. (2006) Analysis of the ataxia telangiectasia mutated-mediated DNA damage response in murine cerebellar neurons. *J. Neurosci.* **26**, 7767-7774.
- DAVIES, D. M. (1983) Orphan drugs. *Lancet* **321**, 290-291.
- DE RYCKE, M., LIEBAERS, I. Y VAN STEIRTEGHEM, A. (2002) Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance. *Hum. Reprod.* **17**, 2487-2494.
- DE SOUZA, W. (2002) Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Pharm. Des.* **8**, 269-285.
- DE SOUZA, W. (2008a) Electron microscopy of trypanosomes — A historical view. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **103**, 313-325.
- DE SOUZA, W. (2008b) An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 822-838.
- DEAN, S., MARCHETTI, R., KIRK, K. Y MATTHEWS, K. R. (2009) A surface transporter family conveys the trypanosome differentiation signal. *Nature* **459**, 213-218.
- DEBAUN, M. R., NIEMITZ, E. L. Y FEINBERG, A. P. (2003) Association of *in vitro* fertilization with Beckwith–Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 156-160.
- DELANGE, R. J., FAMBROUGH, D. M., SMITH, E. L. Y BONNER, J. (1969) Calf and pea histone IV. II. Complete amino acid sequence of calf thymus histone IV; presence of N-,acetyl-lysine. *J. Biol. Chem.* **244**, 319-334.
- DELANGE, R. J., FAMBROUGH, D. M., SMITH, E. L. Y BONNER, J. (1969) Calf and pea histone IV. III. Complete amino acid sequence of pea seedling histone IV; comparison with homologous calf thymus histone. *J. Biol. Chem.* **244**, 5669-5679.
- DORIGO, B., SCHALCH, T., KULANGARA, A., DUDA, S., SCHROEDER, R. R. Y RICHMOND, T. J. (2004) Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science* **306**, 1571-1573.
- DOWLING, D. P., GANTT, S. L., GATTIS, S. G., FIERKE, C. A. Y CHRISTIANSON, D. W. (2008) Structural studies of human histone deacetylase 8 and its site-specific variants complexed with substrate and inhibitors. *Biochemistry* **47**, 13554-13563.
- DOYLE, P. S., SAJID, M., O'BRIEN, T., DUBOIS, K., ENGEL, J. C., MACKAY, Z. B. Y REED, S. (2008) Drugs targeting parasite lysosomes. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 889-900.
- DRUMMOND, M. F., WILSON, D. A., KANAVOS, P., UBEL, P. Y ROVIRA, J. (2007) Assessing the economic challenges posed by orphan drugs. *Int. J. Technol. Assess Health Care* **23**, 36-42.
- DRUMMOND, M., EVANS, B., LELORIER, J., KARAKIEWICZ, P., MARTIN, D., TUGWELL, P. Y MACLEOD, S. (2009) Evidence and values: requirements for public reimbursement of drugs for rare diseases—a case study in oncology. *Can. J. Clin. Pharmacol.* e273-281.
- DU, L., POLLARD, J. Y GATTI, R. A. (2007) Correction of prototypic ATM splicing mutations and aberrant ATM function with antisense morpholino oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 6007-6012.
- DUBNER, S., SCHAPACHNIK, E., PÉREZ RIERA, A. R. Y VALERO, E. (2008) Chagas disease: State-of-the-art of diagnosis and management. *Cardiol. J.* **15**, 493-504.
- DYDA, F., KLEIN, D. C. Y HICKMAN, A. B. (2000) GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 81-103.
- EDEN, S., HASHIMSHONY, T., KESHET, I., CEDAR, H., THORNE, A. W. (1998) DNA methylation models histone acetylation. *Nature* **394**, 842.
- EDWARDS, S. J. L., LILFORD, R. J., BRAUNHOLTZ, D. Y JACKSON, J. (1997) Why “underpowered” trials are not necessarily unethical. *Lancet* **350**, 804-807.
- EHRLICH, M. (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Res.* **10**, 2709-2721.
- ELTSOV, M., MACLELLAN, K. M., MAESHIMA, K., FRANGAKIS, A. S. Y DUBOCHET, J. (2008) Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 19732-19737.

- FEINBERG, A. P. (2007) Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* **447**, 433-440.
- FEINBERG, A. P. Y VOGELSTEIN, B. (1983) Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**, 89-92.
- FELL, D. (1997) *Understanding the Control of Metabolism*. Portland Press, London.
- FERNANDEZ, C. V. (2007) Our moral obligations in caring for patients with orphan cancers. *Can. Med. Asoc. J.* **176**, 297-298.
- FERRAZ, A. (1982) Historia y ciencia. *Boletín Informativo de la Fundación Juan March* **117**, 40-44.
- FICNER, R. (2009) Novel structural insights into class I and II histone deacetylases. *Curr. Top. Med. Chem.* **9**, 235-240.
- FINGERMAN, I. M., DU, H. N. Y BRIGGS, S. D. (2008) Controlling histone methylation via trans-histone pathways. *Epigenetics* **3**, 237-242.
- FINNIN, M. S., DONIGIAN, J. R. Y PAVLETICH, N. P. (2001) Structure of the histone deacetylase SIRT2. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 621-625.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M., KOSTAS, S., DRIVER, S. Y MELLO, C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- FISCHLE, W., WANG, Y., JACOBS, S. A., KIM, Y., ALLIS, C. D. Y KHORASANIZADEH, S. (2003) Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev.* **17**, 1870-1881.
- FISCHLE, W., TSENG, B. S., DORMANN, H. L., UEBERHEIDE, B. M., GARCIA, B. A., SHABANOWITZ, J., HUNT, D. F., FUNABIKI, H. Y ALLIS, C. D. (2005) Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* **438**, 1116-1122.
- FRANCO, L. (1997) Ética de la investigación—Ética del investigador, en *Cuestiones de Bioética*, pp. 95-106, Fundación Valenciana de Estudios Avanzados, Valencia.
- FRANCO, L. (2000) Histone acetylation and the regulation of gene expression, en *V Workshop on "Methionine Metabolism: Molecular and Clinical Implications"*, pp. 105-120. Universidad de Navarra.
- FRANCO, L. (2001) Bioética y solidaridad, en *Manual de Bioética* (TOMÁS GARRIDO, G. M., ed.), pp. 83-95. Ariel Ciencia, Barcelona.
- FRANCO, L. (2008) El código genético cumple 40 años. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp.)* **102**, 201-213.
- FUKUDA, H., SANO, N., MUTO, S. Y HORIKOSHI, M. (2006) Simple histone acetylation plays a complex role in the regulation of gene expression. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **5**, 190-208.
- GARATTINI, S. Y BERTELE, V. (2007) Non-inferiority trials are unethical because they disregard patients' interests. *Lancet* **370**, 1875-1877.
- GARCEA, R. L. Y ALBERTS, B. M. (1980) Comparative studies of histone acetylation in nucleosomes, nuclei, and intact cells. Evidence for special factors which modify acetylase action. *J. Biol. Chem.* **255**, 11454-11463.
- GARCÍA-RAMÍREZ, M., ROCCHINI, C. Y AUSIÓ, J. (1995) Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *J. Biol. Chem.* **270**, 17923-17928.
- GATTI, R. A. BERKEL, I., BODER, E., BRAEDT, G., CHARMLEY, P., CONCANNON, P., ERSOY, F., FOROUD, T., JASPERS, N. G. J., LANGE, K., LATHROP, G. M., LEPPERT, M., NAKAMURA, Y., O'CONNELL, P., PATERSON, M., SALSER, W., SANAL, O., SILVER, J., SPARKES, R. S., SUSI, E., WEEKS, D. E., WEI, S., WHITE, R. Y YODER, F. (1988) Localization of an ataxiatelangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* **336**, 577-580.
- GEORGIEVA, E. I., LÓPEZ-RODAS, G., SENDRA, R., GROBNER, P. Y LOIDL, P. (1991) Histone acetylation in *Zea mays*. II. Biological significance of post-translational histone acetylation during embryo germination. *J. Biol. Chem.* **266**, 18751-18760.
- GERICKE, C. A., RIESBERG, A. Y BUSSE, R. (2005) Ethical issues in funding orphan drug research and development. *J. Med. Ethics* **31**, 164-168.
- GERLITZ, G. Y BUSTIN, M. (2009) Nucleosome binding proteins potentiate ATM activation and DNA damage response by modifying chromatin. *Cell Cycle* **8**, 1641.
- GICQUEL, C., GASTON, V., MANDELBAUM, J., SIFFROI, J. P., FLAHAULT, A. Y LE BOUC, Y. (2003) *In vitro* fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN10T gene. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 1338-1341.

- GOLL, M. G. Y BESTOR, T. H. (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 481-514.
- GOODARZI, A. A., JONNALAGADDA, J. C., DOUGLAS, P., YOUNG, D., YE, R., MOORHEAD, G. B., LEES-MILLER, S. P. Y KHANNA, K. K. (2004) Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A. *EMBO J.* **23**, 4451-4461.
- GREER, K. J., KIRKPATRICK, S. J., WEKSBERG, R. Y PAULI, R. M. (2008) Beckwith-Wiedemann syndrome in adults: Observations from one family and recommendations for care. *Am. J. Med. Genet.* **146A**, 1707-1712.
- GROSS, M. L. (2002) Ethics, policy, and rare genetic disorders: The case of Gaucher disease in Israel. *Theor. Med.* **23**, 151-170.
- GUO, L., HAN, A., BATES, D. L., CAO, J. Y CHEN, L. (2007a) Crystal structure of a conserved N-terminal domain of histone deacetylase 4 reveals functional insights into glutamine-rich domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 4297-4302.
- GUO, C., MI, J., BRAUTIGAN, D. L. Y LARNER, J. M. (2007b) ATM regulates ionizing radiation-induced disruption of HDAC1:PP1:Rb complexes. *Cell. Sign.* **19**, 504-510.
- HAANSTRA, J. R., VAN TUIJL, A., KESSLER, P., REIJNDERS, W., MICHELS, P. A. M., WESTERHOFF, H. V., PARSONS, M. Y BAKKER, B. M. (2008) Compartmentation prevents a lethal turbo-explosion of glycolysis in trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 17718-17723.
- HALLIDAY, J., OKE, K., BREHENY, S., ALGAR, E. Y AMOR, D. (2004) Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 526-528.
- HALPERN, S. D., KARLAWISH, J. H. T. Y BERLIN, J. A. (2002) The continuing unethical conduct of underpowered clinical trials. *J. Am. Med. Assoc.* **288**, 358-362.
- HATA, K., OKANO, M. Y LEI, H. (2002) Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of *de novo* DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* **129**, 1983-1993.
- HAZOUT, A., MENEZO, Y., MADELENAT, P., YAZBECK, C., SELVA, J. Y COHEN-BACRIE, P. (2008) Causes et implications cliniques des altérations de l'ADN des spermatozoïdes. *Gynéc. Obstét. Fertil.* **36**, 1109-1117.
- HERBELLA, F. A. M., AQUINO, J. L. B., STEFANI-NAKANO, S., ARTIFON, E. L. A., SAKAI, P., CREMA, E., ANDREOLLO, N. A., LOPES, L. R., DE CASTRO POCHINI, C., CORSI, P. R., GAGLIARDI, D. Y DEL GRANDE, J. C. (2008) Treatment of achalasia: lessons learned with Chagas' disease. *Dis. Esoph.* **21**, 461-467.
- HEWISH, D. R. Y BURGOYNE, L. A. (1973) Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**, 504-510.
- HIRSCHHORN, J. N., BROWN, S. A., CLARK, C. D. Y WINSTON, F. (1992) Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev.* **6**, 2288-2298.
- HOPFNER, K. P., CRAIG, L., MONCALIAN, G., ZINKEL, R. A., USUI, T., OWEN, B. A., KARCHER, A., HENDERSON, B., BODMER, J. L., MCMURRAY, C. T., CARNEY, J. P., PETRINI, J. H. Y TAINER, J. A. (2002) The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* **418**, 562-566.
- HOTZ, H.-R. Y PETERS, A. H. F. M. (2009) Protein demethylation required for DNA methylation. *Nat. Genet.* **41**, 10-11.
- HUGHES, D. A., TUNNAGE, B. Y YEO, S. T. (2005) Drugs for exceptionally rare diseases: do they deserve special status for funding? *Q J Med.* **98**, 829-836.
- IJIMA, K., OHARA, M., SEKI, R. Y TAUCHI, H. (2008) Dancing on damaged chromatin: Functions of ATM and the RAD50/MRE11/NBS1 complex in cellular responses to DNA damage. *J. Radiat. Res.* **49**, 451-464.
- IKURA, T., TASHIRO, S., KAKINO, A., SHIMA, H., JACOB, N., AMUNUGAMA, R., YODER, K., IZUMI, S., KURAOKA, I., TANAKA, K., KIMURA, H., IKURA, M., NISHIKUBO, S., ITO, T., MUTO, A., MIYAGAWA, K., TAKEDA, S., FISHEL, R., IGARASHI, K. Y KAMIYA, K. (2007) DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7028-7040.
- IMHOF, A., YANG, X.-J., OGRYZKO, V. V., NAKATANI, Y., WOLFFE, A. P. Y GE, H. (1997) Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr. Biol.* **7**, 689-692.
- IRIBARNE, A. (2003) Orphan diseases and adoptive initiatives. *J. Am. Med. Assoc.* **290**, 116.



- IRIGOÍN, L., CIBILS, L., COMINI, M. A., WILKINSON, S. R., FLOHÉ, L. Y RADI, R. (2008) Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Rad. Biol. Med.* **45**, 733-742.
- JACKSON, Y., CHAPPUIS, F. Y LOUTAN, L. (2008) Chagas disease in Switzerland: Managing an emerging infection and interrupting its transmission. *Rev. Med. Suisse* **4**, 1212-1214, 1216-1217.
- JACOB, F. Y MONOD, J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**, 318-356.
- JANNIN, J. Y VILLA, L. (2007) An overview of Chagas disease treatment. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **102**, 95-97.
- Janzen, C. J., Fernandez, J. P., Deng, H., Diaz, R., Hake, S. B. y Cross, G. A. (2006) Unusual histone modifications in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett* **580**, 2306-2310.
- JIANG, Y. H., BRESSLER, J. Y BEAUDET, A. L. (2004) Epigenetics and human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **5**, 479-510.
- JOHNSON, C. A. Y TURNER, B. M. (1999) Histone deacetylases: complex transducers of nuclear signals. *Semin. Cell Develop. Biol.* **10**, 179-188.
- KANGASPESKA, S., STRIDE, B., MÉTIVIER, R., POLYCARPOU-SCHWARZ, M., IBBERSON, D., CARMOUCHE, R. P., BENES, V., GANNON, F. Y REID, G. (2008) Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* **452**, 112-115.
- KATYAL, S. Y MCKINNON (2007) DNA Repair Deficiency and Neurodegeneration. *Cell Cycle* **6**, 2360-2365.
- KIM, H., FEIL, I., VERLINDE, C. L. M., PETRA, P. H. Y HOL, W. G. J. (1995) Crystal structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Leishmania mexicana*: implications for structure-based drug design and a new position for the inorganic phosphate binding site. *Biochemistry* **34**, 14975-14986.
- KIM, Y.-C., GERLITZ, G., FURUSAWA, T., CATEZ, F., NUSSENZWEIG, A., OH, K.-S., KRAEMER, K. H., SHILOH, Y. Y BUSTIN, M. (2008) Activation of ATM depends on chromatin interactions occurring before induction of DNA damage. *Nat. Cell Biol.* **11**, 92-96.
- KIM, J. K., SAMARANAYAKE, M. Y PRADHAN, S. (2009) Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 596-612.
- KIMURA, A., MATSUBARA, K. Y HORIKOSHI, M. (2005) A decade of histone acetylation: Marking eukaryotic chromosomes with specific codes. *J. Biochem.* **138**, 647-662.
- KINGSTON, R. E. Y NARLIKAR, G. J. (1999) ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* **13**, 2339-2352.
- KLEFF, S., ANDRULIS, E. D., ANDERSON, C. W. Y STERNGLANZ, R. (1995) Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* **270**, 24674-24677.
- KO, M., SOHN, D. H., CHUNG, H. Y SEONG, R. H. (2008) Chromatin remodeling, development and disease. *Mutat. Res.* **647**, 59-67.
- KOBAYASHI, J., TAUCHI, H., SAKAMOTO, S., NAKAMURA, A., MORISHIMA, K., MATSUURA, S., KOBAYASHI, T., TAMAI, K., TANIMOTO, K. Y KOMATSU, K. (2002) NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr. Biol.* **12**, 1846-1851.
- KOBAYASHI, J., TAUCHI, H., CHEN, B., BRUMA, S., TASHIRO, S., MATSUURA, S., TANIMOTO, K., CHEN, D. J. Y KOMATSU, K. (2009) Histone H2AX participates the DNA damage-induced ATM activation through interaction with NBS1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **380**, 752-757.
- KOIKE, M., SUGASAWA, J., YASUDA, M. Y KOIKE, A. (2008a) Tissue-specific DNA-PK-dependent H2AX phosphorylation and c-H2AX elimination after X-irradiation in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376**, 52-55.
- KOIKE, M., MASHINO, M., SUGASAWA, J. Y KOIKE, A. (2008b) Histone H2AX phosphorylation independent of ATM after X-irradiation in mouse liver and kidney *in situ*. *J. Radiat. Res.* **49**, 445-449.
- KO, M., SOHN, D. H., CHUNG, H. Y SEONG, R. H. (2008) Chromatin remodeling, development and disease. *Mutat. Res.* **647**, 59-67.
- KORENKE, G. C., FUCHS, S., KRASEMANN, E., DOERR, H. G., WILICHOWSKI, E., HUNNEMAN, D. H. Y HANEFELD, F. (1996) Cerebral adrenoleukodystrophy (ALD) in only one of monozygotic twins with an identical ALD genotype. *Ann. Neurol.* **40**, 254-257.
- KORNBERG, R. D. (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868-871.

- KOTZOT, D. (2008) Prenatal testing for uniparental disomy: indications and clinical relevance. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **31**, 100-105.
- KOUZARIDES, T. (1999) Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr. Op. Genet. Develop.* **9**, 40-48.
- KOUZARIDES, T. (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* **19**, 1176-1179.
- KOZLOV, S. V., GRAHAM, M. E., PENG, C., CHEN, P., ROBINSON, P. Y LAVIN, M. F. (2006) Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *EMBO J.* **25**, 3504-3514.
- KRAUTH-SIEGEL, R. L., BAUER, H. Y SCHIRMER, R. H. (2005) Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**, 690-715.
- KULKARNI, A. Y WILSON, D. M. III (2008) The involvement of DNA-damage and -repair defects in neurological dysfunction. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 539-566.
- KWON, H., IMBALZANO, A. N., KHAVARI, P. A., KINGSTON, R. E. Y GREEN, M. R. (1994) Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex. *Nature* **370**, 477-481.
- LAGAKOS, S. W. (2003) Clinical trials and rare diseases. *N. Engl. J. Med.* **348**, 2455-2456.
- LAI, C. H., CHUN, H. H., NAHAS, S. A., MITUI, M., GAMO, K. M., DU, L. Y GATTI, R. A. (2004) Correction of ATM gene function by aminoglycoside-induced read-through of premature termination codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 15676-15681.
- LAÍN ENTRALGO, P. (1961) Prólogo, en BUSTINZA, F. *10 años de amistad con Sir Alexander Fleming*. Editorial M. A. S., Madrid.
- LAPUNZINA P. (2005) Risk of tumorigenesis in overgrowth syndromes: a comprehensive review. *Am. J. Med. Genet.* **137C**, 53-71.
- LATASA, M. U., BOUKABA, A., GARCÍA-TREVIJANO, E. R., TORRES, L., RODRÍGUEZ, J. L., CABALLERÍA, J., LU, S. C., LÓPEZ-RODAS, G., FRANCO, L., MATO J. M. Y ÁVILA, M. A. (2001) Hepatocyte growth factor induces *MAT2A* expression and histone acetylation in rat hepatocytes. Role in liver regeneration. *FASEB J.* **15**, 1248-1250.
- LAVIN, M. F. (2007) ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene* **26**, 7749-7758.
- LAVIN, M. F., GUEVEN, N., BOTTLE, S. Y GATTI, R. A. (2007) Current and potential therapeutic strategies for the treatment of ataxia-telangiectasia. *Brit. Med. Bull.* **81**, **82**, 129-147.
- LAVIN, M. F. (2008) Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 759-769.
- LEE, K. K. Y WORKMAN, J. L. (2007) Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 284-295.
- LI, E., BEARD, C. Y JAENISCH, R. (1993) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* **366**, 362-365.
- LI, E. Y BIRD, A. (2006) DNA methylation in mammals, en *Epigenetics* (ALLIS, C. D., JENUWEIN, T., REINBERG, D. Y CAPARROS, M.-L., eds.), pp. 341-356, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- LI, M., SQUIRE, J. A. Y WEKSBERG, R. (1998) Molecular genetics of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **79**, 253-259.
- LILFORD, R. J., THORNTON, J. G. Y BRAUNHOLTZ, D. (1995) Clinical trials and rare diseases: a way out of a conundrum. *BMJ* **311**, 1621-1625.
- LIM, D., BOWDIN, S. C., TEE, L., KIRBY, G. A., BLAIR, E., FRYER, A., LAM, W., OLEY, C., COLE, T., BRUETON, L. A., REIK, W., MACDONALD, F. Y MAHER, E. R. (2009) Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies. *Hum. Reprod.* **24**, 741-747.
- LIU, X., WANG, L., ZHAO, K., THOMPSON, P. R., HWANG, Y., MARMORSTEIN, R. Y COLE P. A. (2008) The structural basis of protein acetylation by the p300/CBP transcriptional coactivator. *Nature* **451**, 846-850.
- LOIDL, P. (1988) Towards an understanding of the biological function of histone acetylation. *FEBS Lett.* **227**, 91-95.
- LÓPEZ-RODAS, G., TORDERA, V., SÁNCHEZ DEL PINO, M. M. Y L. FRANCO (1989) Yeast contains multiple forms of histone acetyltransferase, *J. Biol. Chem.* **264**, 19.028-19.033.

- LÓPEZ-RODAS, G., TORDERA, V., SÁNCHEZ DEL PINO, M. M. Y L. FRANCO (1991a) Subcellular localization and nucleosome specificity of yeast histone acetyltransferases, *Biochemistry* **30**, 3728-3732.
- LÓPEZ-RODAS, G., GEORGIEVA, E. I., SENDRA, R. Y LOIDL, P. (1991b) Histone acetylation in *Zea mays*. I. Activities of histone acetyltransferases and histone deacetylases. *J. Biol. Chem.* **266**, 18745-18750.
- LUCIFERO, D., CHAILLET, J. R. Y TRASLER, J. M. (2004) Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. *Hum. Reprod. Update* **10**, 3-18.
- LUGER, K., MÁDER, A. W., RICHMOND, R. K., SARGENT, D. F. Y RICHMOND, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260.
- LUNA, F. (2005) Poverty and inequality: Challenges for the IAB: IAB presidential address. *Bioethics* **19**, 451-459.
- MAHER, E. R. (2005) Imprinting and assisted reproductive technology. *Hum. Mol. Genet.* **14**, R133-R138.
- MAHER, E. R., BRUETON, L. A., BOWDIN, S. C., LUHARIA, A., COOPER, W., COLE, T. R., MACDONALD, F., SAMPSON, J. R., BARRATT, C. L., REIK, W. Y HAWKINS, M. M. (2003) Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J. Med. Genet.* **40**, 62-64.
- MANIPALVIRATN, S., DECHERNEY, A. Y SEGARS, J. (2009) Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Fertil. Steril.* **91**, 305-315.
- MANZARDO, C., TREVIÑO, B., GÓMEZ I PRAT, J., CABEZOS, J., MONGUÍ, E., CLAVERÍA, I., DEL VAL, J. L., ZABALETA, E., ZARZUELA, F. Y NAVARRO, R. (2008) Communicable diseases in the immigrant population attended to in a tropical medicine unit: Epidemiological aspects and public health issues. *Travel Med. Infect. Dis.* **6**, 4-11.
- MARMORSTEIN, R. (2001) Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 422-432.
- MARTIENSSEN, R. Y MOAZED, D. (2006) RNAi and heterochromatin assembly, en *Epigenetics* (ALLIS, C. D., JENUWEIN, T., REINBERG, D. Y CAPARROS, M.-L., eds.), pp. 151-166, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- MARTIN, C. Y ZHANG, Y. (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 838-849.
- MAS-COMA, S. Y BARGUES, M. D. (2009) Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Trop.* **110**, 112-136.
- MASSAD, E. (2008) The elimination of Chagas' disease from Brazil. *Epidemiol. Infect.* **136**, 1153-1164.
- MATSUOKA, S., BALLIF, B. A., SMOGORZEWSKA, A., MCDONALD, E. R. 3RD, HUROV, K. E., LUO, J., BAKALARSKI, C. E., ZHAO, Z., SOLIMINI, N., LERENTHAL, Y., SHILOH, Y., GYGI, S. P. Y ELLEDGE, S. J. (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**, 1160-1166.
- MATTICK, J. S. (2003) Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *BioEssays* **25**, 930-939.
- MATTICK, J. S. (2004) RNA regulation: a new genetics? *Nat. Rev. Genet.* **5**, 316-323.
- MCGRATH, J. Y SOLTER, D. (1984) Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* **37**, 179-183.
- MCCABE, C., CLAXTON, K. Y TSUCHIYA, A. (2005) Orphan drugs and the NHS: should we value rarity? *BMJ* **331**, 1016-1019.
- MCCABE, C., TSUCHIYA, A., CLAXTON, K. Y RAFTERY, J. (2006) Orphan drugs revisited. *QJM* **99**, 341-345.
- MCCABE, C., TSUCHIYA, A., CLAXTON, K. Y RAFTERY, J. (2007) Assessing the economic challenges posed by orphan drugs: a comment on Drummond et al. *Int. J. Technol. Assess Health Care* **23**, 397-401.
- MCKINNON, P. J. (2004) ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Rep.* **5**, 772-776.
- MCKINNON, P. J. Y CALDECOTT, K. W. (2007) DNA strand break repair and human genetic disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **8**, 37-55.
- MEHLER, M. F. (2008) Epigenetic principles and mechanisms underlying nervous system functions in health and disease. *Prog. Neurobiol.* **86**, 305-341.

- MENNA-BARRETO, R. F. S., SALOMÃO, K., DANTAS, A. P., SANTA-RITA, R. M., SOARES, M. J., BARBOSA, H. S. Y DE CASTRO, S. L. (2009) Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. *Micron* **40**, 157-168.
- MÉTIVIER, R., GALLAIS, R., TIFFOCHE, C., LE PÉRON, C., JURKOWSKA, R. Z., CARMOUCHÉ, R. P., IBBERTSON, D., BARATH, P., DEMAY, F., REID, G., BENES, V., JELTSCH, A., GANNON, F. Y SALBERT, G. (2008) Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* **452**, 45-50.
- MICHELS, P. A. M., BRINGAUD, F., HERMAN, M. Y HANNAERT, V. (2006) Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 1463-1477.
- MINGARRO, I., SENDRA, R., SALVADOR, M. L. Y FRANCO, L. (1993) Site specificity of pea histone acetyltransferase B *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **268**, 13248-13252.
- MIRANDA, G. (1994) Fundamentos éticos de la bioética personalista. *Cuadernos de Bioética* **17-18**, 49-62.
- MOHANDAS, T., SPARKES, R. S. Y SHAPIRO, L. J. (1981) Reactivation of an inactive human X-chromosome. Evidence for X-inactivation by DNA methylation. *Science* **211**, 393-396.
- MOLINA, J., MARTINS-FILHO, O., BRENER, Z., ROMANHA, A. J., LOEBENBERG, D. Y URBINA, J. A. (2000) Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 150-155.
- NAREA-MATAMALA, G., FERNÁNDEZ-TORO, M. A., VILLALABEITÍA-UGARTE, E. Y LANDAETA-MENDOZA, M. (2008) Beckwith Wiedemann syndrome: Presentation of a case report. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* **13**, E640-E643.
- NERES, J., BRYCE, R. A. Y DOUGLAS, K. T. (2008) Rational drug design in parasitology: trans-sialidase as a case study for Chagas disease. *Drug. Discov. Today* **13**, 110-117.
- NG, S. S., KAVANAGH, K. L., MCDONOUGH, M. A., BUTLER, D., PILKA, E. S., LIENARD, B. M. R., BRAY, J. E., SAVITSKY, P., GILEADI, O., VON DELFT, F., ROSE, N. R., OFFER, J., SCHEINOST, J. C., BOROWSKI, T., SUNDSTROM, M., SCHOFIELD, C. J. Y OPPERMANN, U. (2007) Crystal structures of histone demethylase JMJD2A reveal basis for substrate specificity. *Nature* **448**, 87-92.
- NIEMITZ, E. Y FEINBERG, A. (2004) Epigenetics and assisted reproduction: a call for investigation. *Am. J. Hum. Genet.* **74**, 599-609.
- NOMA, K., ALLIS, C. D. Y GREWAL, S. I. (2001) Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science* **293**, 1150-1155.
- NWAGWU, M. Y OPPERDOES, F. R. (1982) Regulation of glycolysis in *Trypanosoma brucei*: Hexokinase and phosphofructokinase activity. *Acta Trop.* **39**, 61-72.
- OKA, A. Y TAKASHIMA, S. (1998) Expression of the ataxia-telangiectasia gene (ATM) product in human cerebellar neurons during development. *Neurosci. Lett.* **252**, 195-198.
- OKANO, M., BELL, D. W., HABER, D. A., AND LI, E. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247-257.
- OLINS, A. L. Y OLINS, D. E. (1974) Spheroid chromatin units (n bodies). *Science* **183**, 330-332.
- ONG, M. S., RICHMOND, T. J. Y DAVEY, C. A. (2007) DNA stretching and extreme kinking in the nucleosome core. *J. Mol. Biol.* **368**, 1067-1074.
- OOI, S. K. Y BESTOR, T. H. (2008) The colorful history of active DNA demethylation. *Cell* **133**, 1145-1148.
- OPPERDOES, F. R. Y BORST, P. (1977) Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett.* **80**, 360-364.
- OPREA, L., BRAUNACK-MAYER, A. Y GERICKE, C. A. (2009) Ethical issues in funding research and development of drugs for neglected tropical diseases. *J. Med. Ethics* **35**, 310-314.
- PAOLONI-GIACOBINO, A. (2007) Epigenetics in reproductive medicine. *Pediatr. Res.* **61**, 51R-57R.
- PARKER, M., ASHCROFT, R., WILKIE, A. O. Y KENT, A. (2004) Ethical review of research into rare genetic disorders. *BMJ* **329**, 241-242.
- PATIL, M. M. Y PATIL, S. V. (2009) Ataxia telangiectasia with hepatocellular carcinoma. *Indian Ped.* **46**, 546.
- PEREIRA, M. E. A., ZHANG, K., GONG, Y., HERRERA, E. M. Y MING, M. (1996) Invasive phenotype of *Trypanosoma cruzi* restricted to a population expressing trans-sialidase. *Infect. Immun.* **64**, 3884-3892.
- PETERSON, C. L. Y LANIEL, M. A. (2004) Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* **14**, R546-R551.

- PINTO DIAS, J. C., PRATA, A. Y CORREIA, D. (2008) Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **41**, 193-196.
- PIREDDA, L., FARRACE, M. G., LO BEALLO, M., MALORNI, W., MELINO, G., PETRUZZELLI, R. Y PIACENTINI, M. (1999) Identification of 'tissue' transglutaminase binding proteins in neural cells committed to apoptosis. *FASEB J.* **13**, 355-364.
- PONDER, M., STATHAM, H., HALLOWELL, N., MOON, J. A., RICHARDS, M. Y RAYMOND, F. L. (2008) Genetic research on rare familial disorders: consent and the blurred boundaries between clinical service and research. *J. Med. Ethics* **34**, 690-694.
- POUX, A. N. Y MARMORSTEIN, R. (2003) Molecular basis for Gcn5/PCAF histone acetyltransferase selectivity for histone and nonhistone substrates. *Biochemistry* **42**, 14366-14374.
- PRADHAN, S., BACOLLA, A., WELLS, R. D. Y ROBERTS, R. J. (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J. Biol. Chem.* **274**, 33002-33010.
- PUIGBÓ, J. J., VALECILLOS, R., HIRSCHHAUT, E., GIORDANO, H., BOCCALANDRO, I., SUÁREZ, C. Y APARICIO, J. M. (1977) Diagnosis of Chagas' cardiomyopathy. Non-invasive techniques. *Postgrad. Med. J.* **53**, 527-532.
- RACKI, L. R. Y NARLIKAR, G. J. (2008) ATP-dependent chromatin remodeling enzymes: two heads are not better, just different. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**, 137-144.
- RASSI, A. JR, RASSI, A. Y LITTLE, W. C. (2000) Chagas heart disease. *Clin. Cardiol.* **23**, 883-889.
- RENWICK, A., THOMPSON, D., SEAL, S., KELLY, P., CHAGTAI, T., AHMED, M., NORTH, B., JAYATILAKE, H., BARFOOT, R., SPANOVA, K., MCGUFFOG, L., EVANS, D. G., ECCLES, D., THE BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY COLLABORATION (UK), EASTON, D. F., STRATTON, M. R. Y RAHMAN, N. (2006) *ATM* mutations that cause ataxia telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nat. Genet.* **38**, 873-875.
- RICE, J.C. Y ALLIS, C. D. (2001) Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 263-273.
- RICHMOND, T. J. Y DAVEY, C. A. (2003) The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* **423**, 145-150.
- RISSO, M. G., GARBARINO, G. B., MOCETTI, E., CAMPETELLA, O., GONZALEZ CAPPA, S. M, BUSCAGLIA, C. A. Y LEGUIZAMON, M. S. (2004) Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. *J. Infect. Dis.* **189**, 2250-2259.
- ROBERTSON, K. D. (2005) DNA methylation and human disease. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 597-610.
- ROBINSON, P. J., FAIRALL, L., HUYNH, V. A. Y RHODES, D. (2006) EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 6506-6511.
- ROGAKOU, E. P., PILCH, D. R., ORR, A. H., IVANOVA, V. S. Y BONNER, W. M. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* **273**, 5858-5868.
- ROGGERO, E., PÉREZ, A. R., BOTTASSO, O. A., BESEDOVSKY, H. O. Y DEL REY, A. (2009) Neuroendocrine-immunology of experimental Chagas' disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1153**, 264-271.
- ROTH, S. Y., DENU, J. M. Y ALLIS, C. D. (2001) Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 81-120.
- RUIZ-CARRILLO, A., WANGH, L. J. Y ALLFREY, V. G. (1975) Processing of newly synthesized histone molecules. *Science* **190**, 117-128.
- RUMP, P., ZEEGERS, M. P. Y VAN ESSEN, A. J. (2005) Tumor risk in Beckwith-Wiedemann syndrome: A review and meta-analysis. *Am. J. Med. Genet.* **136A**, 95-104.
- SANTIAGO, E. (1998) *Moléculas, células, salud y enfermedad*. Lección inaugural del curso académico 1998-1999. Universidad de Navarra, Pamplona.
- SAVITSKY, K., BAR-SHIRA, A., GILAD, S., ROTMAN, G., ZIV, Y., VANAGAITE, L., TAGLE, D. A., SMITH, S., UZIEL, T., SFEZ, S., ASHKENAZI, M., PECKER, I., FRYDMAN, M., HARNIK, R., PATANJALI, S. R., SIMMONS, A., CLINES, G. A., SARTIEL, A., GATTI, R. A., CHESSA, L., SANAL, O., LAVIN, M. F., JASPERS, N. G., TAYLOR, A. M., ARLETT, C. F., MIKI, T., WEISSMAN, S. M., LOVETT, M., COLLINS, F. S. Y SHILOH, Y. (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* **268**, 1749-1753.

- SCHIEPPATI, A., REMUZZI, G. Y GARATTINI, S. (2001) Modulating the profit motive to meet needs of the less-developped world. *Lancet* **358**, 1638-1641.
- SCHIEPPATI, A., HENTER, J.-I., DAINA, E. Y APERIA, A. (2008) Why rare diseases are an important medical and social issue. *Lancet* **371**, 2039-2041.
- SCHLANDER, M. (2008) The use of cost-effectiveness by the National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE): no(t yet an) exemplar of a deliberative process. *J. Med. Ethics* **34**, 534-539.
- SCHOFIELD, C. J., JANNIN, J. Y SALVATELLA, R. (2006) The future of Chagas disease control. *Trends Parasit.* **22**, 583-588.
- SCHOU, K. B., SCHNEIDER, L., CHRISTENSEN, S. T. Y HOFFMANN, E. K. (2008) Early-stage apoptosis is associated with DNA-damage-independent ATM phosphorylation and chromatin decondensation in NIH3T3 fibroblasts. *Cell Biol. Intern.* **32**, 107-113.
- SCHUSTER, R. Y HOLZHÜTTER, H.-G. (1995) Use of mathematical models for predicting the metabolic effect of large-scale enzyme activity alterations. Application to enzyme deficiencies of red blood cells. *Eur. J. Biochem.* **229**, 403-418.
- SENDRA, R., SALVADOR, M. L., LÓPEZ-RODAS, G., TORDERA, V. Y L. FRANCO (1986) A plant histone acetyltransferase specific for H3 in nucleosomes, *Plant Sci.* **46**, 189-194.
- SENDRA, R., RODRIGO, I., SALVADOR, M. L. Y FRANCO, L. (1988) Characterization of histone deacetylases from pea. *Plant Mol. Biol.* **11**, 857-866.
- SHI, Y., LAN, F., MATSON, C., MULLIGAN, P., WHETSTINE, J. R., COLE, P. A., CASERO, R. A. Y SHI, Y. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**, 941-953.
- SHIOTA, K. Y YAMADA, S. (2005) Assisted reproductive technologies and birth defects. *Congen. Anom.* **45**, 39-43.
- SNOW, C. P. (1959) *The Two Cultures and the Scientific Revolution*. Cambridge University Press, N. York.
- SOARES, M. J. Y DE SOUZA, W. (1988) Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study. *J. Submicroscop. Cytol. Pathol.* **20**, 349-361.
- SOBEL, R.E., COOK, R.G., & ALLIS, C.D. (1994) Non-random acetylation of histone H4 by a cytoplasmic histone acetyltransferase as determined by novel methodology. *J. Biol. Chem.* **269**, 18576-18582.
- STAROPOLI, J. F. (2008) Tumorigenesis and neurodegeneration: two sides of the same coin? *BioEssays* **30**, 719-727.
- STERNER, D. E. Y BEGER, S. L. (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 435-459.
- STEVENS, J. R., NOYES, H. A., DOVER, G. A. Y GIBSON, W. C. (1999) The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology* **118**, 107-116.
- STEVENS, J. R., NOYES, H. A., SCHOFIELD, C. J. Y GIBSON, W. (2001) The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv. Parasitol.* **48**, 1-56.
- STRAHL, B. D. Y ALLIS, C. D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
- SULLIVAN, JR, W. J., NAGULESWARAN, A. Y ANGEL, S. O. (2006) Histones and histone modifications in protozoan parasites. *Cell. Microbiol.* **8**, 1850-1861.
- SUN, Y., XU, Y., ROY, K. Y PRICE B. D. (2007) DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8502-8509.
- SYLLABA, K. Y HENNER, K. (1926) Contribution a l'indépendance de l'athetose double idiopathique et congénitale. Atteinte familiale, syndrome dystrophique, signe de reseau vasculaire conjonctival, intégrité psychique. *Rev. Neurol.* **1**, 541-562.
- TAFT, R. J., PHEASANT, M. Y MATTICK, J. S. (2007) The relationship between non-protein coding DNA and eukaryotic complexity. *BioEssays* **29**, 288-299.
- TANG, Y., HOLBERT, M. A., WURTELE, H., MEETH, K., ROCHA, W., GHARIB, M., JIANG, E., THIBAUT, P., VERREAULT, A., COLE, P. A. Y MARMORSTEIN, R. (2008) Fungal Rtt109 histone acetyltransferase is an unexpected structural homolog of metazoan p300/CBP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 738-745.
- TAUNTON, J., HASSIG, C. A. Y SCHREIBER, S. L. (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* **272**, 408-411.

- TEUSINK, B., WALSH, M. C., VAN DAM, K. Y WESTERHOFF, H. V. (1998) The danger of metabolic pathways with turbo design. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 162-169.
- THOMPSON, J. R. Y WILLIAMS, C. J. (2005) Genomic imprinting and assisted reproductive technology: connections and potential risks. *Semin. Reprod. Med.* **23**, 285-295.
- THORNE, A. W., KMICIEK, D., MITCHELSON, K., SAUTIÈRE, P. Y CRANE-ROBINSON, C. (1990) Patterns of histone acetylation. *Eur. J. Biochem.* **193**, 701-713.
- TURNBULL, C. Y RAHMAN, N. (2008) Genetic predisposition to breast cancer: Past, present, and future. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **9**, 321-345.
- TURNER, B. M. (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays* **22**, 836-845.
- TURNER, B. M. Y O'NEILL, L. P. (1995) Histone acetylation in chromatin and chromosomes. *Semin. Cell Biol.* **6**, 229-236.
- UMLAUF, D., GOTO, Y., CAO, R., CERQUEIRA, F., WAGSCHAL, A., ZHANG, Y. Y FEIL, R. (2004) Imprinting along the Kcnq1 domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone methylation and recruitment of Polycomb group complexes. *Nat. Genet.* **36**, 1296-1300.
- URBINA, J. A. Y DOCAMPO, R. (2003) Specific chemotherapy of Chagas disease: Controversies and advances. *Trends Parasitol.* **19**, 495-501.
- VAISSIÈRE, T., SAWAN, C. Y HERCEG, Z. (2008) Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat. Res.* **659**, 40-48.
- VAN DER LEE, J. H., WESSELING, J., TANCK, M. W. T. Y OFFRINGA, M. (2008) Efficient ways exist to obtain the optimal sample size in clinical trials in rare diseases. *J. Clin. Epidemiol.* **61**, 324-330.
- VANNINI, A., VOLPARI, C., FILOCAMO, G., CASAVOLA, E. C., BRUNETTI, M., RENZONI, D., CHAKRAVARTY, P., PAOLINI, C., DE FRANCESCO, R., GALLINARI, P., STEINKÜHLER, C. Y DI MARCO, S. (2004) Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 15064-15069.
- VANYUSHIN, B. F., TKACHEVA, S. G. Y BELOZERSKY, A. N. (1970) Rare bases in animal DNA. *Nature* **225**, 948-949.
- VELLIEUX, F. M. D., HAJDU, J. Y HOL, W. G. J. (1995) Refined 3.2 Å structure of glycosomal holo glyceraldehyde phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Acta Crystallogr. D* **51**, 575-589.
- VETTING, M. W., S. DE CARVALHO, L. P., YU, M., HEGDE, S. S., MAGNET, S., RODERICK, S. L. Y BLANCHARD, J. S. (2005) Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**, 212-226.
- VILLALTA, F., MADISON, M. N., KLESHCHENKO, Y. Y., NDE, P. N. Y LIMA, M. F. (2008) Molecular analysis of early host cell infection by *Trypanosoma cruzi*. *Front. Biosci.* **13**, 3714-3734.
- VISSERS, J. H., NICASSIO, F., VAN LOHUIZEN, M., DI FIORE, P. P. Y CITTERIO, E. (2008) The many faces of ubiquitinated histone H2A: insights from DUBS. *Cell Div.* **3**, 8.
- VOLPE P. (1976) The gene expression during the cell life cycle. *Horiz. Biochem. Biophys.* **2**, 285-340.
- WADDINGTON, C.H. (1942) The epigenotype. *Endeavour* **1**, 18-20.
- WANG, X., HE, C., MOORE, S. C. Y AUSIÓ, J. (2001) Effects of histone acetylation on the solubility and folding of the chromatin fiber. *J. Biol. Chem.* **276**, 12764-12768.
- WANG, J., HEVI, S., KURASH, J. K., LEI, H., GAY, F., BAJKO, J., SU, H., SUN, W, CHANG, H., XU, G., GAUDET, F., LI, E. Y CHEN, T. (2009) The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat. Genet.* **41**, 125-129.
- WANGLER, M. F., CHANG, A. S., MOLEY, K. H., FEINBERG, A. P. Y DEBAUN, M. R. (2005) Factors associated with preterm delivery in mothers of children with Beckwith-Wiedemann syndrome: A case cohort study from the BWS registry. *Am. J. Med. Genet.* **134A**, 187-191.
- WATSON, J. D. Y CRICK, F. H. C. (1953a) Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737-738.
- WATSON, J. D. Y CRICK, F. H. C. (1953b) Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* **171**, 964-967.
- WEKSBERG, R., SHUMAN, C. Y BECKWITH, J. B. (2009) Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* [Epub ahead of print]
- WEKSBERG, R., SHUMAN, C. Y SMITH, A. C. (2005) Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **137C**, 12-23.

- WILLIAMS, R. S., WILLIAMS, J. S. Y TAINER, J. A. (2007) Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double strand break signaling, and the chromatin template. *Biochem. Cell Biol.* **85**, 509-520.
- WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., LUCAS-HAHN, A., GEBERT, C., KORSawe, K., LEMME, E., CARNWATH, J. W. Y NIEMANN H. (2005) Epigenetic reprogramming throughout preimplantation development and consequences for assisted reproductive technologies. *Birth Def. Res.* **75C**, 1-9.
- YACOUB, S., MOCUMBI, A. O. Y YACOUB, M. H. (2008) Neglected tropical cardiomyopathies: I. Chagas disease. *Heart* **94**, 244-248.
- YAN, Y., HARPER, S., SPEICHER, D. W. Y MARMORSTEIN, R. (2002) The catalytic mechanism of the ESA1 histone acetyltransferase involves a self-acetylated intermediate. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 862-869.
- YOREK, M. A., DUNLAP, J. A., MANZO-FONTES, A., BIANCHI, R., BERRY, G. T. Y EICHBERG, J. (1999) Abnormal myo-inositol and phospholipid metabolism in cultured fibroblasts from patients with ataxia telangiectasia. *Biochim. Biophys. Acta.* **1437**, 287-300.
- YUAN, Z. Y SETO, E. (2007) A functional link between SIRT1 deacetylase and NBS1 in DNA damage response. *Cell Cycle* **6**, 2869-2871.
- ZHA, S., SEKIGUCHI, J., BRUSH, J. W., BASSING, C. H. Y ALT, F. W. (2008) Complementary functions of ATM and H2AX in development and suppression of genomic instability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 9302-9306.
- ZHANG, B., PAN, X., COBB, G. P. Y ANDERSON, T. A. (2007) microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol.* **302**, 1-12.
- ZHANG, Y. Y REINBERG, D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* **15**, 2343-2360.



## DISCURSO DE CONTESTACIÓN DEL ACADÉMICO NUMERARIO

Excmo. Sr D. Antonio Llombart Bosch

EXCMOS. E ILMOS. SRS. ACADÉMICOS,  
ILMAS. SRAS. ACADÉMICAS,  
SEÑORAS Y SEÑORES:

CELEBRA HOY esta Real Academia de Medicina de la Comunidad Valenciana reunión extraordinaria para recibir como nuevo miembro de la misma al Dr. Luís Franco Vera, distinguido maestro universitario, Catedrático de la Universitat de Valencia y brillante científico en el área de la bioquímica y biología molecular, especialista en el estudio de la cromatina nuclear y de los mecanismos epigenéticos que afectan la expresión del genoma.

Para mí es un honor el tener el privilegio de haber sido no sólo patrocinador de su candidatura ante Uds. Ilustrísimos Académicos, sino también de que el Académico entrante haya tenido a bien invitarme a contestar su importante discurso sobre el tema “Enfermedades huérfanas. Un punto de encuentro entre la medicina clínica, la biomedicina y la bioética” donde, como acaban de escuchar, efectúa importantes contribuciones al análisis de este grupo de procesos morbosos mal conocidos ya no sólo en la clínica por su rareza, sino también desde el punto de vista terapéutico por la ausencia de interés farmacológico hacia ellos y cómo no, a través de una postura ética que en estos momentos está sujeta a revisión y crítica.

No resulta fácil para un patólogo aceptar el reto de analizar la figura científica del beneficiario ni tampoco contestar con consistencia a las sutiles aportaciones contenidas en su disertación, por lo variado de los temas tratados, así como por la profundidad de aspectos tan complejos como es la biología del genoma y su regulación epigenética, en condiciones normales y en la patología. Sirva sólo como excusa y atrevimiento personal, el señalar que también la atracción por el tema de las enfermedades huérfanas me ha llevado ya desde hace varios años a trabajar con ayudas a la investigación del Gobierno español, fondos FISS y de la Comunidad Europea (PF5 y PF6) en relación un grupo de neoplasias infantiles que por su escasa frecuencia pertenecen también a esta larga familia de enfermedades huérfanas como es el caso de los sarcomas de hueso y partes blandas de células redondas los llamados sarcomas de Ewing/PNET y sarcomas sinoviales. En estos tumores se asocian mecanismos de mutaciones genéticas y procesos epigenéticos, contribuyendo ambos a la proliferación maligna.

Hacia referencia el nuevo académico, recordando con cariño y admiración, a la persona del también académico que le precedió en el sillón que a partir de hoy viene a ocupar. Me refiero lógicamente al querido, admirado y añorado Prof. Eduardo Primo Yúfera, gran investigador y profesor universitario, por lo que existe un gran paralelismo entre ambos. No es mi intención incidir más sobre cuanto se ha dicho de él, pero quisiera recordar en estos momentos lo que ha sido la corta pero intensa historia de quienes le precedieron en anteriores circunstancias.

Fue previo a D. Eduardo Primo Yúfera el Académico, también farmacéutico y conocido valenciano, D. Aurelio Gámir Sanz. La historiografía obtenida a través de la publicación “Historia de Farmacia hoy proyectos de futuro” nos aporta los datos biográficos de Aurelio Gámir Sanz. Nació en La Pobla d’Arenós (en el interior de las comarcas castellonenses) el año 1878, y obtuvo la licenciatura en Farmacia el año 1903, en la Universidad de Madrid. Se estableció en Valencia, donde fue el titular de la famosa Farmacia Gámir, en la plaza de la Pilota, actualmente de Mariano Benlliure. Se dedicó al estudio de las plantas medicinales, publicando trabajos sobre la belladona, la digital, la bardana, etc. Cabe señalar el libro Farmacología de la digital (Madrid, 1931), donde a lo largo de sus más de 300 páginas estudia la *Digitalis purpurea*. Publicó trabajos en la prensa profesional (La Farmacia Moderna, Farmacia Nueva, El Monitor de la Farmacia, El Restaurador Farmacéutico, etc.) y en el año 1932 inició la publicación de una serie divulgativa sobre plantas medicinales e industriales en El Mercantil Valenciano. Esta vertiente científica de Aurelio Gámir culminó el año 1935, con su ingreso en la Academia de Medicina de Valencia, para ocupar uno de los sillones reservados a farmacéuticos; su discurso de recepción versó sobre Notas sobre estabilización y cultivo de bardana, digital y belladona.

Gámir tuvo una tercera vertiente profesional: la industria farmacéutica. Según informaciones facilitadas por A. González Bueno, en 1919 registra su primera especialidad, Bardanol, inscribiendo otras especialidades. Recientes investigaciones desarrolladas en el Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica de la Universitat de València han sacado a la luz que, al acabar la contienda civil, Aurelio Gámir fue perseguido. Parece ser que en un principio estuvo ilocalizable, a expensas de su depuración se le clausuró la farmacia, posteriormente se autorizó su reapertura bajo la dirección de un regente, Francisco Bosch Ariño (catedrático de Análisis Químico en la Facultad de Ciencias y presidente del Colegio de Farmacéuticos en Valencia).

También hay que destacar sus actividades relacionadas con la Historia de la Farmacia, respecto a la cual tuvo una actitud de mecenazgo, especialmente en los aspectos relacionados con la cultura valenciana patrocinando premios para el fomento y desarrollo de la Historia de la Farmacia o la colaboración económica, a la publicación del Boletín de la Sociedad Española de Historia de la Farmacia y, en otro orden de cosas, la adquisición de botes de farmacia con destino al Museo de la Farmacia Hispana, en el Museo de Cerámica “González Martí” de Valencia.

Entiendo que también es importante recordar el discurso de entrada en esta la Academia de Eduardo Primo Yúfera, ya que marcó un sello de continuidad en la actividad de este sillón que hoy celebramos con la entrada del nuevo académico.

Se ocupaba el 25 de enero de 1977 del tema “La deficiencia proteica en la alimentación de la humanidad. Un reto a la ciencia y a la tecnología”. La preocupación del nuevo académico nacía del crecimiento exponencial de la población humana que en esas fechas alcanzaba los 4.000 millones y predecía la FAO llegar a los 7.000 en los años 2000. Hoy sabemos por datos de las Naciones Unidas que esta cifra se ha quedado corta y las previsiones de un próximo futuro son de un crecimiento todavía más exponencial que el sospechado hace 30 años. Esto no haría en estos momentos sino aumentar la preocupación que entonces señalaba de cómo poder proveer de alimentos a esta población y particularmente a las poblaciones en áreas deprimidas o subdesarrolladas. Basaba su exposición haciendo propuestas nacidas de las investigaciones desarrolladas por él y su equipo en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos del CSIC que había él mismo fundado, sobre el valor nutritivo y contenido proteico no sólo de proteínas de origen animal sino particularmente de plantas oleaginosas tipo soja y otras proteínas fibriladas, pero especialmente de la proteínas del arroz, cultivo importante en la comunidad valenciana. Su estudio pormenorizado se extiende tanto al análisis de las proteínas del arroz blanco elaborado en los molinos, como de su subproducto el salvado de arroz material obtenido en las distintas etapas de pulido del grano. Pormenoriza en el estudio de los componentes del arroz por su alto valor nutritivo, dando especial atención tanto a la harina del mismo, nutriente de alimentación infantil, como al salvado de arroz con contenido en proteínas, grasas, fibras, almidón y azúcares. Todo ello queda condicionado a una correcta preservación y estabilización de las mismas para lo cual ofrece distintas soluciones llevadas a cabo en su Instituto y presentando un diagrama de flujo de procedimientos para el arroz que sería también útil para otros cereales. En su revisión global analiza la posible obtención de proteínas de origen microbiano así como a partir de algas y hongos. Señalaba para finalizar su exposición que las proteínas obtenidas por estos métodos alternativos se podrán convertir, como de hecho ocurre en estos momentos, en alimentos compuestos de amplia aceptación para el consumo humano mientras que los subproductos y calidades inferiores servirían para la alimentación animal.

Insistía en su discurso de contestación el académico Prof. Enrique Hernández Jiménez, hoy entre nosotros, sobre la importancia de estas investigaciones haciendo una doble reflexión que es muy apropiada en estos momentos, ensalzar la dedicación a la investigación abriendo una nueva frontera de incalculables dimensiones y su interés por los problemas que afectan a la humanidad y particularmente por los más necesitados. Unía de este modo el Prof. Primo Yúfera su doble dimensión de científico universitario y de creyente, sumando los valores éticos a los divinos nacidos de su propia fe. Como veremos estos dos atributos son cualidades también de la personalidad del nuevo académico, dibujando una continuidad de pensamiento, acción y creencias que enaltece a este sillón de la Real Academia.

Permítanme ahora que me ocupe directamente del currículo del Prof. Luís Franco Vera.

Nació en Madrid el 8 de enero de 1942; su niñez y adolescencia se desarrollan en la capital española durante la posguerra, período en el cual la ciudad se vio sujeta a una fuerte represión social con gran limitación de toda clase de medios y alimentos dentro de una España pobre y austera. Vivíamos también nosotros en esa época en la capital de España debido a que nuestro padre el Prof. Antonio Llombart Rodríguez se había incorporado a la Cátedra de Anatomía Patológica de la Universidad Complutense como encargado de curso, poniendo en marcha la maltrecha Facultad de Medicina tras la contienda civil. Por ello el recuerdo de niño de aquellos años permanece vivo en nuestra mente, jugando los domingos en los campos de la Ciudad Universitaria en donde todavía estaban abiertas las heridas de las batallas libradas quedando como mudos testigos restos destrozados de carros de combate y otros elementos bélicos mientras almorzábamos un pan que era una torta de maíz y un trozo de chocolate hecho de algarroba.

Tras su bachillerato en el Colegio de la Sagrada Familia, inicia los estudios universitarios que se orientan a la licenciatura de Química en la Facultad de Ciencias, obteniendo el grado de licenciado en 1964 con sobresaliente y completando su doctorado años después en 1971 también con Sobresaliente cum laude. Su director de tesis el Prof. Ángel Martín Municio fue una de las personas que impactó más directamente en configurar la personalidad científica y humana del nuevo académico, orientándolo hacia el apasionante mundo de la Bioquímica. Sobre las particularidades de su trabajo doctoral tendremos ocasión de comentarlo posteriormente al revisar sus aportaciones científicas.

La orientación profesional del Prof. Franco se decanta desde el principio por el sendero universitario ocupando los puestos de Ayudante de Clases prácticas (1965-1967) en la cátedra de Química del Prof. Manuel Lora Tamayo y posteriormente como Profesor Adjunto interino (1967-1969) y siendo ya doctor como Profesor Adjunto por oposición hasta 1973, esta vez ocupando un puesto en la cátedra de Bioquímica dirigida por su maestro el Prof. Ángel Martín Municio. La creación por el ministro Manuel Lora Tamayo de la figura de Profesor Agregado de Universidad abrió la posibilidad de que también por oposición obtuviera en 1975 esta titulación hasta su nombramiento como Catedrático de la Universidad de Valencia (Estudi General), en 1981, en la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Cátedra primero y luego Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, donde continúa en la actualidad sus funciones de docencia e investigación, después de haberlo dirigido hasta 1993.

Su vida al servicio de la universidad ha sido extremadamente fructífera, al haberse hecho cargo de numerosas responsabilidades académicas que merecen ser destacadas, como son las de Vicedecano de la Facultad de Biología de la Universidad de Valencia (Estudi General) entre 1983 y 1986. Miembro del Claustro constituyente de la Universidad de Valencia. Presidente de la Comisión Académica de la Titulación en Bioquímica de la Universidad de Valencia desde 1995 hasta 2000. Miembro de la Comisión de Disciplina de la Universidad de Valencia desde 1995 y Consejero de Universidades por designación del Senado (2000-2002).

Pero ello no es sino una parte del currículum del nuevo académico, ya que en el mismo destacan otros importantes méritos que es necesario mencionar: Miembro de la Real Sociedad Española de Química (secretario de Publicaciones entre 1967 y 1971). Miembro de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (vocal de su Junta Directiva entre 1980 y 1984). Miembro de la Sociedad Valenciana de Bioética (en la actualidad, vocal de su Junta Directiva). Director del curso “Ética y Ciencia”, Universidad de Valencia, 1999. Director del Instituto de Química de la IVEI (Institución Valenciana de Estudios e Investigación), entre 1995 y 1998. Evaluador de proyectos para NATO, ANEP, TWAS (Third World Academy of Sciences), FWF (Fundación Austriaca de Ciencias) *Referee* de artículos para *Biophysical Journal*, *European Journal of Biochemistry*, *Developmental Biology*, *FEBS Letters*, *Developmental Neuroscience*, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *Physiologia Plantarum*, *Plant Journal*, *Radiation Research*. Miembro del Editorial Board del *Journal of Physiology and Biochemistry*.

El Ministerio de Universidades le ha reconocido el sexto sexenio de investigación en 2001 y la Universidad de Valencia reconoció su larga trayectoria de investigación en 2007.

Sin embargo entendemos que una atención muy especial merece su nombramiento como académico numerario de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Madrid) a lo que se une desde 2002, Miembro de la Comisión de Relaciones Internacionales desde 2005 y Secretario de la Sección de Naturales desde Junio de 2007 de la misma. Ocupó la medalla nº 3 que dentro de la Academia había pertenecido ilustres personalidades como José María Albareda y el catedrático de Botánica de la Universidad Central, Salvador Rivas que fuera el impulsor y director del jardín Botánico de Madrid. En esta ocasión su discurso versó sobre “El rostro humano de la ciencia”. Envolvía este título un estudio profundo de las bases moleculares de la regulación y control biológico en su doble vertiente la regulación metabólica del control enzimático y la regulación de la expresión génica, esta última como dogma central de la Biología Molecular. El análisis de lo que constituye una de sus vertientes docentes, centró el eje del discurso junto con el estudio de la capacidad creativa y el optimismo por ella, lo cual le permitió apreciar las manifestaciones del rostro humano en la ciencia deteniéndose en el análisis de una de sus propiedades fundamentales: la inteligencia aplicada a la posibilidad de creación en la investigación científica y en este sentido hacía suya una idea del académico Primo Yufra cuando indica.” *Los científicos con imaginación creadora o creativos se caracterizan por su capacidad para encontrar ideas que conducen a soluciones originales e innovadoras y al mismo tiempo realistas y útiles*”.

Analiza la libertad de pensamiento humano en el mundo científico buscando dar respuesta a los interrogantes que despiertan las distintas posiciones que le hombre ciencia suele plantearse desde la postura finalista basada en que la ciencia encontrará respuesta final a todos los problemas planteados por la naturaleza y por otro lado la hace suya aceptando la contingencia de la ciencia humana. Por ello sus respuestas no pueden ser últimas sino limitadas, ya que ante cada pregunta contestada surgirá una nueva en una cadena de situaciones sin fin. Así los llamados “misterios de la naturaleza”, como situación inescrutable, abrirían sus puertas a la investigación científica y a la comprensión, desvelándose progresivamente, aunque anteponiendo siempre la incertidumbre de una limitación final como el de la propia existencia humana y por ello apoyada en una Creación superior que en su condición de creyente acepta como respuesta.

Sería apasionante y muy atractivo continuar analizando los distintos capítulos de su largo discurso de entrada en la Academia como es el apartado disecando a la regulación de la expresión génica en los eucariotas o también el de la modulación de la actividad enzimática hasta llegar a ofrecer una visión unificada de la regulación biológica estudiando los factores de crecimiento, la estructura de la cromatina y su regulación a través de las cascadas de señalización desde los receptores de membrana por las señales de trasducción hasta alcanzar el núcleo y llegar en última instancia a configurar una visión global de las corrientes conceptuales de la biología molecular moderna y su puesta al servicio del hombre como eje central de la creación, para terminar con una reflexión del gran maestro de la medicina española Pedro Laín Entralgo “*la bondad del hombre sirve de plinto a la pericia del experto*”.

Hemos querido extendernos, aunque muy someramente en el análisis de este discurso de entrada en la Academia Nacional de Ciencias, por cuanto, a nuestro juicio, refleja exactamente el pensamiento científico y humano del nuevo Académico, concretado también fielmente en el discurso que acabamos de oír sobre “Enfermedades huérfanas: un punto de encuentro entre la medicina clínica, la biomedicina y la bioética”. Evidentemente entraña una continuidad tanto de su creatividad intelectual como de su postura ética y preocupación social que adorna la personalidad de Luís Franco y de su currículo vital como hombre de ciencia y creyente comprometido con su tiempo y la sociedad que le rodea.

Habíamos dejado el Currículo científico del nuevo académico en su conjunción con quienes fueron sus maestros y de modo muy particular con la fuerte y muy atractiva personalidad del Profesor Ángel Martín Municio, quien realmente fue el mentor y orientador en su vida universitaria y de su fecunda aportación científica. Atraído por su energía e impulso universitario Luís Franco inicio el aprendizaje de Bioquímica junto a su maestro quien no solo le transmitió su magisterio sino también su ejemplo, consejo y amistad.

Quienes tuvimos la oportunidad de conocer y compartir trabajo con Martín Municio gozamos de su acertado consejo y pudimos apreciar la fuerte personalidad del que entonces era Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Corrían los años 1990 y la Asociación Española contra el Cáncer, presidida por Doña María Fernanda Méndez Núñez y Gómez Acebo, marquesa de Elche, invito a Don Ángel así como a otros profesores universitarios y médicos a formar parte de su Junta

Técnica. Durante cuatro años tuvimos ocasión de profundizar en su conocimiento que sólo el respeto hacia su persona y la distancia por la edad hacía de ella una respetuosa amistad. Permanecen vivos en el recuerdo sus consejos, siempre acertados y la ecuanimidad de las decisiones que llevaban a tomar acuerdos no siempre fáciles por la diversidad de quienes componíamos aquella junta.

Este corto relato de nuestro común amigo y maestro no puede hacernos olvidar lo que representó para la ciencia española quien, en palabras de Pedro García Barreno, fue ejemplo de “solidez, criterio y amplitud de miras” a través de una vida fecunda para la universidad la docencia y la investigación española. Decía Don Ángel *“Para mí el nacimiento de una nueva cultura va a tener mucho que ver con la conexión de las ciencias y las artes con un aspecto importante de la cultura tradicional, con una nueva filosofía de la naturaleza, de forma que la cultura resultante contribuirá a resolver algunos, o muchos, de los problemas de ambos, ciencia y filosofía de nuestros días, e intentar conciliar al hombre con la cultura global”*. Esta cultura global es la que él sí supo transmitir a sus discípulos como es el caso de Luis Franco.

Pero volvamos nuevamente a el nuevo beneficiario de la Academia para seguir sus pasos a lo largo de su formación y desarrollo de su personalidad científica que se iniciaba con el estudio del metabolismo del 3-amino-1,2,4-triazol en mamíferos, tema sobre el cual efectuó varios trabajos y publicaciones. Ya doctor por la Universidad de Madrid en 1971, comienza una prolongada estancia en Inglaterra, trabajando en Londres sobre el tema del aislamiento y caracterización de histonas de levadura, investigaciones que desarrolla en el Chester-Beatty Research Institute for Cancer Research, situado en la Fulham Rd. Es esta institución una de las más prominentes de la investigación oncológica en el Reino Unido y en los años 60/70 señaera de los primeros avances en la bioquímica del cáncer con importantes figuras de la investigación cancerológica básica como el Dr Sir Alexander Haddow y el Dr. Peter Boyland, descubridores de la relación entre hidrocarburos policíclicos y aminas aromáticas en el desencadenamiento de neoplasias humanas. Nueva coincidencia entre el académico Luis Franco y quien les dirige la palabra fue el conocer que ese centro de investigación había sido el mismo donde nosotros unos años antes, en una repetida estancia, desarrollamos parte de nuestros estudios de investigación de la tesis doctoral, dirigidos también por una de las figuras señeras de aquella institución, el Prof. L. Horning. Sólo la distancia del tiempo hizo que no coincidiéramos ambos en el mismo instituto donde los ladrillos rojos de su fachada y la clásica configuración victoriana, todavía albergan laboratorios de Royal Cancer Hospital.

Los trabajos sobre la composición, estructura y función de las histonas iniciados en Londres se continúan como línea básica de su trabajo de investigador alrededor de la estructura de la cromatina en procariotas y eucariotas en los años siguientes, ya de regreso a Madrid. En la Universidad Complutense entre los años 1972-1981 trabaja y efectúa numerosas publicaciones sobre las histonas, proteínas HMG y cromatina de levadura y del díptero *Ceratitis capitata*, tanto a nivel bioquímico como estructural. Y continua esta línea de investigación a la cual se unen nuevos discípulos y colaboradores de la Universidad de Valencia, tras su traslado a esta ciudad como catedrático en 1981, ocupándose fundamentalmente del análisis de las proteínas cromosomales de plantas, de la acetilación de histonas y de sondas físicas para el estudio del nucleosoma.

Esta continua investigación se prolonga hasta nuestros días produciendo varias publicaciones de alto impacto internacional sobre la estructura de la cromatina, de los genes de la levadura, así como de los cambios de la cromatina en hepatocitos in vitro y otras células eucariotas durante los procesos de apoptosis y malignización cancerosa.

Pero resulta imposible resumir en un corto espacio toda la labor científica del profesor Franco con un merecedor alto nivel de impacto. Haciendo un resumen de sus publicaciones científicas podemos señalar que es responsable como primer firmante o senior de 73 artículos científicos en revistas de alto índice de impacto, con peer reviewers, como son: *FEBS Lett.*; *Cell. Mol. Biol.*; *Eur. J. Biochem.*; *Nucleic Acids Res.*; *J. Biol. Chem.*; *Biochemistry*; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; *Mol. Gen. Genet.*; etc., además de 5 artículos dedicados a la bioética, 2 libros y numerosos trabajos de divulgación. Se une a ello el haber dirigido 16 tesis doctorales y como consecuencia el disponer de un índice de investigación con factor de impacto h de publicaciones de 22.

También ha encontrado apoyo de instituciones oficiales que han reconocido el valor de su trabajo como investigador principal con numerosas ayudas de investigación que enumeramos seguidamente:

“Cambios en la cromatina durante la diferenciación en vegetales” (CAICYT 1101/81), Julio 1983-Julio 1986. “Cambios en la cromatina del guisante (*Pisum sativum*) asociados a la germinación” (Diputación Provincial de Valencia-226), Octubre 1984-Octubre 1985. “Organización de la cromatina activa. Causas moleculares de la activación” (DGICYT, PB85-0233), Septiembre 1986-Septiembre 1989. “Estructura de la cromatina y actividad génica” (DGICYT, PB88-0352), Julio 1989-Julio 1992. “Papel de la acetilación de histonas y de la interacción con proteínas no histonas en la organización de la cromatina activa” (DGICYT, PB91-0338), Julio 1992-Julio 1995. “La acetilación específica de histonas y su papel en la regulación de la transcripción” (DGICYT PB94-0976), Julio 1995-Julio 1998. “Uso de la técnica “SPOT’s Mapping” para la determinación de los sitios de acetilación de las histonas” (Generalitat Valenciana, acción especial 1997). “Papel de la modificación y reticulación de histonas durante la apoptosis” (Conselleria de Cultura Educació i Ciència, GV-D-VS-22-148-96), Enero 1997-Diciembre 1999. “Acetilación de histonas y mecanismos de regulación” (Dirección General de Investigación, PB97-1368), Octubre 1998-Octubre 2001. “Coordinación de los procesos de acetilación y fosforilación en la regulación de la expresión génica” (Ministerio de Ciencia y Tecnología, BMC2001-2868), Noviembre 2001-Noviembre 2004.

Además ha dispuesto de varios contratos de investigación con empresas: “Estudio de las propiedades higiénico-sanitarias de recubrimientos cerámicos”, Empresa: Taulell, S.A., Febrero 1997-Febrero 1999. “Interacción antitumorales-cromatina”, Empresa: PharmaMar, S.A., Julio 1999-Julio 2000.

Otra importante aportación son las ponencias y comunicaciones orales presentadas por invitación en Congresos Internacionales: “HMG proteins of the insect *Ceratitidis capitata*”, International Symposium on Organization and Expression of Eukaryotic Genome, Teherán, 1976. “Nucleosome positioning and chromatin activity: Cause or effect?”, 5th International Congress on Cell Biology, Madrid, 1993. “Transglutaminase-catalyzed modification of histones”, ESF Workshop on Transglutaminases and Protein Crosslinking, Jena, 1998. “Changes in pea chromatin during the embryogenesis-germination events”, Workshop on Chromatin and DNA Modification, Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones, Madrid, 1998. “Histone acetylation and the regulation of gene expression”, 5th Workshop on Methionine Metabolism, Granada, 2000. “The transglutaminase reaction as a probe for nucleosome structure and dynamics”, Workshop on Integration of Transcriptional Regulation and Chromatin Structure, Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones, Madrid, 2000.

Se debe añadir a todo ello una larga serie de conferencias y cursos de proyección internacional: “Chromatin structure of selected genetic loci”, FEBS-Juan March Foundation Advanced Course on Biochemistry and Genetics of Yeasts, Madrid, 1990. “Histone acetylation in *Saccharomyces cerevisiae*”, FEBS-Juan March Foundation Advanced Course on Biochemistry and Genetics of Yeasts, Madrid, 1990. “Histone acetylation: Specific signalling or structural remodelling of the nucleosome?” Universidad de Innsbruck (Austria), 1993. “Histone acetylation: More than just charge neutralization” Universidad de Roma “La Sapienza”, 1994. Así como una serie de conferencias nacionales de especial relevancia: “Evolución de los ácidos nucleicos”. Universidad Internacional Menéndez Pelayo, Santander, 1979. “Tecnología de Enzimas” Universidad Internacional Menéndez Pelayo, Santander, 1979. “Histonas de levadura”, Universidad de Murcia, 1980. “Intuición y Estética en la Creación Científica”, Universitat d’Estiu de Gandía. Julio 1999. “Ciencia y Ética”, Real Academia de Medicina de Valencia, Junio 2001. “Doble Hélice, Genes y Cromosomas”, Programa de Promoción de la Cultura Científica, Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Logroño y Zaragoza, 2001. “¿Por qué proliferan las células?”, Programa de Promoción de la Cultura Científica, Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Miranda de Ebro, Valencia y Madrid, 2004. “Enzimas: Qué son y para qué sirven”, Programa de Promoción de la Cultura Científica, Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Miranda de Ebro, Valencia, Madrid y Zaragoza, 2005. “El código genético cumple 40 años”, Programa de Promoción de la Cultura Científica, Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Madrid y Valencia, 2006. “Enfermedades epigenéticas: desde el cáncer hasta la sordera”, Programa de Promoción de la Cultura Científica, Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Logroño, Madrid y Valencia, 2008.

Como puede apreciarse señores académicos el nuevo miembro de nuestra Corporación tiene un reconocido currículum que su todavía prometedora actividad científica servirá para acrecentar en beneficio del prestigio de la Universidad en la que sirve así como también de esta Real Academia a la cual se incorpora hoy y por lo que sinceramente nos felicitamos.

Tampoco queremos cerrar este recorrido curricular del nuevo Académico sin destacar lo que a nuestro juicio y con la experiencia vivida de más de 40 años de actividad en la Universidad hemos aprendido que tiene el mayor valor de un maestro y un científico. No sólo son los numerosos alumnos que recuerdan con cariño a quien fue su maestro durante la carrera, sino también los discípulos más cercanos que iniciaron su andadura académica y científica junto a uno mismo. Es esa continuidad docente y científica la que llena de orgullo y sana vanidad a un profesor universitario cuando analiza su currículum. En eso el Prof. Luís Franco puede sentirse satisfecho, ya que aunque su camino está todavía con un buen trayecto por concluir, el número de discípulos en los que ha sembrado la semilla de la intranquilidad científica, que él recibió de Don Ángel Martín Municio, ha sido como en el evangelio, multiplicada en los denarios recibidos como préstamo del Señor y si bien todavía no es la hora de rendir cuentas con el Divino, sí lo es para nosotros. No es posible mencionar, por su elevado número, a todos los doctores, profesores universitarios y catedráticos procedentes de su escuela y formados junto a él, pero si señalar a aquellos más cercanos o actualmente aún a su lado, si bien todos los demás están también presentes en su recuerdo. Ponemos en sus propias palabras este agradecimiento y recuerdo:

*“De la época de Madrid, destaco a Francisco Montero Carnerero. Le dirigí la tesis y ahora es Catedrático de Biofísica en la Facultad de Química de la Universidad Complutense. Un excelente colaborador y amigo. De Valencia, hay dos a quienes he dirigido la tesis que ya son Catedráticos: José Enrique Pérez Ortín y Francisco Estruch Ros, ambos en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, aunque tienen sus grupos de investigación independientes. Tengo un especial afecto a Luis Torres, a quien dirigí la tesis doctoral y ahora es Profesor Titular en la Facultad de Farmacia; he seguido colaborando muy gustosamente con él. Otra persona a quien estimo mucho es Esteban Ballestar Tarín. Le dirigí la tesis en Valencia; es uno de los estudiantes más brillantes que he tenido. Tras su etapa posdoctoral en USA volvió a mi grupo, pero poco después se fue a trabajar al CNIO y ahora está como group leader en el IDIBELL (Institut d’Investigació Biomèdica de Bellvitge). También he seguido colaborando con él.*

*Pero me gustaría mencionar especialmente a Gerardo López Rodas, Maribel Rodrigo Aleixandre y José Luís Rodríguez García. El primero acaba de obtener la acreditación como Catedrático y los otros dos son Profesores titulares. Forman el grupo de investigación con el que he trabajado en los últimos 12 años y sin ellos no habría sido capaz de sacar adelante la investigación. Los tres han tenido una dedicación ejemplar. José Luís se jubila próximamente.*

*Mención aparte merece Concepción Abad Mazarío, compañera de los tiempos de Madrid, que se incorporó a Valencia como Profesora Adjunta poco después de acceder yo a la cátedra y algo más tarde obtuvo una cátedra en nuestro Departamento. No he trabajado en investigación con ella, salvo en una ocasión puntual, pero su colaboración fue imprescindible para sacar adelante el Departamento, especialmente en su Sección de Ciencias. Me unía también una gran amistad con su marido, también Catedrático, que falleció el año pasado”.*

## **Comentarios al discurso**

Más volvamos a analizar cuanto acabamos de oír en este denso, interesante y complejo discurso en el que ha abordado distintos aspectos de las llamadas enfermedades huérfanas y los procesos de la organización de la cromatina nuclear así como del control de su expresión por mecanismos epigenéticos para enlazarla con dos ejemplos de enfermedades motivadas por estas alteraciones como son el síndrome de Beckwith-Wiedemann y la Ataxia Telangiectásica junto con la también rara y enfermedad huérfana conocida como Chagas, de alta incidencia en Latinoamérica.

La profundidad y extensión de los temas analizados así como la complejidad de los mismos obligan al lector y creo también a quienes han escuchado su resumido discurso a tratar de entresacar los conceptos más básicos del mismo para aplicar un criterio analítico que pueda posteriormente interrelacionarlo con objeto de alcanzar unas conclusiones que se corresponden con la doctrina que se ha querido plasmar y transmitirnos, tanto en base a su larga experiencia científica como a su postura ética frente a la ciencia misma.

Toma como base de su aproximación tres disciplinas que encuentra interconectadas: Medicina clínica, Biomedicina y Bioética. Las tres a su vez confluyen en un mismo objetivo: la enfermedad como proceso patológico y el enfermo como sujeto humano y paciente. Considerada cada una de ellas a modo de círculos que quedarían entrelazados cual anillos olímpicos, formando un sistema biológico complejo que busca la aproximación a un conocimiento más profundo así como a la propuesta de soluciones más realistas y éticamente aceptables en un problema preocupante de la salud del mundo actual: las enfermedades huérfanas. Ellas aparecen en todo momento como motivo protagonista de su preocupación y de la búsqueda de soluciones.

Es obvio que este análisis lo hace conscientemente más cerca de la biomedicina que de la medicina clínica, la cual por su formación curricular le es ajena. No por ello utilizando una visión objetiva, defiende la necesidad de darse la mano en estrecha cooperación aunando el ojo clínico de la experiencia nacida junto la cama del enfermo a la ganada en el banco del laboratorio. Es así como hace un análisis detallado de las manifestaciones clínico-epidemiológicas de las distintas enfermedades raras o desatendidas, es decir huérfanas, que toma como modelo de estudio.

Parece preciso insistir por parte nuestra en este concepto de “*enfermedad huérfana*” para diferenciarlo de las llamadas enfermedades infrecuentes, “*raras*” según la moderna terminología, y de las “*enfermedades desatendidas*”. Aquí utiliza una terminología que merece un comentario añadido. La Organización Mundial de la Salud, la Comisión Europea así como numerosas organizaciones públicas y privadas a nivel internacional y nacional se han ocupado activamente de este problema de salud pública. Sin ir más lejos, el Boletín Oficial de la Comunidad Europea del 3 de julio del presente año, 2009, recoge una resolución legislativa del 8 de junio de 2009 dando recomendaciones sobre las actuaciones a llevar a cabo en el campo de las enfermedades raras. Estas recomendaciones se sustentan en la necesidad de encontrar una equidad y solidaridad en base a los principios éticos universales que deben proveer el acceso a la salud y cuidado de calidad a toda la población de un modo universal. Recuértese, como ya señalaba el conferenciante, que aunque raras afectan sólo en la Comunidad Europea entre 27 y 36 millones de habitantes (6-8% de la población), debido a la prolongada prevalencia de muchas de ellas, aunque algunas solo afectarían a unos 100.000 habitantes o incluso menos. El problema es extraordinariamente complejo, ya que al tratarse hoy en día de 6.000 a 8.000 tipos distintos de procesos hace que su análisis, diagnóstico y aún más su terapéutica sea muy difícil y también muy costosa, quedando patente de este modo el concepto de enfermedad huérfana de tratamiento. Con objeto de controlar mejor el problema la WHO también acaba de lanzar un proceso de revisión del conocido Código de Clasificación de las Enfermedades, ICD, en su versión 10ª y en la que aparecerá en 2014 (versión 11ª) en la que quedarán codificadas y clasificadas todas las nuevas enfermedades conocidas en estos últimos años. Este es un primer avance en la estandarización de las mismas, si bien no representa más que un paso en su categorización y mejor conocimiento. La incorporación del código ICD en todos los países de la Comunidad Europea permitirá conocer con más detalle el grado de extensión de algunas de ellas y así poder efectuar estudios epidemiológicos y clínicos, creando unidades pan-europeas de centros de referencia. Gracias a ello se espera disponer de una “European Reference Network (ENRs)” para enfermedades raras complementando las bases de datos muy efectivas ya existentes como es la “Orphanet” francesa o la red de enfermedades raras recientemente creada en nuestro país como “Federación Española de Enfermedades Raras” FEDER. Se recomienda además establecer actuaciones a nivel comunitario para poder llevar adelante proyectos de investigación y creación de centros europeos de expertos. También aparece como sujeto importante de estas acciones la sociedad civil, estimulando la presencia de organizaciones sin ánimo de lucro de pacientes y familiares que aumenten la conciencia, todavía en parte ausente, en la sociedad y en los medios de comunicación.

Estas asociaciones de afectados son el motor de acción continuo en aquellas organizaciones que, como oímos previamente sirvieron para crear en Europa la “European Organization of Rare Diseases” (EURORDIS) ya hace más de 10 años. Queda pues precisado que las enfermedades huérfanas en el concepto del conferenciante abarcan tanto las enfermedades raras como las enfermedades desatendidas por motivos diversos. Dos enfermedades le sirven como modelo de estudio. La primera el síndrome de Beckwith–Wiedemann originado por modificaciones epigenéticas de la cromatina nuclear y la Ataxia telangiectásica en la que de modo más complejo participan alteraciones de la cromatina nuclear, con mutaciones génicas y factores epigenéticos.



Ahora bien, el criterio empleado para desarrollar este concepto de enfermedad huérfana no se limita sólo a la rareza de la misma, sino que también se enlaza con los llamados “*medicamentos huérfanos*” considerándolos en su más amplio espectro, tanto por servir potencialmente sólo para tratar enfermedades muy infrecuentes, como por ser medicación costosa en la investigación, el desarrollo farmacéutico y la comercialización, y que en consecuencia carecen de rentabilidad no estando al alcance de determinados estratos sociales en los países ricos y, desde luego, no son accesibles en países pobres, cuando es especialmente en ellos donde son enfermedades relativamente frecuentes o endémicas, como puede ser la tuberculosis, el Sida o el caso de la enfermedad de Chagas, tomada como ejemplo en esta ocasión. Ella, que es frecuente en América latina, es de escaso interés comercial por parte de la gran industria farmacéutica.

Por todo esto convendrán conmigo señores académicos, que el tema elegido por el académico entrante para su disertación no es una materia que pudiéramos considerar extraña o siguiendo la terminología en uso “rara, huérfana o desatendida”, sino que pertenece a ese nuevo criterio emergente de “salud y sostenibilidad” de la que nuestra Universitat de Valencia se ha hecho portadora con una excelencia reconocida recientemente por el Gobierno del Estado, por lo que nos congratulamos y felicitamos al mismo tiempo a su equipo rector dado la visión de futuro que ello entraña. También esa perspectiva de futuro queda patente como perspectiva de presente en la larga y brillante línea de investigación desde hace ya varios años del Prof. Luís Franco y su equipo, como ha quedado patente en sus numerosas publicaciones.

### **El concepto de epigenética molecular y su implicación en la patología del DNA y los mecanismos de control normal y patológico**

Quisiéramos desarrollar y encontrar respuesta, a lo largo de su análisis, con el siguiente aforismo: “del Código genético al Código epigenético y su importancia en la organización y remodelación de la cromatina.” Título que con toda seguridad también lo ha tenido el autor en consideración para aplicarlo a la disertación que hoy nos ocupa.

Hace ya más de medio siglo que Watson y Crick (1953) comunicaron al mundo científico su propuesta de organización del DNA en forma de doble hebra, contenida dentro de la cromatina del núcleo celular. Su capacidad de autorreplicación y la existencia de una información organizada en pares de bases permiten establecer una estructura ordenada de tipo primario que codifica un gen. La organización secuencial del DNA bicatenario provee gracias a su distribución por tripletes en pares el genoma ofreciendo su lectura a modo de un código el llamado “Código genético” mediante el cual la información transmitida a través de un intermediario, llamado RNAt, al citoplasma celular para sintetizar la base estructural y funcional de la vida que son las proteínas por mediación del RNAr. Hoy sabemos que son alrededor de 30.000 los genes que componen esta maquinaria informativa productora de proteínas. También es conocido que mutaciones de diversa naturaleza pueden causar enfermedades del más variado género, desde las malformativas, pasando por las metabólicas, para llegar a las proliferativas y neoplásicas. En no pocas ocasiones aparecen asociadas entre sí, siendo incompatibles con la vida o causando graves taras genéticas en el portador.

La especificidad génica es una paradoja frente a la heterogeneidad del ser humano en donde millones de células conviven una media de 75/85 años (vida media en la actualidad para el hombre) renovándose continuamente y manteniendo un fenotipo que expresa no sólo la configuración física, sino también la capacidad perceptiva e intelectual de cada uno de nosotros. Este fenotipo compuesto por órganos y tejidos organizados en sistemas funcionales configura la estructura corporal, sujeta a una continua remodelación, que varía con la edad y con el medio ambiente. Estas modificaciones de la estructura orgánica no se deben esencialmente a alteraciones de la organización del DNA que posee una sorprendente estabilidad, capacidad replicativa y mecanismos de auto-reparación, sino en su mayor parte tienen su origen a causas que podemos considerar como externas al sistema es decir: epigenéticas. Como recordaba el nuevo académico es preciso tener presente cuál es el concepto de epigenética a la luz de modernos avances logrados por la biología molecular. Jiang (2004) lo define como aquellos cambios hereditarios o al menos potencialmente heredables, experimentados por el material genético y no debidos a alteraciones de la secuencia de DNA. Se trata por ello de la parte de la biología celular que estudia las

interrelaciones entre los genes y su entorno y que conducen al fenotipo (Waddington, 1942). Hemos insistido en estos conceptos por cuanto entendemos son eslabones básicos para comprender lo que hoy puede considerarse como complemento de la regulación génica y que en palabras del nuevo académico, correspondería al llamado “Código epigenético”, complementario del previamente mencionado código genético, al regular la diversidad de la transcripción (RNA mensajero) como *transcriptoma* y la síntesis de proteínas (RNA ribosomal) considerada como esta última como *proteoma*. No se trata sólo de codificar genes que van a producir señales para la síntesis de proteínas determinadas, sino también regular esta síntesis y establecer las vías de coordinación y interacción entre ellas tanto a nivel estructural como metabólico (proteínas complejas de exportación como son las hormonas, factores de crecimiento y sus receptores, proteínas de membrana y sus receptores así como las señales de transducción del citoplasma al núcleo o de naturaleza más compleja como son las proteínas estructurales, glicoproteínas, glicolípidos, proteínas fosforiladas, etc.).

Se llega en este momento a la cuestión clave del estudio ¿cuáles son los factores capaces de modificar la expresión del DNA sin necesidad de alterar su estructura así como también afectar a otros componentes de la cromatina como las proteínas histónicas del nucleosoma? ¿En qué medida estos mecanismos epigenéticos son causa de alteraciones fenotípicas en la célula que conducen a una expresión patológica a través de una síntesis proteica alterada?

Desde hace años se conoce que las modificaciones epigenéticas del genoma se pueden producir a través de dos grandes mecanismos. En primer lugar modificando directamente el DNA mediante la metilación de las llamadas “islas CpG” transformando la Citosina en Citosina metilada, que es catalizada por enzimas metilantes/desmetilantes (DNA metiltransferasas, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B), lo cual provoca una represión transcripcional del gen afecto y permite una rápida metilación-desmetilación en lugares específicos de los promotores. En segundo lugar el mecanismo epigenético afecta a las histonas, proteínas nucleares de soporte del DNA, mediante un mecanismo también reversible de acetilaciones. Las 4 histonas (H2A, H2B, H3, H4) que componen en pares la “partícula núcleo” del nucleosoma forman un octámero de diminuto tamaño (2.8 Amstromgs) sobre el que se empaquetan 147 pares bases de DNA organizando una superhélice que queda unida al siguiente nucleosoma gracias a la histona H1, creando una estructura de orden superior que se repite tanto en el núcleo en interfase como en los cromosomas, si bien variando el distinto grado de empaquetamiento y de condensación. En el estudio de las modificaciones de las histonas, como hemos oído, es donde del Prof. Luís Franco y su grupo han aportado datos más novedosos tras varios años de estudio sobre los mecanismos de acetilación de las mismas a través de las enzimas: Histona-Acetiltransferasas (HATs nucleares, A y citoplásmicas B) e Histonas DesAcetilinas (HDACs). La especificidad necesaria para la acetilación de cada histona así como la llamada especificidad de sitio, conlleva la necesidad de que existan múltiples enzimas HATs-A y HDACs. La caracterización de los genes que codifican la acetilación de histonas ha dado como fruto en estos últimos años a la identificación de numerosas familias, (GNAT, MYST, p300, CBP, SRC-1 y ACTR). También sabemos que las HDACs como las anteriores se agrupan en 5 distintas familias en base a su homología de secuencia (1, 2a, 2b, 3 y 4). Pero además ellas están implicadas en una compleja red de interacciones celulares que determinan la especificidad y modulan la actividad de regiones de la cromatina.

Tanto la acetilación como la metilación de las histonas han sido objeto de un enorme impulso en estos últimos años, abriendo grandes expectativas en la biología y patología molecular. El propio Luís Franco pudo demostrar ya en el año 2000 y con posterioridad (2001, 2006) que esta acetilación está relacionada con su actividad transcripcional mientras que la metilación puede desempeñar un doble papel es decir poseería un papel bifuncional.

El Dr. Allis y colaboradores, ya hace unos años, postuló basado en las diferencias funcionales entre metilaciones y acetilaciones en distintos aminoácidos de las histonas que actuarían de modo secuencial y específico, sugiriendo la hipótesis, hoy más firme, sobre la existencia de un *código epigenético*, en cierto modo comparable con el antes mencionado código genético. Obviamente al mismo pertenecerían también las modificaciones antes señaladas de metilación del DNA.

La consecuencia directa de estos estudios ha sido el reconocimiento de que la acetilación de las histonas va a influir sobre la remodelación de la estructura nucleosomal permitiendo la reestructuración de la cromatina como uno de los mecanismos epigenéticos producidos sin causar alteraciones estructurales del DNA.

Otro importante mecanismo epigenético es el conocido como *impronta genómica*, mecanismo por el cual la actividad de un determinado gen puede modificar su expresión de modo reversible en función del sexo parental que lo transmite, dando lugar a una expresión distinta que puede ser reversible. Este mecanismo temporal del control génico está producido por metilaciones específicas del DNA así como de las histonas e interviene en procesos normales de crecimiento y diferenciación embrionaria pero también en algunos mecanismos de malignización neoplásica. El síndrome de Beckwith –Wiedemann es un ejemplo de desregulación de este mecanismo al variar una de las regiones modificadas epigenéticamente y contigua a los genes (ICR, *imprinting control region*).

Finalmente se aborda en el discurso el estudio de los mecanismos epigenéticos de regulación celular, junto con las funciones del microRNA (small interfering RNA). Este RNA de interferencia (RNAi) se acopla al DNA de un modo transitorio pudiendo modificar a determinados genes durante el proceso de transformación neoplásica, bien activándolos (oncogenes) o inhibiéndolos (genes supresores).

Nos encontramos pues en la segunda etapa de la encrucijada que vincula la Biomedicina con la genética y epigenética a la patología del enfermo detectando la lesión pendiente de diagnóstico y posible tratamiento mediante la Medicina Clínica. Es el nuevo anillo entrelazado al cual posteriormente uniremos un tercero con el necesario posicionamiento ético frente a estas enfermedades.

### **Enfermedades epigenéticas: el síndrome de Beckwith-Wiedemann y la Ataxia Telangiectásica**

El Prof. Luís Franco ha elegido entre las más de 6.000 posibilidades de patologías huérfanas, la mayoría con importante componente genético en su más amplio aspecto, dos de ellas que de modo muy sugestivo ilustran ambos mecanismos de interferencia mixta genética y epigenética asociadas a lo que podríamos llamar interacciones antes comentadas, entre el código genético y el código epigenético. Su elección, como él mismo ha destacado, no ha sido casual sino profundamente meditada por cuanto cada una de ellas es ejemplo característico del papel de la epigenesis sola o asociada a las mutaciones en el DNA como mecanismo patogénico desencadenante a lo que se añade una afortunada rareza. También ello ofrece oportunidad para discutir otro concepto que comentábamos al principio de nuestro discurso de contestación al nuevo académico, es decir la problemática de las medicaciones huérfanas y las nuevas perspectivas que la terapia génica está ofreciendo en forma de dianas terapéuticas específicas.

El síndrome de Beckwith-Wiedemann es modelo de complejo proceso genético y epigenético en donde se ven afectados genes que regulan el crecimiento orgánico, cursando con hemigigantismos macroglosia, citomegalia adrenocortical y tumores, especialmente nefroblastomas y hepatoblastoma entre otros, y algunos bilaterales como los tumores de Wilms que pueden afectar ambos riñones. Desde el punto de vista molecular se producen alteraciones cromosómicas preferentemente, aunque no de modo exclusivo del 11p15. Analiza el conferenciante con detalle los genes relacionados con los loci situados en este segmento del cromosoma describiendo la presencia de genes supresores de tumores como el *CDK1C* (*p57<sup>kip2</sup>*) junto con el *KCNQ1*. A ello se une la presencia también en el dominio 2 del 11p15 de una ICR2 situada en la vecindad del segundo. Otro gen relacionado con el proceso es el *IGF2* codificante de un factor de crecimiento relacionado con la insulina y el gen *H19*, que se considera como gen supresor tumoral al regular la traducción del mensajero del primero. La expresión de ambos está dominada por otra ICR1 que regula la comunicación entre ambos y cuando no está metilada permanece silente, pero que cuando se metila bloquea el proceso, y no se transcribe *H19*.

Antes hacíamos referencia a la ICR2 que esta metilada en la copia materna mientras se desmetila en la paterna lo cual causa bloqueo de la expresión del gen *KCNQ1*. La pérdida esporádica de la metilación de ICR2 daría lugar a la total ausencia de expresión del *KCNQ1* y *CDK1C* y como expresión fenotípica la presencia de hemigigantismos y macroglosia pero no nefroblastomas. Por contra la metilación del ICR1 que se expresa en los dos alelos materno y paterno produciría una síntesis alta de IGF2 favoreciendo la producción de nefroblastomas.

Además de estas posibilidades epigenéticas este síndrome se asocia también a defectos del cromosoma 11p15 en forma de duplicaciones, translocaciones o inversiones haciendo más compleja la interpretación genética / epigenética de esta enfermedad, al darse asociados ambos tipos de procesos.

También hace especial hincapié el académico en la posible relación entre las técnicas de reproducción asistida y el aumento del número de enfermos portadores de este síndrome en una proporción superior hasta 9 veces al de la población general, postulando como posible causa la aparición de un fenotipo distinto que sería secundario a una metilación asociada a la pérdida de la impronta en la ICR2. Este hecho no sólo es circunstancial del síndrome descrito sino que también se ha visto en otros procesos como en el síndrome de Angelman lo hace pensar que éste es, posiblemente, uno de los peligros a que se enfrenta la reproducción asistida.

El segundo proceso que se aborda es la Ataxia Telangiectásica (ATG) delineándose también como una enfermedad compleja con un importante componente epigenético aunque fundamentalmente sea debida a mutaciones del gen ATM por cambios en la fase de lectura, por mutaciones puntuales, o bien por una terminación prematura que causa la aparición de formas truncadas. Ello motiva el defecto de una quinasa relacionada con la reparación de DNA por lo que hay una mayor inestabilidad génica, que facilita la aparición de frecuentes tumores malignos además de otras graves lesiones neurológicas.

Las alteraciones de los mecanismos de reparación del DNA monocatenario o bicatenario juegan un papel esencial en este proceso y sitúan a la quinasa ATM como protagonista de la reparación por uniones no homólogas de los extremos del DNA (NHEJ, *Non Homologous End Joining*) mientras que su participación en los mecanismos de recombinación homóloga (HR) tras ruptura de una sola cadena de ADN sería menos importante. El proceso va a producirse en buena medida también mediante mecanismos epigenéticos. La fosforilación de la histona H2AX aparece como uno de los sustratos base de la actividad ATM permitiendo que se reparen roturas de DNA adecuadamente. Sin embargo es evidente que otras modificaciones de las proteínas cromatínicas intervienen en este proceso como es la proteína no histona HMG1.

Es importante por todo ello insistir en que la relación posible de una función deficiente de la quinasa ATM pueda interferir no solo en la degeneración neuronal sino también en la aparición de cánceres cervicales, mama o hepatomas humanos, los más frecuentes en la ATG. Ello significa que el silenciamiento epigenético del gen ATM por hipermetilación de su promotor alcanzaría a distintas estirpes celulares, tanto del sistema nervioso central como del ectodermo en un nivel muy precoz, posiblemente en fase de célula troncal (célula madre).

Esto abre una nueva disyuntiva de gran repercusión en este momento ¿Qué papel juegan estos mecanismos epigenéticos en transformación de células madre troncales normales en células madre cancerosas?

### **Solidaridad necesaria ante las enfermedades desatendidas y los principios éticos: la enfermedad de Chagas**

Cuando mi buen amigo Luís Franco me planteó en una larga conversación a principios del pasado verano cuál era su proyecto de discurso de recepción en esta real Academia, debo decir que me dejó numerosos interrogantes alguno de los cuales se han contestado con la lectura del mismo, aunque otros resistían a mi análisis. Como distinguido y, tal y como hemos visto, profundo conocedor de la biología molecular y de la cromatina, así como de los mecanismos epigenéticos que se han esbozado con detalle, nadie en esta sala podría poner en tela de juicio el valor de los datos científicos aportados. Me pregunté, y así le hice saber, por qué introducir el problema de la enfermedad de Chagas en el contexto de una enfermedad huérfana cuando entre las más de 6.000 existentes y las dos previamente seleccionadas eran materia más que suficiente para justificar su interesante discurso.

Ha tenido que transcurrir estos meses y poder tener en mis manos su discurso para entender el significado global del mismo y su verdadera orientación.

En realidad el Prof. Franco utiliza esta enfermedad para introducirnos en otro de los problemas que atañen a la humanidad, y aún más a la necesidad ética y moral de atender con decisión problemas que no sólo nos afectan directamente en nuestro mundo más desarrollado, como es la solidaridad, virtud necesaria en un mundo globalizado en que el hombre como ser se ha transformado en hombre objeto y cuyo valor se mide más por la proximidad que por su número.

Las enfermedades desatendidas como es el caso del Chagas afecta como hemos oído a cerca de 20 millones de seres humanos en Latinoamérica y no es sino un pequeño ejemplo de las múltiples enfermedades parasitarias que son plaga en el tercer mundo y los países tropicales. ¿Por qué ocuparnos de ellas cuando la Sanidad en nuestro propio entorno no llega a cubrir las necesidades que presenta la sociedad donde vivimos, es decir donde realmente el hombre es persona y no objeto?

El análisis detallado de la epidemiología, etiopatogenia y clínica de este proceso desde sus albores históricos a principio del pasado siglo en Brasil hace interesante su discurso y orienta a los posibles sistemas de control y de tratamiento que se están llevando a cabo en distintos países de América latina. La prevención y el diagnóstico serológico de la enfermedad ya establecida tras un primer periodo de incubación hacen teóricamente posible identificarla con rapidez e incluso desde el punto de vista teórico controlarla. Es cierto que en países como Brasil, cuyo nivel económico se sitúa entre los primeros de Latinoamérica, la enfermedad va perdiendo vigencia y el número de afectados ha disminuido considerablemente. Ello no es motivo positivo al conocer que en Bolivia casi el 20 % de la población podría tener anticuerpos circulantes frente al *Tripanosoma cruzi*. Ello muestra el alto grado de extensión de la enfermedad. Además, el hecho de que sus peores manifestaciones clínicas sean la miocardiopatía dilatada así como las graves esofagomegalias de aparición tardía (entre 10 y 30 años tras la infección) unido a la presencia de otras posibles parasitosis en los mismos portadores hacen que su diagnóstico sea generalmente tardío y por ello la mortalidad elevada.

El primer argumento en contra se produce cuando por falta de educación sanitaria y medios económicos el tripanosoma mantiene una capacidad de contagio a través del vector no erradicable y luego se propaga durante años en enfermos carentes de un diagnóstico adecuado.

Sin olvidarse de ello, el nuevo académico describe los nuevos hallazgos logrados con el estudio básico tanto del parásito como de las relaciones entre el parásito y el huésped en sus diversas etapas de transmisión. Es un interesante recorrido por la clínica y epidemiología del flagelado, dentro del agente vector invertebrado la chinche *Triatoma infestans*, que transcurre en distintas etapas desde su absorción del enfermo como tripomastigota y posterior transformación dentro del agente vector en esferomastigota y epimastigota, para a continuación depositarse en su tubo intestinal en forma de tripomastigota. Finalmente infecta nuevamente al hombre a través de la picadura y consiguiente defecación sobre ella, bien sobre la mucosa ocular o a través de la piel. Aquí empieza el ciclo de la enfermedad aguda, seguido de la aparición de anticuerpos circulantes y una prolongada fase silente que da lugar a una clínica tardía muy grave en el 80% de los infectados.

El conocimiento de la biología, enzimología y de la bioenergética del vector, así como de las posibles vías terapéuticas con medicaciones ya conocidas pero no totalmente eficientes, permiten suponer y hacen manifestar al conferenciante que una dedicación mayor de medios técnicos y económicos podrían facilitar el control del ciclo del tripanosoma y curar la enfermedad. De hecho, como señala, ya se están efectuando ensayos terapéuticos con células madre en Brasil que posiblemente permitan mejorar los actuales tratamientos con derivados del benznidazol y el nifurtimox. La postura analítica descrita con detalle de lo que debería ser un antiparasitario ideal se enfrenta con la realidad por la falta de progresos terapéuticos efectivos en este campo. Una posibilidad es poder atacar la vía de la glicolisis, atendida la particular capacidad de obtención de ATP disponible por el parásito, mediante los glicosomas tabicados que impiden un estallido metabólico del mismo. De este modo se abren expectativas para la aplicación de potenciales fármacos, alguno de los cuales está ya en estudio, como es el caso de los inhibidores de la gliceraldehído - 3-fosfato deshidrogenasa.

Todo esto es base para poner como sujeto del discurso a las enfermedades desatendidas unidas a las antes mencionadas enfermedades raras para crear el concepto global de “enfermedad y medicación huérfana”. Nuevamente ello nos lleva al principio de su disertación cuando hablamos de las relaciones entre la Biomedicina, la Medicina Clínica y la Bioética entrelazadas cual anillos olímpicos. Vamos a comentar algunos aspectos de este último apartado que a nuestro juicio sirve también como llamada a la conciencia y postura ética de quienes vivimos en esta “jaula dorada” que es nuestro mundo desarrollado también mal llamado “primer mundo”.

## **¿Hay soluciones globales para las enfermedades huérfanas?: Bioética y solidaridad en un mundo en crisis**

Adentrarse en los problemas bioéticos que entrañan tanto las enfermedades raras como las desatendidas y su repercusión sanitaria, en búsqueda de soluciones que les den soporte tanto financiero como social, constituye la última aportación de su discurso. Debo reconocer que también para nosotros ha sido la más compleja, no sólo por la dificultad de compartir la idea de encontrar posibles soluciones a los problemas que aborda, sino también para poder hacer nuestras las propuestas que preconiza alcanzando una comunidad de intereses en una postura personal coherente.

Se da por entendido que el Académico que lee el discurso de contestación a un nuevo miembro de la misma, hace suyas las posturas doctrinales del recipiendario, siendo su misión el ensalzar su relevancia científica y moral. Evidentemente este no es el caso nuestro ya que el Prof. Luís Franco goza de un buen ganado reconocimiento, que la pluma de quien les lee estas letras hace innecesario. Pero además de este reto personal, el nuevo académico adopta postura ética definida, que nos obliga a evidenciar posiciones que van más allá de la que necesariamente compartiríamos. Es como si tuviéramos que hacer confesión pública sobre nuestra posición bioética ante un problema de inconmensurables proporciones.

Es evidente que vivimos en un mundo globalizado en que los problemas de pequeñas comunidades o incluso de algunas personas pueden ser magnificados de modo inimaginable, gracias a los medios de comunicación, alcanzando dimensiones sensacionalistas que están alejadas de la misma entraña del problema y solo buscan la notoriedad del momento.

En más de una ocasión todos hemos vivido la llamada angustiada de una familia o una madre ante el problema de un hijo afectado de una de estas enfermedades y como la sociedad se ha movilizad buscando aportar soluciones que por desgracia en más de un caso han sido inefectivas o incluso contraproducentes.

¿Cuántas de estas enfermedades raras lo son por ignorancia o desconocimiento, incluso del profesional que las atiende? ¿Cuántas veces el sentido ético de la solidaridad ha sido engañado por falsas soluciones?

En un mundo globalizado los problemas del tercer mundo son también nuestros problemas y no me refiero exclusivamente a situaciones bélicas o del entramado político. Pero buscar soluciones para los mismos es problemático y sin querer pecar de pesimista, hasta casi imposible. ¿Hemos por ello de dejarnos llevar por corriente egoísta de una vida cómoda y llena de pequeñas felicidades o buscar la otra cara de la moneda y acercarnos a la trágica realidad del día a día?

¿Hasta cuándo nuestra sociedad de consumo puede olvidarse de estos problemas o por el contrario combatir para que no se produzcan? Pero también cabe la duda de que estos problemas socio sanitarios tengan una solución hoy, aún aportando los recursos más exigentes que ellos demandasen.

Las enfermedades raras crecen a medida que nuestros conocimientos avanzan y que la investigación básica se hace más potente y los descubrimientos como es el caso de la biología molecular, son tal y como hemos visto en este discurso, más certeros pero también más complejos y en consecuencia las soluciones más costosas.

Aquí nace por tanto el concepto de solidaridad para con el prójimo, enfermo o desatendido, ignorante de su problema o sabedor del mismo pero impotente para solucionarlo. ¿Hasta dónde se ha de movilizar la sociedad civil para solucionarlo? ¿Qué deben hacer las organizaciones Internacionales o las organizaciones sin ánimo de lucro no gubernamentales para resolver estos problemas?

Pero lo más grave es si, aun poniendo todos los medios que una sociedad rica y teóricamente avanzada dispone en la lucha contra el hambre, la pobreza, la falta de educación sanitaria y la ausencia de recursos para detectar ciertas patologías, se dan los recursos adecuados para cumplimentarlos. Podríamos debatir tópicos como el de dedicar el dinero de los armamentos a las ayudas sanitarias o de las exploraciones extraterrestres a programas de educación en los países del tercer mundo. Pero esto sólo sería pura demagogia en la cual no queremos caer.

Entiendo y el conferenciante también lo ha dicho, que es necesario querer encontrar posturas realistas y éticamente adecuadas. La toma de conciencia del problema, uno más de los muchos que el mundo avanzado toma nota y conciencia, es manera adecuada para entrever soluciones. Pero estas soluciones son también globales y cuando indico globales no me refiero sólo una dimensión mundial sino esencialmente personal de la conciencia de cada uno de nosotros.

Hemos hecho un breve recorrido de los asientos que ocuparon preclaros académicos que precedieron al hoy nuevo miembro y también lo hemos hecho de los maestros que modelaron la personalidad científica y humana del Prof. Luís Franco. Cuando lo hacíamos no tenía un mero sentido descriptivo de la vida de nuestra academia en el pasado siglo sino como base de un mejor conocimiento de la filosofía que la anima y de las posturas de quienes en un momento determinado de su existencia formamos parte de ella. Es la propia historia de la academia la que se atestigua por la vida de sus miembros.

Quienes precedieron al hoy nuevo académico, los doctores Aurelio Gamir y Eduardo Primo Yúfera, fueron ejemplos de esta entrega a la ciencia y a la sociedad de su momento, aportando soluciones que en la medida y en base a sus posibilidades técnicas pudieron ofrecer a su entorno. Entiendo que son ejemplos de solidaridad. Los maestros del profesor Franco también han sido ejemplo de solidaridad y dedicación a través de la ciencia conjugándola como es el caso de D. Ángel Martín Municio con una extraordinaria finura espiritual y sentido ético la vida. El propio nuevo académico toma el relevo de ellos con la grandeza de espíritu que le brinda no sólo su profundo conocimiento científico sino también su sentido religioso, haciéndonos consideraciones que entiendo son llamada de atención para todos los presentes. Es una llamada que hace suya tomándolas del Papa Benedicto XVI quien también nos recuerda que los derechos y deberes del hombre están implicados estrechamente de modo que nuestro bienestar no sólo puede basarse en una escalada en la demanda de valores materiales sino también de obligaciones éticas para la sociedad donde vivimos y a la cual hemos solidariamente que corresponder.

Perdonaran señores estas últimas consideraciones más personales que puramente académicas, son quizás las que mi buen amigo Luís ha querido proporcionarme para que esta tarde noche revele ante Uds., distinguidos miembros de esta Corporación, mi pensamiento.

He dicho.