

INSTITUTO DE ESPAÑA

ANALES
de la
REAL ACADEMIA
NACIONAL
DE
FARMACIA



2000

VOLUMEN LXVI

Núm. 4

Publicación trimestral

Domicilio de la Academia

FARMACIA, 11

28004 MADRID

Anal. Real Acad. Farm. 66:

Doctrina

Conmemorando un Siglo de Genética (1900-2000)

JUAN-RAMÓN LACADENA
Académico de Número

RESUMEN

Con motivo del centenario del redescubrimiento en 1900 de las leyes de Mendel, se hace una revisión de la evolución histórica, conceptual y metodológica de la genética, definida como la “ciencia que estudia el material hereditario bajo cualquier nivel o dimensión”. El contenido formal de la Genética son las preguntas y respuestas en torno a los genes: ¿qué son? ¿cómo se organizan y transmiten? ¿cómo y cuándo se expresan? ¿cómo cambian? ¿cuál es su destino en el espacio y en el tiempo?

Dentro del desarrollo cronológico de la Genética, la última década (1990-2000) se caracteriza especialmente por el progreso de la *Genómica* y de la *Transgénesis*. En el presente trabajo se analizan algunos aspectos, tanto de la Genómica como de los animales y las plantas y alimentos transgénicos.

Palabras clave: Genética.- Historia.- Genómica.- Animales transgénicos.- Plantas transgénicas.- Alimentos transgénicos

SUMMARY

In commemoration of a century of Genetics (1900-2000)

The rediscovery of Mendel's laws in 1900 was an important landmark in the History of Genetics. Thus, this Science is 100 the present year 2000.

In this work, the historical, conceptual and methodological evolution of Genetics is reviewed. Genetics is defined as the “science who studies the hereditary material under any level (molecular, cellular, individual, population) or aspect”. The formal contents of Genetics are questions and answers in relation to the genes: What are they? How are they organized and transmitted? How and when are they expressed? How do they change? Which is their spacial and temporal fate?

In the chronological development of Genetics, the last decade (1990-2000) is specially characterized by the progress of *Genomics* and *Transgenesis*. In the present review some aspects of the most important advances both of Genomics and transgenic animals and plants are analyzed.

Key words: Genetics: History – Genomics – Transgenic animals – Transgenic plants – Transgenic foodstuff

I. EL NACIMIENTO DE LA GENÉTICA

“Estoy plenamente seguro de que no pasará mucho tiempo hasta que el mundo entero reconozca los resultados de mis investigaciones”. Estas son las palabras proféticas que pronunció Gregor Johann Mendel, el día 1 de Octubre de 1883, tres meses antes de morir, en su última actuación en público como abad y prelado de la Abadía agustina de Brünn, Moravia (hoy Brno, República Checa). Ciertamente que todo el mundo acepta hoy la importancia de la Genética y rinde homenaje a Mendel como fundador de esta ciencia.¹

Se conmemora este año 2000 el centenario oficial del nacimiento de la Genética puesto que fue en 1900 cuando tres investigadores –Hugo de Vries, Karl Correns y Erich Tschermak²– redescubrieron por separado las denominadas “leyes de Mendel” basadas en los datos experimentales que Mendel había dado a conocer el 8 de febrero y el 8 de marzo de 1865 en sendas sesiones científicas públicas de la Sociedad de Naturalistas de Brünn, Moravia, y que fueron publicados al año siguiente en las actas de la Sociedad³. Sin embargo, tal como se justificará después, en un sentido conceptual estricto podría decirse que el nacimiento de la Genética no fue instantáneo, sino que fue consecuencia de un largo proceso. De ahí que la fecha del redescubrimiento en 1900 sea más bien simbólica.

II. DESARROLLO HISTÓRICO-CONCEPTUAL DE LA GENÉTICA⁴

El nacimiento de una nueva ciencia -la Genética- que explicara los fenómenos hereditarios biológicos habría de estar condicionado a su capacidad para dar respuesta a las dos preguntas fundamentales siguientes: ¿cuáles son las leyes por las que se transmiten los caracteres biológicos de padres a hijos? ¿cuál es la base física -es decir, la sustancia- por la que tales características hereditarias se conservan y transmiten? o, en otras palabras, ¿cuál es la base molecular de la herencia?

La respuesta a la primera pregunta fue conocida a partir de las experiencias de Gregor Johann Mendel. La respuesta a la segunda pregunta está en íntima relación con la historia del ácido desoxirribonucleico, ADN, que se inicia en 1869 cuando Miescher escribió el artículo (aparecido en 1871) en el que describía la “nucleína” como una “sustancia ácida rica en fósforo” aislada por vez primera de los núcleos de las células de pus y después de otros tipos de células (levaduras, riñón, hígado, testículos y glóbulos rojos nucleados). La “nucleína” fue rebautizada en 1889 por Richard Altmann como ácido nucleico. Sin embargo, la identificación de la sustancia o material hereditario como ADN -los genes son ADN- no se produjo hasta 1944 cuando Avery, MacLeod y McCarty identificaron el ADN como el “principio transformante” de Griffith (1928) en el fenómeno de transformación bacteriana. Por ello, se deduce que es incorrecto decir -como suele hacerse- que la Genética nació como ciencia en 1900 cuando de Vries, Correns y Tschermak redescubrieron las denominadas leyes de Mendel. En realidad, de acuerdo con lo expuesto anteriormente, podría decirse que el parto de la Genética duró 80 años puesto que empezó en 1865 con el trabajo de Mendel y terminó en 1944 con la identificación del ADN como el material hereditario.

De ambos tipos de planteamientos se derivan dos definiciones diferentes de la Genética: una, que la considera como “la ciencia que estudia la herencia y la variación en los seres vivos” (Bateson, 1906) y, otra, que la define como “la ciencia que estudia el material hereditario bajo cualquier nivel o dimensión” (Lacadena, 1974, 1988), tal como será justificado a continuación.

El desarrollo de la Genética a partir del redescubrimiento de las leyes de Mendel en 1900 fue muy rápido y, posiblemente, igualado por muy pocas ciencias. Su progreso ha estado impulsado por tres fuerzas. La primera en orden cronológico fue su inmediata aplicación a la Mejora de plantas y animales. Aquí habría que tener en cuenta su propio origen como consecuencia de la actividad de los mejoradores y criadores de plantas y animales, recordando que las reuniones que hoy se consideran como los tres primeros congresos internacionales de Genética se convocaron como “International Conference on Hybridization” (Londres, 1899), “International Conference on Plant Breeding and Hybridization” (Nueva York, 1902) y “Conference on Hybridization and Plant Breeding” (Londres, 1906). Y fue precisamente en esta tercera reunión donde William Bateson propuso el nombre de Genética para la actividad que allí les reunía y que “había dejado de ser un misterio para convertirse en ciencia”, decidiéndose que los resúmenes y acuerdos de dicha reunión se publicaran bajo el nuevo epígrafe de “Third International Conference on Genetics”.

La segunda fuerza que ha impulsado el progreso de la Genética radica en su aplicación a la Medicina, convirtiendo al ser humano en beneficiario directo del conocimiento genético.

Por último, pero no por eso menos importante, hay que tener en cuenta que la Genética puede aportar luz al conocimiento básico del fenómeno vital: su esencia, origen y evolución.

Cuando se tiene una perspectiva global de la Genética es posible apreciar la posición que ocupa entre las ciencias biológicas. Así, el profesor Rubio (1973)⁵, tras examinar las relaciones interdisciplinarias entre la Genética y otras ciencias biológicas (Citología, Bioquímica, Fisiología, Microbiología, Botánica, Zoología, Ecología, Agronomía, Zootecnia, Medicina), concluía que la Genética ocupa un puesto central porque con todas ellas tiene conexión en contenido y desarrollo histórico, ofreciendo un punto de vista aglutinante del pensamiento biológico actual. Es -decía el profesor Rubio- “como un relieve orográfico en una llanura, observatorio desde el cual se consigue una visión nueva de todo el paisaje circundante, pero siendo al mismo tiempo desde los diversos puntos de la llanura desde donde se logra precisar el perfil característico [diferente] de ese relieve”. En la llanura de ese panorama descrito podrían situarse también las ciencias

experimentales no biológicas como la Física, la Química, las Matemáticas y la Geología.

Esta relación múltiple de la Genética con las demás ciencias implica una enorme diversidad de organismos y de técnicas de estudio que pueden llevar -como se lamentaba Hadorn en su alocución presidencial del XI Congreso Internacional de Genética (La Haya, 1963)- a una diversificación y divergencia tan grandes entre los diferentes campos de investigación de la Genética que conduzcan a una falta de entendimiento mutuo entre las diversas especialidades, con la consiguiente desintegración y secesión. Las técnicas experimentales, los organismos manejados y los problemas abordados son tan dispares que puede resultar incluso ininteligible el lenguaje utilizado por los diversos especialistas.

Sin embargo, a pesar de la especialización de la Genética a nivel de organismos (Genética de virus, Genética de bacterias, Genética de hongos, ..., Genética humana), a nivel de organización (Genética Molecular, Citogenética, Genética Mendeliana, Genética de Poblaciones) o a nivel de proceso (Genética del Desarrollo, Genética Evolutiva), se mantiene un concepto unitario gracias a la existencia de un denominador común: el material hereditario. Tan genético es quien estudia el material hereditario de los virus (Genética de virus) como quien analiza cómo se organiza y transmite (Citogenética), cómo se expresa (Genética Molecular) o cuál es su destino en el espacio y en el tiempo (Genética Evolutiva). De ahí que adquiriera todo su significado la definición propuesta de Genética como “la ciencia que estudia el material hereditario bajo cualquier nivel o dimensión”.

Como señalaba Rubio, el material hereditario se puede estudiar bajo tres dimensiones: analítico-estructural (en sí mismo), dinámica (propiedades y expresión) y espacio-temporal (destino). En otras palabras, el objeto de la Genética son los genes y, por tanto, el contenido formal de esta ciencia ha de proporcionar respuestas adecuadas a las siguientes preguntas en torno a los genes:

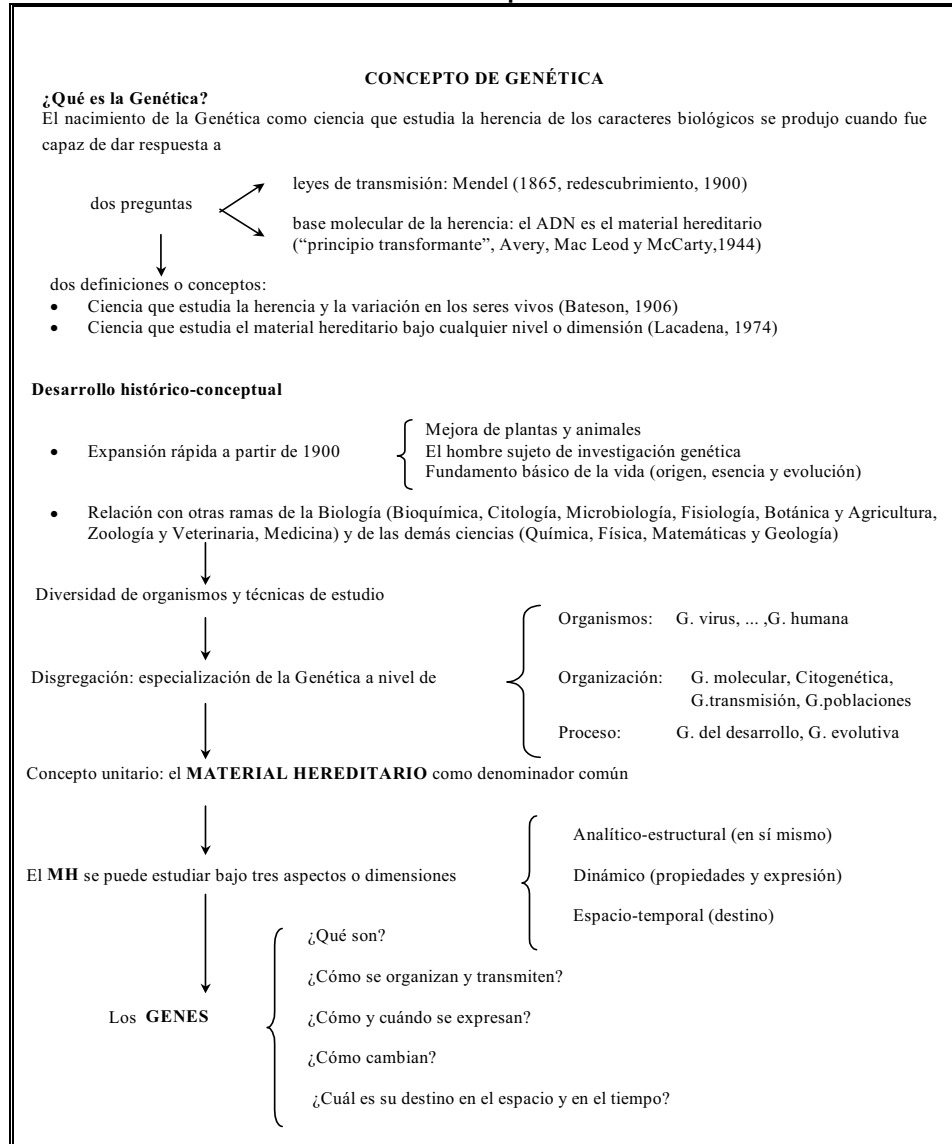
- ¿qué son?
- ¿cómo se organizan y transmiten?
- ¿cómo y cuándo se expresan?

- ¿cómo cambian?

- ¿cuál es su destino en el espacio y en el tiempo?

En el Cuadro 1 se resumen las ideas expresadas anteriormente.

Cuadro 1. Desarrollo histórico-conceptual de la Genética



En el desarrollo histórico de la Genética pueden diferenciarse, hasta el momento, siete etapas cronológicas:

- la primera etapa, que comprende desde Mendel (1865) y el redescubrimiento de sus leyes en 1900 hasta 1944, corresponde al estudio de la transmisión de los caracteres tanto a nivel familiar como de población;
- la segunda etapa, que abarca de 1940 a 1960 incluye fundamentalmente el estudio de la naturaleza y propiedades del material hereditario;
- la tercera etapa, que va de 1960 a 1975, abordó especialmente los mecanismos de acción génica (código genético, transcripción, traducción) y su regulación;
- la cuarta etapa, denominada de la *Nueva Genética* (Nathans, 1979), abarca de 1975 a 1985 y se caracteriza por el desarrollo y la aplicación de la tecnología de los ácidos nucleicos (restricción o fragmentación, hibridación, secuenciación y amplificación);
- la quinta etapa, que va desde 1985 hasta 1990, se caracteriza por la introducción del análisis genético en la dirección gen \rightarrow proteína (es decir, genotipo \rightarrow fenotipo), contraria al análisis genético mendeliano convencional (fenotipo \rightarrow genotipo), por lo que ha venido en denominarse *Genética Inversa* (Orkin, 1986);
- la sexta etapa abarca desde 1990 hasta 1995 y se caracteriza por la transferencia horizontal de genes (*Transgénesis*), tanto para la obtención de plantas y animales transgénicos como para la Terapia génica como nueva herramienta en la Medicina;
- en la séptima y por el momento última etapa, que abarca desde 1995 hasta la fecha, domina la *Genómica* (Roderick, 1986) que se caracteriza por la disección molecular del genoma de los organismos, desde los más sencillos a los más complejos, siendo su máximo exponente el Proyecto Genoma Humano. Incluso, dentro de la Genómica ya se distingue entre una *Genómica estructural*, una *Genómica funcional* y una *Genómica comparada*. También en esta etapa hay que hacer referencia a la

Clonación en mamíferos por transferencia de núcleos (véase el Cuadro 2).

Cuadro 2. ETAPAS CRONOLÓGICAS DE LA GENÉTICA

1865 (1900) – 1940:	Genética de la transmisión
1940 – 1960:	Naturaleza y propiedades del material hereditario
1960 – 1975:	Mecanismos de acción génica: Expresión (código, transcripción, traducción) y regulación de los genes. Desarrollo
1975 – 1985:	Nueva Genética , basada en la tecnología de los ácidos nucleicos (fragmentación, hibridación, secuenciación, amplificación)
1985 – 1990:	Genética Inversa: Análisis genético dirección gen → proteína
1990 – 1995:	Transgénesis: Plantas y animales transgénicos. Terapia génica
1995 – 2000:	Genómica: Disección molecular del genoma de los organismos (bacterias, eucariontes, Proyecto Genoma Humano). Genómica estructural y Genómica funcional. Genómica comparada.
1997 – 2000:	Clonación en mamíferos por transferencia de núcleos. Clonación reproductiva y clonación no reproductiva (cultivos de tejidos).

Finalmente, en relación con la cronología histórica de la Genética, es importante resaltar que la identificación en 1944 del ADN como el material hereditario supuso un cambio de paradigma en la Genética -ampliable a la Biología en general e incluso a la Sociedad- de tal importancia que permite decir que la Historia de la Genética puede dividirse en dos grandes épocas –“antes del ADN” y “después del ADN”- que en estos momentos se corresponden a períodos de tiempo más o menos equivalentes (1865-1944, 1944-2000). Utilizando un juego de palabras, se podría hablar de “la transformación de la Genética por el ADN” (Lederberg, 1994), haciendo referencia a la demostración experimental que supuso el fenómeno de transformación bacteriana y la identificación del ADN como “principio transformante”.

III. EL CONCEPTO Y EL MÉTODO EN LA GENÉTICA DESDE LA PERSPECTIVA DE LOS PREMIOS NOBEL: HISTORIA “NOBELADA” DE LA GENÉTICA⁶

En el desarrollo histórico de la Genética se ha producido una coincidencia cronológica que no se ha dado en otras ciencias, a saber: el devenir científico de la Genética, iniciado a partir de 1900 con el redescubrimiento de las leyes de Mendel, ha coincidido plenamente con la vida de la Fundación Nobel cuyos premios, que suponen el máximo reconocimiento de la comunidad científica internacional, empezaron a concederse a partir de 1901. Por ello, resulta muy interesante analizar cómo el concepto y el método de la Genética han quedado reflejados en su propia historia puesta de manifiesto por el reconocimiento de la comunidad científica a través de los 27 premios que la Fundación Nobel ha concedido desde su creación hasta la fecha a un total de 57 investigadores por sus aportaciones relevantes en el campo de la Genética o materias afines. De los 27 premios considerados, 21 son de Fisiología y Medicina, 5 de Química y uno de la Paz (ver el Cuadro 3).

Cuadro 3. Premios Nobel relacionados con la Genética

(todos ellos de Fisiología y Medicina, salvo indicación expresa)

1910	ALBRECHT KOSSEL: “por sus trabajos sobre las sustancias albuminoides, incluyendo las nucleínas, que han contribuido al conocimiento de la química de las células”
1930	KARL LANDSTEINER: “por sus descubrimientos de los grupos sanguíneos de la especie humana”
1933	THOMAS H. MORGAN: “por su descubrimiento sobre la función de los cromosomas como portadores de la herencia”
1946	HERMANN J. MULLER: “por su descubrimiento de la inducción de mutaciones mediante radiación con rayos X”
1958	GEORGE W. BEADLE y EDWARD L. TATUM: “por su descubrimiento de que los genes actúan regulando sucesos químicos definidos” JOSHUA LEDERBERG: “por sus descubrimientos relacionados con la recombinación genética y la organización del material genético en las bacterias”
1959	SEVERO OCHOA y ARTHUR KORNBERG: “por su descubrimiento de los mecanismos en la síntesis biológica de los ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico”
1960	PETER MEDAWAR y FRANK MACFARLANE BURNET: “por su descubrimiento de la tolerancia inmunológica adquirida”
1962	JAMES D. WATSON, FRANCIS H. C. CRICK y MAURICE H. F. WILKINS: “por sus descubrimientos en relación con la estructura molecular de los ácidos nucleicos y su significación para la transmisión de la información en la materia viva”
1965	FRANCOIS JACOB, JACQUES MONOD y ANDRE LWOFF: “por sus descubrimientos en relación con el control genético de la síntesis de enzimas y virus”
1968	ROBERT W. HOLLEY, HAR GOBIND KHORANA y MARSHALL W. NIRENBERG: “por su interpretación del código genético y su función en la síntesis de proteínas”

1969	MAX DELBRÜCK , SALVADOR E. LURIA y ALFRED D. HERSHEY : “por sus descubrimientos sobre el ciclo de reproducción de los virus y el papel del material genético en las bacterias y los virus”
1970	NORMAN E. BORLAUG : “por su contribución a la revolución verde” (Paz)
1972	RODNEY R. PORTER y GERALD M. EDELMAN : “por sus descubrimientos sobre la estructura química de los anticuerpos” (Química)
1975	RENATO DULBECCO , DAVID BALTIMORE y HOWARD M. TEMIN : “por sus descubrimientos en relación con la interacción entre los virus tumorales y el material genético en la célula”
1978	WERNER ARBER , HAMILTON O. SMITH y DANIEL NATHANS : “por su descubrimiento de las endonucleasas de restricción y su aplicación en genética molecular”
1980	GEORGE SNELL , BARUJ BENACERRAF y JEAN DAUSSET : “por sus descubrimientos sobre las estructuras de las superficies celulares genéticamente determinadas que rigen las reacciones inmunológicas”
1980	PAUL BERG : “por sus estudios fundamentales de bioquímica sobre ácidos nucleicos, en particular el ADN recombinante”. (Química) WALTER GILBERT y FREDERICK SANGER : “por sus contribuciones a la determinación de las secuencias de bases en los ácidos nucleicos” (Química)
1982	AARON KLUG : “por su desarrollo de la microscopía electrónica cristalográfica y sus descubrimientos sobre la estructura de complejos de ácidos nucleicos-proteínas biológicamente importantes” (Química)
1983	BARBARA McCLINTOCK : “por su descubrimiento de estructuras móviles en la masa genética”
1984	NIELS K. JERNE : “por sus teorías sobre la especificidad en el desarrollo y control de los sistemas de inmunidad” GEORGE J. F. KÖHLER y CESAR MILSTEIN : “por su descubrimiento del principio que rige la producción de anticuerpos monoclonales”
1987	SUSUMU TONEGAWA : “por su descubrimiento del fundamento genético de la formación de una rica variedad de anticuerpos”
1989	J. MICHAEL BISHOP y HAROLD E. VARMUS : “por sus descubrimientos sobre el origen celular de los oncogenes retrovirales”

1989	SIDNEY ALTMAN y THOMAS R. CECH : "por su descubrimiento de las propiedades catalíticas del ácido ribonucleico (ARN)" (Química)
1993	RICHARD J. ROBERTS y PHILLIP A. SHARP : "por el descubrimiento de los genes discontinuos"
1993	KARY B. MULLIS : "por su invención del método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)" (Química) MICHAEL SMITH : "por su contribución fundamental al establecimiento de la mutagénesis dirigida mediante oligonucleótidos y su desarrollo para estudios de proteínas" (Química)
1995	EDWARD B. LEWIS , CHRISTIANE NÜSSLEIN-VOLHARD y ERICK F. WIESCHAUS : "por sus descubrimientos sobre el control genético del desarrollo temprano del embrión"
1996	PETER C. DOHERTY y ROLF M. ZINKERNAGEL : "por sus descubrimientos sobre la respuesta inmunitaria de las células frente al ataque de organismos infecciosos"

En el apartado anterior se ha justificado el concepto de Genética como la ciencia que estudia el material hereditario bajo cualquier nivel o dimensión y ello permite concluir que su contenido formal viene dado por el planteamiento y respuestas a las preguntas siguientes en torno a los genes: ¿qué son? ¿cómo se organizan y transmiten? ¿cómo y cuándo se expresan? ¿cómo cambian? ¿cuál es su destino?. En el Cuadro 4 se esquematizan las aportaciones de los premios Nobel al contenido formal (concepto) de la Genética.

Cuadro 4. Aportaciones de los premios Nobel al contenido formal (concepto) de la Genética

GENES	¿Qué son?	<ul style="list-style-type: none"> - Química de los ácidos nucleicos (1893-1894): Kossel (1910) - Los genes son ADN: Fagos radiactivos (1952): Hershey (1969) - Modelo estructural del ADN (1953): Watson y Crick (1962), Wilkins (1962)
	¿Cómo se organizan y transmiten?	<ul style="list-style-type: none"> - Estructura de la cromatina (1977): Klug (1982) - Transmisión molecular: Replicación semiconservativa (propuesta por Watson y Crick, 1953). Síntesis enzimática del ADN (1956): Kornberg (1959) - Transmisión celular: Teoría cromosómica de la herencia <ul style="list-style-type: none"> - Los genes están en los cromosomas (1910): Morgan (1933) - Sobrecruzamiento y recombinación (1931): McClintock (1983)
	¿Cómo y cuándo se expresan?	<ul style="list-style-type: none"> - Hipótesis un gen - una enzima (1941): Beadle y Tatum (1958) - Hipótesis de la secuencia (1958): Crick (1962) - Desciframiento de la clave del código genético (1961-1966): Ochoa (1959); Nirenberg y Khorana (1968) - Síntesis de proteínas: el ARNt (1965): Holley (1968) - Genes discontinuos (1977): Sharp y Roberts (1993) - Procesamiento del ARN y actividad catalítica del ARN (1981, 1983): Altman y Cech (1989) - Regulación de la expresión génica: Modelo del operón: Jacob y Monod (1965) - Control genético del desarrollo embrionario temprano en <i>Drosophila</i> (1978, 1980): Lewis, Nüsslein-Volhard y Wieschaus (1995)
	¿Cómo cambian?	<ul style="list-style-type: none"> - Inducción de mutaciones con rayos X (1927): Muller (1946) - Elementos genéticos móviles (1951): McClintock (1983) - Mutagénesis dirigida (1978): Smith (1993)
	¿Cuál es su destino?	

Las fechas indicadas en primer lugar corresponden a las de publicación de los trabajos originales fundamentales mientras que las que aparecen detrás de los nombres hacen referencia a las de concesión del premio Nobel

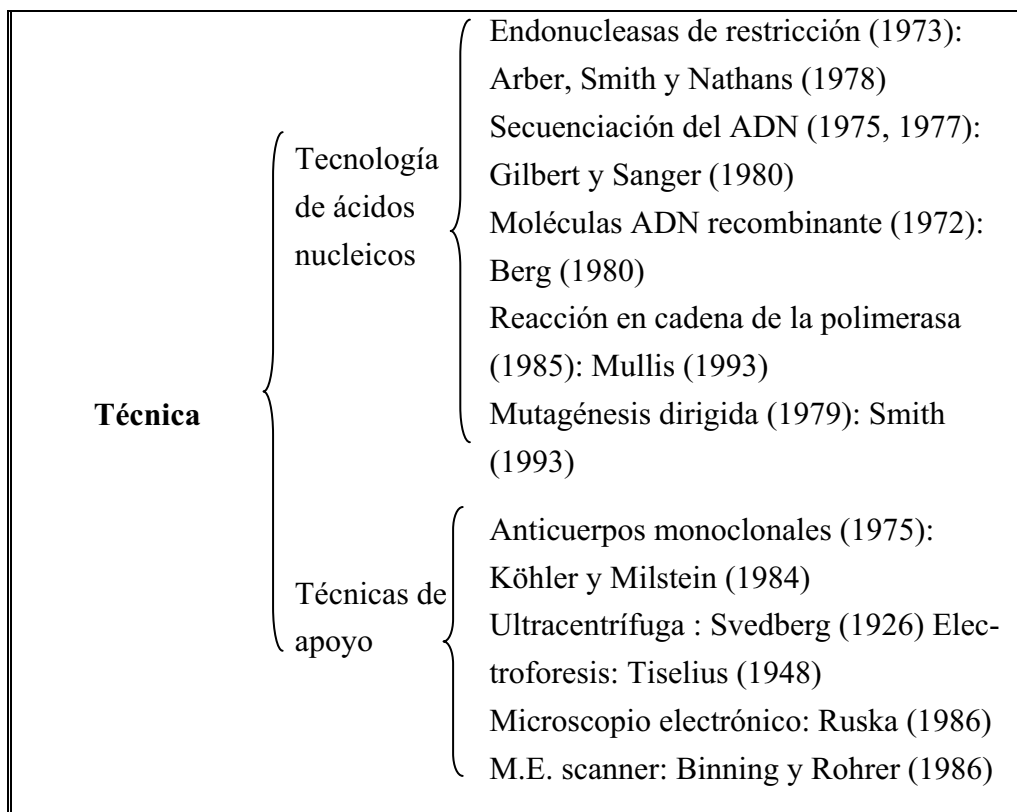
El método científico hipotético-deductivo implica el planteamiento de una hipótesis de trabajo -basada en y coherente con los datos previamente conocidos- que debe ser sometida a rigurosas pruebas experimentales. Los resultados obtenidos conducirán al planteamiento de nuevos experimentos para contestar a los nuevos interrogantes surgidos.

La regla de oro de la investigación biológica, extensible obviamente a la investigación genética, se basa en tres puntos: qué pregunta o problema se trata de resolver, en qué material biológico se va a realizar la experimentación y mediante qué técnica metodológica e instrumental. No cabe duda que si un investigador aspira a ser premio Nobel habrá de

plantearse una pregunta importante y, a partir de ahí, decidir cuál es el organismo más adecuado para abordar dicho problema y si dispone de la técnica metodológica e instrumental necesaria. En el Cuadro 5 se resume cómo en la historia “nobelada” de la Genética se ha aplicado en el método científico la regla de oro de la investigación en su triple aspecto antes mencionado.

Cuadro 5. EL MÉTODO CIENTÍFICO EN GENÉTICA Y LOS PREMIOS NOBEL

REGLA DE ORO DE LA INVESTIGACIÓN	
Pregunta importante	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="font-size: 3em; margin-right: 10px;">{</div> <div style="margin-right: 10px;"> ¿Qué son los genes? ¿Cómo se organizan y transmiten? ¿Cómo y cuándo se expresan? ¿Cómo cambian? ¿Cuál es su destino? </div> <div style="font-size: 3em; margin-left: 10px;">}</div> <div style="margin-left: 20px;">(ver Cuadro 4)</div> </div>
Material biológico	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="font-size: 3em; margin-right: 10px;">{</div> <div> Guisante (1866): Mendel Drosophila (1915): Morgan (1933) Hongos (1941): Beadle y Tatum (1958) Virus (1943, 1946): Delbrück, Luria y Hershey (1969) Bacterias: Conjugación (1946), Lederberg (1958); Lisogenia (1950), Lwoff (1965) </div> </div>



Por último, el análisis del desarrollo histórico-conceptual de la Genética desde el punto de vista de los premios Nobel concedidos pone de manifiesto que -además de las investigaciones realizadas para dar contestación a las preguntas referentes al concepto de la Genética como ciencia que estudia el material hereditario (¿qué son los genes? ¿cómo se organizan y transmiten? ¿cómo y cuándo se expresan? ¿cómo cambian?)- hay algunas áreas específicas de investigación que también han sido motivo de concesión del galardón, tales como la Inmunogenética, la Genética del Cáncer y la Genética aplicada a la Mejora de Plantas (ver el Cuadro 6).

Cuadro 6. Areas específicas de investigación en Genética y premios Nobel

Areas de investigación	El material hereditario: los genes (ver Cuadro 4)	<ul style="list-style-type: none"> - ¿Qué son? - ¿Cómo se organizan y transmiten? - ¿Cómo y cuándo se expresan? - ¿Cómo cambian?
	Inmunogenética	<ul style="list-style-type: none"> - Inmunología de los grupos sanguíneos humanos (1900, 1901): Landsteiner (1930) - Tolerancia inmunológica y teoría de la selección clonal : Medawar y Burnet (1960) - Estructura química de los anticuerpos (1959): Porter y Edelman (1972) - Sistemas de histoincompatibilidad (1948, 1958): Snell, Benacerraf y Dausset (1980) - Control de sistemas de inmunidad: Jerne (1984) - Anticuerpos monoclonales (1975): Köhler y Milstein (1984) - Base genética de la diversidad de los anticuerpos (1976): Tonegawa (1987) - Mecanismos de reconocimiento de los microorganismos invasores por las células del sistema inmunitario (1974): Doherty y Zinkernagel (1996)
	Genética y cáncer	<ul style="list-style-type: none"> - Interacción entre los virus tumorales y el material genético de las células (1964, 1970): Dulbecco, Baltimore y Temin (1975) - Origen celular de los oncogenes retrovirales (1976): Bishop y Varmus (1989)
	Genética aplicada a la Mejora de Plantas	<ul style="list-style-type: none"> - La revolución verde: Borlaug (1970)

Las fechas que se citan en primer lugar corresponden a las de los trabajos originales fundamentales mientras que las que aparecen detrás de los nombres hacen referencia a las de concesión del premio Nobel

IV. MANIPULACIÓN GENÉTICA

Como se indicaba anteriormente, en la década 1975-1985 se desarrollaron las técnicas moleculares de fragmentación, hibridación, secuenciación y amplificación del ADN que permiten, respectivamente, 1) cortar moléculas de ADN por donde desea el investigador utilizando “tijeras enzimáticas” como son las endonucleasas de restricción, 2) localizar genes concretos hibridando sondas marcadas con sus secuencias complementarias en el ADN original, 3) leer directamente el mensaje genético contenido (realizable ya mediante técnicas de secuenciación automática) y 4) multiplicar millones de veces la cantidad de ADN disponible a partir de una muestra ínfima mediante la técnica denominada

“reacción en cadena de la polimerasa” (PCR). Esta tecnología de los ácidos nucleicos es la que he hecho manipulables a los genes.

Hace ya muchos años que Fred Hoyle, el famoso astrónomo de la Universidad de Cambridge, profetizaba que “dentro de veinte años, los físicos, que sólo fabrican inofensivas bombas de hidrógeno, trabajarán en libertad, mientras que los biólogos moleculares lo harán tras alambradas eléctricas”. Lo que Hoyle predecía era el enorme poder que iba a tener la Genética al poder manipular los genes. Salvando las distancias, se podría hacer la siguiente comparación: lo mismo que el poder y el peligro de la Física se alcanzó cuando los científicos fueron capaces de “tocar” los átomos (me refiero a la física atómica y la energía nuclear), el poder y el peligro potencial de la Genética se han hecho realidad cuando los científicos han podido “tocar” los genes; es decir, manipularlos. Es la manipulación genética.

Realmente, la potencialidad de la Genética es enorme y eso hace que el ciudadano -la Sociedad- perciba la Genética como una ciencia todopoderosa y considere al ADN como una nueva piedra filosofal de la Biología; aunque algunos, ante el mal uso que pueda hacerse de las técnicas genéticas, puedan ver la doble hélice del ADN como una molécula de doble filo.

En el Cuadro 7 se pone de manifiesto el avance vertiginoso de la Ingeniería Genética Molecular y sus aplicaciones en sus treinta años de historia (1970-2000):

Cuadro 7. CRONOLOGÍA DE LA INGENIERÍA GENÉTICA MOLECULAR Y SUS APLICACIONES

1970:	Moléculas de ADN recombinante : Utilización de ligasas (Khorana)
1972:	Moléculas de ADN recombinante : Extremos cohesivos utilizando nucleotidil terminal transferasas (Berg)
1973:	Moléculas de ADN recombinante : Extremos cohesivos mediante endonucleasas de restricción (EcoRI, Cohen)
1974-1975:	Moratoria : Conferencia de Asilomar (Berg <i>et al</i>)
1976:	Aislamiento de genes : ARNm → ADNc (Rabbits, Maniatis)

1977:	Síntesis artificial del gen a clonar : Insulina, somatostatina (Boyer)
1978:	Bibliotecas (genotecas) de ADN eucariótico : Fagos y cósmidos (Maniatis)
1979:	Paseo cromosómico (Hogness)
1981:	Comercialización (I+D) : la empresa Genentech cotiza en la bolsa de Nueva York. Biotecnología
1982:	Se comercializa la “Humulina”: insulina humana obtenida mediante las técnicas del ADN recombinante
1982-1985:	Animales transgénicos (Gordon, Ruddle, Hammer)
1983-1986:	Cromosomas artificiales de levaduras, YACs (Murray y Szostak, Olsen)
1986:	Genética Inversa: Análisis genético en la dirección gen → proteína (Orkin)
1986:	Bloqueo de genes por recombinación homóloga: Gene targeting, ratones knockout (Capecchi)
1984-1990:	Terapia Génica (Friedmann, Verma, Anderson, Blaese, Rosenberg)
1990-1995:	Terapia Génica: Se aprueban los primeros protocolos (1990) y se obtienen los primeros resultados positivos (Anderson <i>et al.</i> ,1995; Bordignon <i>et al.</i> ,1995)
1986-1990:	Iniciación del Proyecto Genoma Humano
1990-2000:	Plantas transgénicas y su utilización en la agricultura Animales domésticos transgénicos productores de proteínas terapéuticas humanas: Granjas farmacéuticas
1995-2000:	Genómica: Disección molecular del genoma de organismos: Secuenciación total del genoma de bacterias (Venter <i>et al.</i>). Genoma esencial mínimo (Venter <i>et al.</i>)
1995-2000	Proyecto Genoma Humano: Mapas de transcripción basados en secuencias expresadas, ESTs (Venter) y mapas físicos basados en secuencias etiquetadas, STS (Cohen, Lander). The Sanger Centre (Dunham), NIH (Collins), etc. Genómica estructural y Genómica funcional.
1996:	Genómica : Secuenciación total del genoma de un organismo eucariótico (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 12.052.000 pb) (Goffeau <i>et al.</i>)
1997-2000:	Clonación de mamíferos a partir de células diferenciadas de un individuo adulto de oveja (“Dolly”, Wilmut <i>et al.</i>), vaca, ratón, etc.
1998:	Genómica: Secuenciación total del genoma de un organismo eucariótico pluricelular (<i>Caenorhabditis elegans</i> , 97.000.000 pb) (Sulston, Waterston <i>et al.</i>)
1999:	Genómica: El Genoma mínimo de <i>Mycoplasma</i> (Venter <i>et al.</i>)

1999-2000:	Terapia celular: Cultivos de tejidos a partir de células pluripotentes
1999:	Genómica: Secuenciación del cromosoma 22 humano; 33,4 Mpb; 545 genes; 134 pseudogenes (Dunham <i>et al.</i>)
2000:	Genómica: Secuenciación del cromosoma 21 humano; 33,5 Mpb; 225 genes; 59 pseudogenes (Hattori <i>et al.</i>)
2000:	Genómica: Secuenciación del genoma de <i>Drosophila melanogaster</i>
2000:	Genómica: Secuenciación del genoma humano (> 90%)
2000:	Terapia génica: nuevos éxitos en inmunodeficiencia combinada grave (Cavazzana-Calvo <i>et al.</i>) y en la hemofilia tipo B

La última década de la Genética (1990–2000) se ha caracterizado por el desarrollo de tres áreas de investigación realmente notables: la Genómica, la Transgénesis y la Clonación. Por razones de espacio, en lo que sigue solamente se hará referencia a las dos primeras.

1. GENÓMICA

El término *Genómica* hace referencia a la rama de la Genética que trata de la *disección molecular del genoma de los organismos*; es decir, el conocimiento total de la secuencia de bases nitrogenadas (A,T,G,C) de su ADN. El desarrollo de la Genómica empezó a dar resultados espectaculares a partir de 1995 con el desciframiento de la secuencia total de los genomas de organismos sencillos, como son las bacterias, para continuar con organismos más complejos (la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el nematodo *Caenorhabditis elegans*, el insecto *Drosophila melanogaster* y otros aún en progreso como el ratón *Mus musculus*, la planta *Arabidopsis thaliana*, etc.), para terminar con el *Proyecto Genoma Humano* como máxima expresión de la Genómica. En el cuadro 8 se incluyen algunos datos de interés.

Cuadro 8. GENÓMICA: ORGANISMOS SECUENCIADOS

ORGANISMO	TAMAÑO DEL GENOMA (en pares de bases, pb)	AÑO DE SECUENCIACIÓN
Procariontes (Bacterias)		

<i>Haemophilus influenzae</i>	1.830.137 pb	Fleischmann, ... ,Venter (1995)
<i>Mycoplasma genitalium</i>	580.070 pb	Fraser, ... ,Venter (1995)
<i>Methanococcus jannaschii</i>	1.660.000 pb	Bult, ... ,Venter (1996)
<i>Helicobacter pylori</i>	1.667.867 pb	Tomb, ... ,Venter (1997)
<i>Escherichia coli</i>	4.639.221 pb	Blattner <i>et al</i> (1997)
<i>Bacillus subtilis</i>	4.214.810 pb	Kunst <i>et al</i> (1997)
<i>Treponema pallidum</i>	1.138.006 pb	Fraser, ... ,Venter (1998)
<i>Rickettsia prowazekii</i>	1.111.523 pb	Anderson <i>et al</i> (1998)
Eucariontes		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12.052.000 pb (completo)	Goffeau <i>et al</i> (1996)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	97.000.000 pb (completo)	Consorcio (1998)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cromosoma 2: 19.600.000 pb Cromosoma 4: 17.380.000 pb (en conjunto, un 32% del genoma total: 130-140 Mpb)	Lin, ... ,Venter (1999) Consorcio (1999)
<i>Drosophila melanogaster</i>	120.000.000 pb ADN eucromatina (el 30% del ADN del genoma total, 180 Mpb, es de heterocromatina)	Adams, ... ,Venter (2000)

	centromérica)	
<i>Homo sapiens</i>	> 90% del genoma (3.000 Mpb)	Venter, Collins, Dunham, etc. (2000)

En el Cuadro 9 se señalan los hitos más importantes relacionados con el desarrollo del Proyecto Genoma Humano.

Cuadro 9. CRONOLOGÍA DEL PROYECTO GENOMA HUMANO

Marzo, 1986	El Departamento de Energía (DoE) de los Estados Unidos discute en Santa Fe los planes de secuenciación del genoma humano.
Abril, 1987	El DoE acuerda gastar mil millones de dólares a lo largo de siete años.
Febrero, 1988	El US National Research Council apoya el Proyecto Genoma Humano (PGH).
Marzo, 1988	Los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) de los Estados Unidos anuncian su participación.
Abril, 1988	La Office of Technology Assessment (OTA) del Congreso de los Estados Unidos apoya el PGH.
Septiembre, 1988	Se crea la Office of Human Genome Research en los NIH presidida por J.D. Watson.
Octubre, 1989	Los NIH crean el National Center for Human Genome Research (NCHGR) dirigido por Watson.
Abril, 1990	NIH y DoE publican un plan quinquenal (1990-1995) de mapeo y secuenciación con un presupuesto de 200 millones \$/año.
Julio, 1991	Craig J. Venter, entonces en los NIH, revela que esta institución ha solicitado las patentes de fragmentos de ADN de células del cerebro secuenciadas en su laboratorio. Watson se opone.
Abril, 1992	Watson dimite como director del NCHGR, siendo sustituido por Francis Collins
Junio, 1992	Venter abandona los NIH y crea The Institute for Genomic Research (TIGR) en Rockville, Mariland, que es financiado con 125 millones \$ por

	SmithKline Beecham a través de la compañía Human Genome Sciences (HGS).
Julio, 1992	Se crea en Inglaterra el Wellcome Trust, anunciando una subvención de 50 millones £ para proyectos de secuenciación que incluye el del nematodo <i>Caenorhabditis elegans</i> . El PGH continúa como proyecto multinacional sostenido por fondos públicos y de organizaciones benéficas.
Octubre, 1993	NIH y DoE hacen público un plan quinquenal revisado (1993-1998) cuya meta es la secuenciación de 80 Mpb. Se estima que el PGH será completado en 2005.
Octubre, 1993	Wellcome Trust y UK Medical Research Council abren el Sanger Center en Hinxton Hall, Cambridge, para la secuenciación del genoma humano y otros organismos modelo.
Septiembre, 1994	Investigadores franceses y americanos hacen público un mapa genético de ligamiento completo del genoma humano, con un año de antelación sobre el plan programado.
Diciembre, 1995	En otra colaboración de investigadores americanos y franceses se publica un mapa físico del genoma humano que contiene 15.000 marcadores.
Febrero, 1996	Los miembros internacionales componentes del PGH acuerdan en las Bermudas dar a conocer en 24 horas en una base de datos pública las secuencias del genoma humano que se vayan obteniendo.
Abril, 1996	Un consorcio internacional publica la secuencia completa del genoma de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
Enero, 1997	El NCHGR cambia su denominación como National Human Genome Research Institute (NHGRI).
Junio, 1997	TIGR rompe sus relaciones con HGS por razones de política de publicación.
Mayo, 1998	Venter anuncia la formación de una compañía, más tarde denominada Celera, para secuenciar el genoma humano en un plazo de tres años, utilizando el método "whole-genome shotgun". La política de acceso a los datos de Celera no seguirá la declaración de las Bermudas.
Mayo, 1998	Como respuesta a Celera, Wellcome Trust anuncia que duplicará su dotación económica, haciéndose responsable de la tercera parte de la realización del PGH.

Octubre, 1998	NIH y DoE hacen públicas sus metas para el quinquenio 1998-2003: un tercio del genoma total humano (1000 Mpb) y un “borrador de trabajo” del resto del genoma para el 2003.
Diciembre, 1998	Investigadores británicos y americanos secuencian completamente el genoma del nematodo <i>Caenorhabditis elegans</i> .
Diciembre, 1998	NIH y Wellcome Trust bloquean la colaboración propuesta entre Celera y DoE, argumentando que el acuerdo iría en contra de la política de acceso libre a los datos del PGH.
Marzo, 1999	NIH adelanta la fecha de obtención del “borrador de trabajo” del genoma humano a la primavera del 2000. NIH y Wellcome Trust anuncian el final de la “fase piloto” y comienzan la secuenciación total. Los costes se reducen a 20-30 centavos \$/base
Septiembre, 1999	NIH lanza el proyecto de secuenciación del genoma del ratón, <i>Mus musculus</i> .
Noviembre, 1999	El PGH alcanza los mil millones de bases secuenciadas.
Diciembre, 1999	Se publica la primera secuencia completa de un cromosoma humano (el cromosoma 22). Celera y PGH oficial discuten su posible colaboración.
Enero, 2000	Celera anuncia haber secuenciado un 90% del genoma humano.
Marzo, 2000	Celera, en colaboración con investigadores de universidades y otras instituciones, publican la secuencia “substancialmente completa” (120 Mpb de la eucromatina) de <i>Drosophila melanogaster</i> utilizando el método “whole-genome shotgun”.
Marzo, 2000	Nuevo intento fracasado de colaboración entre Celera y PGH por la política de liberación de datos.
Marzo, 2000	PGH anuncia haber alcanzado la secuenciación de 2000 Mpb.
Abril, 2000	Celera anuncia la terminación del “estadio de secuenciación en bruto” del genoma completo de un individuo humano.
Mayo, 2000	Un consorcio del PGH formado por investigadores alemanes y japoneses publica la secuencia completa del cromosoma 21.
Junio, 2000	El consorcio oficial del PGH y Celera anuncian conjuntamente el “borrador de trabajo” del genoma humano completo.

De nada servirían los trabajos de secuenciación si no se sabe para qué sirven las secuencias descifradas. Por eso, muy pronto la *Genómica estructural* –la secuenciación sin más– dio paso a la *Genómica funcional*, que trata de descubrir la función que tiene cada secuencia conocida, para lo cual resulta de gran ayuda la comparación de las secuencias que aparecen en los genomas de organismos más o menos relacionados en la evolución (*Genómica comparada*).

Al término de la secuenciación total del genoma humano en el año 2000, se puede decir que se ha llegado al “fin del principio”: ya se dispone de toda la base de datos necesaria para iniciar la segunda fase de estudio que ya algunos denominan el Proyecto Proteoma, indicando que se trata de identificar las proteínas que los genes secuenciados codifican, analizando sus funciones e interacciones. De esta manera, el Proyecto Genoma Humano abre las puertas a una nueva Medicina –la Medicina genómica, que incluye la Farmacogenómica- que ha de ser de gran beneficio para la Humanidad. No obstante, todos somos conscientes de los importantes problemas éticos y jurídicos que se están planteando ya sea en términos de privacidad (relaciones laborales, seguros), patentes de genes humanos, identificación legal, etc.⁷

1.1. Jugando a Dios⁸

En el desarrollo de la Genómica está jugando un papel preponderante el científico norteamericano J. Craig Venter, trabajando primero en los Institutos Nacionales de la Salud (NIH, organismo oficial de los Estados Unidos), después en la compañía privada The Institute for Genomic Research (TIGR) y, finalmente, en Celera Genomics que fundó y dirige.

A mediados del año 1999, los medios de comunicación transmitían la siguiente noticia de agencia fechada en Los Angeles, Estados Unidos:

“Un grupo de científicos norteamericanos, que investigan la estructura genética de los seres vivos, afirmó que está a punto de descifrar la forma de crear vida artificial a partir de un grupo reducido de genes [...] El investigador Craig Venter espera emplear ADN de bacterias muertas para crear artificialmente un microorganismo”

En aquella fecha el Dr. J. Craig Venter expuso sus planes en la reunión que la Asociación Americana para el Avance de las Ciencias (AAAS) celebró en la ciudad de Anaheim, cerca de Los Angeles. Algunos meses más tarde, el 10 de Diciembre de 1999, el Dr. Venter publicaba en la revista *Science*⁹ los primeros resultados experimentales de su proyecto. Sorprendentemente, los medios de comunicación no han percibido el significado e importancia de la investigación realizada y del proyecto futuro planteado. Este proyecto de “jugar a Dios” (el *playing God* inglés) es el motivo de la presente reflexión.

El enorme poder de la Biomedicina actual estriba, por una parte, en que el científico puede “crear” la vida en el laboratorio mediante la técnica de fecundación *in vitro* y, por otra parte, en la posibilidad de “tocar” los genes y, por tanto, manipularlos. El investigador puede identificar los genes de entre la masa molecular de ADN que constituye el genoma de los organismos, puede caracterizarlos (leerlos), modificarlos, transferirlos de unas células a otras, de unos individuos a otros o de unas especies a otras (transgénesis).

Cuando el científico realiza la fecundación *in vitro* puede originar una nueva vida, pero no actúa como “creador” ya que esa nueva vida que constituye el cigoto no ha sido creada de la nada, sino a partir de dos células preexistentes: los gametos masculino y femenino. Podría decirse, si se quiere, que el científico ha actuado como un dios menor. Sin embargo, la Genómica puede deparar alguna sorpresa en el futuro.

La *Genómica funcional* se plantea la cuestión fundamental de cuántos genes son esenciales para la vida celular. Es decir, la pregunta *¿qué es la vida?* puede expresarse en términos genómicos como *¿cuál es el juego mínimo de genes celulares esenciales?*

La comparación de los genomas de *Mycoplasma genitalium* (580.070 pb) y de *Mycoplasma pneumoniae* (816.000 pb) puso de manifiesto que esta última tiene los mismos 480 genes (aunque más o menos evolucionados) que codifican para proteínas que *M.genitalium* más otros 197 genes adicionales. Por ello, Venter y colaboradores trataron de comprobar si los 480 genes comunes representan un *juego esencial mínimo*. La técnica utilizada (*mutagénesis global con transposones*) consistió en inducir con transposones en ambas especies un gran número de mutaciones

en genes distintos con objeto de identificar cuáles eran o no esenciales para la vida de la célula bacteriana. La conclusión que obtuvieron fue que, de los 480 genes codificantes para proteínas en *Mycoplasma genitalium*, solamente entre 265 y 350 son esenciales para el crecimiento de la bacteria en las condiciones de laboratorio, incluyendo entre ellos unos 100 genes de función todavía desconocida. La existencia de este centenar de genes esenciales cuya función no es conocida podría indicar que aún no se han descrito todos los mecanismos moleculares básicos implicados en la vida de las células.

Otra conclusión que extraen Venter y colaboradores de su experimento es que el *juego de genes esenciales* no se corresponde exactamente con el *genoma mínimo*, ya que genes que son individualmente dispensables pueden no serlo simultáneamente.

Como conclusión final de su trabajo, Venter y colaboradores indican que su investigación representa la etapa inicial de la posible construcción artificial de una célula con un genoma mínimo esencial capaz de desarrollarse en condiciones de laboratorio. Para poder identificar el juego mínimo de genes esenciales apuntan la posibilidad de construir y ensayar un cromosoma artificial tipo “casette” construido con los supuestos genes. No obstante, dicen los autores que dicho experimento no se hará sin una deliberación ética previa. Ante este requerimiento, en el mismo número de la revista *Science*, Cho y colaboradores publican un artículo que discute los aspectos éticos y religiosos de la cuestión¹⁰.

Simplificando mucho la cuestión, podría decirse que para ser “creadores” de una nueva forma de vida habría que sintetizar artificialmente una especie de membrana celular (lo cual es posible) e introducir en ella, junto con el genoma mínimo construido también artificialmente, los elementos moleculares necesarios para que se exprese. En este contexto es importante recordar que para que se sinteticen las proteínas codificadas por el ADN es necesario a su vez el concurso de ciertas enzimas y otras proteínas; es decir, que se reproduce el círculo vicioso de qué es antes si el huevo o la gallina, el ADN o las proteínas.

A pesar de las enormes dificultades técnicas que implicaría el proyecto de “jugar a Dios”, no debemos olvidar que la experiencia parece demostrar –pensemos, por ejemplo, en el caso de la clonación– que para la Ciencia

todo es posible; en palabras del premio Nobel Severo Ochoa, “la Ciencia es imparable”. Esta frase tiene dos lecturas: la primera, constatar que el progreso científico es continuo, lo cual nos llena a todos de orgullo; la segunda lectura tiene un sentido peyorativo porque podría ser interpretada como que el científico no está dispuesto a parar. Y aquí entraríamos ya en el terreno ético de que no todo lo que es técnicamente posible puede ser éticamente deseable.

Desde hace unos años, en los que la Bioética ha tomado carta de naturaleza en la sociedad y en la comunidad científica, el debate bioético se produce a la par, o incluso antes, que el hecho científico. Pensemos, por ejemplo, en los debates sobre las moléculas de ADN recombinante, el Proyecto Genoma Humano o la clonación. Por ello, no estaría de más que, a la vista de que la Genómica de hoy pueda llevarnos a la posibilidad, aunque sea muy remota, de “jugar a Dios” en el futuro, se abriera un foro de debate sobre la cuestión.

Un proyecto de crear un nuevo organismo con un genoma mínimo implica la realización de un gran número de líneas de investigación que, estableciendo hitos diferentes, deberán converger en una meta común. Es lógico pensar que algunas líneas de investigación tengan un valor científico puramente básico, mientras que otras sean de tipo aplicado, y que las implicaciones éticas, sociales y económicas sean distintas.

Al plantearse el problema ético de la libertad de investigación hay que valorar, como si de una contabilidad se tratara, los beneficios y los costos; es decir, los pros y los contras pero, a diferencia de una contabilidad comercial, no solamente de hacer tal investigación sino también de no hacerla. Se puede pecar por acción o por omisión.

¿Qué repercusiones positivas podría tener el proyecto? Desde el punto de vista de la investigación básica puede suponer una aportación muy importante al conocimiento del origen de la vida, de la evolución bacteriana y del control del metabolismo celular. Desde el punto de vista de la ciencia aplicada, el proyecto podría implicar un progreso en la biotecnología microbiana al tratar de diseñar bacterias con fines específicos y gastos mínimos de energía. Como posibles problemas habría que contemplar las implicaciones ambientales y la posibilidad no deseable, pero posible, de que la ingeniería bacteriana se utilizara como arma biológica.

El reduccionismo es uno de los problemas éticos y filosóficos que plantea el proyecto de “jugar a Dios”. En la controversia científica actual sobre el concepto de vida, muchos biólogos la definen en términos de propiedades metabólicas, de la capacidad de respuesta al ambiente o de la capacidad de replicarse. Como señalan Cho y colaboradores, quienes consideran que la propiedad de replicación es la característica clave de la vida piensan que los genes constituyen tanto el origen como la naturaleza de la vida; es decir, los genes son los que hacen que vivan los seres vivos. La Genómica en sí supone un reduccionismo máximo de la Biología al tratar a los organismos vivos desde la disección molecular de su genoma. El propio Dr. Venter decía: “...estamos cuestionándonos si es ético crear vida de forma sintética ... creemos que esta discusión bien vale la pena ... porque llega a la definición de lo que es vida”. Como se mencionaba antes, en términos genómicos la vida se identificaría con el genoma mínimo o juego esencial de genes.

Una de las singularidades de la especie humana que la diferencia de cualquier otra especie animal es la de ser *sujeto ético* (*the ethical animal* de Waddington); es decir, estar genéticamente capacitado para hacer juicios de valor, distinguir el bien del mal, y obrar libremente optando por uno u otro. Esa capacidad genética es producto de la evolución. El libro del Génesis relata la prohibición divina: “...mas del árbol de la ciencia del bien y del mal no comerás” (Gn 2,16) y por eso la serpiente tentó a Eva diciéndole “... se os abrirán los ojos y seréis como dioses, concedores del bien y del mal” (Gn 3,5). Por eso en una ocasión anterior me planteaba la cuestión de si el pecado original no podría interpretarse en términos de la capacidad exclusiva del ser humano, como especie biológica, de elegir conscientemente el mal¹¹. En relación con el proyecto de crear la vida, los científicos deberán ejercitar su condición de sujetos éticos y obrar en consecuencia.

2. TRANSGÉNESIS

Normalmente, en los organismos superiores animales o vegetales la información genética se transmite por mecanismos de reproducción sexual ; es lo que se conoce como *transmisión genética vertical*. Sin embargo, hace

ya unos veinte años se logró obtener los primeros ratones transgénicos mediante *transferencia génica* por inyección directa de ADN extraño en un cigoto obtenido por fecundación *in vitro*; es decir, se trataba de una *transmisión genética horizontal*, también llamada *transgénesis*.

2.1. Animales transgénicos

A partir de las experiencias de Gordon, Ruddle y colaboradores iniciadas en 1980 en las que inyectaron ADN de ratón en uno de los pronúcleos de un cigoto de la misma especie, se inició una nueva era en la manipulación genética de embriones de mamíferos¹². Al año siguiente, Gordon y Ruddle¹³ demostraban la integración y transmisión estable a través de la línea germinal de genes inyectados en pronúcleos de cigotos de ratón obtenidos por fecundación *in vitro*. Eran los primeros *ratones transgénicos*. El paso siguiente consistió en probar que también se podían obtener ratones transgénicos que incorporaran en su genoma un gen (*transgén*) de otra especie. Así, Palmiter y colaboradores obtuvieron ratones transgénicos gigantes al inyectar en el pronúcleo de un cigoto el gen de la rata que codifica para la hormona del crecimiento. Incluso, se obtuvieron también ratones transgénicos gigantes cuando el transgén introducido era el gen humano que codifica para la hormona de crecimiento¹⁴.

Como era de esperar, a los ratones transgénicos siguieron los conejos, ovejas y cerdos transgénicos a los que se les había introducido por microinyección en uno de los pronúcleos del cigoto el ADN del gen humano que codifica para la hormona de crecimiento, en un intento de aumentar el tamaño de tales animales¹⁵. Sin embargo, este avance científico no tuvo aplicación zootécnica porque la presencia del transgén modifica la fisiología del animal transgénico, produciendo efectos colaterales perjudiciales para su desarrollo. De cualquier manera, la era de la transgénesis animal había comenzado como una realidad imparable. Se han obtenido animales transgénicos en mamíferos (ratón, rata, conejo, oveja, cabra, vaca, cerdo), aves (pollo, codorniz) y peces (salmón, trucha, carpa, dorada, medaka, etc.)¹⁶.

Por su especial importancia, en lo que sigue solamente se hará referencia a la obtención y utilización de animales transgénicos en especies de mamíferos de valor económico.

2.1.1. *Mamíferos transgénicos*

Como se indicaba anteriormente, las investigaciones llevadas a cabo a principio de los años ochenta no fueron más que el lanzamiento de una serie ininterrumpida de avances, tanto en la investigación básica como en la utilización práctica de los animales transgénicos. En el cuadro 10 se incluyen los principales hitos relacionados con la obtención y desarrollo de los mamíferos transgénicos.

Cuadro 10. MAMÍFEROS TRANSGÉNICOS: ANTECEDENTES Y CRONOLOGÍA
1938: Spemann propone experimento de transferencia nuclear
1949: Hammond mantiene embriones de ratón en cultivo in vitro
1961: Tarkowski obtiene ratones quiméricos agregando embriones
1966: Lin describe la técnica de microinyección de embriones de ratón
1980: Gordon, Ruddle y col. obtienen los primeros ratones transgénicos por microinyección de ADN en el pronúcleo de cigotos de ratón
1981: Gordon y Ruddle obtienen ratones transgénicos por microinyección de ADN en el pronúcleo de cigotos de ratón
1981: Evans y Kaufman obtienen células embrionarias totipotentes de ratón
1982: Palmiter y col. obtienen ratones transgénicos gigantes mediante transgenes de la hormona del crecimiento de la rata
1983: Palmiter y col. obtienen ratones transgénicos gigantes mediante transgenes de la hormona de crecimiento humana
1983: McGrath y Solter desarrollan una nueva técnica para experimentos de transferencia nuclear en ratón
1985: Hammer y col. obtienen animales de granja transgénicos (conejos, ovejas, cerdos) con el transgén de la hormona del crecimiento humano
1987: Thomas y Capecchi obtienen los primeros ratones knockout por

- recombinación homóloga
- 1989: Clark y col. obtienen ovejas transgénicas con el gen humano del factor IX de coagulación de la sangre mediante microinyección de ADN en el pronúcleo del cigoto
- 1991: Wright y col. obtienen ovejas transgénicas con el gen humano de la α -1-antitripsina mediante microinyección de ADN en el pronúcleo de cigotos
- 1991: Ebert y col. obtienen cabras transgénicas con el gen AtPH humano (activador tisular de plasminógeno) mediante microinyección de ADN en pronúcleo de cigoto
- 1991: Krimpenfort y col. obtienen vacas transgénicas con el gen humano de la lactoferrina mediante microinyección de ADN en el pronúcleo de cigotos
- 1993: Nagy y Rossant obtienen ratones quiméricos por co-cultivo de embriones
- 1993: Schedl y col. obtienen ratones transgénicos con cromosomas artificiales de levaduras
- 1994: Brinster y col. obtienen ratones transgénicos por trasplante de espermatogonias
- 1996: Campbell y col. obtienen ovejas clónicas por transferencia nuclear de células embrionarias en cultivo
- 1997: Wilmut y col. obtienen ovejas clónicas por transferencia nuclear de células diferenciadas fetales y adultas en cultivo
- 1997: Schnieke y col. obtienen ovejas clónicas transgénicas por transferencia nuclear a partir de células fetales diferenciadas
- 1998: Cibelli y col. obtienen vacas clónicas transgénicas por transferencia nuclear a partir de células fetales diferenciadas
- 1999: Baguisi y col. obtienen cabras transgénicas por transferencia nuclear
- 1999: Yanagimachi y col. obtienen ratones transgénicos mediante la coinyección de cabezas de espermatozoides y ADN exógeno
- 2000: PPL Therapeutics obtiene cerdos clónicos por transferencia nuclear, etapa previa para obtener cerdos transgénicos útiles para xenotrasplantes
- 2000: McCreath y col., de PPL Therapeutics, obtienen ovejas clónicas transgénicas con el gen humano de la alfa-1-antitripsina integrado

en el genoma de la oveja por recombinación homóloga

Las técnicas de obtención de animales transgénicos son:

- Microinyección de ADN en núcleo de ovocito
- Microinyección de ADN en pronúcleo o en citoplasma de cigoto (óvulo fecundado)
- Electroporación de cigoto
- Transfección de células totipotentes
- Co-inyección en ovocitos de una mezcla de cabezas de espermatozoides y ADN exógeno
- Vectores virales
- Transfección de gametos
- Transferencia de núcleos transfectados (clonación)

La introducción de una nueva información genética (el transgén) dentro del genoma de un organismo puede presentar algunos problemas en relación a dónde y cuándo expresar el transgén. En cualquier caso, el ideal sería poder dirigir con total precisión el lugar de integración del transgén. Así, por ejemplo, en 2000 se obtuvieron en el Roslin Institute de Edinburgo ovejas transgénicas a partir de la clonación de cultivos celulares modificados mediante recombinación homóloga (*gene targeting*)¹⁷.

2.1.2. Las granjas farmacéuticas

La Biotecnología ha aplicado estas técnicas experimentales de transgénesis y ya hoy se están estableciendo las primeras *granjas farmacéuticas* en las que se crían ovejas, cabras, vacas o cerdos transgénicos que producen en su leche proteínas terapéuticas humanas (ver Velander *et al.*, 1997, nota nº 10 a pie de página).

La manipulación genética de un mamífero doméstico transgénico consiste, en primer lugar, en preparar el fragmento de ADN que contiene el gen humano, uniéndolo a otro fragmento de ADN correspondiente a un elemento regulador (promotor) procedente de un gen que promueve la síntesis de una proteína de la leche (por ejemplo, la β -lactoglobulina, la

caseína, etc.). De esta manera se asegura que el gen humano sólo se expresará en las células de las glándulas mamarias del animal transgénico (oveja, cabra, vaca, cerdo) obtenido tras la inyección del ADN manipulado en el pronúcleo masculino de un cigoto producido por fecundación *in vitro*¹⁸. Sin embargo, actualmente, la utilización de la técnica de clonación por transferencia de núcleos de células genéticamente modificadas resulta más ventajosa. Con esta última técnica, los investigadores del Roslin Institute de Edinburgo obtuvieron por vez primera en 1997 ovejas transgénicas procedentes de núcleos de fibroblastos fetales a los que se les había introducido el gen humano que codifica para el factor IX de coagulación de la sangre¹⁹. Los resultados de estos autores demostraron además que la utilización de la técnica de clonación de los núcleos modificados genéticamente es mucho más eficaz que la técnica original de microinyección de ADN en los pronúcleos de los cigotos.

Posteriormente, con estas técnicas se ha conseguido que la leche de las hembras transgénicas contenga también otras proteínas terapéuticas humanas (α -1-antitripsina, proteína C, factor VIII de coagulación, anti-trombina III, etc.) que pueden luego ser fácilmente separadas de las restantes proteínas propias del animal. Además es importante señalar que el animal transgénico no se ve perjudicado en su desarrollo porque el gen humano sólo se expresa en las células de las glándulas mamarias debido al regulador específico al que se le ha asociado y, por tanto, en las restantes células del animal no se sintetiza la proteína humana al estar silenciado el gen humano. En consecuencia, el animal doméstico ha sido convertido en un gran biorreactor sin perjuicio aparente para él.

Las primeras granjas farmacéuticas fueron establecidas por compañías biotecnológicas como Pharmaceutical Proteins Ltd (PPL) en Escocia (1500 ovejas), Genzyme Transgenics en Estados Unidos (1000 cabras), Gene Pharming Europe en Holanda (vacas), etc. Otros grupos de investigación son partidarios de la utilización de las granjas de cerdos transgénicos dado su corto tiempo de gestación (cuatro meses), el intervalo generacional (un año) y el mayor tamaño de las camadas (10 a 12 lechones), teniendo en cuenta además que una cerda lactante produce unos 300 litros de leche al año.

Las cifras económicas demuestran la importancia futura de las granjas farmacéuticas : el mercado de proteínas terapéuticas, que actualmente se obtienen principalmente mediante fermentación o cultivo celulares, se estima en unos 7.600 millones de dólares anuales y se calcula que podrá llegar a ser de 18.500 millones de dólares el año 2000²⁰.

Las cifras expresadas parecerían justificar las enormes inversiones que es necesario hacer para obtener animales transgénicos, tal como se indica en el cuadro 11.

Cuadro 11. PRODUCCIÓN DE MAMÍFEROS TRANSGÉNICOS EN DIFERENTES ESPECIES

Especie	Animales transgénicos producidos		Meses para obtener la F2	Coste en \$ estimado de cada animal transgénico	Proteína producida en la leche (por individuo)
	% descendencia	% embriones inyectados y transferidos			
Ratón	17,3	2,6	7,5	121 \$	1 g
Conejo	12,8	1,5	17		1 Kg
Porcino	9,2	0,9	38	25.000 \$	
Ovino	8,3	0,9	52	60.000 \$	100 Kg
Bovino	3,6	0,7	100	546.000 \$	1.000 Kg

Fuente: A. Sánchez Bonastre, 1999

De la última columna del cuadro anterior se deduce el valor económico de los rebaños de animales transgénicos.

2.2. Plantas transgénicas²¹

La **Biotecnología** incluye cualquier técnica que utilice organismos vivos o partes de los organismos para fabricar o modificar productos, para *mejorar plantas o animales* o para desarrollar microorganismos para usos específicos²². La Biotecnología posee la capacidad de cambiar a la comunidad industrial del siglo XXI debido a su potencial para producir cantidades prácticamente ilimitadas de:

- sustancias de las que nunca se había dispuesto antes;
- productos que se obtienen normalmente en cantidades pequeñas;
- productos con coste de producción mucho menor que el de los fabricados por medios convencionales;
- productos que ofrecen mayor seguridad que los hasta ahora disponibles;
- productos obtenidos a partir de nuevas materias primas más abundantes y baratas que las utilizadas anteriormente.

La **manipulación genética de las plantas** en beneficio del hombre es parte de la Biotecnología.

2.2.1. Mejora genética de plantas

En un sentido amplio, podría decirse que la Mejora de Plantas se remonta a los tiempos más antiguos mediante la aplicación intuitiva de procesos de selección. Así, se puede citar como ejemplo concreto el caso del descubrimiento hecho en la “Cueva de los murciélagos” de Méjico donde se encontraron restos de mazorcas de maíz correspondientes a estratos geológicos sucesivos que mostraban un aumento gradual de tamaño correlativo con la sucesión cronológica. Estos hechos indican sin duda alguna que el hombre del Neolítico, haciendo uso de su inteligencia racional, aplicaba ya un proceso de selección en el maíz que cultivaba.

Los orígenes de la Genética están íntimamente relacionados con la investigación de los hibridistas experimentales de plantas. A partir del redescubrimiento de las leyes de Mendel, la aplicación de los conocimientos genéticos impulsó el desarrollo de la Mejora.

La Mejora Genética de Plantas tiene como fin obtener los genotipos (constitución genética) que produzcan los fenotipos (manifestación externa de los caracteres) que mejor se adapten a las necesidades del hombre en unas circunstancias determinadas. Aspectos parciales de ese objetivo final son:

- **Aumentar el rendimiento:**
 - *Mejora de productividad*, aumentando la capacidad productiva potencial de los individuos
 - *Mejora de resistencia*, obteniendo genotipos resistentes a plagas, enfermedades y condiciones ambientales adversas
 - *Mejora de características agronómicas*, obteniendo nuevos genotipos que se adaptan mejor a las exigencias y aplicación de la mecanización de la agricultura. Por ejemplo, tales son los casos del sorgo enano o la remolacha monogermen.
- **Aumentar la calidad:**
 - *Mejora de calidad*, atendiendo, por ejemplo, al valor nutritivo de los productos vegetales obtenidos
- **Extender el área de explotación**, adaptando las variedades de las especies ya cultivadas a nuevas zonas geográficas con características climáticas o edafológicas extremas, como ocurrió con el trigo en los países nórdicos europeos
- **Domesticar nuevas especies**, transformando las especies silvestres en cultivadas con utilidad y rentabilidad para el hombre.

Los métodos convencionales de la Mejora Vegetal han sido los cruzamientos y la selección complementados en ocasiones con técnicas citogenéticas y de mutagénesis artificial. Sin embargo, mediada la década de los ochenta se inició la aplicación de la *ingeniería genética molecular* en la Mejora mediante la utilización de *plantas transgénicas*, que se hicieron

una realidad a escala comercial a partir de la mitad de la década de los noventa.

2.2.2. *La revolución verde*

Se puede decir que Malthus se quedó corto cuando predijo la catástrofe para la humanidad porque estimó que la población humana crecería según una progresión geométrica mientras que los alimentos lo harían en progresión aritmética, siendo así que la demografía humana ha crecido a un ritmo más exponencial que geométrico. Sin embargo, las malas predicciones de Malthus no se cumplieron, entre otras causas, por el incremento de las producciones agrícolas gracias, por una lado, a los avances tecnológicos y, por otro lado, a la aplicación de los conocimientos genéticos a la obtención de variedades cultivadas más productivas (Mejora Genética de Plantas). Un magnífico ejemplo de esto último es la denominada “Revolución Verde” llevada a cabo por Norman E. Borlaug, mejorador de plantas y Premio Nobel de la Paz en 1970, que salvó del hambre a las poblaciones humanas en muchas zonas de la tierra.

Como no es éste el lugar de extendernos en detallar en qué consistió la Revolución Verde, sin embargo, puede ser suficiente incluir los siguientes datos²³:

LA REVOLUCIÓN VERDE: ASPECTOS POSITIVOS

- Importantes incrementos en la producción de cultivos básicos
 - En poco más de una década se pasó en Méjico de un rendimiento en el cultivo de trigo de 750 Kg/Ha a 9.000 Kg/Ha
 - Las variedades de arroz obtenidas en el IRRI duplicaron la producción en países como la India, Filipinas y Pakistán
 - En sólo cuatro años (1965-1969), la superficie cultivada con las nuevas variedades de trigo y arroz llegó a alcanzar los 15 millones de hectáreas
 - En el período 1961-1981, la India triplicó su producción anual de trigo

- En 1967 Pakistán ocupaba el segundo lugar entre los países receptores de ayuda alimentaria externa; dos años más tarde Pakistán era un país exportador de arroz
- En el período 1963-1983, China consiguió aumentos en el rendimiento medio del arroz de 2 a 5 Tn/Ha y el del trigo de 1 a 2,5 Tn/Ha
- 800 millones de personas sufren actualmente hambre o escasez de alimentos, pero sin la ayuda de la Revolución Verde esta cifra habría alcanzado los 2.000 millones
- Desde 1970 los precios de los alimentos básicos han disminuido en torno al 70%

LA REVOLUCIÓN VERDE: ASPECTOS PENDIENTES

No obstante, persisten algunos problemas tras la Revolución Verde, como son:

- 800 millones de personas, sobre todo mujeres y niños, consumen menos de 2.000 cal/día
- 180 millones de niños tienen problemas graves relacionados con la falta de alimentos
- 100 millones de niños tienen una grave deficiencia en vitamina A (problemas relacionados con la vista, piel, mucosas y sistema inmune)
- 400 millones de mujeres (15-49 años) tienen deficiencia en hierro (la anemia es la causa del 20% de los abortos o muerte prematura en Asia y Africa)

Teniendo en cuenta los rendimientos actuales y el aumento de población, si no se hace nada en los próximos años la cifra de personas hambrientas en el tercer mundo puede ser escalofriante. Se ha estimado que en el año 2020 habrá una cifra adicional de 1.500 millones de personas con hambre en el mundo.

Esta estimación pesimista plantea los objetivos que la Mejora de Plantas debe abordar en el futuro, tal como se indica a continuación:

Países no desarrollados

- Variedades adaptadas a las características de cada zona y con una productividad que se ajuste a la demanda de alimentos por parte de la población
- Las nuevas variedades deben suministrarse a coste cero o casi simbólico

Países desarrollados

- Mejora “a la carta”
- Rapidez en obtención de resultados

Medios técnicos

- Nuevos desarrollos en el campo de la Biotecnología
- Integración de métodos clásicos (Mejora convencional) y biotecnológicos (Ingeniería genética molecular: Planta transgénicas)

Medio ambiente

- El desarrollo de nuevas variedades tiene que tener en cuenta:
 - La escasez de agua
 - La salinización de las tierras de cultivo (especialmente en zonas con regadío)
- Mejora sostenible
- Recursos fitogenéticos
 - Variedades autóctonas
 - Preservación y aprovechamiento de las fuentes de variación intra- y extraespecífica

Condición social

- Compatibilizar los intereses de los sectores público y privado (objetivos, protección, registro y patentes)
- Concentración de poder en pocas manos

2.2.3. *Plantas transgénicas*

La utilización de plantas transgénicas en programas de Mejora se va incrementando de día en día. En un principio, algunos expertos habían llegado incluso a predecir que hacia el año 2005 el 25% de la producción agrícola en Europa lo sería de plantas transgénicas. Hoy, sin embargo, ante el rechazo social promovido por importantes grupos de presión es impredecible hacer una estimación tan a corto plazo. En esta guerra incruenta, la primera batalla la ganaron –podría decirse que por sorpresa– las grandes compañías multinacionales productoras de las plantas transgénicas, pero la segunda batalla se ha inclinado de parte de los grupos de presión ecologistas y algunas ONGs²⁴. ¿Cuál será el resultado final de la guerra de los transgénicos? Yo creo que, aunque con cierto retraso, finalmente se impondrá la cordura por ambos bandos y que, con las debidas precauciones tomadas caso por caso, las plantas y los alimentos transgénicos se aceptarán como una realidad más del avance biotecnológico para beneficio de la humanidad.

Como se mencionaba anteriormente, en los programas de Mejora de Plantas interesa en ocasiones incorporar un gen determinado a una cierta variedad para dotarla, por ejemplo, de resistencia a un patógeno o darle cierta calidad. El método convencional consiste en realizar un primer cruzamiento con un individuo que lleve el gen deseado y luego, mediante un proceso continuado durante varias generaciones de cruzamientos con individuos del genotipo original (*retrocruzamiento*) y selección para el carácter (gen) que se quiere introducir, se puede llegar a obtener, tras un proceso más o menos largo, individuos con el genotipo original al que se ha añadido el gen deseado. Este método convencional tiene varios inconvenientes como son las muchas generaciones necesarias y en ocasiones la limitación que supone la reproducción sexual cuando lo que interesa es introducir el gen de otra especie, ¡y con más razón si esta otra especie ni siquiera pertenece al reino vegetal sino que se trata de una especie bacteriana o animal!

2.2.4. La ingeniería genética molecular en la mejora de plantas

Las técnicas de ingeniería genética molecular suponen un método alternativo de incorporación de un gen deseado en el genoma de una planta mediante la obtención de plantas transgénicas. No obstante, no debe olvidarse que, una vez introducido el gen deseado, los procesos de selección son similares a los empleados en los métodos convencionales de la Mejora.

La *transgénesis* o *transferencia génica horizontal* en plantas se puede realizar utilizando el *ADN-T* (transferible) del plásmido *Ti* (inductor de transformación) de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* que produce los tumores o “agallas” en las heridas que se originan en las plantas. En el proceso de infección, el *ADN-T* tiene la propiedad de poder pasar de la célula bacteriana a las células de las plantas, incorporándose al *ADN* de los cromosomas de éstas. Dicho de forma muy esquemática, la manipulación genética en este caso consiste en incorporar al *ADN-T* el gen que se desee introducir en la planta. La mayor eficacia de la técnica se consigue utilizando cultivos celulares de hoja o de tallo que son capaces de regenerar plantas adultas completas a partir de células que han sido genéticamente modificadas (transformadas) usando como vector el *ADN-T*.

Otras técnicas de transferencia de genes consisten en la introducción del *ADN* en *protoplastos* (células desprovistas de la pared celulósica por medios enzimáticos o químicos) utilizando el polietilenglicol o la *electroporación*. También se puede introducir el *ADN* en las células por bombardeo con *microproyectiles* (*biobalística*) formados por partículas de oro o tungsteno recubiertas con *ADN* del gen deseado. En cualquier caso, después se induce la regeneración de la planta adulta a partir de los *protoplastos* o de las células tratadas.

Con las técnicas mencionadas (especialmente utilizando el *ADN-T* del plásmido *Ti* de *Agrobacterium tumefaciens*) se han obtenido plantas resistentes a virus, a insectos, a herbicidas, etc. Por ejemplo, desde hace más de treinta años se viene utilizando en agricultura y jardinería un insecticida especialmente eficaz contra las larvas de los lepidópteros cuya eficacia reside en la proteína *Bt* producida por la bacteria *Bacillus thuringiensis*.

giensis. Pues bien, la ingeniería genética molecular ha permitido identificar y aislar el gen bacteriano que codifica para la proteína *Bt* y se ha logrado transferirlo a plantas transgénicas de algodón, patata, tomate y maíz, haciéndolas resistentes a los insectos.

Otro caso interesante ha sido la obtención de plantas transgénicas de tomate, soja, algodón, colza, etc. a las que se les ha incorporado un gen que produce la resistencia al principio activo (por ejemplo, el glifosato) de los herbicidas de amplio espectro, lo cual permite eliminar las malas hierbas de especies de hoja ancha y crecimiento cespitoso tratando los campos con herbicidas que no dañan al cultivo.

También se han obtenido plantas transgénicas de tomate con genes que alargan el periodo de conservación y almacenamiento evitando la síntesis de la poligalacturonasa que produce el reblandecimiento del fruto, o plantas de arroz capaces de sintetizar β caroteno precursor de la vitamina A²⁵. Como se decía en un lugar anterior, este último avance científico puede ser de gran importancia para solucionar problemas sanitarios en aquellas zonas donde el arroz es la fuente principal de alimentación: al menos 26 países de Asia, Africa y América Latina donde viven grandes masas de población.

Por último, podrían citarse también las plantas transgénicas utilizadas como biorreactores para producir lípidos, hidratos de carbono, polipéptidos farmacéuticos o enzimas industriales²⁶.

Resumiendo, puede decirse que los genes (*transgenes*) hasta ahora utilizados en las plantas transgénicas y que son cuestionados corresponden a cinco categorías²⁷:

- RESISTENCIA A INSECTOS
 - Proteína *Bt*
- RESISTENCIA A HERBICIDAS
 - Amonio de glufosinato (“Basta”, AgrEvo)
 - Glifosato (“Roundup”, Monsanto)
- GENES MARCADORES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS
 - Canamicina / Neomicina
 - Estreptomina
 - Ampicilina

- Amicacina
- GENES DE ANDROESTERILIDAD
 - Genes *barnasa* y *barstar* que afectan a la fecundidad del polen. Esta tecnología, denominada “terminator”, fue abandonada por la compañía Monsanto antes de hacerla efectiva ante la mala imagen que produjo
- GENES SILENCIADORES
 - Antisentido (Inhibición poligalacturonasa, maduración tomate)

2.2.5. *Soja y maíz transgénicos*

Por su repercusión en Europa, los casos de la soja y el maíz transgénicos resultan de especial relevancia. La soja se utiliza en un 40-60% de los alimentos procesados: aceite, margarina, alimentos dietéticos e infantiles, cerveza, etc. Europa importa anualmente 9 millones de toneladas de los Estados Unidos por un importe de unos 1.400 millones de dólares. España, que importa 1,5 millones de toneladas, es el cuarto país importador detrás de Japón, Taiwan y Holanda.

El 50% de la soja producida en los Estados Unidos es transgénica, de la que un 40% se exporta a Europa. A la soja transgénica, que fue obtenida por la compañía Monsanto, se le ha transferido un gen que produce resistencia al glifosato, que es el elemento activo del herbicida “Roundup”, dándose la circunstancia de que es también la misma compañía la que fabrica el herbicida. Este hecho, que es absolutamente lícito, es interpretado por algunos como un abuso de la compañía; algo así como si fuera juez y parte ya que produce el herbicida y la semilla resistente al mismo.

Ante la protesta de los movimientos ecologistas y la posibilidad de que fuera rechazada la semilla transgénica, los exportadores la mezclan con semilla de soja normal para evitar su identificación. Sin embargo, ya alguna compañía (por ejemplo, la Genetic ID, Iowa, USA) comercializó un test de diagnóstico que permite saber si la semilla de soja (o de maíz, que tiene el mismo problema) es transgénica o no; es decir, si lleva el gen de resistencia al herbicida. Es importante señalar que la comercialización de la soja transgénica está autorizada en los Estados Unidos, Canadá, Japón y la Unión Europea (en esta última desde Abril de 1996).

Otro caso parecido es el del maíz transgénico producido por la multinacional Ciba-Geigy (hoy Novartis). Este maíz, además de resistente al glufosinato de amonio (que es componente activo del herbicida “Basta”), lo es también al “taladro”, un insecto (*Ostrinia nubilalis*) que horada el tallo de la planta destruyéndola. La resistencia la produce el gen procedente de la bacteria *Bacillus thuringiensis* que, como se ha señalado anteriormente, produce la proteína *Bt* que es tóxica para la larva de los dípteros. El problema que puede presentar este maíz transgénico es que la manipulación genética realizada ha unido el gen *Bt* a otro gen utilizado como marcador genético que produce resistencia a antibióticos beta-lactámicos (incluyendo la ampicilina). Los movimientos ecologistas han alertado sobre la posibilidad de que las bacterias del tracto intestinal animal y humano puedan incorporar directa o indirectamente la información genética que da la resistencia a tales antibióticos, con el consiguiente peligro sanitario. En este aspecto hay que decir que no hay evidencia científica alguna de que ello pueda ocurrir en la práctica aunque fuera teóricamente posible²⁸. Podría decirse que la probabilidad es cero. En lo que todos están de acuerdo es en señalar que mucho más peligroso que las plantas transgénicas portadoras de construcciones genéticas con marcadores de resistencia a antibióticos puede ser la utilización masiva de antibióticos en la cría animal.

La comercialización del maíz transgénico está autorizada en los Estados Unidos (donde supone un 33% del maíz cultivado), Canadá, Japón y también en la Unión Europea desde Enero de 1997.

En este contexto es importante señalar que, en una estimación global de 1998²⁹, el 33% del comercio mundial de semillas, que suponía unos 23.000 millones de dólares, estaba controlado por las diez primeras empresas del mundo, de las que solamente las tres más importantes (DuPont, Monsanto y Novartis) representan un 20% del total. Además, las cinco compañías más importantes (AstraZeneca, DuPont, Monsanto, Novartis y Aventis) controlan el 60% del mercado mundial de pesticidas, el 23% del mercado de semillas y, prácticamente, el 100% del mercado de semillas transgénicas. Por otro lado, las diez primeras empresas agroquímicas del mundo controlan el 91% del mercado mundial. Todos estos datos de concentración de poder económico en la agricultura plantean

problemas éticos importantes y, en ocasiones, puede conducir a situaciones de prepotencia que pueden provocar reacciones violentas en la sociedad como ha sucedido indudablemente con los cultivos transgénicos. Quizá sea éste el verdadero problema ético.

A continuación se hacen algunas consideraciones en relación con los aspectos ecológicos y sanitarios de las plantas y los alimentos transgénicos, respectivamente:

2.2.6. Aspectos ecológicos: beneficios y riesgos potenciales de las plantas transgénicas

Al considerar los aspectos ecológicos de la utilización de los cultivos transgénicos hay que tener en cuenta tanto los beneficios como los riesgos potenciales, tal como se indica a continuación³⁰:

a) PLANTAS RESISTENTES A HERBICIDAS DE AMPLIO ESPECTRO

- **Beneficios potenciales**

- Elimina la necesidad del tratamiento pre-emergencia. Reduce las labores de cultivo. Reduce la erosión, mantiene la humedad del suelo y ayuda a conservar la microfauna y la flora.
- El glifosato y el glufosinato, que son los principios activos de los herbicidas utilizados con las plantas transgénicas, son menos persistentes que cualquier otro herbicida, reduciendo por tanto los residuos tóxicos en las aguas subterráneas.
- La estrategia de poder combatir sistemáticamente las malas hierbas puede llegar a controlar algunos biotipos endémicos resistentes a herbicidas como *Alopecurus myosuroides*.

- **Riesgos potenciales**

- La introgresión de genes de resistencia a herbicidas en especies silvestres afines.
- El tratamiento con herbicidas de los márgenes de los cultivos podía perjudicar a la biodiversidad y favorecer el desarrollo espontáneo de plantas tolerantes.
- La utilización de los herbicidas de amplio espectro puede repercutir en la fauna (por ejemplo, aves) al suprimir la presencia de las plantas de las especies no cultivadas que infestaban los campos de cultivo.

- Podría ser aconsejable diversificar los tipos de herbicidas para mantener la biodiversidad de las poblaciones silvestres dentro de unos mínimos de presión de selección.

b) PLANTAS CON GENES *Bt* RESISTENTES A INSECTOS

- **Beneficios potenciales**

- Reducción en el uso de insecticidas químicos tóxicos.
- Reducción en el impacto sobre insectos no nocivos (por ejemplo, abejas), parasitoides y predadores.
- Control más efectivo de la plaga al expresarse la proteína *Bt* en todos los tejidos de la planta en cualquier momento.

- **Riesgos potenciales**

- Posibilidad de que la población de insectos evolucionara a formas resistentes por la presión de selección favorable a los individuos mutantes (*carácter preadaptativo* de la mutación).
- Posible impacto sobre otras especies de insectos no nocivas.
- Posible efecto sobre el valor adaptativo de las plantas resistentes al insecto. Una liberación ecológica en un centro de diversidad de la especie podría reducir el acervo genético necesario para ulteriores planes de mejora.

c) PLANTAS TRANSGÉNICAS (GEN *cp*) RESISTENTES A PATÓGENOS VIRALES

- **Beneficios potenciales**

- Reducción del uso de productos químicos tóxicos para controlar los insectos vectores del virus patógeno.
- Reducción concomitante en el impacto sobre otros insectos no vectores del virus.
- Control más efectivo de la resistencia al ataque viral al expresarse constitutivamente en la planta (cualquier tejido y en todo momento).

- **Riesgos potenciales**

- Consecuencia de la liberación ecológica: impacto sobre la supervivencia y fecundidad.
- Transencapsidación: La cápside viral incluye sedes de reconocimiento para insectos vectores. Un virus nuevo puede usurpar la cápside ajena y acceder a otros huéspedes vegetales.
- Recombinación: El ARNm del gen *cp* podría recombinar con otro virus que hubiera infectado a la planta huésped, dando lugar a un nuevo virus infeccioso. No se sabe con qué frecuencia puede ocurrir este fenómeno en condiciones naturales.

- Sinergismo: Posibilidad de que otros virus infecciosos puedan interactuar con el producto transgénico, dando lugar a un efecto peor que la infección simple.

Desde el punto de vista ecológico se ha denunciado la posibilidad de que al crear las variedades transgénicas resistentes a herbicidas se incrementará notablemente el uso de éstos con los posibles efectos secundarios negativos de contaminación del suelo y del agua. Otros, sin embargo, defienden la postura contraria. Además, la obtención de resistencia genética a diferentes plagas y enfermedades implicará el menor uso de pesticidas.

Por otro lado, en especies alógamas (de fecundación cruzada) existe la posibilidad de que una parcela sembrada con plantas transgénicas contamine con su polen a otras parcelas vecinas no transgénicas del mismo cultivo. Por ejemplo, si el polen de un campo de maíz transgénico poliniza plantas normales de una parcela próxima, la semilla que se produzca en esta parcela puede haber incorporado el gen *Bt* transmitido por el polen; es decir, sería transgénica. También podría ocurrir que la resistencia al herbicida de una variedad transgénica se transfiriera por fecundación interespecífica espontánea a una especie silvestre afín, con el consiguiente daño para la agricultura. ¿Se va a legislar respecto a medidas de aislamiento (distancia, barreras naturales, etc.) de los cultivos transgénicos? Estas medidas se aplican durante el periodo de experimentación, pero ¿es posible mantenerlas una vez autorizada su comercialización? De hecho, es importante señalar que ya se ha descrito un primer caso de transferencia de un gen que da resistencia a un insecticida en plantas transgénicas de colza a plantas de rábano que se habían cultivado en su proximidad³¹, poniendo de manifiesto que se ha hecho realidad una posibilidad teórica. Sin duda alguna, esta evidencia científica dará más fuerza a las argumentaciones de los que se oponen a la utilización de las plantas transgénicas. No obstante –sin menoscabo de la prudencia aconsejable en relación con la utilización de cultivos transgénicos– es importante poner de manifiesto que situaciones similares pueden producirse con plantas mejoradas mediante procedimientos genéticos convencionales y nunca nadie ha manifestado su alarma.

Desde el punto de vista de la biodiversidad, se ha planteado también la posibilidad de que las plantas transgénicas *Bt* resistentes a insectos puedan influir a largo plazo sobre otros insectos que no son blanco de la acción directa de la toxina *Bt* o, incluso, sobre aves y mamíferos. Como está ocurriendo ya de forma recurrente en esta polémica, los primeros resultados experimentales obtenidos son contradictorios. Por ejemplo, los experimentos de laboratorio realizados con la mariposa monarca³², que tanto impacto causaron en los medios de comunicación, no son extrapolables a las condiciones naturales por diversos motivos.

BIODIVERSIDAD Y BIOSEGURIDAD

Desde el punto de vista de la biodiversidad y de la bioseguridad, las plantas transgénicas han sido también objeto de una fuerte contestación a escala mundial promovida por importantes grupos de presión ecologistas, que empezaron con la Convención de Bioseguridad de Cartagena de Indias (Febrero 1999), continuaron con el boicot a la reunión de la Organización Mundial de Comercio en Seattle (Noviembre, 1999) y terminaron con el Protocolo de Bioseguridad de Montreal (Enero, 2000). A continuación se indican las reuniones internacionales a escala mundial que están relacionadas con la biodiversidad y la bioseguridad:

- **CUMBRE DE LA TIERRA o CONVENIO DE BIODIVERSIDAD (Río de Janeiro, 1992)**
 - Objetivo: “Conservación y uso sostenible de la diversidad biológica”
- **SEGUNDA CONFERENCIA DEL CONVENIO DE BIODIVERSIDAD (Yakarta, 1995)**
 - Objetivo: “Establecer negociaciones para la creación de un Protocolo de Bioseguridad”
- **CONVENCIÓN DE BIODIVERSIDAD (Cartagena, Colombia, Febrero 1999)**
 - Objetivo: “Protocolo de Bioseguridad”, como Acuerdo Internacional sobre Medio Ambiente de las Naciones Unidas. Fracasó por oposición del Grupo de Miami (Estados Unidos, Canadá, Australia, Argentina, Chile y Uruguay)
- **REUNIÓN EN VIENA (Septiembre, 1999)**
 - Objetivo: “Expresión del deseo político de ‘rescatar’ el Protocolo de Bioseguridad, convocando un encuentro de los ministros de medio ambiente de todo el mundo”. Se acuerda la fecha del 24 al 28 de enero de 2000 en Montreal

- **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE COMERCIO (Seattle, Noviembre 1999)**
 - ❑ Objetivo: Estados Unidos y Canadá intentaron que se acordara que “las exportaciones e importaciones de transgénicos fueran reguladas por las normas de comercio internacional y no por normas de protección ambiental”. Fracaso.
- **PROTOCOLO DE BIOSEGURIDAD (Montreal, 24-28 enero 2000)**
 - ❑ Objetivo: “Crear normas ambientales internacionales para prevenir los riesgos causados por los organismos modificados genéticamente (OMGs)”. Regula el comercio internacional de OMGs a fin de evitar riesgos para la salud y el medio ambiente
 - ❑ Productos afectados: Todos los que entran en contacto con el medio ambiente, desde las semillas a los peces transgénicos, y los productos agrícolas no transformados (maíz, soja, colza y algodón transgénicos)
 - ❑ Productos no afectados: Los alimentos parcialmente elaborados con OMGs, como la salsa de tomate, los fármacos y las vacunas
 - ❑ Procedimiento previsto: El comercio no es libre. Los países importadores pueden establecer medidas de control. Todo cargamento de semillas transgénicas necesitará un permiso previo del país importador
 - ❑ Principio de precaución: Los países podrán vetar la llegada de un producto, tras analizar los estudios científicos relacionados con su seguridad. Además, el país importador puede solicitar al exportador una evaluación de riesgo
 - ❑ Etiquetado: El Protocolo exige un etiquetado en los cargamentos donde se detalle que “pueden contener” OMGs, pero no en una etiqueta específica, sino en la general del producto
 - ❑ Jerarquía del Protocolo: El Protocolo no está subordinado a ningún acuerdo internacional (especialmente, los que dependan de la Organización Mundial de Comercio)
- **CONFERENCIA DE NAIROBI (21-26 MAYO 2000)**
 - ❑ Se ratifica y firma el Protocolo de Bioseguridad aprobado en Montreal

2.2.7. Aspectos sanitarios: alimentos transgénicos³³

La sociedad vive en un continuo estado de alarma ante determinados avances científicos, tales como la clonación en mamíferos o los cultivos transgénicos y su utilización en la producción de alimentos. Como señala Moreno³⁴, el debate sobre los alimentos transgénicos se ha produ-

cido como consecuencia de los intereses enfrentados de la industria biotecnológica (léase las grandes compañías multinacionales productoras de las plantas transgénicas) y los agricultores avanzados, por un lado, y los grupos ecologistas y determinadas ONGs y asociaciones de consumidores, por otro lado. ¿A qué se debe el clima de desconfianza y rechazo hacia las plantas y los alimentos transgénicos que se ha producido en una buena parte de la sociedad? En cierto modo –dice Moreno– puede achacarse a la falta de transparencia informativa y a una serie de estrategias poco afortunadas por parte de los más interesados en la rápida comercialización de estos productos. Además, el debate social está contaminado por la escasa participación de los agentes sociales en su desarrollo, por el lenguaje equívoco utilizado por determinados grupos de presión en forma de metáforas inapropiadas (por ejemplo, “transgénico como sinónimo de alterado”, “transgénico como sinónimo de dañino”, “lo natural como sinónimo de inocuo, y lo artificial de nocivo”) y por el exceso de contenido retórico y falta de rigor científico y técnico en los argumentos utilizados. Por ejemplo, publicar en los medios de comunicación que se ha demostrado –sin que haya una publicación científica seria que lo avale– que los alimentos transgénicos son dañinos (por aquello de que “calumnia que algo queda”) o asegurar que las plantas transgénicas atentan contra la biodiversidad o magnificar los riesgos y apelar al *principio de precaución* para aconsejar la prohibición de los cultivos transgénicos o tachar de “vendidos a las multinacionales” a los científicos que honradamente defienden la utilización de plantas y alimentos transgénicos. Todo ello supone, a mi juicio, una enorme y grave manipulación social.

De cualquier manera, como señalaba Moreno, la presión social ejercida por grupos ecologistas y determinadas asociaciones parece que, de momento, están ganando la batalla al conseguir convencer al gran público que los alimentos transgénicos son antinaturales y perjudiciales para la salud humana y las plantas transgénicas ecológicamente dañinas. Dice Moreno que la estrategia de tales grupos se ha centrado en pocas claves, pero muy efectivas:

- 1^a Desarrollar acciones limitadas, pero de gran repercusión en los medios de comunicación social (protestas ante la llegada de barcos cargados de soja transgénica, etc.);

- 2^a Arrojar sobre productores, distribuidores, científicos y autoridades políticas partidarios de la comercialización de los alimentos transgénicos la sospecha de estar al servicio de las poderosas compañías agroquímicas multinacionales, que no escatiman medios ni influencias políticas o académicas para aumentar sus beneficios y cuotas de mercado;
- 3^a Otorgar la mayor importancia a cualquier estudio que ponga de manifiesto los posibles riesgos sanitarios o ecológicos de algún OMG o semilla transgénica, incluso aunque no hayan sido contrastados científicamente ni publicados (recuérdese el caso del Dr. Pusztai del Instituto Rowett, Aberdeen, Escocia, y su posiblemente mal interpretado experimento con ratas alimentadas con patatas transgénicas);
- 4^a Aprovechar la creciente importancia de la educación para el consumo para destacar el carácter autoritario y antidemocrático de quienes no dan prioridad absoluta a los intereses de los consumidores y constituirse así en interlocutores preferentes ante las autoridades.

En este contexto, me parece importante hacer alusión al peligroso papel que están jugando los medios de comunicación social como sustitutos de las revistas científicas ya que en numerosas ocasiones los científicos dejan filtrar o informan a la prensa de los resultados de sus investigaciones y luego no es posible encontrar el hecho fehaciente de la publicación científica seria que los avale, posiblemente porque nunca se sometieron o no pudieron superar el juicio crítico del comité editorial de la revista científica.

También habría que señalar aquí que el National Research Council de la National Academy of Sciences de los Estados Unidos ha puesto de manifiesto en un informe científico que las plantas transgénicas diseñadas para resistencia a insectos no presentan riesgos especiales para la salud o el medio ambiente (*Nature*, 404:693, 13 abril 2000), ratificando las conclusiones de un informe previo de la US National Academy of Sciences de 1987 sobre el impacto ambiental de los OMGs. Como decía su Presidente, el Dr. Bruce Alberts, “es muy importante que la voz de la ciencia sea oída con claridad”.

Desde el punto de vista sanitario ya se ha indicado anteriormente el riesgo teórico que supone que el gen que da resistencia a los antibióticos beta-lactámicos (ampicilina) pase a bacterias del tracto intestinal humano directa o indirectamente vía bacterias del tracto intestinal de los animales que se alimenten con el maíz transgénico no procesado. ¿Justificaría ese riesgo potencial con una probabilidad prácticamente nula la prohibición del maíz transgénico con el gen Bt de *Bacillus thuringiensis*? Posiblemente no. Por otro lado, nunca se ha demostrado que un gen consumido por boca haya sido transmitido a una bacteria del tracto intestinal.

Como señalaba Jones³⁵, “en el fragor del debate es fácil olvidar que el ADN es –y siempre lo ha sido– parte de nuestra dieta diaria. Diariamente, cada uno de nosotros consume millones de copias de miles de genes. Muchos de estos genes son totalmente funcionales en el momento de la consumición y en la mayoría de los casos no conocemos su función. ¿Cuánta gente se detiene a considerar los genes desconocidos y todavía funcionales que comemos en el tomate, el pepino o en la lechuga de una ensalada, los genes bovinos de un filete de carne, el ADN fragmentado de muchos alimentos procesados y los genes de multitud de microorganismos que respiramos y tragamos?”. A este respecto, y como exponente de la falta de información y desconocimiento de algunos ciudadanos, podría mencionarse aquí que, en encuestas sociológicas realizadas sobre alimentos transgénicos, muchos encuestados (en torno a un 30%) respondían que ellos solamente querían comer “tomates sin genes”.

Otro aspecto sanitario es el de la aparición de alergias insospechadas por el consumo de alimentos transgénicos. En relación con la alergia hay que tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Nivel de riesgo aceptable en comparación con la situación normal (1%–2% de adultos, 6% de niños): ¿Las plantas transgénicas aumentan estas cifras?
- Alimentos alergénicos:
 - Crustáceos, pescado, huevos, leche, nueces, cacahuete, soja, trigo
- ¿Cómo evaluar el riesgo de alergia?

- Ausencia de similitud entre la proteína transgénica y un alérgeno conocido
- Digestión rápida de la proteína en el tubo digestivo

Por ejemplo, los planes que se habían hecho para comercializar colza y judías genéticamente modificadas para aumentar su valor nutritivo incrementando su contenido en cisteína y metionina usando la albúmina de reserva 2S rica en metionina procedente de la nuez de Brasil se abandonaron al descubrirse su elevado poder alérgico. También se ha citado el caso de alergia producidas por soja transgénica manipulada con genes de la nuez de Brasil³⁶ o de fresas resistentes a las heladas por llevar incorporado un gen de pescado (un pez que vive en aguas árticas a bajas temperaturas). En este segundo supuesto, las personas alérgicas al pescado podrían sufrir una crisis alérgica al ingerir las fresas transgénicas en el caso de que la proteína que confiere la resistencia a las heladas fuera ella misma alérgica.

En relación con los problemas alérgicos, las autoridades que han de establecer la normativa adecuada confían que el efecto alérgico de las proteínas no ensayadas pueda ser predicho con cierta fiabilidad por su análisis estructural. La mayoría de las proteínas alérgicas tienen un peso molecular comprendido entre 10 y 70 kilodalton, comparten ciertas secuencias de aminoácidos y resisten la degradación por el calor así como la digestión ácida y por peptinasa que semejan las condiciones naturales del estómago.

La capacidad de los alimentos alérgicos de alcanzar la mucosa intestinal es un prerrequisito para su alergenidad y ello implica, obviamente, su supervivencia a la digestión gástrica producida por la pepsina secretada en el estómago. Por ello son de mucho interés los estudios de estabilidad de los alimentos alérgicos a la digestión *in vitro* con un fluido gástrico simulado³⁷.

2.2.8. El riesgo

Las plantas transgénicas son un reto de la Biotecnología actual que han creado un cierto grado de alarma social consecuencia, en cierto modo, del temor a lo desconocido y novedoso. De todas formas, es bueno y

necesario que se plantee en la sociedad un debate serio y riguroso, sin “ecologismos” demagógicos, que permita el avance de la ciencia, evitando a la vez peligros y riesgos innecesarios. De cualquier manera, tal como indica García Olmedo³⁸, hay que tener en cuenta que:

- no existe el riesgo cero: Toda actividad humana conlleva un cierto riesgo que ha de ser evaluado en función de los beneficios que tal actividad reporta;
- natural no es sinónimo de inocuo: Hay productos naturales que llevan sustancias mutagénicas y cancerígenas; por ejemplo, la pimienta negra (safrol), las setas comestibles (hidrazinas), el apio (psolareno), los frutos secos (aflatoxinas de hongos), etc.;
- no todo lo artificial es nocivo: Ninguno de los conservantes autorizados llega a ser tan peligroso como las toxinas que pueden producir las bacterias y los hongos que el conservante evita

En relación con el riesgo, es importante hacer hincapié otra vez en el *principio de precaución*, que fue en gran parte el caballo de batalla de la reunión de Montreal (enero, 2000) que estableció el Protocolo de Bioseguridad. A la hora de aplicar correctamente el principio de precaución es fundamental tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Distinción entre producto y proceso
 - Es el producto, no el proceso, lo que debe ser sometido a debate
- Distinción entre peligro y riesgo
 - El peligro indica la posibilidad de que se produzca un hecho
 - El riesgo indica la probabilidad de que tal hecho ocurra
- Una moratoria sería justificable a condición de definir claramente sus objetivos y su duración, a fin de evitar la prohibición pura y simple que tal nombre ocultaría

BIBLIOGRAFÍA

(1) ¹Un estudio biográfico de Mendel fue realizado por el autor con ocasión del centenario de su muerte el 6 de enero de 1884 (LACADENA, J.R. 1984.

-
- Mendel, ese desconocido. *Arbor (C.S.I.C., Madrid)*, tomo CXVII, núm. 459: 7-37. LACADENA, J.R. 1986. La Genética: Una narrativa histórico-conceptual. *Editorial Alhambra, S.A., Madrid*, 171 pp.)
- (2) ² de VRIES, H. 1900. Sur la loi de disjonction des hybrides. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 130:845-847
- (3) de VRIES, H. 1900. Das Spaltungsgesetz der Bastarde. *Berichte der Deutschen Botanischen Gessellschaft*, 18:83
- (4) CORRENS, K.G. 1900. G. Mendel's Regel über das Verhalten der Nachkommenschaft der Rassenbastarde. *Berichte der Deutschen Botanischen Gessellschaft*, 18:158-168
- (5) TSCHERMAK, E. 1900. Über Künstliche Kreuzung bei *Pisum sativum*. *Berichte der Deutschen Botanischen Gessellschaft*, 18:232-239
- (6) ³ MENDEL, G. 1866. Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verh. Des Naturf. Vereines in Brünn (Abhandlungen)*, 4:3-47
- (7) ⁴ Tomado de LACADENA, J.R. 1999. Genética General. Conceptos fundamentales (Cap. 1), *Editorial Síntesis, S.A., Madrid*, 623 pp.
- (8) ⁵ RUBIO, J. 1973. Genética: Su posición entre las ciencias biológicas. *Bol. Est. Exp. Aula Dei*, 12: 80 pp.
- (9) ⁶ Basado en el discurso de ingreso del autor en la Real Academia de Farmacia el 14 de diciembre de 1995 (LACADENA, J.R. 1995. Historia "nobelada" de la Genética: Concepto y método, *Real Academia de Farmacia, Madrid*, pp. 7-76)
- (10) ⁷ Ver LACADENA, J.R. 1996. El Proyecto Genoma Humano: Ciencia y Ética. *Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas. Real Academia de Farmacia*, pp. 6-41
- (11) ⁸ Tomado de LACADENA, J.R. 2000. Seréis como dioses. *Crítica (Madrid)*, 874: 12-16
- (12) ⁹ HUTCHISON III, C.A.; PETERSON, S.N.; GILL, S.R.; CLINE, R.T.; WHITE, O.; FRASESR, C.M.; SMITH, H.O.; VENTER, C.V. 1999. Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science*, 286:2165-2169
- (13) ¹⁰ CHO, M.K.; MAGNUS, D.; CAPLAN, A.L.; MCGEE, D.; AND THE ETHICS OF GENOMICS GROUP. 1999. Ethical considerations in synthesizing a minimal genome. *Science*, 286:2087-2090
- (14) ¹¹ LACADENA, J.R. 1981. Problemas genéticos con dimensión ético-religiosa. *Anales de Moral Social y Económica (Centro de Estudios Sociales del Valle de los Caídos)*, vol. 53:75-120

-
- (15) ¹² GORDON, J.W.; SCANGOS, G.A.; PLOTKIN, D.J.; BARBOSA, J.A.; RUDDLE, F.H. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 77:7380-7384.
- (16) ¹³ GORDON, J.W.; RUDDLE, F.H. 1981. Integration and stable germ line transmissions of genes injected into mouse pronuclei. *Science*, 214:1244-1246.
- (17) ¹⁴ PALMITER, R.D.; BRINSTER, R.L.; HAMMER, R.E.; TRUMBauer, M.E.; ROSENFELD, M.G.; BIRNBERG, N.C.; EVANS, R.M. (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 300:611-615.
- (18) PALMITER, R.D.; NORSTEDT, G.; GELINAS, R.E.; HAMMER, R.E.; BRINSTER, R.L. (1983) Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science*, 222:809-814.
- (19) ¹⁵ HAMMER, R.E.; POURSEL, V.G.; REXROAD, C.E.(Jr); WALL, R.J.; BOLT, D.J.; EBERT, K.M.; PALMITER, R.D.; BRINSTER, R.L. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 315:680-683
- (20) ¹⁶ Para revisiones ver CHEN, T.T.; POWERS, D.A. (1990) Transgenic fish. *Trends in Biotechnology*, 8:209-215.
- (21) BIALY, H. (1991) Transgenic pharming comes of age. *Bio/technology*, 9:786-787.
- (22) SANG, H. (1994) Transgenic chickens: methods and potential applications. *Trends in Biotechnology*, 12:415-420.
- (23) VELANDER, W.H.; LUBON, H.; DROHAN, W.N. (1997). Transgenic livestock as drug factories. *Scient. Amer.*, 276(1):54-58.
- (24) ¹⁷ McCREATH, K.J.; HOWCROFT, J.; CAMPBELL, K.H.S.; COLMAN, A.; SCHNIEKE, A.E.; KIND, A.J. 2000. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 405:1066-1069
- (25) ¹⁸ CLARK, A.J.; BESSOS, H.; BISHOP, J.O.; BROWN, P.; HARRIS, S.; LATHER, R.; McCLENAGHAN, M.; PROWSE, C.; SIMONS, J.P.; WHITELAW, C.B.A.; WILMUT, I. 1989. Expression of human antihemophilic factor IX in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology*, 7:487-492.
- (26) EBERT, K.M.; SELGRATH, J.P.; di TULLIO, P.; DENMAN, J.; SMITH, T.E.; MEMON, M.A.; SCHINDLER, J.; MONASTERSKY, G.M.; VITALE, J.A.; GORDON, K. 1991. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology*, 9:835-838.

-
- (27) WRIGHT,G.; CARVER,A.; COTTOM,D.; REEVES,D.; SCOTT,A.; SIMONS,P.; WILMUT,I.; GARNER,I.; COLMAN,A. 1991. High level expression of active human alfa-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology*, 9:830-834.
- (28) DENMAN,J.; HAYES,M.; O'DAY,C.; EDMUNDS,T.; BARLETT,C.; HIRANI,S.; EBERT,K.M.; GORDON,K.; McPHERSON,J.M. 1991. Transgenic expression of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Biotechnology*, 9:839-843.
- (29) ¹⁹ SCHNIEKE,A.E.; KIND,A.J.; RITCHIE,W.A.; MYCOCK,K.; SCOTT,A.R.;RITCHIE,M.; WILMUT,I.; COLMAN,A.; CAMPBELL,K.H.S. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 278:2130-2133.
- (30) ²⁰ Para una versión divulgadora de los experimentos de clonación y de animales transgénicos). Ver POSTEL-VINAY,O.; MILLET,A. (1997) ¿Qué tal, Dolly?. *Mundo Científico*, 180:534-547.
- (31) ²¹ Basado en LACADENA,J.R. 2000. Plantas y alimentos transgénicos. Seminario Cátedra de Bioética, Universidad Pontificia Comillas, Avila, 19-21 Mayo 2000, (Dilemas éticos de la Medicina actual, nº 13, en prensa)
- (32) ²² RODRIGUEZ VILLANUEVA, J. 1986. Perspectivas de la investigación biomédica y farmacéutica en España. *Discurso de Ingreso en la Real Academia de Farmacia*, 94 pp.
- (33) ²³ Datos cedidos por el Prof. Vicente Moreno, IBMCP, C.S.I.C. - UP Valencia, y presentados en el *Simposio Internacional "Un Siglo de Genética (1900-2000)"*, Fundación Ramón Areces, Madrid, 21-22 marzo 2000
- (34) ²⁴ RIECHMANN, J. 1999. Argumentos recombinantes. Sobre cultivos y alimentos transgénicos. *Los Libros de la Catarata, Madrid*
- (35) RIECHMANN, J. 2000. Cultivos y alimentos transgénicos. Una guía práctica. *Los Libros de la Catarata, Madrid*
- (36) THE ECOLOGIST. 1998. The Monsanto files. Can we survive genetic engineering?, 28 (5) (traducido al castellano en la revista *Gaia*, nº 15, 67 pp., Diciembre 1998)
- (37) ²⁵ YE, X.; AL-BABILI, S.; KLÖTI, A.; ZHANG, J.; LUCCA, P.; BEYER, P.; POTRYKUS, I. 2000. Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287:303-305
- (38) ²⁶ Ver el número especial dedicado a estos temas por la revista *Trends in Biotechnology*, "Plant-product and crop biotechnology", vol.13, nº 9, pp. 313-409, 1995.

-
- (39) ²⁷ CHESSON, A.; JAMES, P. 2000. Los alimentos con OGM ¿están exentos de peligros? *Mundo Científico*, 210:23-31
- (40) ²⁸ BEEVER, D.E.; KEMP, C.F. 2000. Safety issues associated with the DNA in animal feed derived from genetically modified crops. A review of scientific and regulatory procedures. *Nutrition Abstracts and Reviews, Series B: Livestock Feeds and Feeding*, vol.70, No.3:175-182
- (41) COURVALIN, P. 1998. Plantas transgénicas y antibióticos. *Mundo Científico*, 192:20-24
- (42) CASSE, F. 2000. El maíz y la resistencia a los antibióticos. *Mundo Científico*, 210:32-36
- (43) ²⁹ Fuente: UNESCO y Ernst & Young, según El País
- (44) ³⁰ Basado en HAILS, R.S. 2000. Genetically modified plants – the debate continues. *Trends in Ecology*, 15:14-18
- (45) ³¹ CHÈVRE, A.M. ; EBER, F. ; BARANGER, A. ; RENARD, M. 1997. Gene flow from transgenic crops. *Nature*, 389 : 924
- (46) ³² LOSEY, J.E.; RAYOR, L.S.; CARTER, M.E. 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 399:214
- (47) ³³ Basado en LACADENA, J.R. 1999. Plantas y alimentos transgénicos: verdades y mentiras. *Innovación y Ciencia (Santa Fe de Bogotá)*, vol. VIII, nº 3:40-48
- (48) ³⁴ MORENO, M. 1999. Argumentos, metáforas y retórica en el debate sobre los alimentos transgénicos. Comunicación presentada en las Jornadas sobre Ciencia, Tecnología y Valores. Santa Cruz de Tenerife, 5-9 Abril 1999
- (49) ³⁵ JONES, L. 1999. Science, medicine, and the future. Genetically modified foods. *British Medical Journal*, 318:581-584
- (50) ³⁶ NORDLEE, J.A.; TAYLOR, S.L.; TOWNSEND, J.A.; THOMAS, L.A.; BUSH, R.K. 1996. Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *N.Engl.J.Med.*, 334:688-692
- (51) ³⁷ ASTWOOD, J.D.; FUCHS, R.L. 1996. Allergenicity of foods derived from transgenic plants. En (Wüthrich, B.; Ortolani, C., eds.) *Highlights in Food Allergy. Monogr. Allergy, Basel*, vol.32:105-120
- (52) ASTWOOD, J.D.; LEACH, J.N.; FUCHS, R.L. 1996. Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotechnology*, 14:1269-1273
- (53) ³⁸ GARCIA OLMEDO, F. 1998. La tercera revolución verde. Plantas con luz propia. *Editorial Debate S.A.*, 209 pp.

Anal. Real Acad. Farm. 200, 66:

In Vitro Induction of Apoptosis in Rat Hepatocytes by Cyclosporine A

ARMIN WOLF, SIBYLLE GRUB, ELKE PERSOHN,

*Novartis Pharma AG, Experimental Toxicology, CH-4002 Basel,
Switzerland,*

WOLFGANG E. TROMMER

Department of Chemistry, University of Kaiserslautern, Germany

ABSTRACT

In rat hepatocytes and isolated liver mitochondrial fractions, CsA is often used as a specific inhibitor of mitochondrial Ca^{2+} release and as a specific blocker of mitochondrial membrane potential and permeability transition (MPT), which are all processes involved in the inhibition of apoptosis. However, neither inhibition nor induction of apoptosis by CsA has yet been described in the rat hepatocyte primary culture during incubation for 4 and 20 hours. It was the purpose of the present study to examine by means of morphological and biochemical criteria the effects of CsA on apoptosis, and to characterize the underlying mechanisms.

Rat hepatocytes were cultured for 4 or 20 hours with CsA at concentrations of 0, 10, 25 and 50 μM . Chromatin condensation and fragmentation, DNA fragmentation (TUNEL), membrane phosphatidylserine distribution (Annexin V), caspase-1, -3 and -6 activity, mitochondrial membrane potential (Rhodamine 123), and cytochrome c release into the cytosol were investigated.

Four hours after CsA treatment, chromatin condensation and fragmentation, and the number of TUNEL- and Annexin V-positive cells increased dose dependently

without any observable enzyme leakage, which indicated the integrity of the outer cell membrane. After 20 hours of CsA incubation apoptosis parameters were further increased and were accompanied by the increased activity of the cysteine protease, caspase-3 (CPP 32), and slightly increased caspase-6 (Mch 2), but not caspase-1 (ICE). The specific caspase-3 inhibitor, Ac-DEVD-CHO, inhibited caspase-3 activation and attenuated CsA-induced apoptosis and LDH leakage. The caspase-6 inhibitor, Ac-VEID-CHO, only marginally inhibited CsA-induced apoptosis. Decreased mitochondrial membrane potential and cytochrome c release went in parallel with ultrastructural mitochondrial changes and might be regarded as early events which trigger the apoptosis cascade. Transmission electron microscopy (TEM) confirmed an increase in the number of necrotic cells after 20 hours, but not after 4 hours, compared with controls.

Key words: Apoptosis.- Ciclosporine A.- Mitochondrial membrane potencial.- Caspases.- DNA fragmentation.

RESUMEN

Inducción de Apoptosis in vitro en hepatocitos de rata por ciclosporina A

La cefalosporina A (CsA) se utiliza frecuentemente en hepatocitos de rata y fracciones mitocondriales hepáticas aisladas como inhibidor específico de la liberación de Ca^{2+} y como bloqueador selectivo de la permeabilidad y del potencial de membrana mitocondriales, procesos implicados en la inhibición de la apoptosis. Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito ni la inhibición ni la inducción de apoptosis por CsA en cultivos primarios de hepatocitos de rata tras su incubación por un periodo de 4 a 20 horas. El propósito de este estudio ha sido examinar con criterios morfológicos y bioquímicos los efectos de la CsA sobre la apoptosis y esclarecer las características de los mecanismos subyacentes.

Los hepatocitos de rata se cultivaron durante 4-20 h. con CsA a concentraciones de 0, 10, 25 y 50 μ M. Se investigaron los fenómenos de condensación y fragmentación de la cromatina, fragmentación de ADN (TUNEL), distribución de fostatidilcolina en la membrana (Anexina V), así como la actividades enzimática de caspasas 1, -3 y -6, el potencial de membrana mitocondrial (Rhodamina 123) y la liberación de citocromo C en el citosol.

Tras cuatro horas de incubación con CsA, la condensación y fragmentación de la cromatina y el número de células TUNEL y Anexina V positivas aumentaron en función de la dosis sin que se observara pérdida enzimática, lo que indica la integridad de la membrana celular externa. Después de 20 horas de incubación con CsA, experimentaron un mayor incremento acompañado del aumento de las actividades de cistein-proteasa, caspasa-3 (CPP32) y de un ligero incremento de caspasa-6 (Mch 2), pero no de caspasa-1 (ICE). El inhibidor específico de caspasa-3, Ac-DEVD-CHO,

inhibió la activación de caspasa-3 y atenuó la apoptosis inducida por CsA y la pérdida de LDH. El inhibidor de caspasa-6, Ac-VEID-CHO, únicamente inhibió la apoptosis inducida por CsA. El descenso de potencial de membrana mitocondrial y la liberación de citocromo C fueron paralelos a los cambios de ultraestructuras mitocondriales y pudieran considerarse reacciones tempranas que desencadenan la cascada de fenómenos apoptóticos. La microscopia de transmisión electrónica (TEM) confirmó el incremento del número de células necróticas al cabo de 20 horas, pero no tras 4 horas de incubación, en comparación con los controles.

Palabras clave: Apoptosis.-. Ciclosporina A.- Potencial de membrana mitocondrial.- Caspasas.- Fragmentación de ADN.-

INTRODUCTION

Over the last 20 years, the immunosuppressive drug, CsA, has revolutionized organ transplantation by preventing graft rejection of different organs, and has been successfully used in the treatment of autoimmune disease. In cancer therapy, CsA-related compounds are successfully used in the reversion of multidrug resistance by inhibiting the p-gp 170-kDa protein (Advani *et al.* 1999). Its successful clinical application is accompanied, however, by side effects in the liver (Kahan 1993, Rush 1991). Clinically, CsA-induced hepatic effects are mainly of a cholestatic nature, which manifests itself by elevated serum bile-acid levels (Schade *et al.* 1983), together with hyperbilirubinemia (Soresi *et al.* 1995). In rat hepatocytes, CsA inhibited the uptake and secretion of bile acids, and bile flow in the isolated perfused rat liver (Wolf *et al.* 1998, Kiefer *et al.* 1997). In addition to cholestasis, an increase in serum aminotransferase activity has been observed in some clinical studies with CsA, but this has been found more frequently after treatment with its O-hydroxyethyl-D-(Ser)⁸-cyclosporine derivative, SDZ IMM125 (Wolf *et al.* 1998). In rats, serum aminotransferase activity increased only after treatment at very high dosages (Donatsch *et al.* 1992). In hepatocyte primary cultures and in the isolated perfused liver, CsA caused the release of lactate dehydrogenase, which correlated very well with that of serum transaminases (Wolf *et al.* 1998, Wolf *et al.* 1997). The leakage of liver-specific aminotransferases into the serum might be regarded as the result

of cellular membrane damage and, hence, necrosis. However, using histopathological criteria, neither apoptosis nor necrosis has been found in man after CsA treatment.

In vivo, CsA induced apoptosis in tubular and intestinal cells of rats (Thomas *et al.* 1998), and in mouse thymocytes (Saiagh *et al.* 1994). In vitro, depending on the cellular system, CsA-induced apoptosis and inhibition of apoptosis has been observed. For example, CsA acts as an inhibitor of apoptosis in T and B lymphocytes (Ito *et al.* 1998) and in neuronal cells (Kruman *et al.* 1999). Induction of programmed cell death has been observed in thymocytes (Huss *et al.* 1995), in glioma cells (Mosieniak *et al.* 1997), and in renal proximal tubular cells (Healy *et al.* 1998).

In rat hepatocyte primary cultures, we recently showed that CsA causes oxidative stress, and that CsA cytotoxicity can be inhibited by antioxidants (Wolf and Broadhurst 1992, Wolf and Donatsch 1990, Wolf *et al.* 1994). The enhanced uptake of Ca^{2+} into liposomal vesicles (Wolf *et al.* 1997) and an increase in extracellular Ca^{2+} (Ellouk-Achard *et al.* 1997) have been demonstrated after treatment of rat hepatocytes with CsA. In the current literature, oxidative stress and increased intracellular Ca^{2+} concentrations have been described as inducers of apoptosis (Buttke and Sandstrom 1994), which suggests the potential role of CsA as an inducer of apoptosis. In contrast, in the current literature, CsA was often used as a specific inhibitor of mitochondrial Ca^{2+} release and of mitochondrial membrane potential, and as a blocker of the MPT in rat hepatocytes (Lemasters *et al.* 1998, Qian *et al.* 1997), all three are processes involved in the inhibition of apoptosis.

To our knowledge, neither inhibition nor induction of apoptosis by CsA has been described in the liver after in vivo treatment. It was recently shown that CsA induced apoptosis in rat hepatocyte cultures treated for 48 hours in the presence of epidermal growth factor (EGF), with the DNA laddering method applied as an indicator of apoptosis (Roman *et al.* 1998).

In order to obtain a better understanding of the nature and mechanisms underlying the hepatic side effects of CsA, the present

investigation aimed to examine CsA action with relation to apoptosis and necrosis by means of morphological and biochemical tools under conditions in which specific hepatocellular functions are preserved during an incubation time between 4 and 20 hours.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Permission for animal studies was obtained from the Veterinäramt Basel-Landschaft, CH-4410 Liestal, and all study protocols were in compliance with the institutional guidelines. Male Wistar rats were obtained from Biological Research Laboratories (CH-4414 Füllinsdorf, Switzerland). They were kept in Macrolon[®] cages with wood shavings as bedding under optimal hygienic conditions, at a temperature of 22-23 °C, a relative humidity of 50-74 %, and fluorescent light for a 12-hour day/12-hour night cycle. They were given water and rodent pellets ad libitum.

Hepatocyte isolation and cell-culture conditions

Rat hepatocytes (rats 180-220 g) were isolated according to the two-step liver perfusion method (Boelsterli *et al.* 1993). The cells were seeded in 35 mm six-well culture dishes¹ at a density of 0.7×10^6 cells in 2 ml WME², or in 60 mm culture dishes¹ at a density of 2×10^6 cells in 5 ml WME. The culture medium contained 10 % fetal calf serum, penicillin (100 U/ml), streptomycin (0.1 mg/ml), insulin (10^{-7} M) and dexamethasone (10^{-7} M). After an attachment period of 2 hours at 37 °C in a 5 % CO₂/95 % air atmosphere, the medium was changed. The test compound was added together with the new medium. CsA³ was dissolved in DMSO, and this solution was added to the culture medium, resulting in a final concentration of 1 % DMSO in the culture medium. Control plates received the DMSO- containing medium without CsA.

The maximum soluble CsA concentration in culture medium in the presence of BSA, without any observable precipitation, was 50 µM.

Transmission electron microscopy

The cell cultures were fixed with 1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, for 1 hour or overnight at 4 °C. After postfixation with 1 % OsO₄ in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, for 1 hour at 4 °C, the cell cultures were dehydrated in graded ethanol solutions and embedded in Epon according to the method of Pease (Pease 1984).

Ultrathin sections of hepatocyte cultures from at least two selected tissue blocks per well were counterstained with uranyl acetate and lead citrate, and were examined with a Philips CM10 transmission electron microscope.

Alterations in the treated cell cultures were expressed by different scores depending on their degree of intensity. The following scores were used: changes observed in one cell per mm² = marginal; changes in two cells per mm² = slight; alterations in three to nine cells per mm² = moderate; alterations in ten or more cells per mm² = marked.

Determination of cytotoxicity

Lactate dehydrogenase (LDH) activity in the culture media was measured spectrophotometrically as an index of plasma membrane damage and loss of membrane integrity (Wedler and Acosta 1994). Enzyme activity was expressed as the percentage of extracellular LDH activity of the total LDH activity on the plates.

Determination of chromatin condensation and degradation

Chromatin condensation and fragmentation were determined by Feulgen staining and using light microscopy to count the percentage of cells containing alterations in the nuclear structure (Lillie and Fullmer 1976).

Hepatocyte samples were treated as follows: after the cell culture medium was removed, the cells were fixed overnight with 4 % formaldehyde in PBS. After hydrolyzing in 5 N HCl for 90 min at room temperature, the cells were rinsed in distilled water and stained for 30 min in Schiff reagent⁴. After this, the hepatocytes were rinsed in 0.05 M Na₂S₂O₃ solution for 2 min, washed first in tap water, and then washed in

distilled water, and mounted by Crystal Mount⁵. After staining, hepatocyte nuclei were violet in color.

The following criteria were used: normal nuclei were those in which the chromatin was unaltered and uniformly spread over the whole nucleus. Condensed chromatin was located at the nuclear membrane periphery and appeared in a half-moon form. Fragmented chromatin was identifiable by its scattered, droplike structure, which was located on the area of the original nucleus. The total size of apoptotic nuclei appeared to be smaller and more shrunken when compared with intact cells. For each sample, 1000-1500 nuclei were counted.

Determination of DNA fragmentation

TUNEL assay was performed using the DNA fragmentation kit TdT-FragEL™⁶. The principle of the assay is based on the fact that terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) binds to exposed 3'-OH ends of DNA fragments generated in response to apoptotic signals, and catalyzes the addition of biotin-labeled and unlabeled deoxynucleotides (Gavrieli *et al.* 1992). Biotinylated nucleotides were detected using a streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) conjugate. Diaminobenzidine reacts with the labeled sample to generate an insoluble, colored substrate at the site of DNA fragmentation. Non-apoptotic cells do not incorporate significant amounts of labeled nucleotide because they lack an excess of 3'-OH ends. Non-apoptotic cells were counterstained with methyl green. Positive TUNEL staining was indicated by a dark brown DAB signal, while shades of blue-green signified a non reactive cell.

Determination of membrane phosphatidylserine distribution

Phosphatidylserine distribution was detected by labeling the cells with the biotin-conjugate of Annexin V⁷ according to the method of Vermes (*Vermes et al.* 1995).

Cells were washed with binding buffer (Hepes/NaOH 10 mM pH 7.4, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2.5 mM) and incubated for 1 hour with Annexin-biotin 1:20 in binding buffer. After washing in PBS, the cells were fixed with formalin. To detect of Annexin V, cells were washed in PBS and incubated with Streptavidin peroxidase complex⁸ for 30 min.

After a further washing, the ABC substrate⁹ was added for 5-15 min. Cells were washed and mounted with Crystal Mount. Annexin-positive cells were detected by their brown color.

Determination of caspase-1, -3 and -6 activity

Caspase activity was determined according to the method of Rodriguez (Rodriguez *et al.* 1996).

After incubation, 2×10^6 cells were washed once in ice-cold PBS and lysed in 1 ml buffer A (10 mM Hepes, pH 7.4, 42 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT and protease inhibitors¹⁰). After three thaw-freeze cycles, the lysate was centrifuged for 20 min at 13000 g at 4 °C. The supernatant (lysate) was removed and stored at -80 °C until the assay was performed.

Lysates (70 µg protein) were assayed in 0.1 % CHAPS, 100 mM Hepes, 10 % sucrose and 10 mM DTT, pH 7.5, with or without protease inhibitors (100 µM); caspase-1 (Ac-YVAD-CHO), caspase-3 (Ac-DEVD-CHO) or caspase-6 (Ac-VEID-CHO)¹¹ were added in DMSO. The reaction was started with 20 µM of the substrate for caspase-1 (Ac-YVAD-AMC), caspase-3 (Ac-DEVD-AMC) and caspase-6 (Ac-VEID-AMC), which were labeled with the fluorochrome 7-amino-4-methyl coumarin (AMC)¹¹, and the reaction was followed for 60 min. Fluorescence was measured at excitation 360 nm and emission 460 nm in a fluorescence plate reader.

Fluorescence intensity was calibrated with standard concentrations of 7-amino-4-methyl coumarin (AMC). Protease activity was calculated from the slope of the recorder trace and expressed as pmol/ mg protein/ min.

The difference between the substrate cleavage activity levels in the presence and absence of selective inhibitors reflected the contribution of either caspase-1, -3 or -6 enzyme activity.

Determination of mitochondrial membrane potential

Mitochondrial membrane potential was determined by the uptake of Rhodamine 123 according to the method of Wu (Wu *et al.* 1990).

After treatment, hepatocytes cultured on 96-well plates¹, were washed in PBS and incubated with 10 µg/ml Rhodamine 123¹² for 30 min at 37 °C. After further washing, the hepatocytes were incubated with WME medium for 30 min. Ethanol/Water 1/1 was used to extract the amount of dye retained by the cells. Fluorescence was measured with a Cytofluor 2300 from Millipore, with an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm.

Determination of cytosolic and mitochondrial cytochrome c content

Cytochrome c was determined after subcellular fractionation by the Western blotting technique according to the method of Tang (Tang *et al.* 1998).

After incubation, 2×10^6 cells were washed once in ice-cold PBS and lysed in 1 ml buffer A (10 mM Hepes, pH 7.4, 42 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT and protease inhibitor). After three thaw-freeze cycles, the lysate was centrifuged for 20 min at 13 000 g at 4 °C. The pellet fraction (mitochondria) was first washed in buffer A containing sucrose and then solubilized in 50 µl TNC buffer (10 mM Tris-acetate, pH 8.0, 0.5 % NP-50, 5 mM CaCl₂) The supernatant was re-centrifuged at 100 000 g (4 °C, 1 hour) to generate the cytosol, and then removed and stored at -80 °C.

Fifty µg of the cytosolic and mitochondrial fraction was loaded onto a 15 % SDS- polyacrylamide gel and separated according to Laemmli (Laemmli 1970). After fractionation, the proteins were electroblotted onto a PVDF transfer membrane (0.2 µm)¹³. Immunostaining of cytochrome c was carried out with an anti-cytochrome c monoclonal antibody¹⁴. For detection, the membrane was washed in PBS and incubated with Streptavidin peroxidase complex for 30 min. After further washing, the ABC substrate was added for 5-15 min. Protein bands (15 kD) were revealed using NBT/BCIP.

Determination of protein concentration

Protein content was determined according to Bradford (Bradford 1976). Bovine serum albumin served as standard.

Statistics

A two-way analysis of variance was performed (group and animal; each of them were regarded as qualitative). If the effect of the animal number was not significant it was omitted. A quantile plot was used to visually judge the normality of the residuals. If the residuals were not normally distributed, we tried to achieve (approximate) normality by transforming the response or by omission of outliers.

A multiple comparison method was applied using the three methods of Turkey (Hayter 1989), Sidak (Sidak 1967) and Dunnett (Dunnett 1964). The Dunnett test compares every treated group with the control group, while the other two methods can be used to compare each group with each other group.

The multiple comparison method delivers an estimation of the difference in the response expected between the two groups compared, the standard error of the response, and a lower and an upper confidence limit for the difference. If the two limits do not include zero, the difference is significantly different from zero, on the level of 5 %. By repeating the method for 1 % and 0.1 %, we could analyze how big the significance was.

The S-Plus software (version 5) was used for the computations; the three methods of Turkey (Hayter 1989), Sidak (Sidak 1967) and Dunnett (Dunnett 1964) were used adaptively, i.e. in every case, the most sensitive method was used.

RESULTS

Cytotoxicity

Primary hepatocytes were incubated with CsA at concentrations of 0, 10, 25 and 50 μM for 4 and 20 hours. LDH release was determined as a parameter of cytotoxicity. CsA treatment resulted in a dose- and time-dependent induction of LDH release. While CsA was not cytotoxic at any concentration after 4 hours, CsA was statistically significantly cytotoxic at 25 and 50 μM after 20 hours (Fig.1)

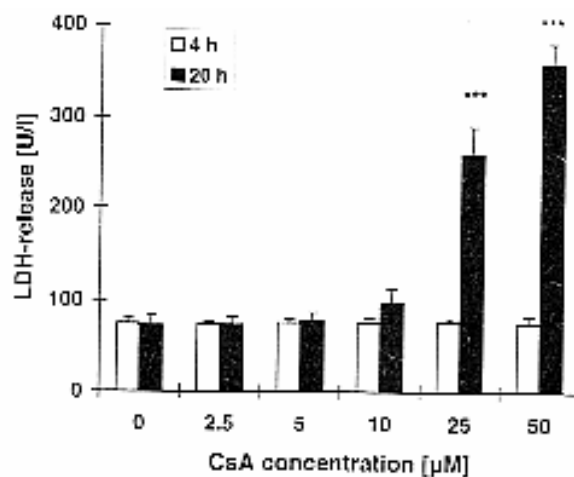


Fig. 1: Effect of CsA on release of lactate dehydrogenase after 4 hours (open square) and 20 hours (closed square). Data are expressed as mean \pm SD (n=3). Statistically significant differences versus the control group are expressed as ***P<0.001

Morphology

After 4 and 20 hours of cultivation, untreated control hepatocytes showed a percentage of 1-2 % condensed chromatin. Incubation of the hepatocytes with CsA resulted in a dose-dependent increase in chromatin condensation, with maximum percentages reached at concentrations of 50 μ M, i.e. 8.5 times and 14 times above control values after 4 hours and 20 hours, respectively (Fig. 2).

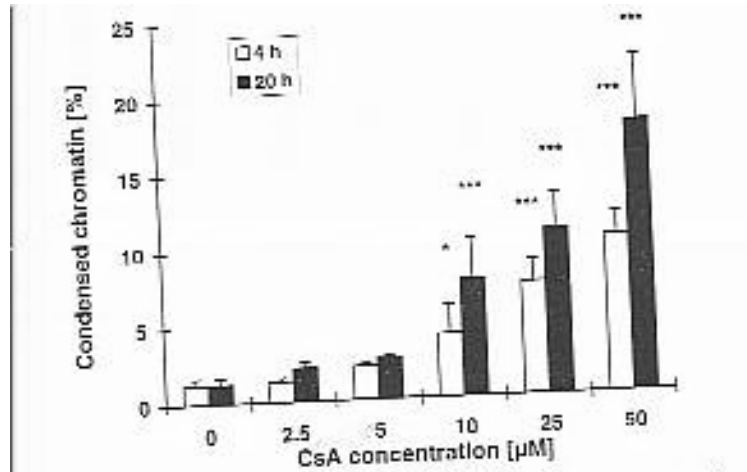


Fig. 2: Effect of CsA on chromatin condensation in hepatocytes after 4 hours (open square) and 20 hours (closed square). Data are expressed as mean \pm SD (n=3). Statistically significant differences versus the control group are expressed as *P<0.05 and ***P<0.001.

Chromatin fragmentation in control hepatocytes was 0.1 % after 4 hours and 0.6 % after 20 hours. Under the same conditions, CsA caused a dose-dependent increase in fragmented nuclei. After 20 hours of incubation, 50 μ M CsA increased chromatin fragmentation, compared with controls by a factor of 7.4. The effects observed at all concentrations after 20 hours were, on average, about 2-3 times higher than after 4 hours (Fig.3)

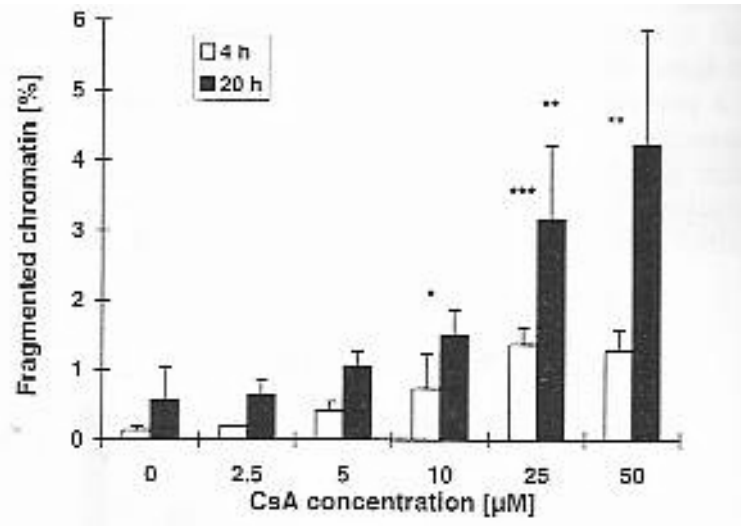


Fig. 3: Effect of CsA on chromatin fragmentation in hepatocytes after 4 hours (open square) and 20 hours (closed square). Data are expressed as mean \pm SD (n=3). Statistically significant differences versus the control group are expressed as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

DNA fragmentation, as determined by the TUNEL assay, showed in a time- and dose-dependent increase after treatment with CsA. At both time points, 50 μM CsA caused a percentage of positive TUNEL

stained

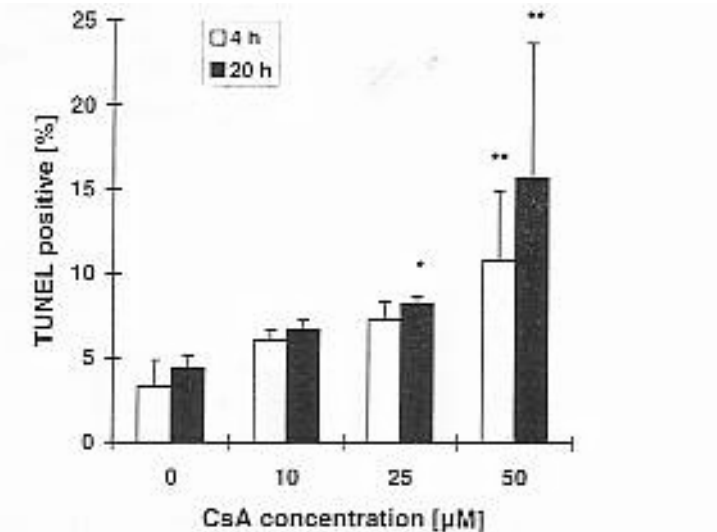


Fig. 4: Effect of CsA on TUNEL-positive hepatocytes after 4 hours (open square) and 20 hours (closed square). Data are expressed as mean \pm SD (n=3). Statistically significant differences versus the control group are expressed as *P<0.05 and ***P<0.001.

cells which was about three times higher than that in the control (Fig. 4).

For electron microscopy investigations, hepatocytes were incubated for 4 and 22 hours with 0, 10 and 50 μ M CsA. After 4 and 22 hours, hepatocytes from control cultures showed a normal distribution and morphology of all cellular organelles, similar to that observed in hepatocytes in liver tissue (Fig. 5A) (Rhodin 1974, Philips *et al.* 1987, Cheville 1994), with the exception of some cells which had a weakly visible mitochondrial membrane, a few swollen mitochondria, and a marginal dilatation of smooth endoplasmatic reticulum (SER after 22 hours only). A few necrotic cells were observed, and all hepatocytes contained lipid vacuoles and glycogen.

The main ultrastructural changes seen in all treated cultures (4 and 22 hours) were the occurrence of cells with aggregated chromatin in compact masses, condensed cytoplasm with marked crowding of organelles, which was frequently associated with the development of translucent cytoplasmic vacuoles, and cell surface protuberances or blebs. Mitochondria and other organelles maintained their integrity (Fig. 5B-D).

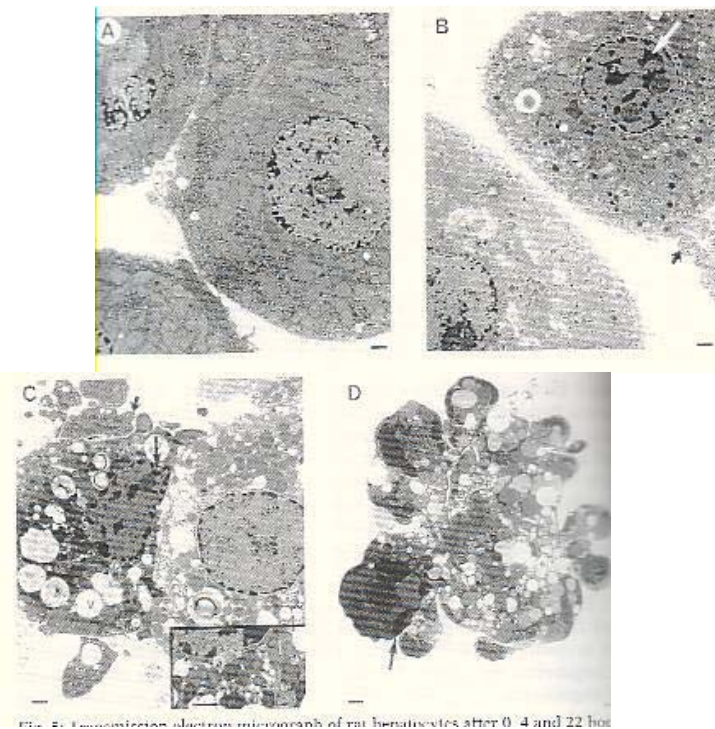


Fig. 5: Transmission electron micrograph of rat hepatocytes after 0, 4 and 22 hours in culture. (A) Control hepatocytes with normal ultrastructure exhibiting distinct mitochondrial membranes and clearly visible cristae. Nucleus appears large and round. Cells contain glycogen. (B-D) Hepatocytes treated with 50 μ M CsA for 4 hours (B+D) and 22 hours (C) showing morphological sequence of apoptosis. (B) Note the different ultrastructure of the two cells. Upper right cell has darker mitochondria with clearly visible cristae and membranes (*arrowhead*), focally dilated endoplasmic reticulum and some blebs (*small arrow*), and the nucleus is darker and has areas of condensed chromatin (*large arrow*). (C) Left cell shows condensed cytoplasm with structurally intact mitochondria and other organelles, formation of surface protuberances and cytoplasmic bodies (*small arrow*), nuclear

shrinkage with invagination of nuclear membrane (*large arrow*), and vacuoles (v). Inset: higher magnification of area from left cell showing mitochondria with intact cristae and membranes (*arrowhead*). (D) Cluster of apoptotic bodies. A variety of organelles is included in the different bodies, and one contains nuclear fragments with condensed chromatin (*large arrow*). Bars: 1.0 μm .

In addition, induction of dilated ER and vacuoles was observed. At 22 hours, all CsA-treated cultures displayed necrotic changes, including swelling of all cytoplasmic compartments, swelling and disappearance of mitochondrial cristae, disintegration of membranes, and accumulation of large, dense granules in the mitochondrial matrix. The necrotic changes were more pronounced in cultures treated with 50 μM CsA (Fig. 6A). There was no significant difference in necrosis in control preparations and CsA-treated preparations after 4 hours of incubation (summary of data in Table 1).

TABLE 1

Synoptic table of ultrastructural findings observed by electron microscopy

Treatment			Mitochondrial			Apoptotic bodies	Blebs	Necrosis
	SER dilatation	RER dilatation	Membrane weak	Matriz dark	Size/no.			
Control 0h	-	-	-	-	-/-	-	-	-
Control 4h	-	-	(+)	-	S/-	-	-	(+)
CsA 10 μM , 4h	(+)	-	(+)	(+)	S/-	(+)	(+)	(+)
CsA 50 μM , 4h	(+)	(+)	+	(+)	S,d/ni	(+)	(+)	(+)
Control 22h	(+)	(+)	(+)	-	s/-	-	-	(+)
CsA 10 μM , 22h	++	+	+	(+)	s/ni	(+)	(+)	(+)
Csa 50 μM , 22h	+++	+	+	+	d/ni	+	+	+

(+) marginal, + slight, ++ moderate, +++ marget, - no alteration/finding, s = swollen,

i = size increased, d = size decreased, ni = number increased

Biochemical markers of apoptosis

Four hours after CsA treatment, Annexin V reaction was increased from 8 % in control preparations to 20 % in hepatocytes treated with CsA (50 μ M). The Annexin V reaction showed a similar concentration dependency as chromatin condensation/fragmentation and DNA fragmentation. Twenty hours after CsA treatment, Annexin V-stained cells increased from 7 % in controls to 30 % (Fig. 7).

After 20 hours of CsA incubation, the activity of the cysteine protease caspase-3 and caspase-6, but not caspase-1, was statistically significantly increased in comparison with controls. CsA treatment at 50 μ M resulted in a sevenfold increase in caspase-3 activity; caspase-6 activity increased by 40 %. At the earlier time point (4 hours) no statistically significant increases were seen (Fig. 8).

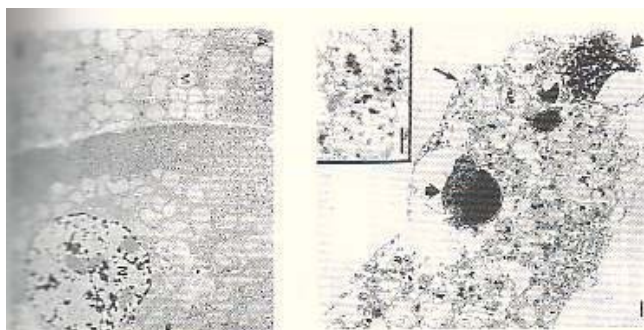


Fig. 6: Transmission electron micrograph of rat hepatocytes. (A) Control culture, 22 hours. Normal cell (upper third), and altered cell showing swelling of all cytoplasm compartments, swelling of mitochondria and disappearance of mitochondrial cristae (*arrowhead*), and detachment of ribosomes from rough endoplasmic reticulum membranes and vacuolisation (*small arrow*). Glycogen (g), mitochondria (m), vacuoles (v). (B) Culture treated with 50 μ M CsA for 22 hours. Secondary necrosis of apoptotic body: condensed chromatin (*large arrows*) and mitochondrial and cytoplasmic fragments (*small arrow*). Inset: higher magnification of necrotic

mitochondria characterized by disintegration of membranes and accumulation of large dense granules in the mitochondrial matrix (*arrowhead*). Bars: 1.0 μm .

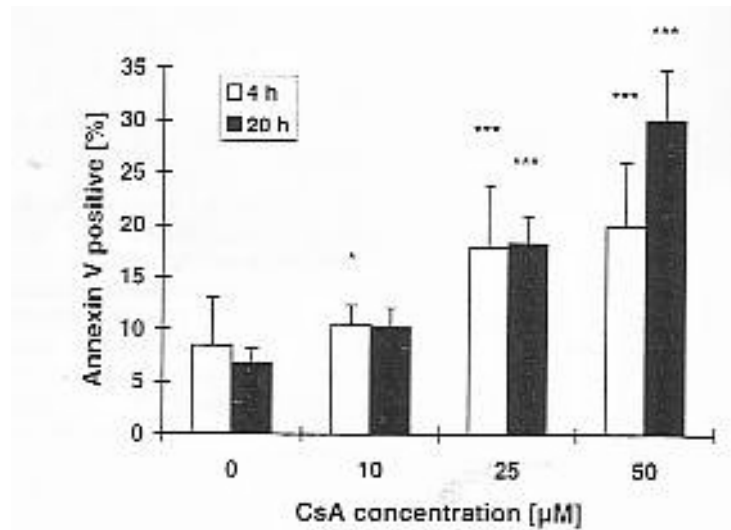


Fig. 7: Effect of CsA on phosphatidylserine distribution after 4 hours (open square) and 20 hours (closed square) of incubation in hepatocyte primary cultures. Data are expressed as mean \pm SD (n=3). Statistically significant differences versus the control group are expressed as *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001.

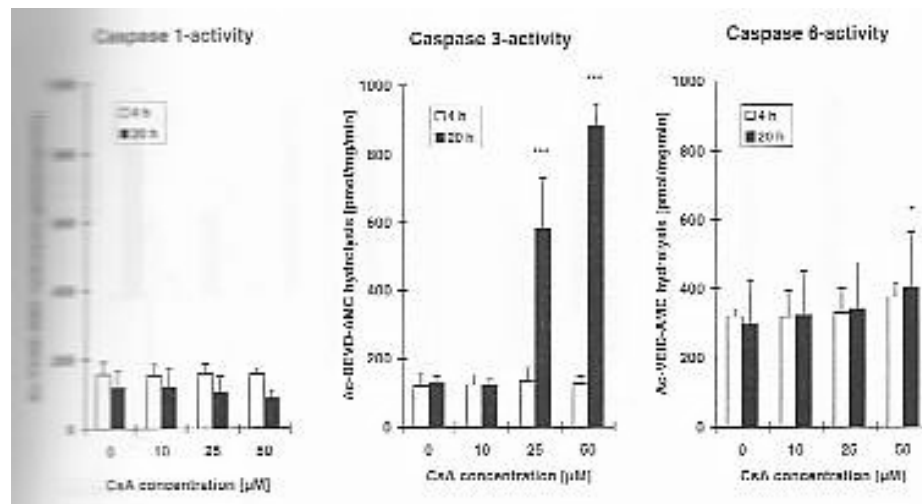


Fig. 8: Effect of CsA on caspase activity after 4 hours (open square) and 20 hours (closed square). Data are expressed as mean \pm SD (n=3). Statistically

significant differences versus the control group are expressed as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

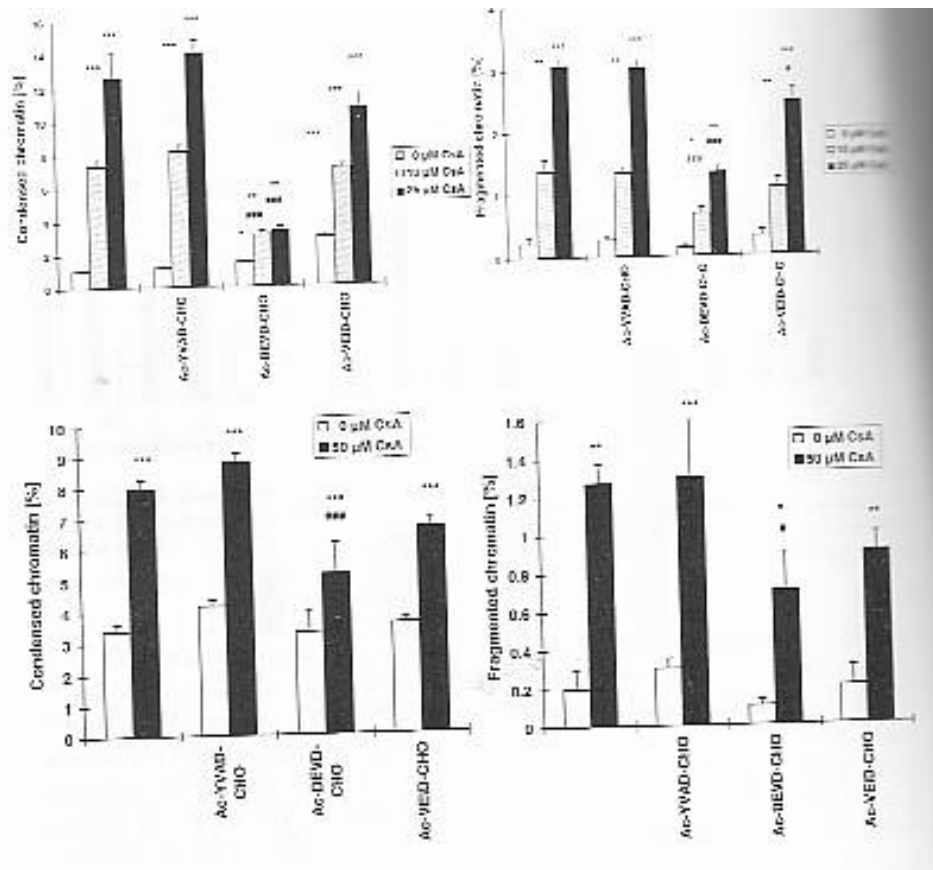


Fig. 9: Effect of caspase inhibitors on CsA-induced chromatin condensation and fragmentation. Hepatocytes were preincubated 1 hour with 100 μM Ac-YVAD-AMC, Ac-DEVD-CHO and Ac-VEID-CHO before adding CsA in combination with the inhibitors.

A: Chromatin condensation after treatment with 0 and 50 μM CsA after 4 hours

B: Chromatin fragmentation after treatment with 0 and 50 μM CsA after 4 hours

C: Chromatin condensation after treatment with 0, 10 and 25 μM CsA after 20 hours

D: Chromatin fragmentation after treatment with 0, 10 and 25 μM CsA after 20 hours

Data are expressed as mean \pm SD (n=3). Statistically significant differences compared with 0 μM CsA are expressed as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. Statistically

significant differences compared with the respective CsA group without inhibitor are indicated by [#]P<0.05, ^{##}P<0.01 and ^{###}P<0.001.

The specific inhibitors of caspase-1, caspase-3 and caspase-6 were co-incubated at concentrations of 100 μ M with 0 and 50 μ M CsA for 4 hours and with 0, 10 and 25 μ M CsA for 20 hours. After 4 hours, Ac-DEVD-CHO (Nicholson *et al.* 1995) statistically significantly inhibited CsA-induced chromatin condensation and fragmentation to between 50 and 60 % of their initial values (Fig. 9). After 20 hours of incubation chromatin condensation was reduced by the caspase-3 inhibitor by 83 % (10 μ M CsA) and 65 % (25 μ M CsA). Ac-DEVD-CHO reduced DNA fragmentation by 65 % (10 μ M CsA) and 83 % (25 μ M CsA). While the caspase-6 inhibitor had only a slight inhibitory effects, on both chromatin condensation and on chromatin fragmentation after 4 hours of incubation, statistically significant 28 % inhibitory effect was found on chromatin fragmentation after 20 hours after coincubation with 50 μ M CsA. No effect on chromatin condensation and fragmentation was observed with caspase-1 inhibition.

After 20 hours of incubation, CsA-induced LDH release (50 μ M) was reduced by the caspase-3 inhibitor, Ac-DEVD-CHO, to nearly 45 % of leakage values obtained with CsA without the inhibitor. No significant

effect was observed with the caspase-1 or caspase-6 inhibitor (Fig.10)

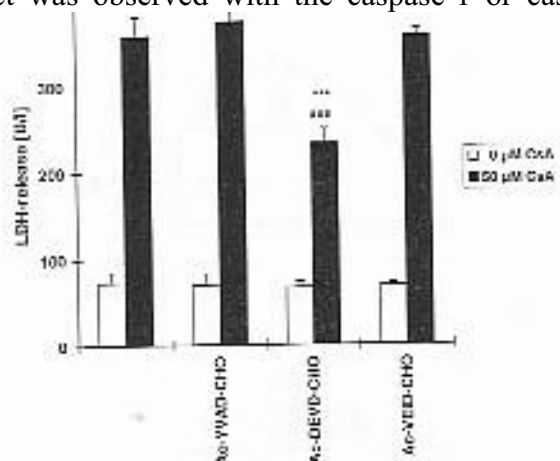


Fig.10: Effect of caspase inhibitors on CsA-induced LDH release. Hepatocytes were preincubated 1 hour with 100 μ M Ac-YVAD-AMC, Ac-DEVD-CHO and Ac-VEID-CHO before adding 50 μ M CsA together with the inhibitors. LDH release was measured after 4 hours and 20 hours of incubation.

Data are expressed as mean \pm SD (n=3). Statistically significant differences compared with 0 μ M CsA are expressed as *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001. Statistically significant differences compared with the 50 μ M CsA group are indicated by #P<0.05, ##P<0.01 and ###P<0.001.

Hepatocyte cultures were incubated at CsA concentrations of 0, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 and 50 μ M for 1, 2, 4 or 20 hours. Mitochondrial membrane potential decreased after 1 hour of CsA incubation by about 50 % of the control at the highest CsA concentration (50 μ M). After 20 hours of CsA incubation at 50 μ M, Rhodamine 123 uptake decreased maximally by 75 % of control values. The decrease in membrane potential was dose and timedependent (Fig.11).

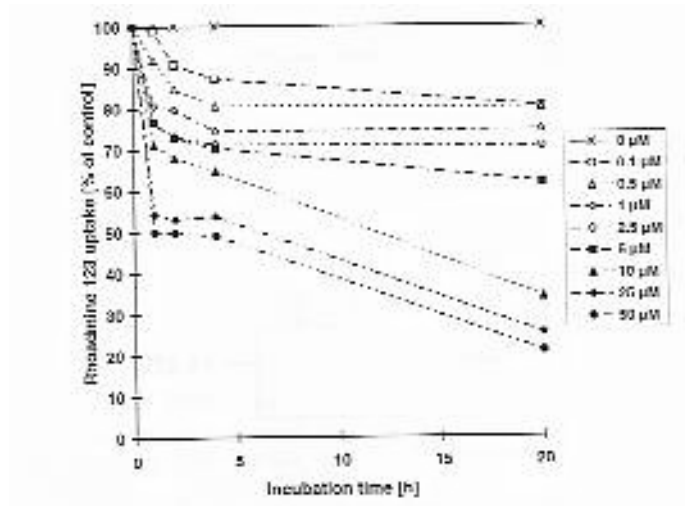


Fig.11: Effect of CsA on the mitochondrial membrane potential after 1, 2, 4 and 20 hours of incubation in hepatocyte primary cultures.

Cytochrome c release from the mitochondria into the cytosol was determined after 4 and 20 hours of CsA incubation. Four hours after CsA treatment (50 μM), there was an approximate twofold increase in cytochrome c in the cytosol, and a decrease in the mitochondria. After 20

hours, this effect was even more pronounced (Fig.12).

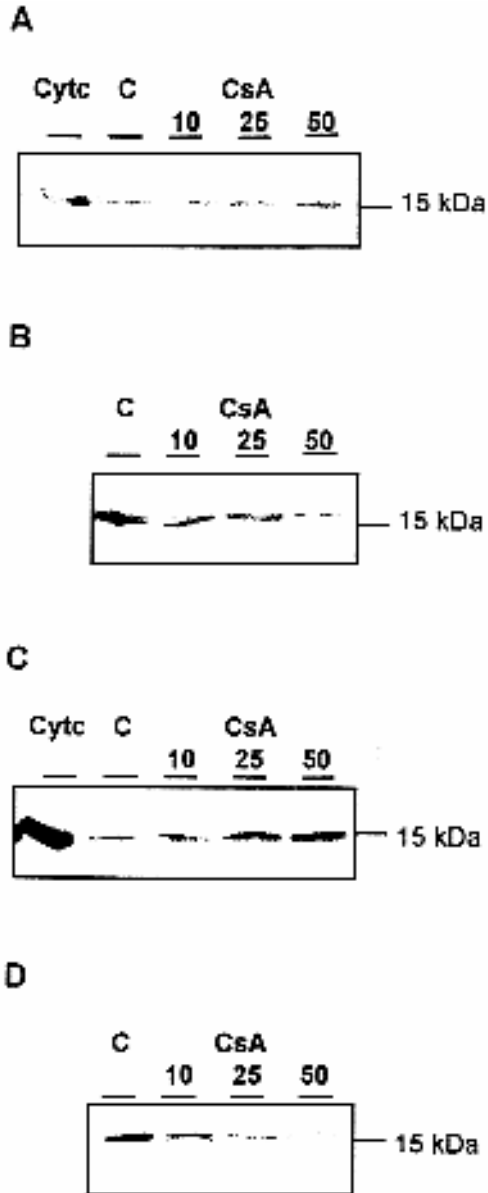


Fig.12: Effect of CsA on cytochrome c release after 4 and 20 hours. Immunoblot of cytosol and mitochondria after 4 hours and 20 hours of treatment.

A: Cytosol after 4 hours, B: Mitochondria after 4 hours; C: Cytosol after 20 hours; D: Mitochondria after 20 hours. C = Control cells; Cells treated with either 10 μ M, 25 μ M and 50 μ M CsA.

DISCUSSION

Cell death induced by a foreign compound may occur from two major mechanisms, necrosis and apoptosis (Fawthrop *et al.* 1991, Wyllie *et al.* 1980). Necrotic cell death can occur from noxious injury, while apoptosis is an endogenous cellular process in which an external signal activates a metabolic pathway that results in cell death. This type of cell death is a common feature in cellular differentiation and other biological processes that regulate cell numbers. In addition, apoptosis is triggered by various xenobiotics, such as antineoplastic agents, or after removal of growth factors. While necrotic cell death results in cell lysis and destruction of the outer plasma membrane, cellular apoptosis is morphologically characterized by cell shrinkage, nuclear pyknosis, chromatin condensation and degradation, blebbing of the plasma membrane, and solubilization of the nuclear matrix (Fawthrop *et al.* 1991, Eanshaw 1995, Miller *et al.* 1993).

In the present study, by applying morphological and biochemical methods and determining apoptosis at different subcellular levels, we have shown, for the first time, that CsA specifically induced apoptosis in primary rat hepatocyte cultures after 4 hours and 20 hours of treatment.

At the nuclear level, we found that CsA induced an increase in chromatin condensation and fragmentation as determined by light microscopy after Feulgen staining and TEM investigation. Feulgen staining is regarded as a specific method for chromatin staining (Lillie and Fullmer 1976), and in our investigations we found that CsA induced apoptosis according to the recognized criteria detailed above in the methodological part of this paper. The light microscopy data were

supported by ultrastructural evaluations using TEM. TEM was used for qualitative assessment of the structural changes and did not permit a full quantitative assessment of the findings. With TEM it was possible to demonstrate that CsA induced apoptosis according to classical criteria and to distinguish the effects observed from necrosis. Apoptosis appeared as typical cell shrinkage accompanied by condensed cytoplasm with focally dilated endoplasmic reticulum, structurally intact mitochondria and other organelles compacted together and maintaining their integrity, formation of cytoplasmic protuberances on the cell surface (blebbing) and cytoplasmic bodies, nuclear shrinkage with invagination of nuclear membrane, and massive deposits of chromatin in compact masses adjoining the nuclear envelope. It was also possible to clearly distinguish necrosis characterized by swelling of all cytoplasmic compartments, swelling and disappearance of mitochondrial cristae, disintegration of membranes and accumulation of large dense granules in the mitochondrial matrix, detachment of ribosomes from rough endoplasmic reticulum membranes, and nuclear swelling with clumping of loosely textured nuclear chromatin (Wyllie *et al.* 1980).

The results obtained from morphological investigations were supported by the specific determination of DNA fragmentation using the TUNEL method. The results showed that CsA specifically causes DNA damage by the generation of 3'-OH end fragments. This method is considered to be specific because of the binding of the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) to exposed 3'-OH ends of DNA fragments generated in response to apoptotic stimuli (Gavrieli *et al.* 1992). The loss of plasma membrane asymmetry is another feature, and is an early process in apoptosis, preceding apoptotic DNA degradation (Eanshaw 1995, Martin *et al.* 1995).

In the present investigation, membrane phosphatidylserine distribution was used as a sensitive parameter of apoptosis to indicate plasma membrane asymmetry. In normal cells, phosphatidylserine is located exclusively in the inner cytoplasmic surface of the membrane. In apoptotic cells, phosphatidylserine flips within the cell membrane to become located on both surfaces. This is an early event in the apoptotic

process, which is used to detect apoptotic cells before gross morphological changes become visible. The phospholipid-binding protein Annexin V has a high affinity for phosphatidylserine and serves as a very specific marker for apoptotic cells. In the current study, CsA-induced Annexin V reactive cells increased dosedependently, at all time points, in parallel with chromatin changes and DNA degradation.

Annexin V staining, chromatin condensation and fragmentation and the TUNEL assay have also a certain potential to give positive results with necrotic cells (Gold *et al.* 1994, Vermes *et al.* 1995). By means of ultrastructural investigation with TEM we could exclude the possibility of necrosis at 4 hours after CsA treatment at all concentrations. Exclusion of necrosis can also be supported by the determination of LDH activity in the cell culture supernatant, proof of the integrity of the outer cell membrane, a typical criteria for necrotic cell death. The results obtained from the parameters of apoptosis applied after 4 hours can therefore be considered to be highly specific for the induction of apoptosis.

There is no general mechanism for the induction of apoptosis; induced by different mediators, it may occur by different mechanisms. Mitochondria, however, are thought to play a central role in the activation of apoptosis, induced by multiple agents, by a mechanism that involves breakdown of mitochondrial membrane potential and release of cytochrome c and its binding to a multiprotein complex that activates caspase-3 (Pan *et al.* 1998).

Our data strongly suggest that CsA induces apoptosis by decreasing mitochondrial membrane potential, which is followed by MPT as determined by cytochrome c release from the mitochondria. This finding is in conflict with the current literature. CsA has been described by many authors as a very specific inhibitor of mitochondrial membrane potential and permeability transition in isolated mitochondrial fractions and in isolated hepatocytes (Lemasters *et al.* 1998), when incubated for 1 hour at concentrations in the nanomolar range. Under our experimental conditions, we found a rapid loss of mitochondrial membrane potential 1 hour after CsA treatment at 1 μ M. After 1 hour of incubation with 50 μ M CsA, mitochondrial membrane potential decreased to 50 % of that of control cells. CsA-mediated MPT was observed after 4 hours, and

significantly increased apoptosis was found after 4 hours at concentrations of 10 μ M. The difference in our data to those of other investigators might be explained by the different CsA concentrations used and differences in the treatment periods. CsA can serve as a specific inhibitor at low concentrations and after short-term exposure, but not after longer treatment with high concentrations.

CsA-induced MPT can have several consequences. One consequence is the release of apoptosis-inducing factors (AIF), which could be the cause of the increase in phosphatidylserine observed in the outer leaflet of the cytoplasmic membrane, possibly by decreasing flippase activities or inhibiting inactivated phosphatidylserine translocases. Among others, cytochrome c may serve by itself as an AIF, which, once it has been released from the mitochondria, can activate the caspase cascade. Caspases are important effector molecules, which trigger the biochemical events in apoptosis and ultimately execute apoptotic cell death. The caspases are probably the most important effector molecules in the apoptotic process. In general, caspases are present as inactive proenzymes that are activated by specific proteases, in some cases by autocatalysis (Guerrero and Arias 1998). Caspases are organized in enzymatic cascades so that several upstream caspases are able to activate downstream caspases. The presence of a protease cascade has been suggested by the sequential appearance of proteolytic activity cleaving fluorescent YVAD and DEVD substrates (Enari *et al.* 1996). In our study, the participation of caspase-3 in the induction of CsA-induced apoptosis can, at this time, be concluded only indirectly. In our experiments, we observed a dose-dependent increase in caspase-3 activity after an incubation of 20 hours with CsA, but not after 4 hours, although apoptosis has also been clearly shown at this time point. This result principally demonstrates that caspase-3 might be involved in the induction of CsA-induced apoptosis after 20 hours. In comparison to this, the specific caspase-3 blocker, Ac-DEVD-CHO was able to inhibit CsA-induced chromatin condensation and fragmentation already after 4 hours, which indicates that caspase-3 might be involved in the early apoptotic steps. As well as the possible time-specific action of caspase-3, it also seems possible that the activity of caspase-3 is not visible or is hidden after

4 hours in the case of CsA. Under the same conditions, the cyclosporin derivative, IMM 125, an inducer of apoptosis which is twice as strong as CsA, significantly increased caspase-3 activity after 4 hours (paper in preparation). The differences in the CsA-induced, caspase-3 activity dose-response curve and the chromatin condensation/fragmentation dose-response curves might be due to analytical reasons. While the natural substrate of caspase-3 is poly-ADP-ribose-polymerase (PARP) (Thornberry and Lazebnik 1998, Inayat-Hussain *et al.* 1997), in our analytical test system we used an artificial substrate, Ac-DEVD modified 7-amino-4-methyl coumarin (AMC), which could have a different affinity to the enzyme, and thus be less sensitive. In addition, the strong background noise signal in the analytical assay of caspase-3 activity did not allow the sensitive detection of very small increases in comparison with controls.

Caspase-6 activity was also found to be statistically significantly increased by CsA, but these effects were only minor. Its minor role was also demonstrated by the relatively weak effect of the specific inhibitor, which showed an inhibitory effect on chromatin condensation and fragmentation only after 20 hours at a low magnitude of inhibition.

The results obtained by Ac-DEVD-CHO suggest that necrosis might be in close relation to apoptosis. In our experiments, we also found that the caspase-3 inhibitor not only prevented CsA-induced apoptosis, but also LDH release. Since LDH leakage indicates plasma membrane damage, this is a parameter which, under the given conditions, could serve to determine necrosis. Results obtained by TEM would support such an assumption, especially under *in vitro* conditions. Some apoptotic cells with necrotic properties were seen. Within tissue, apoptotic bodies usually undergo rapid phagocytosis. However, in cell cultures, such bodies can undergo spontaneous degeneration with swelling and membrane rupture (Eanshaw 1995). The necrosis observed in the cultures in the present study could partly be "secondary necrosis" of apoptotic bodies (Eanshaw 1995). It seems possible that transition from apoptosis into necrosis may also occur *in vivo*.

Our results suggest that the mechanism of CsA-induced apoptosis proceeds from disruption of mitochondrial membrane potential to

destruction of the mitochondrial membrane, resulting in cytochrome c release into the cytosol. This results in an activation of caspases, especially caspase-3, and, to a less extent, caspase-6. As a consequence, DNA is attacked, as observed by condensation and fragmentation of chromatin.

Although Ac-DEVD-CHO and Ac-VEID-CHO inhibited CsA-induced chromatin condensation and fragmentation, the blockage of apoptosis was, in all cases, not complete. In our experiment, we used inhibitor concentrations which were supposed to be specific according to the current literature (Inayat-Hussain *et al.* 1997). Thus, it can be assumed, that the concentrations to achieve full inhibitory action were sufficient to demonstrate the involvement of both of these enzymes. That we did not succeed in total inhibition may indicate that not only caspases are involved in the process of CsA-induced apoptosis, but also other mechanisms.

We cannot exclude that there exist other mechanisms, parallel with the activation of caspases, which result in CsA-induced apoptosis. It is also possible that intracellular calcium plays a role in this complex mechanism. This would be consistent with the hypothesis of Jewell *et al.* (Jewell *et al.* 1982), who postulated that morphological changes in the plasma membrane are associated with disturbances in intracellular calcium homeostasis. It is known that an increase in intracellular calcium concentration may directly cause toxicity. Free calcium can serve as a mediator of cytotoxicity by means of activating catabolic pathways by which important cellular macromolecules such as proteins, lipids and nucleic acids are degraded (Orrenius 1993, Richter and Kass 1991). Activation of Ca^{2+} -dependent endonucleases could lead to the typical apoptotic DNA ladder pattern (Guerrero and Arias 1998). Although inhibition of CsA-mediated Ca^{2+} efflux from mitochondria has been described by Richter *et al.* and several other authors (Richter and Kass 1991, Nicchitta *et al.* 1985, Kehrer *et al.* 1993), there is good evidence that the uptake of extracellular Ca^{2+} is enhanced by CsA in intact hepatocytes (Ellouk-Achard *et al.* 1997), in other cell types, and also in liposomal fractions (Wolf *et al.* 1997, Meyer-Lehnert and Schrier 1989,

Lo Russo *et al.* 1996) Reactive oxygen species (ROS) are also supposed to be inducers of apoptosis in various in vitro cellular systems (Jabs 1999), and in agreement with this, inhibition of apoptotic cell death has been observed with antioxidants (Jabs 1999). Under certain circumstances, ROS might serve to trigger the increase in intracellular Ca^{2+} concentrations, and, by this process, leading to the induction of apoptosis (Orrenius 1993); a mechanism different from that with caspases. We have also recently found that CsA induced the formation of ROS, which makes the assumption of such a mechanism very likely (Wolf *et al.* 1997).

In summary, the present results showed that, in rat hepatocyte primary cultures, CsA specifically induced apoptosis after short-term incubation; this overlapped with necrosis after longer-term incubation. It is likely that the necrosis which occurs after 20 hours is, partially, a secondary result of apoptosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank B. Greiner and M. Gianella for their excellent technical assistance, and Dr. W. Seewald from Aicos, Basel, Switzerland, for performing the various statistical analyses.

REFERENCES

- (1) ADVANI R., SABA M. S., TALLMAN M. S., ROWE J. M., WIERNIK P. H., RAMEK J., DUGAN K., LUM B., VILLENA J., DAVIS E., PAIETTA E., LITCHMAN M., SIKIC B. I., GREEBERG P. L. (1999). Treatment of refractory and relapsed acute myelogenous leukemia with combination chemotherapy plus the multidrug resistance modulator PSC 833 (Valspodar). *Blood* 93, 787-795
- (2) BOELSTERLI U. A., WOLF A., GÖLDLIN C. (1993). Oxygen free radical production mediated by cocaine and its ethanol-derived metabolite, cocaethylene, in rat hepatocytes. *Hepatology* 18, 1154-61.
- (3) BRADFORD M. A. (1976). Rapid and sensitive method for the quantification of microgram amounts of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72, 248-254.

- (4) BUTTKE T. M., SANDSTROM P. A. (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today*, 15, 7-10.
- (5) CHEVILLE N. F. (1994). *Ultrastructural Pathology; An Introduction to Interpretation*. pp. 51-123. Iowa State University Press, Iowa.
- (6) DONATSCH P., MASON J., RICHARDSON B. P., RYFFEL B. (1992). Toxicological evaluation of the new cyclosporin derivative, SDZ IMM-125, in a comparative, subchronic toxicity study in rats. *Transplant. Proceed.* 24(4suppl2), 39-42.
- (7) DUNNETT C. W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*; 20:482-491.
- (8) EANSHAW W. C. (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biol.* 7, 337-343.
- (9) ELLOUK-ACHARD S., MARTIN C., PHAM-HUY C., DUC T. H., THEVENIN M., DUTERTRE-CATELLA P., WARNET J.-M. ET AL. (1997). Implication of Cyp 3A in the toxicity of cyclosporin G (CsG), cyclosporin A (CsA) and FK506 on rat hepatocytes in primary culture. *Arch. Toxicol.* 71, 437-442.
- (10) ENARI M., TALANIAN R. V., WONG W. W., NAGATA S. (1996). Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* 380, 723-726.
- (11) FAWTHROP D. J., BOOBIS A. P., DAVIES D. S. (1991). Mechanisms of Cell Death. *Arch. Toxicol.* 65, 437-444.
- (12) GAVRIELI Y., SHERMAN Y., BEN SASSON S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119, 493-501.
- (13) GOLD R., SCHIED M., GIEGERICH G., BREITSCHOPF H., HARTUNG H. P., TOYKA K. V., LASSMANN H. (1994). Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab. Investigat.* 71, 219-225.
- (14) GUERRERO A., ARIAS J.M. (1998). Apoptosis. In *Cell Physiology Source Book Section IX Cell Division and programmed cell death* (N. Sperelakis Ed.) Academic Press, San Diego, London.
- (15) HAYTER A. J. (1989). Pairwise comparisons of generally correlated means. *J. Am. Stat. Assoc.* 84, 208-213.
- (16) HEALY E., DEMPSEY M., LALLY C., RYAN M. P. (1998). Apoptosis and necrosis: mechanisms of cell death induced by cyclosporine A in a renal proximal tubular cell line. *Kidney Internat.* 54, 1955-1966

- (17) HUSS R., HOY C. A., OTTINGER H., GROSSE-WILDE H., DEEG H. J. (1995). Cyclosporine-induced apoptosis in CD4⁺ T lymphocytes and computer-simulated analysis: modeling a treatment scenario for HIV infection. *Res. Immunol.* 146, 101-108.
- (18) INAYAT-HUSSAIN S. H., COUET C., COHEN G. M., CAIN K. (1997). Processing/activation of CPP32-like proteases is involved in transforming growth factor β 1-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 25, 1516-1526.
- (19) ITO C., RIBEIRO R. C., BEHM F. G., RAIMONDI S. C., PUI C.-H., CAMPANA D. (1998). Cyclosporin A induces apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 91, 1001-1007.
- (20) JABS T. (1999). Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem. Pharmacol.* 57, 231-245.
- (21) JEWELL S. A., BELLOMO G., THOR H., ORRENIUS S., SMITH M. T. (1982). Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium homeostasis. *Science* 217, 1257-1259.
- (22) KAHAN B. D. (1993). Cyclosporine: the base for immunosuppressive therapy - present and future, *Transplant. Proceed.* 25, 508-510.
- (23) KEHRER J. P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Rev. Toxicol.* 23, 21-48.
- (24) KIEFER J., CORDIER A., THOMAS H., WOLF A., SCHRAMM U. (1997). Cyclosporine-induced cholestatic mechanisms in isolated rat hepatocyte couplets. *8th North American ISSX Meeting*, October 26-30 Head Island USA, Presentation.
- (25) KRUMAN I. I., MATTSON M. P. (1999). Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J. Neurochem.* 72, 529-540.
- (26) LAEMMLI U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-688.
- (27) LEMASTERS J. J. (1998A). The mitochondrial permeability transition: from biochemical curiosity to pathophysiological mechanism. *Gastroenterol.* 115, 783-786.
- (28) LEMASTERS J. J., NIEMINEN A.-L., QIAN T., TROST L. C., ELMORE S., NISHIMURA Y., CROWE R. A. ET AL. (1998B). The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 177-196.

- (29) LIESER M. J., PARK J., NATORI S., JONES B. A., BRONK S. F., GORES G. J. (1998). Cholestasis confers resistance to the mitochondrial permeability transition. *Gastroenterol.* 115, 693-701.
- (30) LILLIE R. D., FULLMER H. M. (1976). *Histopathological techniques and practical histochemistry*. Ed. 4, McGraw-Hill, New York.
- (31) LO RUSSO A., PASSAQUIN A. C., ANDRÉ P., SKUTELLA M., RÜEGG U. T. (1996). Effect of cyclosporin A and analogues on cytosolic calcium and vasoconstriction: possible lack of relationship to immunosuppressive activity. *Brit. J. Pharmacol.* 118, 885-892
- (32) MARTIN S. J., REUTELINGSPERGER C. P. M., MCGAHON A. J., RADER J. A., SCHIE R. C. A. A. VAN, LAFACE D. M., GREEN D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* 182, 1545-1556.
- (33) MENTHA G., HOUSSIN D. (1986). La ciclosporine: Un immunosuppresseur selectif en hematology. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 10, 641-647.
- (34) MEYER-LEHNERT H., SCHRIER R. W. (1989). Potential mechanism of cyclosporine A-induced vascular smooth muscle contraction. *Hypertension* 13, 352-360.
- (35) MILLER T. E., BEAUSANG L. A., MENEGHINI M., LIDGARD G. (1993). Cell death and nuclear matrix proteins, in Apoptosis II: The molecular basis of apoptosis in disease. *Curr. Commun. in Cell. Mol. Biol.* 8, 357-376.
- (36) MOSIENIAK G., FIGIEL I., KAMINSKA B. (1997). Cyclosporin A, an immunosuppressive drug, induces programmed cell death in rat C6 glioma cells by a mechanism that involves the AP-1 transcription factor. *J. of Neurochem.* 68, 1142-1149.
- (37) NICCHITTA C. V., KAMOUN M., WILLIAMSON J. R. (1985). Cyclosporine augments receptor-mediated cellular Ca²⁺ fluxes in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 260, 13613-13618.
- (38) NICHOLSON D. W., ALI A., THORNBERRY N. A., VAILLANCOURT J. P., DING C. K., GALLANT M., GAREAU Y., GRIFFIN P. R. ET AL. (1995). Identification and inhibition of the ICE / CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37-43.
- (39) ORRENIUS S. (1993). Mechanisms of oxidative cell damage. In *Free radicals: From Basic Science to Medicine* (G. Poli, E. Albano, M. U. Dianzani, Eds.) pp. 47-64 Birkhäuser Verlag, Basel.

- (40) PAN G., HUMKE E. W., DIXIT V. M. (1998). Activation of caspases triggered by cytochrome c in vitro. *FEBS Letters* 426, 151-154
- (41) PEASE D.C. (1984). *Histological techniques for electron microscopy*. Academic Press, New York.
- (42) PHILLIPS M. J, POUCELL S., PATTERSON J., VALENCIA P. (1987). *The Liver; An Atlas and Text of Ultrastructural Pathology*. pp. 1-35. Raven Press, New York.
- (43) QIAN T., NIEMINEN A.-L., HERMAN B., LEMASTERS J. J. (1997). Role of pH_i and Na⁺ in reperfusion injury to rat hepatocytes: protection by cyclosporin A and glycine. *Am. J. Physiol.* 273, C1783-C1792.
- (44) RHODIN A. G. (1974). *An Atlas of Histology*. pp. 331-346. Oxford University Press, New York.
- (45) RICHTER C., KASS G. E. N. (1991). Oxidative stress in mitochondria: its relationship to cellular Ca²⁺ homeostasis, cell death, proliferation and differentiation. *Chem.-Biol. Interact.* 77, 1-23.
- (46) RODRÍGUEZ I., MATSURA K., ODY C., NAGATA S., VASSALLI P. (1996). Systemic injection of a tripeptide inhibits the intracellular activation of CPP32-like proteases in vivo and fully protects mice against Fas-mediated fulminant liver destruction and death. *J. Exp. Med.* 184, 2067-2072.
- (47) ROMAN I. D., RODRÍGUEZ-HENCHE N., FURYO J. A., ZUECO J. A., MENOR C., PRIETO J. C., GUIJARRO L. G. (1998). Cyclosporin A induces apoptosis in rat hepatocytes in culture. *Arch. Toxicol.* 72, 559-565.
- (48) RUSH D. N. (1991). Cyclosporine toxicity to organs other than the kidney. *Clin. Biochem.* 24, 101-105.
- (49) SAIAGH S., FABIEN N., AUGER C., MONIER J.-C. (1994). Induction of apoptosis in mouse thymocytes by cyclosporin A: in vivo study. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 16, 359-388.
- (50) SCHADE R. R., GUGLIELMI A., VAN THIEL D. H., THOMSON M. E., WARTY V., GRIFFITH B., SANGHVI A. ET AL. (1983). Cholestasis in heart transplant recipients treated with cyclosporine, *Transplant. Proceed.* 25, 2757-2760.
- (51) SIDAK Z. (1967). Rectangular confidence regions for the means of multivariate normal distributions. *J. Am. Stat. Assoc.* 62, 626-633.
- (52) SORESI M, SPARACION V., PISCIOTTA G., BONFISSUTO G., CAPUTA F., CARROCCIO A., CALABRESE S., MONTALTO G. (1995). Effects of cyclosporine A on various indices of cholestasis in kidney transplant recipient. *Minerva Urology Nephrology* 47, 65-69.

- (53) TANG D. G., LI L., ZHU Z., JOSHI B. (1998). Apoptosis in the absence of cytochrome c, accumulation in the cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242, 380-384.
- (54) THOMAS S. E., ANDOH T. F., PICHLER R. H., SHANKLAND S. J., COUSER W. G., BENNETT W. M., JOHNSON R. J. (1998). Accelerated apoptosis characterizes cyclosporine-associated intestinal fibrosis. *Kidney Internat.* 53, 897-908.
- (55) THORNBERRY N.A., LAZEBNIK Y. (1998). Caspases: Enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- (56) TRENDELENBURG C. F. (1995). Oxidativer Stress als Mechanismus der Cyclosporin A-Toxizität in Rattenhepatozyten Primärkulturen. Dissertation D386, Fachbereich Chemie, Universität Kaiserslautern.
- (57) VERMES I., HAANEN C., STEFFENS-NAKKEN H., REUTELINGSPERGER C. (1995). A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein-labelled Annexin V. *J. of Immunol. Meth.* 184, 39-51.
- (58) WEDLER A. A., ACOSTA D. (1994). Membrane integrity and function. In: *Methods in Toxicology* (C. A. Tyson, J. M. Frazier, Eds.) Volume 1. Part B. pp. 46-49. Academic Press, San Diego.
- (59) WITKAMP (1995). Efficacy and tolerability of multi-dose SDZ IMM 125 in patients with severe psoriasis. *Brit. J. Dermatol.* 133, 95-103.
- (60) WOLF A., BROADHURST M. (1992). Cyclosporin A (Sandimmun[®]) induces the formation of free reactive oxygen species in vitro in rat liver and kidney microsomes. In: *Oxygen Radicals*. (K. Yagi, M. Kondo, E. Niki, T. Yoshikawa, Ed.), pp. 525-528. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam.
- (61) WOLF A., DONATSCH P. (1990). Cyclosporin A-dependent induction of lipid peroxidation in rat liver and kidney, *Free Radic. Biol. Med.* 9, 123.
- (62) WOLF A., SCHRAMM U., FAHR A., AICHER L., CORDIER A., TROMMER W. E., FRICKER G. (1998). Hepatocellular effects of cyclosporine A and its derivative SDZ IMM 125 in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284, 817-825.
- (63) WOLF A., TRENDELENBURG C.-F., DIEZ-FERNANDEZ C., PRIETO P., CORDIER A. (1994) Role of glutathione in cyclosporine A in vitro hepatotoxicity. *Transplant. Proceed.* 26, 2912-2914.
- (64) WOLF A., TRENDELENBURG C.-F., DIEZ-FERNANDEZ C., PRIETO P., HOUY S., TROMMER W. E., CORDIER A. (1997). Cyclosporine A-induced oxidative stress in rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280, 1328-1334.

- (65) WU E. Y., SMITH M. T., BELLOMO G., DI MONTE D. (1990). Relationships between the mitochondrial transmembrane potential, ATP concentration, and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 282, 358-362.
- (66) WYLLIE A. H., KERR J. F. R., CURRIE A. R. (1980). Cell death: The significance of apoptosis. *Internat. Rev. Cytol.* 68, 251-306.

ABBREVIATIONS

Ac	Acetate
AMC	7-amino-4-methyl coumarin
[Ca ²⁺] _i	Intracellular calcium
CHO	Aldehyde
CPP 32	Caspase-3
CsA	Cyclosporine A
DEVD	Asp-Glu-Val-Asp
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermal growth factor
ICE	Interleukin-1 β -converting enzyme, caspase-1
LDH	Lactate dehydrogenase
Mch 2	Caspase-6
MPT	Mitochondrial permeability transition
MW	Molecular weight
NBT/BCIP	Nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
PARP	Polyadenosylribosepolymerase
PBS	Phosphate buffered saline
RER	Rough endoplasmic reticulum
ROS	Reactive oxygen species
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SER	Smooth endoplasmatic reticulum

TEM	Transmission electron microscopy
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
VEID	Val-Glu-Ile-Asp
WME	William's medium E
YVAD	Tyr-Val-Ala-Asp

Footnotes

- ¹ Primaria; Falcon, Switzerland
- ² Gibco, BRL Life Technologies AG, Switzerland
- ³ Novartis, Switzerland
- ⁴ Merck, Switzerland
- ⁵ Biomed, USA
- ⁶ Calbiochem, Switzerland
- ⁷ Roche, Switzerland
- ⁸ Elite Kit Vector; Vector, USA
- ⁹ Biomed, USA
- ¹⁰ Complete; Roche, Switzerland
- ¹¹ Bachem, Bubendorf, Switzerland
- ¹² Molecular Probes, Netherlands
- ¹³ Bio-Rad, Switzerland
- ¹⁴ 7H8.2C12; Pharmingen, USA

La Difusión en la reacción Antígeno – Anticuerpo*

PEREA FALOMIR, M.; PEREZ PLA, F.; MORENO FRIGOLS, J.L.
*Departamento Química Física. Facultades de Farmacia y Química
de Valencia.*
*Servicio de Radioisótopos. Hospital Clínico Universitario de
Valencia*

RESUMEN

En trabajos realizados anteriormente se ha observado indicios sobre la importancia de la difusión molecular en la reacción antígeno-anticuerpo. Para el tratamiento de los resultados se utilizaron exclusivamente ajustes polinómicos, los cuales tienen la ventaja de su sencillez y generalidad, pero son poco informativos en cuanto a las características inherentes al proceso.

En el presente trabajo se partió de los resultados obtenidos en varias series de experiencias tendentes al estudio de la cinética de distintas reacciones antígeno anticuerpo. En la mayor parte de ellas, se utilizaron antígenos marcados con I^{125} y en algunos casos, anticuerpos con este mismo radionúclido. En todos los casos se siguió el curso de la reacción midiendo la radiactividad del inmunocomplejo Ag-Ac formado a diferentes tiempos, directamente proporcional a su concentración, por lo que los datos de partida son siempre tablas: Actividad, en cuentas por minuto (CPM), representada por A, frente al tiempo (t) en minutos.

Los resultados obtenidos para un total de dieciséis reacciones se analizan utilizando exclusivamente el método integral mediante los modelos de Stenberg y Karlsson, cada uno de los cuales suministra una ecuación de velocidad integrada que ha sido adaptada para aplicarla a los valores disponibles. Se encuentra control por difusión en un elevado tanto por ciento de los casos estudiados.

* Conferencia pronunciada por el Dr. José Luis Moreno Frigols en la sesión científica celebrada el 14 de enero de 1999

Palabras clave: Difusión.- Antígeno.- Anticuerpo.

SUMMARY

Diffusion in the antigen - antibody reaction

In previous works some indications about the importance of molecular diffusion in the antigen-antibody reaction have been reported. Polynomic plots were used for the analysis of the results; They have the advantage of being simple, but the drawback of not giving very much information concerning the characteristics of the process.

In this work the results obtained in several series of kinetics of antigen-antibody experiences were used. In most of them the antigen was labelled with I^{125} and in some cases it was the antibody, with the same radionuclide. In all cases the reaction was followed by measuring the radioactivity of the Ag-Ab immunocomplex produced in different times. This signal is directly proportional to the concentration, so the original data are presented as Activity (represented by A) in CPM vs time (t) in minutes.

The results obtained for sixteen reactions were analyzed using exclusively the integral method by means of both Stenberg and Karlsson models. Each one gives an integrated velocity equation that was adapted in order to be applied to the data. A Diffusion control was found in a high percentage of the studied cases.

Keywords: Diffusion.- Antigen.- Antibody.

INTRODUCCIÓN

Técnicas inmunoanalíticas: Radioinmunoanálisis (RIA)

En el terreno bioquímico-fisiológico es frecuente la existencia de sustancias cuyas concentraciones en los fluidos biológicos son demasiado bajas para ser detectadas por los métodos espectrofotométricos. Además, muchas de ellas se encuentran mezcladas con otras de estructura muy semejante, por lo que su determinación analítica suponía un doble reto, ya que se necesitaba una técnica de gran sensibilidad y especificidad. En los años 60 Yallow y Berson resolvieron el problema poniendo a punto, para la valoración de la insulina, un método que combina la capacidad de la radioquímica para la detección de cantidades muy pequeñas, con la cualidad de distinguir selectivamente entre compuestos muy parecidos, característica de las reacciones antígeno-anticuerpo.

Acudamos a las fuentes: “El principio del radioinmunoanálisis se expresa por reacciones competitivas. El antígeno no marcado, presente en la muestra problema, compite frente el antígeno marcado (“trazador”), por unirse al anticuerpo y, por tanto, disminuye el enlace de antígeno marcado. El grado de inhibición competitiva observado en la muestra problema se compara con el obtenido en disoluciones patrón para la determinación de antígeno en los problemas. El radioinmunoanálisis fue originalmente usado para la medida de insulina plasmática y, desde entonces, ha sido aplicado a muchas otras hormonas peptídicas y otras sustancias.

La extensión del principio del radioinmunoanálisis a sistemas no inmunológicos y no hormonales puede ser expresado por el más general término “radioanálisis competitivo”, aunque dicho término no es completamente satisfactorio, puesto que el principio es aplicable al uso de “marcadores” distintos de los trazadores radioisotópicos, aunque solamente los últimos han sido empleados hasta ahora. Herbert y otros demostraron la aplicabilidad del radioanálisis competitivo a la medida de la vitamina B12 en homogeneizados de hígado, usando factor intrínseco como reactor específico, y Rothenberger, en nuestro laboratorio, y Barakat y Ekins en Londres, desarrollaron métodos analíticos para la vitamina B12 sérica, usando el mismo principio. Rothenberger, más tarde, midió ácido fólico usando fólico reductasa como reactor específico. Ekins ha determinado tiroxina y Murphy, en Montreal, tiroxina y hormonas esteroides, usando el enlace específico a proteínas plasmáticas como reactores específicos. Una más reciente aplicación ha tenido lugar en la detección y medida de RNA mensajero específico, usando DNA de secuencias complementarias como reactor específico. La reacción de RNA con DNA sirve como contrapartida de la reacción antígeno-anticuerpo”.

Hasta aquí, la cita literal de un artículo (28) en el que los propios autores, galardonados posteriormente con el Premio Nobel, exponen el espíritu de la técnica desarrollada por ellos .

Análisis inmunoradiométrico (IRMA)

“Con objeto de mejorar los métodos de análisis con respecto a la sensibilidad y precisión, es necesario considerar algunas características generales de los procedimientos analíticos que optimizan estas cualidades. La mayor parte de las técnicas incluyen la conversión de la sustancia problema en un producto que pueda ser observado directamente. Para la máxima sensibilidad se requieren dos condiciones. En primer lugar, una máxima conversión molar de problema en producto (la sensibilidad puede aumentarse por procedimientos cíclicos que den como resultado la conversión de una molécula de problema en varias moléculas de producto). En segundo lugar, la propiedad ensayada debe ser detectable con gran sensibilidad. Considerado a la luz de otros procedimientos analíticos, el radioinmunoanálisis es muy peculiar, ya que proporciona un método indirecto de medida del analito, convirtiéndolo, parcialmente en un complejo antígeno-anticuerpo. La cantidad de este complejo es estimada indirectamente por su efecto en reducir la cantidad de complejo formado entre el antígeno marcado, y el anticuerpo. Este procedimiento presenta algunas desventajas teóricas y prácticas:

1. Las hormonas polipeptídicas marcadas han de ser alteradas más o menos severamente para introducir el trazador.

2. Una proporción variable, y a menudo grande, del problema queda sin reaccionar, lo cual reduce la sensibilidad.

3. Para obtener competición entre hormona marcada y no marcada en radioinmunoanálisis, la concentración de anticuerpo es reducida hasta que es solamente suficiente para unir, en ausencia de hormona no marcada, aproximadamente la mitad de la hormona marcada presente. Esto tiene dos importantes implicaciones:

Los cambios en la hormona no marcada se observan frente a un alto fondo de radiactividad.

La concentración de anticuerpo debe ser reducida a un nivel inferior a la del antígeno. Por lo tanto, a no ser que el anticuerpo tenga una muy alta afinidad, el equilibrio de la reacción antígeno-anticuerpo impedirá que se alcance una sensibilidad grande.

4. Las gráficas de calibración en radioinmunoanálisis no son lineales con respecto al efecto de la concentración de antígeno frente a la radiactividad, sino que, más frecuentemente, muestran una relación lineal entre el logaritmo de la concentración y la radiactividad. Esto limita la precisión con que pueden medirse pequeños cambios porcentuales en la concentración de antígeno.

Teóricamente, la mejor vía para el uso de anticuerpos en el análisis de antígenos, es conseguir que el anticuerpo convierta todo el antígeno en un producto detectable, que pueda medirse directamente. Debe ser posible medir cantidades muy pequeñas de complejo antígeno-anticuerpo, si el anticuerpo estuviera marcado, pero sólo si es posible separar el complejo del anticuerpo libre”.

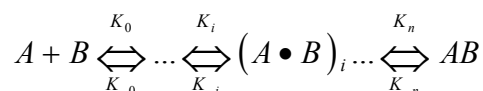
Las consideraciones anteriores, debidas a Miles y Hales (9), representan una evidente crítica del radioinmunoanálisis y suponen el punto de arranque de la modificación conocida como análisis inmunoradiométrico (IRMA). En ella se hace reaccionar el antígeno presente en la muestra con un anticuerpo marcado, y se mide la radiactividad del complejo antígeno-anticuerpo, que, lógicamente, aumenta con la concentración de antígeno. Como puede verse, la diferencia fundamental entre RIA e IRMA consiste en que el trazador radiactivo es el antígeno en el primero y el anticuerpo en el segundo. La separación de anticuerpo libre y ligado al antígeno suele realizarse por adsorción del complejo sobre una fase sólida y lavado de la fracción libre.

Las técnicas radioinmunoanalíticas han gozado de una amplia difusión en las últimas décadas, aún con los condicionamientos inherentes a la utilización de radiactividad, que limita su utilización a laboratorios autorizados. Por otra parte, se ha querido ver en ellas un componente de peligrosidad más teórico que real, ya que las actividades utilizadas son bajísimas.

Cinética de la reacción antígeno-anticuerpo

La interacción Ag-Ac se conoce como una reacción bimolecular específica y muy rápida, lo que hace pensar en un posible control por difusión para la reacción global (11) (19) (24) (26). Además, elevadas

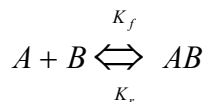
concentraciones de sitio receptor libre provocan una mayor velocidad de reacción del sistema, agotando el sustrato en sus proximidades y obligando posteriormente a los ligandos a difundir distancias macroscópicas hasta alcanzar la vecindad del reactor. Por tanto la interacción Ag Ac puede describirse de acuerdo a la fórmula:



Aquí k_i son las diferentes constantes de velocidad de reacción directa, k_{-i} son las diferentes constantes de velocidad de reacción inversa y AB es el complejo final formado después de n diferentes estados intermedios $(A \bullet B)_i$.

Para reactivos multivalentes A o B, el intermediato $(A \bullet B)_i$ podría representar estados con diferente número de enlaces múltiples.

Un camino para considerar control por difusión es el de identificar el estado intermedio inicial $(A \bullet B)_0$ como complejo de encuentro, el cual, debe formarse antes de que la reacción pueda continuar. En este caso, la constante de velocidad k_0 representa la constante de velocidad de difusión con la cual los dos reactivos son posicionados o estereodirigidos apropiadamente para la reacción. Esto podría conllevar ambas difusiones traslacional y rotacional. Consecutivamente la constante de velocidad k_{-0} representa la constante de difusión inversa con la que puede disociarse el complejo de encuentro. En el esquema de este tipo de reacción las diferentes constantes de velocidad de reacción son probablemente muy diferentes en magnitud. Normalmente ambas constantes de velocidad de reacción global, tanto directa como inversa, están limitadas por una constante de velocidad particular y el esquema de reacción global puede ser simplificado a:



Donde k_f es la constante de velocidad de reacción directa (forward) o de asociación, y K_r es la constante de velocidad de reacción inversa (reverse) o de disociación.

Al considerar los estados intermedios como cuasi estacionarios, se pueden obtener expresiones simplificadas para las constantes de velocidad de reacción global. Este procedimiento para reducir un esquema de reacción complicado ha sido utilizado en muchos estudios, por ejemplo al analizar las uniones bivalentes y también al estudiar las reacciones en superficie celular.

OBJETIVOS

Muchos métodos inmunológicos de rutina están basados en las reacciones inmunoquímicas realizadas en la interfase sólido-líquido, debido principalmente a que los métodos en fase sólida proporcionan modos simples de separación de reactivos libres y unidos. Estos métodos también son conocidos por su sensibilidad y pueden ser utilizados con diferentes técnicas de medida de análisis en superficie.

Las características de sensibilidad y especificidad exigidas a la técnica inmunoanalítica descansan sobre las propiedades cinéticas y de equilibrio inherentes a la reacción antígeno-anticuerpo, sobre las que hemos establecido una línea de investigación que comenzó al observar los resultados obtenidos en el estudio del efecto de la temperatura sobre la velocidad de una de estas reacciones: el clásico ajuste de $\ln k$ vs $1/T$ para la ecuación de Arrhenius daba, en algunos casos, un coeficiente de correlación próximo a cero. : Se trata de reacciones con baja energía de activación en las que la influencia de la temperatura es muy poco marcada, y además es lógico que sea así, ya que el antígeno y el anticuerpo son sustancias destinadas a reaccionar específicamente entre ellas, y por tanto cabe esperar que no presenten grandes exigencias en cuanto a la necesidad de activarse: lo que necesitan es encontrarse. En pocas palabras, es la difusión el fenómeno que controla el proceso. Si estas reacciones están controladas por difusión, el Ag que difunde abriéndose paso a través de las moléculas de disolvente acuoso que se oponen a su movimiento tan sólo tendrá que superar el umbral de energía de flujo viscoso del disolvente, correspondiente a la ecuación de Guzmán. Cuando las moléculas de reactivos se encuentren, su separación estará impedida o dificultada por la “jaula” de moléculas de disolvente que las

rodean, debiendo reaccionar al cabo de un número más o menos grande de colisiones.

En los primeros trabajos realizados se utilizaron exclusivamente ajustes polinómicos para el tratamiento de los resultados (1) (2) (3) (6) (7). Tales ajustes tienen la ventaja de su sencillez y generalidad, pero son poco informativos en cuanto a las características intrínsecas del proceso. En una fase posterior, Perea Falomir (16) ha analizado los resultados mediante dos diferentes modelos no excluyentes descritos en la bibliografía, cada uno de los cuales suministra una ecuación de velocidad integrada que hemos adaptado para aplicarla a ellos. Aunque son más complejos y plantean dificultades de manipulación, resultan ser potentes por el bajo número de parámetros a ajustar y flexibles por llevar incluidas tanto la difusividad como la reactividad, proporcionando una abundante información en el comportamiento de las reacciones caracterizadas por estas variables. Se trata de los modelos de Stenberg y Karlsson (23) (8).

Resumiendo, el objetivo principal es :

La caracterización cinética de algunas reacciones Ag-Ac, en cuanto al control por difusión externa, aplicando diferentes modelos no excluyentes que describan el proceso de unión.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos partido de los resultados obtenidos en varias series de experiencias, en la mayor parte de las cuales se utilizaron antígenos marcados con ^{125}I y en algunos casos, anticuerpos con este mismo radionúclido. El curso de las reacciones se siguió midiendo la radiactividad del inmunocomplejo Ag - Ac formado a diferentes tiempos. De las experiencias antes citadas se han recogido las tablas con pares de valores actividad- tiempo. La variable dependiente, representada por A, es la actividad medida en cuentas por minuto correspondiente a la emisión radiactiva del complejo Ag-Ac, más ciertas cuentas inespecíficas cuya cuantía corresponde a la ordenada en el origen de las curvas directas de optimización, y la independiente es el tiempo medido en minutos. Los modelos de Stenberg y Karlsson fueron programados en su día por Pérez Pla, con la aplicación Borland C++, con el fin de que se dispusiera de una

herramienta de análisis para los datos, asistido por una computadora PC50. Este programa cinético está concebido desde el programa madre (18) que encierra prácticamente todas las técnicas de optimización (15) para el ajuste de cualquier conjunto de datos experimentales a modo de menú para usuarios de Windows, llamado OPKINE.

Las curvas directas son obtenidas a través de técnicas de programación no lineal para el ajuste por el método de los mínimos cuadrados simple utilizando un algoritmo de búsqueda directa como es el de Rosenbrock, y uno de gradiente como es el de DFP para la minimización de la función cuadrática objetivo. Se ha aplicado, además, simulaciones de Monte-Carlo con números aleatorios en el perfil de distribución de probabilidad acumulada, para sintetizar conjuntos ajustados en la consecución del error de cada parámetro (modelización del error).

EL MODELO DE STENBERG

En este estudio la cinética es analizada con especial atención sobre las propiedades específicas de la interfase sólido - líquido. El doctor Manne Stenberg junto con sus colaboradores han desarrollado estos métodos cinéticos de tal manera que han creado escuela en el análisis de interacción molecular sumamente extendida en las investigaciones llevadas a cabo en la Universidad de Uppsala (Suecia) (12) (13) (23) (24) (25)

Ecuaciones de velocidad

El anticuerpo adopta forma de Y con dos brazos en cuyas extremidades se encuentran las regiones hipervariables (Figura 1). Por tanto, cada molécula de IgG (molécula ligante) podrá unir dos moléculas de Ag (ligando en solución). Veamos las ecuaciones de velocidad que caracterizan el mecanismo de reacción:

$$\frac{d\Gamma_1}{dt} = 2k_1c_s(\Gamma_0 - \Gamma_1 - 2\Gamma_2) - \Gamma_1(k_{-1} + k_2) + 2k_{-2}\Gamma_2 \quad (1)$$

$$\frac{d\Gamma_2}{dt} = k_2\Gamma_1 - 2k_{-2}\Gamma_2 \quad (2)$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\nabla^2 c \quad (3)$$

En donde: Γ_0 es la concentración superficial de Ac libre o capacidad de la monocapa, Γ_1 la concentración superficial de anticuerpo simplemente ocupado y Γ_2 la concentración superficial de anticuerpo doblemente ocupado. Hay que tener en cuenta que el receptor inmovilizado o molécula ligante posee dos sitios de unión específicos del anticuerpo, con lo que: $\Gamma_0 - \Gamma_1 - 2\Gamma_2$ será el número de sitios libres.

C_0 es la concentración inicial de ligando antigénico en estadios iniciales y en condiciones distantes a la interfase reactiva. C es la concentración de ligando antigénico libre en cualquier instante de tiempo y C_s es la concentración de antígeno próximo a la interfase sólido-líquido.

ESQUEMA DE REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO.

$$c(r,t) = c_0 - \frac{hR^2 c_0}{r(Rh+1)} \left\{ \operatorname{erfc} \frac{r-R}{2\sqrt{Dt}} - \exp[h'(r-R) + h^2 Dt] \operatorname{erfc} \left[\frac{r-R}{2\sqrt{Dt}} + h'\sqrt{Dt} \right] \right\}$$

$$c(R,t) = \frac{c_0}{1+D_a} \left\{ 1 + D_a \exp \left[\frac{(1+D_a)^2}{R^2} Dt \right] \operatorname{erfc} \left[\frac{(1+D_a)}{R} \sqrt{Dt} \right] \right\} \quad h = \frac{k_f \Gamma_0}{D} \quad h' = \frac{h+1}{R} \quad Rh = D_a$$

Carlslaw & Jaeger: 1959

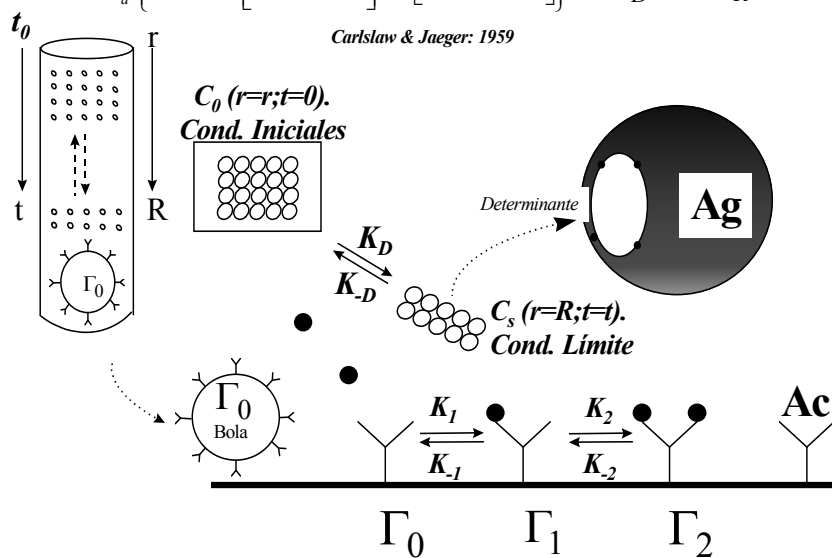


Figura 1

La ecuación (1) caracteriza la formación de complejo monovalente, es decir, para un sitio de unión del ligando, mientras que la ecuación (2) lo hace para la formación de complejo bivalente con dos sitios; k_1 k_2 k_{-1} k_{-2} son, en este orden, las microconstantes de velocidad de reacción directa monovalente, directa bivalente, inversa monovalente e inversa bivalente. Las constantes híbridas dependientes de las microconstantes puras son: k_f y k_r , constantes globales de velocidad de reacción directa e inversa respectivamente. La ecuación (3) no es más que el tratamiento de la difusión por transporte de masa

En los estadios iniciales de la reacción puede aceptarse que:

1. Γ_1 y $\Gamma_2 \ll \Gamma_0$. La capacidad de la monocapa es muy superior a las fracciones de superficie cubierta debida a los complejos mono y bivalente, con lo que la reacción no ha alcanzado todavía el estado de

equilibrio asegurando un grado de avance en la reacción significativo durante el curso del experimento.

2. Para anticuerpos bivalentes (como son los IgG utilizados) y a altas concentraciones receptor, podemos asumir que: $2k_{-2}/k_2 \ll 1$, por tanto k_2 es mucho mayor que el doble de k_{-2} .
2. Con $k_{-1} \approx k_{-2}$ del mismo orden de magnitud, conseguimos una constante de velocidad de reacción inversa: $k_r = 2k_1k_{-2}/k_2$ pequeña, con lo que el par de equilibrios consecutivos se encuentran desplazados hacia la formación de los productos inmunológicos.

Con estas premisas resulta para la constante de velocidad de reacción directa $k_f = 2k_1$. Puede ahora formularse una expresión simplificada para la reacción inicial de enlace omitiendo la disociación:

Si los sitios de unión están localizados en la superficie de una bola o esfera macroscópica de radio R, consideramos un problema de difusión con geometría esférica en concentración dependiente de las coordenadas r y del tiempo t. La ley de difusión de Fick describe la velocidad de transferencia de sustancia en la superficie.

$$\frac{d\Gamma_A}{dt} = D \frac{\partial c}{\partial r} \Big|_{r=R}$$

Con estos condicionamientos se obtiene la ecuación integrada:

$$\Gamma_a = c_0 \sqrt{D\tau} \frac{D_a^3}{(1+D_a)^3} \left[\frac{\bar{t}^*}{D_a} + 2\sqrt{\frac{\bar{t}^*}{\pi}} + \exp(\bar{t}^*) \operatorname{erfc}(\sqrt{\bar{t}^*}) - 1 \right] \quad (4)$$

Multiplicándola por una constante de proporcionalidad α

para convertir la concentración superficial de inmunocomplejos y sumándole una Rb (radiactividad basal), debida a uniones inespecíficas:

$$A = A^{\neq} + Rb = \alpha\Gamma_A + Rb$$

Obtenemos una función adaptada a nuestro propósito que relaciona la radiactividad en cpm debida al inmunocomplejo (A) con el tiempo (t).

Los pares de valores (A,t) están ajustados a la ecuación [79], que llamaremos ecuación completa de Stenberg.

$$A = \alpha \cdot \beta_0 \cdot \left[\beta_2 t + \frac{2}{\sqrt{\pi}} \beta_1 \sqrt{t} + \exp(\beta_1^2 t) \cdot \operatorname{erfc}(\beta_1 \sqrt{t}) - 1 \right] + Rb \quad (5)$$

Donde $\beta_0, \beta_1, \beta_2$ se definen como:

$$\beta_0 = \frac{D_a R C_0}{(D_a + 1)^3} \quad \beta_1 = \frac{D_a + 1}{D_a} \cdot \frac{1}{\sqrt{\tau}} \quad \beta_2 = \frac{\beta_1^2}{D_a}$$

Parámetros de la ecuación completa de Stenberg

La eq. (5) contiene explícita o implícitamente cuatro parámetros que deben ser optimizados por el método de m.m.c.c simple para obtener perfiles teóricos con máxima verosimilitud. Veamos cuáles son:

Número de Damkoehler:

Es la razón entre velocidades máximas de reacción y difusión, con lo que si el cociente es >1 o <1 , será suficiente para describir el grado de control por difusión que existe en la reacción global.

$$D_A = \frac{\left(\frac{d\Gamma_A}{dt}\right)_{\text{Reaccion}_{max}}}{\left(\frac{d\Gamma_A}{dt}\right)_{\text{Difusion}_{max}}} = \frac{k_f \cdot c_s \cdot \Gamma_0}{\frac{DC_0}{R}} \longrightarrow \boxed{D_A = \frac{k_f \cdot \Gamma_0 \cdot R}{D}}$$

Por tanto, es un parámetro adimensional inversamente proporcional al coeficiente de difusión, con lo que bajas difusividades provocarán números altos. A su vez, es directamente proporcional a la capacidad de la monocapa retenida y a la constante de asociación.

Constante de tiempo (TAU):

Tiene unidades de tiempo y es inversamente proporcional al cuadrado de la constante de asociación y de la capacidad de la monocapa.

Es directamente proporcional al coeficiente de difusión de las especies homólogas en el líquido.

$$D_a = \frac{RK_f\Gamma_0}{D} \left\{ \begin{array}{l} K_f\Gamma_0 \\ D \end{array} = \frac{1}{\sqrt{D\tau}} \rightarrow \sqrt{D\tau} = \frac{D}{K_f\Gamma_0} \rightarrow \tau = \frac{D}{(K_f\Gamma_0)^2} \right.$$

$$D_a = \frac{RK_f\Gamma_0}{R} \left\{ \begin{array}{l} K_f\Gamma_0 \\ D \end{array} = \frac{1}{\sqrt{D\tau}} \rightarrow \sqrt{D\tau} = \frac{D}{K_f\Gamma_0} \rightarrow \tau = \frac{D}{(K_f\Gamma_0)^2} \right.$$

Radiactividad basal

Es la actividad residual debida a uniones inespecíficas del trazador. Se exterioriza como la ordenada en el origen a tiempo cero en las representaciones directas A,t.

Concentración inicial aparente:

Este cuarto parámetro ha sido denominado de esta manera porque sus valores optimizados deben seguir una proporcionalidad lineal con las concentraciones relativas de Ag en solución y a cuya pendiente, al igual que ocurre con la ley de Lambert-Beer, denominaremos coeficiente señal-concentración.

$$C'_0 = \alpha C_0 \sqrt{D\tau}$$

↓
Coeficiente $\frac{s}{c} = \alpha \sqrt{D\tau}$

Simplificación de la ecuación de Stenberg

En condiciones de control por difusión el número de Damkoehler tiende a infinito, con lo que desaparece el término lineal de la ecuación (4). Del mismo modo, la razón entre números tenderá a 1, con lo que la

función gamma quedará simplificada a una nueva expresión eq. (6). Sustituyéndola en tiempo real, la eq. (7) permite eliminar la raíz cuadrada de τ , quedando finalmente la eq. (8) correspondiente a la ecuación de una recta.

$$\Gamma_A = C_0 \sqrt{D\tau} \left[2\sqrt{\frac{\bar{t}^*}{\pi}} + \exp(\bar{t}^*) \cdot \operatorname{erfc}(\sqrt{\bar{t}^*}) - 1 \right] \quad (6)$$

$$\Gamma_A = C_0 \sqrt{D\tau} \left[2\sqrt{\frac{t}{\tau\pi}} + \theta - 1 \right] \quad (7)$$

$$\Gamma_A = 2C_0 \sqrt{\frac{D}{\pi}} \sqrt{t} + w \quad (8)$$

La ordenada en el origen en la recta vendrá condicionada por θ . Si expresamos la eq. en función de las actividades (CPM), obtenemos la ecuación simplificada de Stenberg (eq. (9)).

$$A = 2\alpha C_0 \sqrt{\frac{D}{\pi}} \sqrt{t} + (\alpha w + Rb) \quad (9)$$

Ecuación que predice una proporcionalidad lineal entre la actividad y la raíz cuadrada del tiempo en caso de cumplirse un número de Damkoehler tendente a ∞ (condición de control por difusión).

EL MODELO DE KARLSSON

Este modelo (8) fue estudiado para la unión de la Noscapina tritiada (antitusígeno) frente a tejido cerebral homogeneizado de cobaya, cuyos procesos de unión pudieron ser discriminados por sus cinéticas. El método puede encontrar aplicación general para poblaciones de receptor de uno y dos sitios de unión en exceso de ligando.

El análisis de los datos de enlace en equilibrio es muy utilizado a la hora de determinar la actividad de una droga capaz de unirse a una o

varias poblaciones de receptor. Sin embargo, como apuntó Weber (26), la detección de dos sitios de unión con estudios de enlace en equilibrio requiere que el ligando tenga una afinidad diferente para los dos sitios de unión. La magnitud de la razón entre afinidades necesaria para discernir entre ellos depende de la variación experimental y las densidades relativas de los dos sitios receptores

Al caracterizar la cinética de unión ligando-receptor fueron detectadas heterogeneidades, lo que podría indicar la existencia de dos sitios de unión que no aparecieron en los estudios de enlace en equilibrio. Al detectarse a través de los datos iniciales que el enlace podría no estar adscrito a ningún tipo de receptor conocido, se desarrolló una estrategia para la diferenciación de modelos de enlace basado sólo en sus propiedades cinéticas. Para este propósito Motulsky y Mahan (10) desarrollaron un método cinético utilizando ligandos selectivos. Cada uno de estos métodos necesitan algún conocimiento de los sitios de unión, tejidos y ligandos.

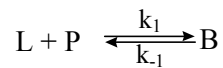
Basándonos solamente en los datos cinéticos este método nos permitirá discriminar entre modelos de unión y estimar los parámetros de enlace. A partir de ensayos de asociación y disociación los datos experimentales pueden ser ajustados simultáneamente a modelos con cinéticas mono o bifásicas con la ayuda de un programa informático específicamente creado en el departamento para la ocasión, y con los mismos métodos de optimización que los aplicados en el proceso de minimización de la función cuadrática objetivo en la función de Stenberg.

La cantidad de ligando asociado a los sitios de unión saturables en el tiempo t ($B_{ass,t}$) depende de las constantes de velocidad de asociación (k_1) y disociación (k_{-1}), así como de la cantidad de ligando libre (L) y la concentración total de sitios de unión (B_{max}), de acuerdo a la eq. (10):

$$B_{ass,t} = \frac{B_{max}}{1 + \frac{k_{-1}}{k_1 \cdot (L)}} \cdot \left[1 - e^{-(k_1 \cdot (L) + k_{-1}) \cdot t} \right] \quad (10)$$

Deducción de la ecuación de Karlsson

Supóngase un ligando o antígeno (L) que reacciona con una proteína o anticuerpo (P), según el siguiente esquema de reacción:



La concentración total de molécula ligante en el estado inicial es la suma:

$$(P)_0 = (P) + (B)$$

La velocidad de formación de los componentes productos puede ser expresada por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{d(B)}{dt} = k_1(P)(L) - k_{-1}(B) = k_1[(P)_0 - (B)](L) - k_{-1}(B)$$

Desarrollando los términos de la ecuación de velocidad, resulta:

$$\frac{d(B)}{dt} = k_1(P)_0(L) - k_1(B)(L) - k_{-1}(B) = -[(k_1(L) + k_{-1})B - k_1(P)_0(L)]$$

$$\frac{d(B)}{(k_1(L) + k_{-1})(B) - k_1(P)_0(L)} = -dt$$

Para obtener la ecuación integrada debe integrarse entre límites definidos:

$$\int_0^{(B)} \frac{(k_1(L) + k_{-1})d(B)}{(k_1(L) + k_{-1})(B) - k_1(P)_0(L)} = -(k_1(L) + k_{-1}) \int_0^t dt$$

$$\ln \frac{(k_1(L) + k_{-1})(B) - k_1(P)_0(L)}{-k_1(P)_0(L)} = -(k_1(L) + k_{-1})t$$

$$(k_1(L) + k_{-1})(B) - k_1(P)_0(L) = -k_1(P)_0(L) \cdot e^{-(k_1(L) + k_{-1})t}$$

Despejando la concentración de molécula ligada al anticuerpo resulta:

$$B = \frac{(P)_0}{1 + \frac{k_{-1}}{k_1(L)}} \left[1 - e^{-(k_1(L) + k_{-1})t} \right] \quad (11)$$

Donde B representa la cantidad de reactivo unido o asociado a tiempo t y (P)₀ como la máxima cantidad ligada que se puede unir al reactivo, es decir, la máxima capacidad de unión.

$$B \equiv B_{ass,t} \quad (P)_0 \equiv B_{max} \quad (12)$$

La eq. (11) es idéntica a la eq. (10) sin más que realizar los cambios enunciados en (12), quedando :

$$B_{ass,t} = \frac{B_{max}}{1 + \frac{k_{-1}}{k_1 \cdot (L)}} \cdot \left[1 - e^{-(k_1 \cdot (L) + k_{-1}) \cdot t} \right] \quad (10)$$

La cual, una vez adaptada a nuestro propósito, se transforma en:

$$Y_{ki} = \alpha 0i + \frac{\alpha}{1 + \frac{\beta}{C}} \cdot \left[1 - e^{-(\gamma + \delta C)t} \right] \quad (13)$$

La cantidad de ligando asociado a los sitios de unión saturables en el tiempo t (B_{ass,t}) depende de las constantes de velocidad de asociación (k₁)

y disociación (k_{-1}), así como de la cantidad de ligando libre (L) y la concentración total de sitios de unión (B_{\max}), de acuerdo a la eq. (10).

En el tratamiento matemático realizado se ha supuesto despreciable la constante de reacción inversa $[\gamma]$, lo cual equivale a considerar la reacción global como prácticamente irreversible calculándose la constante de velocidad de asociación $[\delta]$. Hay que tener en cuenta que δ no es igual a la constante de velocidad k_1 , sino que es directamente proporcional a ella, ya que la concentración expresada en unidades relativas (c) se relaciona con la concentración en $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ [L] por la expresión: $c = \theta[L]$, con lo que resulta: $k_1[L] = \delta c = \delta\theta[L]$, de donde $k_1 = \theta\delta$.

A su vez, la irreversibilidad supuesta autoriza a despreciar igualmente el cociente β/C , ya que el parámetro β es directamente proporcional a k_{-1}/k_1 , siendo este último término igual a la constante de equilibrio de la reacción inversa, que por la mencionada hipótesis puede considerarse muy pequeña. En cálculos de optimización no incluidos aquí hemos intentado obtener valores de β que nos proporcionaran información sobre la reacción inversa, pero los valores obtenidos fueron muy poco consistentes en cuanto a su relación con la temperatura, por lo que consideramos preferible realizar la aproximación de β tendente a cero.

Parámetros del modelo de Karlsson

Con estas aproximaciones la ecuación (13) expresa la actividad ligada (y_{ki}) como función de dos variables (C, t) obteniéndose cuatro parámetros:

Actividad a tiempo cero (α_0).- Teóricamente sería nula ya que la concentración inicial de inmunocomplejo es cero pero en la práctica se obtiene un valor pequeño debido a las uniones inespecíficas.

Concentración total de lugares de unión (α).-Representa la capacidad máxima de enlace del anticuerpo expresada en cpm.

Constante de equilibrio para la asociación (β).- Es el cociente entre las constantes de velocidad de las reacciones directa e inversa.

Constante aparente de velocidad (δ).- Comentada anteriormente

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha estudiado la cinética de las reacciones con sus anticuerpos específicos para la FSH, LH, T3 Insulina (INS), DHEA, Osteocalcina (OSTC), PTH, Enolasa Específica Neuronal (NSE), Tiroglobulina con dos anticuerpos (TG1 y TG2), Antígeno Asociado a Cáncer con dos anticuerpos (CA1 y CA2), Estradiol (Estr), Cortisol (Cortis), Progesterona (Prog) y Testosterona (Test), mediante la aplicación de los modelos teóricos de Karlsson y Stenberg en función de la concentración de reactivos y temperatura

Criterios de control por difusión basados en el modelo de Stenberg

Para considerar que un proceso está controlado por la difusión, no basta con encontrar un ajuste satisfactorio a la ecuación integrada de Stenberg, pues en su deducción se consideran tanto efectos difusivos como reactivos. El parámetro más decisivo y que en principio puede adoptarse como criterio de validación, es el número de Damkoehler. No obstante, cabe la posibilidad de que un ajuste satisfactorio a la ecuación de Stenberg, lo sea solo aparentemente. Al fin al cabo dicha ecuación corresponde a una simple función creciente con perfil de tipo parabólico. Por tanto, se necesitan nuevos criterios que confirmen la calidad del ajuste. En este sentido es útil comprobar la proporcionalidad existente entre la concentración inicial aparente y la concentración inicial. Tal comprobación confirma el buen seguimiento de la ecuación de Stenberg.

Un segundo aspecto a tener en cuenta es que, para números de Damkoehler suficientemente altos, la ecuación de Stenberg se reduce a una forma simplificada, que predice una relación lineal entre Z y la raíz cuadrada del tiempo. Un buen ajuste a dicha ecuación simplificada confirma que nos encontramos en condiciones correspondientes a número

de Damkoehler grande. La pendiente de las gráficas obtenidas en este último caso debe ser proporcional a la concentración inicial.

En caso de comprobarse esta última relación, quedaría definitivamente confirmado el buen seguimiento de la ecuación de Stenberg.

Por tanto, y como resumen de lo anterior, estableceremos los siguientes criterios de posible control por difusión

1. *Ajuste satisfactorio a la ecuación de Stenberg, con valores aceptables de τ*
2. *Números de Damkoehler altos*
3. *Proporcionalidad entre concentración inicial aparente y concentración inicial*
4. *Buen seguimiento de la ecuación de Stenberg simplificada.*
5. *Proporcionalidad entre la pendiente de la gráfica correspondiente a esta última ecuación y la concentración inicial.*
6. *Finalmente, en caso de cumplirse los criterios anteriores es necesario comprobar que la entalpía de activación calculada a partir de la ecuación de Eyring es del orden de magnitud de la energía de flujo viscoso del agua. ($\square H^{\ddagger} < 9000 \text{ cal mol}^{-1}$).*

Debe hacerse notar que las condiciones correspondientes a los criterios 3 y 5 no son independientes entre sí, por lo que hay que hacer especial hincapié en la exigencia de que ambos criterios se cumplan o fallen simultáneamente.

Téngase en cuenta que la concentración inicial aparente procede de ajustes no lineales, de A frente a t, la pendiente de la ecuación simplificada, tiene origen en ajustes lineales de A frente a \sqrt{t} . Por tanto, la concordancia entre ambos, caso de producirse, no puede considerarse casual y refuerza considerablemente la hipótesis.

Criterios de control por difusión basados en el modelo de Karlsson

El modelo no presenta condicionamientos específicos en cuanto a efectos difusivos, pero permite la determinación de la constante de velocidad a distintas temperaturas, posibilitando el cálculo de la energía y entalpía de activación, que, como se indicó al comentar el modelo de Stenberg, debe ser inferior a $9000 \text{ cal mol}^{-1}$

Comparación de ambos modelos

La característica fundamental del modelo de Stenberg es la flexibilidad, ya que considera en principio tanto el fenómeno de la difusión, como el de la reacción propiamente dicha, llegando a una ecuación de velocidad integrada que relaciona la concentración de receptores del anticuerpo ocupados con el tiempo de reacción, a través de cuatro parámetros. El hecho de considerar específicamente la influencia de la difusión y de suministrar un parámetro como el número de Damkohler le hace particularmente informativo y adecuado para su aplicación a nuestro propósito. Su principal inconveniente es que su aplicación se restringe a los estadios iniciales de la reacción, y por tanto no reproduce correctamente los valores en la zona de equilibrio

El modelo de Karlsson resulta genérico y relativamente inespecífico, ya que consiste básicamente en la obtención de una ecuación de velocidad para unas reacciones reversibles, siendo la reacción directa de segundo orden y la inversa de primero. Además en su desarrollo matemático es necesario admitir que el término $k_1[L] + k_{-1} = (\delta[L] + \gamma)$ se mantiene razonablemente constante durante el periodo de reacción, lo cual implica exceso de ligando, condición que habitualmente, (aunque no siempre) se cumple en los sistemas radioinmunoanalíticos. Es en general más flexible (o quizá menos exigente) que el de Stenberg, ajustándose razonablemente bien durante todo el curso de la reacción, incluido el equilibrio.

Como resumen, puede decirse que ambos modelos se complementan.

Influencia de la temperatura en la reacción

Se ha estudiado mediante el ajuste de las constantes de velocidad obtenidas frente a la temperatura a través de las ecuaciones :

$$k = A_f \exp (-E_a / RT) \quad (\text{Arrhenius}) \quad y$$

$$k = B T \exp (-\Delta H^\ddagger / RT) \quad (\text{Eyring}).$$

Los valores de ΔH^\ddagger calculados por ambos modelos se muestran en el Cuadro 1

En las reacciones controladas por difusión la constante de velocidad es inversamente proporcional a la viscosidad del disolvente:

$$k = 8RT/3\eta$$

La viscosidad se relaciona con la temperatura a través de la ecuación de Guzmán :

$$\eta = A \exp (E/RT)$$

Con lo que la dependencia de la constante de velocidad con la temperatura adopta una forma equivalente a la ecuación de Eyring:

$$k = (8R/3A) T \exp (- E/RT)$$

De modo que, comparando términos, resulta que la entalpía de activación coincide con la energía E de flujo viscoso, que en el caso del agua es aproximadamente igual a la mitad de la entalpía de vaporización, por lo que para reacciones en disolución acuosa controladas por difusión, el valor aparente de ΔH^\ddagger debe ser de este mismo orden, por lo que tomaremos un valor de $9000 \text{ cal mol}^{-1}$ como límite máximo

El análisis de los resultados de acuerdo con los criterios expuestos anteriormente se resume en los cuadros 1 y 2

CUADRO 1

	Stenberg			Karlsson		
	Ajuste	$\Delta H^{\bar{}}$	Cont Dif	Ajuste	$\Delta H^{\bar{}}$	Cont Dif
FSH	Malo	36646	NO	Regular	8335	SI
LH	Bueno	8144	SI	Bueno	5889	SI
T3	Malo	-----	NO	Bueno	-----	¿
INS	Bueno	7670	SI	Bueno	7336	SI
DHEA	Bueno	15073	NO	Bueno	6428	SI
OSTC	Bueno	1239	SI	Bueno	3646	SI
PTH*	Malo	97744	NO	Regular	54694	NO
NSE	Malo	18212	NO	Bueno	7715	SI
TG 1	Bueno	-----	¿	Bueno	-----	¿
TG 2	Malo	-----	NO	Malo	-----	NO
CA 1	Malo	9764	NO	Bueno	-606	SI
CA 2	Bueno	4958	SI	Bueno	389	SO
Estr	Aceptable	8770	SI	Aceptable	4504	SI
Cortis	Bueno	-----	¿	Malo	-----	¿
Prog	Bueno	16642	NO	Bueno	8811	SI
Test	Malo	-----	NO	Bueno	-----	¿

* Posible alteración

CUADRO 2

Control Difusión	Stenberg	Karlsson
SI	5 (31,3%)	10 (62,5%)
NO	9 (56,3%)	2 (12,5%)
Dudoso	2 (12,5%)	4 (25,0%)

CONCLUSIÓN GENERAL

A la vista de los cuadros anteriores puede deducirse que los resultados, en un elevado tanto por ciento, confirman la hipótesis en cuanto al control difusivo de la reacción antígeno – anticuerpo.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ANTON FOS, G., MORENO FRIGOLS, J.L., SALABERT SALVADOR, M.T., MUT RONDA, S.Y PEREZ GIMENEZ, F. (1991) "Influencia de la temperatura de incubación y cálculo de parámetros cinéticos de la reacción entre el 125Estradiol y su anticuerpo específico en fase sólida". *Anal. Real Acad. Farm.*, 57:317-326
- (2) ANTON FOS, G. , MORENO FRIGOLS, J.L.. SALABERT SALVADOR, M.T., MUT RONDA ,S. Y PEREZ GIMENEZ, F. (1991) "Estudio de la cinética de reacción entre 125I-Cortisol y su anticuerpo específico en fase sólida." *Anal. Real Acad. Farm.* 57:43-50
- (3) ANTON FOS, G., MORENO FRIGOLS J.L., SALABERT SALVADOR, M.T., MUT RONDA, S Y PEREZ GIMENEZ, F. (1990) "Estudio de la Influencia en la Velocidad de Reacción de la Viscosidad del disolvente en la reacción entre el 125I-Testosterona y su anticuerpo específico en fase sólida". *Industria Farmacéutica - Investigación y Tecnología.*
- (4) ASISH XAVIER, K. AND WILLSON, R. C. (1998) "Association and Dissociation Kinetics of Anti-Hen Egg Lysozyme Monoclonal Antibodies HyHEL-5 and HyHEL-10" *Biophysical Journal* 74, 2036 – 2045.
- (5) DE LISI,C., WIEGEL,F (1981). "Effect of nonspecific forces and finite receptor number on rate constants of ligand-cell bound-receptorinteractions". *P.N.E. As USA* 78 : 5569-5572
- (6) GALLEGO GARCÍA, C., MORENO FRIGOLS, J.L, CIUDAD PLATERO, J. (1991)"Estudio cinético de la reacción antígeno-anticuerpo que tiene lugar en la valoración de la hormona foliculo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) mediante radioinmunoanálisis (RIA)" *Anal. Real Acad. Farm.*, 57:581-594
- (7) GALLEGO GARCÍA, C., MORENO FRIGOLS, J.L.Y CIUDAD PLATERO, J. (1992) "Efecto de la temperatura sobre la velocidad de la reacción en la determinación cuantitativa de la hormona foliculo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) mediante radioinmunoanálisis (RIA)". *An. Real Acad. Farm.*, 58:59-65
- (8) KARLSSON, M. NEIL A. "Estimation of binding parameters by kinetic data analysis: Differentiation between one and two binding sites". *Eur. J. of Pharm.* 148 , 115-125 (1988)
- (9) Miles L.E.M.and Hales C.N. (1970) "Immunoradiometric assay procedures: Newdevelopments". En *In vitro procedures with radioisotopes in medicine.* 483-484. Viena .
- (10) MOTULSKY, H.J.AND L. C.MAHAN (1984) "The kinetics of competitive radioligand binding predicted by the law of mass action". *Mol.Pharmacol.* 25, 1.

- (11) NORTHROP, S.H. AND ERICKSON, H.P. (1992) "Kinetics of protein-protein association explained by Brownian Dynamics computer simulation" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(8) : 3338-42
- (12) NYGREN H, WERTHEN M AND STENBERG.M (1988) "Kinetics of antibody binding to solid-phase- immobilised antigen. Effect of diffusion rate limitation and steric interaction". *Journal of Immunological Methods*. 101 : 63-71
- (13) NYGREN H AND STENBERG M (1989)" Immunochemistry at interfaces". *Immunology*, 66: 321-327
- (14) OLIVAS ARROYO, C., MORENO FRIGOLS, J.L. (1998) "Aspectos cinéticos y difusivos de la competición trazador-analito en radioinmunoanálisis de Péptido C" *Anal.Real Acad. Farm*, 64 : 615-633
- (15) "Optimization, Theory and Applications" 2ª Edición.SS Rao. Wiley Eastern Limited.
- (16) VAN OSS, C.J. (1997) "Kinetics and Energetics of Specific Intermolecular Interactions" , *J. Mol. Recogn* , 10 , 203-216
- (17) PEREA FALOMIR, MANUEL. (1998) "Aplicación de los modelos matemáticos de Karlsson y Stenberg a la caracterización cinética de algunas reacciones antígeno-anticuerpo". Tesis Doctoral. Universidad de Valencia
- (18) PÉREZ PLA, FRANCISCO. "Métodos de optimización OPKINE". Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- (19) RAMAN, C.S. ET AL. (1992) "Diffusion-limited rates for monoclonal antibody binding to cytochrome C. *Biochemistry* 31(42) : 10370-9
- (20) RABBANY ET AL. (1998) "Dissociation rate kinetics in a solid-phase flow immunoassay", *Analytical letters*, 31(10), 1663-1675
- (21) SAN MARTIN CIGES, E., MORENO FRIGOLS, J.L.,Y .PERIS RIBERA, J.E. (1998) "Cinética de las reacciones producidas en el análisis inmunoradiométrico (IRMA) de algunos marcadores tumorales". *Anal.Real Acad. Farm* 64 :513-531
- (22) SAN MARTIN CIGES, E., MORENO FRIGOLS, J.L. PERIS RIBERA J.E.Y SAN MARTÍN M.D. (1998) "Cinética de las reacciones producidas en el radioinmunoanálisis (RIA) de algunas sustancias". *Ars Pharmaceutica*, 39 (1) : 19-28
- (23) STENBERG M AND STIBLERT L. (1986) "External diffusion in Solid-Phase Immunoassays". *J. Theor. Biol* 120 : 129-140
- (24) STENBERG M AND NYGREN H. (1988) "Kinetics of antigen-antibody reactions at solid-liquid interfaces". *J. Immunol. Methods* 113 :3-15
- (25) STENBERG M, WERTHEN M, THEANDER S AND NYGREN.H (1988) "A diffusion limited reaction theory for a microtiter plate assay" *Journal of Immunological Methods*. 112 : 23-29.
- (26) VOSS, E.W. (1993) "Kinetic measurements of molecular interactions by spectrofluorometry" *J. Mol. Recogn* , 6(2) : 51-8
- (27) WEBER,G. "The binding of small molecules to proteins", in: *Molecular Biophysics*, eds. B. Pullman and M.Weissblut (Academic Press, New York) p. 369

- (28) YALOW R.S., BERSON. S.A. (1970) "General aspects of radioimmunoassay procedures." En: *In vitro procedures with radioisotopes in medicine*. 455-457. Viena
- (29) ZUBER, E., MATHIS, G. AND FLANDROIS, J.-P. (1997) "Homogeneous Two-Site Immunometric Assay Kinetics as a Theoretical Tool for Data Analysis" *Analytical Biochemistry* 251 : 79-88
- (30) ZUBER ET AL. (1997) "A descriptive model for the kinetics of a homogeneous fluorometric immunoassay" *Journal of Immunoassay* , 18(1) , 21-47

Anal. Real Acad. Farm. 2000, 66:

Necrológica

Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Sr. D. Manuel Martel San Gil



D. Manuel Martel San Gil, el Geólogo

EXCMO. SR. D. EMILIO FERNÁNDEZ-GALIANO

Académico de Número

Señoras y señores Académicos,

Señoras y señores:

Allá por los años cuarenta, la Universidad española era mucho más reducida que ahora, que recientemente ha adquirido un tamaño ya incluso desmesurado. Tanto, que las últimas estadísticas fiables elevan a 64 el número de centros de enseñanza superior en España.

Primero, eran las clásicas Universidades tradicionales de las grandes poblaciones. Después, las de las capitales de provincia. Más tarde, se empezaron a duplicar (o incluso triplicar) las de las grandes poblaciones donde, no obstante, ya existían universidades tradicionales. Y más tarde, se crearon incluso en ciudades que ni siquiera son capitales de provincia. Conocida es la definición de algún notable pensador de las ciudades tranquilas y relajantes que invitaban al estudio, al reposo y a la meditación: eran las que tenían obispo, pero no tenían gobernador. Ahora podríamos cambiar esta ingeniosidad diciendo: las ciudades que tienen obispo y rector, pero que no tienen gobernador, aunque sí tienen alcalde, al menos por el momento.

Carecemos todavía de una proyección de futuro para determinar si esta proliferación es o no buena, aprovechable y si va a generar los resultados que, con buena lógica, los gobernantes (y los gobernados) esperan de ella. Pero hoy nos reunimos aquí para recordar a un académico fallecido, Manuel Martel San Gil, un típico universitario, producto simbólico de aquella época en la que, dentro de la escasez y las dificultades inherentes a los centros de enseñanza superior, brotaron hombres singulares que mantuvieron a muy altos niveles el prestigio y la eficacia de algunas de las nuevas universidades nacidas, paradójicamente,

de las antiguas. Una de aquellas personas fue, precisamente, el hombre al que hoy recordamos que, en su calidad de Rector de la Universidad de Alcalá de Henares, realizó una tarea encomiable, digna de elogio.

Por los años en los que Martel inició sus estudios universitarios, la Universidad de La Laguna, única entonces en el archipiélago canario, contaba sólo con tres Facultades, Ciencias, Derecho y Filosofía y Letras, y ninguna de ellas “completa”, en el sentido de que no enseñaban todas las materias que se podrían enseñar y que respondiesen a las necesidades y deseos de los alumnos de las islas, únicos que, por razones obvias, accedían a ella.

Y en esta época del comienzo del curso, empezaba la migración hacia la península de los alumnos de las islas, cuyas ansias de cultura no se satisfacían con la escasez de enseñanzas ofrecida por la universidad a unos jóvenes que, generalmente, venían a la península agrupados en su calidad de “inmigrantes”, a los que recibíamos con el apelativo genérico, pero en manera alguna peyorativo, de “los canarios”, y que enseguida se integraban con el resto de la clase, una vez diluidas las diferencias que, por cortedad o por escasez de trato, nos separaban a unos de otros. En este grupo de alumnos “foráneos” se incluía Manuel Martel San Gil, palmeño de la Villa de Mazo, en la bellísima Isla de la Palma, que, deseoso de estudiar Geología, una materia que en la Universidad de La Laguna sólo se enseñaba a nivel del curso preparatorio de Ciencias, se incorporó a la Sección de Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Madrid, donde entonces todavía no se habían separado las disciplinas que más tarde habían de integrar las Secciones de Biológicas y Geológicas, y donde recibió las enseñanzas de geólogos tan notables como D. Eduardo y D. Francisco Hernández Pacheco, este último destacado miembro de esta Academia de Farmacia, D. Maximino San Miguel de la Cámara, petrógrafo, D. Florencio Bustinza Lachiondo, al que, curiosamente, sucedió aquí como Académico, y tantos otros ya desaparecidos.

Terminados brillantemente sus estudios universitarios, comienza entonces la difícil labor de integrarse en los equipos de investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, organismo que reunía a la mayoría de las personas que trabajaban en los estudios relacionados

con las ciencias geológicas, realizando previamente la tesis doctoral, y simultaneando sus trabajos con la obtención de la Licenciatura en Farmacia por la Universidad de Madrid. Pero volviendo antes a sus orígenes isleños, como Asesor Geológico del Puerto de Santa Cruz de Tenerife y Profesor Adjunto de Geología de la Universidad de La Laguna.

Más tarde se vinculó definitivamente a Madrid, y entonces es cuando ya establecí una relación continua de amistad y, en cierto sentido, de colaboración, con Manuel Martel que, con su trato exquisitamente amable y un profundo sentido de la amistad, facilitaba de buen grado este acercamiento. Entonces obtuvo el nombramiento de Investigador Científico del CSIC y empezó a colaborar en los trabajos del Instituto de Edafología.

Pero, su sentido de aunar los estudios impartidos por la Universidad clásica con las aplicaciones técnicas de los mismos, y su gran visión de futuro, le inducen a la obtención del título de Ingeniero de Petróleos de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de París y el de Maestro Industrial. Finalmente, su vocación por la enseñanza le animó a opositar a la cátedra universitaria de Geología General y Geoquímica, que desempeñó sucesivamente en las Universidades de La Laguna, Valencia y Alcalá de Henares.

Fue, así, titular de cátedras de enseñanza general, aquéllas cátedras que existían en determinadas universidades para complementar las asignaturas del Curso Preparatorio de las Facultades de Ciencias (Geología en Valencia y en La Laguna, Biología en Salamanca y en Sevilla, Botánica en Murcia, Química Orgánica en Cádiz, etc.), que desarrollaban enseñanzas generalistas, aunque es evidente que a Martel, por su formación, podía calificársele como naturalista, es decir, un estudioso de la Naturaleza creada y escondida, por el puro afán de conocerla. Jamás para utilizar su conocimiento en su propia promoción, pues, como decía el sabio, todo lo nuevo que se descubre está ya creado, y lo que ve el naturalista tiene la grandeza de la obra modelada por el divino Creador. Quizá lo que condujo a los gobernantes a la transmutación de naturalista en biólogo, además de la separación de unas disciplinas estáticas de otras dinámicas, evolutivas, fue la presunta creencia de la supremacía del especialista sobre el generalista, el conocimiento de casi

todo sobre casi nada, o el conocimiento de casi nada sobre casi todo. Pero cuando se lee a un gran geólogo, o a un gran biólogo general, el espíritu sufre una catarsis hacia la claridad y la serenidad del pensamiento. Como así ocurre con la lectura de los relatos naturalistas de las Indias, de Gonzalo Fernández de Oviedo, los estudios de las minas andaluzas del geólogo irlandés William Bowles, que estuvo al servicio del rey Carlos III, o la descripción física del Cosmos de Alejandro Humboldt. Y en ese sentido, Martel, en los casi quince años que estuvo de catedrático en la Facultad de Ciencias de Valencia, realizó una encomiable labor docente, aparte de otras actividades organizativas de las que, sin duda, nos hablarán los compañeros que nos acompañan en esta sesión necrológica.

Con la muerte de Manuel Martel, que desempeñó una labor callada y prudente en la Academia, plasmada, entre otras, en la generosa donación para nuestro museo de una bella y valiosa colección de minerales, desaparece el penúltimo académico representante de los naturalistas, de los que ya sólo queda el que esto escribe, como una especie a extinguir de “fósil viviente”. En los recientes años, las últimas tendencias modernas han dado lugar a que la Academia vaya perdiendo pluralidad representativa en beneficio de otras ciencias consideradas como “más modernas”, asignando patentes de modernidad a las últimas que se van representando, pero no a las que el libro del Génesis relaciona en la secuencia de la aparición de los seres vivos según el orden de la creación, que coincide, precisamente, con el orden ecológico de la cadena trófica: primero, los organismos productores primarios, después los animales predadores acuáticos, luego los terrestres y, finalmente, el hombre, objeto de una creación independiente a imagen y semejanza del Creador.

Por eso y por muchas otras razones, que estoy seguro de que están en el ánimo de todos nosotros, la pérdida de Manuel Martel significa una merma importante del prestigio de esta Academia, de la que tardaremos muchos años en recobrarnos, y de la Sección 2ª a la que perteneció y que yo, inmerecidamente, presido. En nombre de la Academia, hago patente a sus familiares nuestro pesar, que compartimos con ellos.

He dicho

Excmo. Señor D. Manuel Martel San Gil

Semblanza del Académico

EXCMO. SR. D.. DAVID MARTÍN HERNÁNDEZ
Académico de Número

Excmo. Señor Director
Excmas. Señoras Académicas
Excmos. Señores Académicos
Señoras y Señores

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento por la atención que ha tenido la Junta de Gobierno de la Real Academia de Farmacia para que, con escasos méritos por mi parte, glose la brillantísima “Semblanza Académica” del insigne Investigador y Maestro Don Manuel Martel San Gil, paisano mío de las lejanas, y a la vez cercanas, Islas Canarias.

Pocas tareas son más gratas y nobles como honrar a quien tanto se lo merece.

El Excelentísimo Académico de Número de la Real Academia de Farmacia Instituto de España Don Manuel Raimundo Martel San Gil, nació el día 15 de marzo de 1914, en la Villa de Mazo, Isla de La Palma, provincia de Santa Cruz de Tenerife (islas Canarias).

1.- La Persona

Es muy satisfactorio manifestar que Don Manuel Martel San Gil, como persona, destacó por su gran naturalidad y bondad, exquisita amabilidad en su trato, profundo sentido de la amistad, extraordinario

amor a la Naturaleza, especialmente a la de las Islas Canarias, y su clara vocación científica, con un alto sentido de la responsabilidad hacia el trabajo infatigablemente bien hecho.

2.- Sus Títulos Universitarios

El Profesor Martel era Doctor en Ciencias Naturales (Premio Extraordinario de la Universidad de Madrid), y en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid, Ingeniero de Petróleos por la Escuela Nacional Superior de Ingenieros de París.

3.- Otros Títulos Docentes

El profesor Martel poseía , además otros títulos docentes tales como los de:

Catedrático Numerario de Universidad(1963)

Profesor de Enseñanza General Básica.

Profesor Mercantil.

Maestro Industrial en la Rama de Electricidad

4.- Su Labor Docente

Su vocación científica condujo al profesor Martel hacia la enseñanza universitaria.

Fue Catedrático de Geología General y Geoquímica en las Universidades de La Laguna, Valencia y Alcalá de Henares.

5.- Sus Cargos Universitarios

Decano de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Alcalá de Henares.

Vicepresidente de la Comisión Gestora de la Universidad de Alcalá de Henares.

Rector Magnífico de la Universidad de Alcalá de Henares (1981-1984).

6. Cursos de Doctorado Impartidos

Impartió una veintena de cursos de doctorado sobre los siguientes temas:

- Geoquímica de los elementos litosféricos.
- Los silicatos y su función en los materiales litosféricos.
- La influencia de las rocas endógenas en el microclima.
- Las rocas exógenas y su influencia en el hábitat de los seres vivos.
- Macropaleontología, micropaleontología y paleobotánica.
- Geomorfología y medioambiente
- Las rocas y los hidrocarburos.
- Relaciones entre rocas y tipos de suelos.
- Los minerales y sus acciones sobre los organismos vegetales y animales.

7.- Tesis Doctorales Dirigidas por el Prof. Martel

El profesor Martel dirigió muchas Tesis Doctorales entre las que se destacan las siguientes:

- Los Yacimientos Glauconíferos españoles y su función en la geología
- Estudio petrográfico de las rocas sedimentarias de Valencia
- Estudio estratigráfico y paleontológico del Neógeno continental del río Júcar.

- Microestratigrafía del Neógeno¹ de la Provincia de Valencia.
- Influencia de las litofacies en las aguas de la cuenca del río Cabriel.
- Composición y aprovechamiento de las aguas subterráneas de la provincia de Valencia, y su relación con las litofacies.
- Estudio del Cuaternario del Macizo Central de Gredos.
- El Archipiélago Canario: sus rocas y sus fósiles.

8.- Su Labor Investigadora

Realizó importantes investigaciones sobre “Estructuras de Minerales Arcillosos”, en La Universidad Sorbona de París (Francia), y sobre “Geología de los Petróleos” en Minerve (Alpes Marítimos Franceses).

En el Observatorio Sismológico del Vesubio (Italia), estudió el “Aprovechamiento de la Energía Geotérmica”.

En Évora (Portugal) el Profesor Martel realizó investigaciones sobre los yacimientos de mármoles.

El afán investigador del profesor Martel lo orientó hacia el C.S.I.C., del que llegó a ser Investigador Científico.

Obtuvo el Premio Nacional Torres Quevedo del C.S.I.C.

¹ Parte del periodo terciario que comprende sus estratos más modernos

9.- Publicaciones

El número de publicaciones científicas, en España y en el extranjero, se acerca al centenar.

El tema predominante, se desarrolla dentro del campo de la Geología pura y de la Geología aplicada:

La génesis de las Islas Canarias,

Los yacimientos de Wolframio en la provincia de Jaén,

Los yacimientos de caolín en los límites de las provincias de Guadalajara y Cuenca.

El Mapa geológico de España y Portugal.

Consideraciones Geoquímicas de los elementos litosféricos.

La Isla de La Palma y su Caldera de Taburientes ...

10.- El profesor Martel Académico de Número de la Real Academia de Farmacia

Los prestigiosos Excelentísimos Señores Académicos de Número profes. D. Ángel Vián Ortuño, D. Antonio Doadrio López y D. Eugenio Sellés Martí, el día 18 de noviembre de 1982, presentaron a Don Manuel Martel San Gil como candidato para cubrir la vacante producida por el fallecimiento del Excmo. Académico de Número de la Real Academia de Farmacia D. Florencio Bustinza Lachiondo.

El prof. Martel fue elegido Académico de Número, en concurrencia con otros dos candidatos, día 17 de febrero de 1983, habiendo tomado posesión en la sesión solemne del día 16 de mayo de 1985, con la lectura de su discurso titulado “Los Radioelementos en Farmacia. La contestación a este discurso fue realizada por el Excmo. Sr. D. Juan Manuel López Azcona. Perteneció a la Sección 2ª de Ciencias Biológicas.

El día 17 de octubre de 1985, acompañado del Excmo. Académico D. Gregorio González Trigo, fue designado para acompañar al prof. D. Gregorio Espinós Pérez en la toma de posesión de este último.

El día 29 de mayo de 1985, el Excmo. Académico Secretario Perpetuo de la Real Academia de Farmacia certifica que Don Manuel Martel San Gil venía colaborando en las tareas académicas, especialmente en las áreas de su competencia y en todo lo relacionado con temas de docencia e investigación, dados los altos cargos que en dichos campos había ostentado.

El profesor Martel San Gil además, asesoró competentemente como geólogo y miembro constituyente, a la Comisión para el estudio de los manantiales de aguas mineromedicinales de la Real Academia de Farmacia.

El día 27 de marzo de 1987 la Junta de Gobierno de la Real Academia de Farmacia le felicita por haber sido investido Doctor "Honoris Causa" por la Universidad Central del Este de la República Dominicana.

El 30 de abril de 1987, la Junta de Gobierno de la Real Academia de Farmacia tomó el acuerdo de designarle miembro de la Comisión de Concesión de la Medalla Carracido.

Se le designa, junto con D. Domingo Espinós Pérez, para acompañar a D. Román de Vicente Jordana, en su toma de posesión de Académico de Número de la Real Academia de Farmacia, el día 8 de mayo de 1986.

El día 22 de febrero de 1990, la Junta de Gobierno le designa Tesorero interino, hasta que se cubra dicho cargo por elección reglamentaria

El día 19 de abril de 1990, la Junta de Gobierno de la Real Academia de Farmacia le designa miembro de la Comisión de Hacienda y de Régimen Interior.

En distintas ocasiones contribuyó a dotar al Museo de la Real Academia de Farmacia², de muestras de minerales de una interesantes colección.

² Memoria de la Secretaría correspondiente al año de 1993; Cartas del Excmo. Académico Secretario de fechas 31 de enero de 1994 y de 6 de febrero de 1995.

11. – Algunas de sus Distinciones Profesionales

Medalla de Plata de la Universidad de Alcalá de Henares.

Profesor Honorario de la Universidad Primada de América.

Profesor Honorario de la Universidad UNAPEC de Santo Domingo.

Doctor Honoris Causa de la Universidad de Estudios Técnicos de Santo Domingo

Académico de Número de la Real Academia de Doctores de Madrid.

Premio Nacional Torres Quevedo.

Premio de Colegiado Distinguido Doctores y Licenciados del Distrito Universitario de La Laguna (Tenerife).

Miembro de Número del Instituto de Estudios Canarios

Académico Correspondiente de la Real Academia Hispano Americana(Cádiz).

12.- Otros Honores

El Profesor Martel es:

Hijo predilecto de Mazo Isla de la Palma

Premio Nacional de Ciencias del C.S.I.C.

Encomienda con Placa de la Orden de Alfonso X el sabio.

Gran Cruz de la Orden de Malta

Medalla de Plata de la Ciudad de Alcalá de Henares

Gran Cruz de la Orden de Cristóbal Colón

Su constante y cariñosa atención a las actividades de la Real Academia de Farmacia, y su exquisito trato humano, han

convertido al Excmo. Señor Académico D. Manuel Martel San Gil, en el modelo digno de ser imitado por cada uno de los Académicos, y el personal de esta prestigiosa Institución.

D. MARTÍN HERNÁNDEZ

ANAL. REAL ACAD. FARM.

Los miembros de la Real Academia de Farmacia se felicitan de haber tenido la ocasión de conocerle y de admirarle.

El Dr. Manuel Martel San Gil, Rector de la Universidad de Alcalá de Henares

EXCMO. SR. D. MANUEL ORTEGA MATA

Académico de Número

Cuando supe la triste noticia del fallecimiento del Prof. Martel, sentí la verdad que encierra ese dicho popular que se escucha por mi Andalucía y que dice: “*algo se muere en el alma cuando un amigo se va*”, porque el Prof. Martel, ante todo y sobre todo era un buen amigo mío. Por eso y por el hecho de haber estado ligado a él de una manera muy especial durante tantos años, es aún el día en que puedo decir que no ha calado en su verdadera esencia la pesadumbre de su irremediable pérdida.

Tanto es así que quiere uno hacerse a la idea de que su desaparición es temporal, que se ha ausentado hacia lugares remotos desde los cuales cualquier día retornará.

Pero la realidad es que el Prof. Martel, gran cristiano, se encuentra ahora en el Reino de Dios, y sabe bien que todo cuanto yo exprese en el acto que nos reúne no son meras palabras de ritual, sino que son palabras sentidas que salen de lo más profundo de mi ser.

Conocí al Prof. Martel cuando siendo él Catedrático y Decano de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Alcalá de Henares, completaba sus estudios de la Licenciatura en Farmacia, y yo como Secretario entonces de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense le atendía en los diversos trámites de matriculación. Posteriormente, al trasladarme a la Universidad de Alcalá, pude comprobar con cuanta satisfacción celebraba él mi llegada a dicha Universidad, y que fue el inicio de una entrañable amistad que perduró en el tiempo.

Cuando fue designado Rector Magnífico de la Universidad de Alcalá de Henares puso todo su empeño en que colaborara con él como Vicerrector, y dado que bajo ningún concepto era mi intención dejar mis tareas como Decano de la Facultad de Farmacia, en plena fase de

organización, consiguió del Ministerio de Educación que se me permitiese simultanear durante un cierto tiempo ambos cargos. Esta estrecha colaboración universitaria perduró hasta el momento de su jubilación, en que tuve el honor de pronunciar las palabras de ofrecimiento del homenaje que los compañeros de la Universidad le tributamos en reconocimiento a la labor realizada.

Con ello quiero significar que el trato diario durante tantos años, despachando asuntos y resolviendo los problemas de toda índole que conlleva la marcha de una Universidad en fase de desarrollo y consolidación, me han permitido conocer en toda su dimensión la grandeza del Prof. Martel.

Tengo que reconocer que en esta última etapa de mi vida al servicio de la Universidad, que siempre estuvo marcada por dificultades de toda índole, la fortuna estuvo de mi lado, representada por la amistad del Prof. Martel. En este punto y por su similitud, no puedo dejar de mencionar a otros dos ilustres profesores, D. José Lucas Gallego y D. Ángel Hoyos de Castro, Decanos que fueron de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, con los cuales colaboré como Secretario de dicha Facultad, y que me honraron también con su sincera amistad. Con estas palabras quiero rendir homenaje, una vez más, en recuerdo de ambos Académicos de esta Real Academia de Farmacia, profesores universitarios en los que destacaban la bondad de sus caracteres, no exentos de rectitud, la caballerosidad y la serenidad con la que afrontaban los momentos difíciles y penosos. Colaborar con ellos ha sido para mí un honor y forma parte de los mejores recuerdos de mi vida universitaria.

Del Prof. Martel yo destacaría en primer lugar su capacidad de trabajo, que por supuesto no terminaba con su marcha diaria de la Universidad, pues su despacho lo trasladaba a su casa. Llamaba la atención ver al personal subalterno portando las carpetas de documentos a su coche, que al día siguiente volvían de nuevo para seguir despachando.

Temeroso yo de que dicha práctica pudiese ocasionar en algún momento, el extravío o deterioro de alguno de los documentos, se tomó el acuerdo de que dichas carpetas para el trabajo en casa, sólo contuviesen fotocopias de los documentos originales que permanecían en el Rectorado.

Su dedicación a la Universidad de Alcalá de Henares fue total, por lo que para las personas con este talante, el designarle su dedicación como exclusiva es decir poco y había que buscarle algo que definiese la realidad de su esfuerzo y dedicación.

Otro rasgo, perceptible por cualquiera que entrase en contacto con el Prof. Martel, era su bondad. He sido testigo de cómo cuantos acudían a él en busca de soluciones para sus pequeñas y grandes cosas, sabían que podían confiar en que el Prof. Martel procuraría por todos los medios su solución.

Una anécdota de las vividas, bastará para ilustrar cuanto hemos dicho anteriormente. Un cierto día un profesor que estaba pendiente de realizar unas oposiciones a cátedra, acudió a su despacho para solicitarle su ayuda, con el fin de que el presidente del tribunal, que debía fijar la fecha de la convocatoria, no la demorase en exceso. Pues bien, esa gestión que podía haber sido realizada mediante una llamada telefónica, la resolvió el Prof. Martel diciendo al Vicerrector Prof. Ángel Romero y a mí: “que os parece si nos vamos a Salamanca para entrevistarnos con el Presidente del Tribunal”. Y allá que nos fuimos los tres y volvimos con la convocatoria fijada y el asunto resuelto.

Al recordar esta anécdota, y tantas otras de las muchas vividas, que podía traer a colación, me hace ver lo alejado que estaba el Prof. Martel de aquellos que piensan que la reciprocidad es la base de la cooperación humana, o lo que es lo mismo, que de todo cuanto hacemos esperamos alguna clase de compensación.

Se suele contar, como representativo de esta forma de comportamiento basada en la reciprocidad, la historieta de un Académico a quien al preguntarle por las causas de su ausencia a la sesión necrológica dedicada a la memoria de un colega, contestó “que al haber muerto dicho colega, tengo la seguridad de que no acudirá a mi propio funeral”.

El Prof. Martel que yo tuve la suerte de conocer era la antítesis de los que así se comportan, hasta tal punto que hacía su norma de comportamiento lo que nos dice San Mateo (Capítulo 6º, versículo 3º): “*Cuando hagas limosna, que no sepa tu mano izquierda lo que haga tu derecha*”. Aparentemente daba la impresión que olvidaba el hecho

realizado a favor del que lo necesitase, pues jamás volvía a comentar el tema, lo que para mí era el reflejo evidente de su gran generosidad.

Otro rasgo de su personalidad era lo arraigado que tenía el sentido de responsabilidad, que se ponía de manifiesto especialmente en sus intervenciones públicas con motivo de solemnidades académicas. Se torturaba pensando que cualquiera de sus intervenciones podría ser mejorable, lo que le producía un cierto estado de nerviosismo.

En esos momentos yo quiero pensar que él deseaba de mi presencia, que le producía una cierta confianza, lo que no era óbice para que echase mano de los remedios que la Farmacia tradicional nos proporciona para combatir los estados de ansiedad.

Por eso más de una vez nos deteníamos en las Farmacias de Alcalá de Henares para adquirir Agua de Azahar, que ingería a dosis generosas.

Naturalmente, y siempre que cuando ello era posible, le gustaba conocer mi opinión, no sólo del valor científico y literario de su prevista intervención en el acto que se tratase, sino también en la forma en que debía expresarse. Recuerdo muy especialmente con cuanta meticulosidad preparó su intervención en el solemne acto de toma de posesión como Académico de Número de esta Real Academia de Farmacia. Por aquel entonces, yo era Secretario Perpetuo de la Academia y fui testigo de cómo cuidaba todo hasta el más mínimo detalle, como la posición de los micrófonos, la iluminación, la dicción y el tiempo de su intervención.

Otro acontecimiento que el Prof. Martel vivió con especial ilusión, fue el acto celebrado en Santo Domingo (República Dominicana) por el que fue investido Doctor Honoris Causa por la Universidad Central del Este, en el que tuve el honor de estar presente por expreso deseo del Prof. Martel. El acto resultó solemnísimos y su discurso, preparado con especial esmero, fue excelente. Fueron unos días de grato recuerdo, con numerosas reuniones con las autoridades académicas de las restantes Universidades de Santo Domingo, siendo recibido incluso por el Presidente de la República.

Fruto de estos contactos fue la posterior celebración de un ciclo de conferencias-coloquios en la Universidad de Alcalá de Henares, para un grupo de profesores de dichas Universidades.

La mutua confianza con el Prof. Martel no quedaba reducida al ámbito universitario, sino que trascendía al ámbito familiar. He vivido y compartido sus afanes, sus alegrías y sus penas en el período de la vida que nos mantuvo unidos, y que son recuerdos que pertenecen a nuestra intimidad.

Hay un hecho, sin embargo, que sí quiero relatar porque puede servir para entender mejor la personalidad del Prof. Martel. Se trata de que en un momento determinado percibe ciertas anomalías en su visión, y también en este caso me pide que le acompañe al especialista para la realización del examen y las pruebas correspondientes. Afortunadamente aquello se resolvió satisfactoriamente, sin ninguna consecuencia.

Este comportamiento yo lo interpreto en el sentido de que quería evitar a toda costa cualquier sufrimiento a los suyos.

El Prof. Martel era un hombre de una gran sensibilidad, que se emocionaba con pequeñas cosas, y de ello pueden testimoniar los componentes de la Tuna Universitaria de aquellos tiempos, quienes sabían bien que la mejor forma de alegrar el ánimo del Prof. Martel, y de paso conseguir las pequeñas cosas que requerían, era cantarle aires canarios, y muy especialmente aquel de “palmero sube a la Palma...”

Para un hombre de estas características ejemplares por su relieve, debió ser un momento difícil el tener que abandonar la Universidad por motivo de su jubilación. En nuestras conversaciones nunca se tocaba el tema y en realidad lo que hacíamos era engañarnos con el pensamiento de que ese momento no llegaría jamás, por no ser deseado por ambas partes. Pero la realidad es que ese día, triste día, llegó y comenzó para él una nueva etapa de su vida, aquella que se inicia a los setenta años.

El Académico Julián Marías, en uno de sus excelentes artículos, el titulado “Un proyecto para una edad nueva” (ABC, 27-5-2000) afirma que “*el siglo XX que termina ha añadido al horizonte vital acaso quince años de vida, con añadidura de un frecuente buen estado de conservación*”.

Suyas son también estas consideraciones: “*se está dibujando una figura de vida definida por la pasividad, la perpetuación de los proyectos anteriores, sin imaginación ni intervención; un aterrador panorama de*

monotonía y aburrimiento. ¿Se puede aceptar esto para una parte sustancial de la biografía, digamos quince interminables años?”.

El Prof. Martel por supuesto que no aceptó este aterrador panorama de monotonía y aburrimiento, sino que por el contrario, puso de inmediato manos a la obra en dos proyectos con los que pretendía seguir viviendo, lo que hasta entonces había sido su quehacer universitario.

Uno de ellos era el profundizar en el campo de la vulcanología, con especial referencia a su querida tierra, la que le vio nacer, la Isla de la Palma.

El otro gran proyecto era el redactar sus vivencias como Rector de la Universidad de Alcalá de Henares, al objeto de que todo aquel que deseara hacer historia de dicha Universidad, encontrase en su trabajo la fuente más fiable de los acontecimientos acaecidos en ese periodo crítico del desarrollo y despegue de una Universidad.

Dicho y hecho, comenzó de inmediato las tareas de dictado a una secretaria mecanógrafa y, como hasta entonces, seguía haciéndome partícipe de su tarea, hasta tal punto que cuando ya tuvo una idea clara de la magnitud de la obra, me pidió que gestionase en la imprenta editora de nuestros Anales, la elaboración del presupuesto para conocer el probable coste de la composición y edición de la citada obra. Recuerdo que no resultaba nada barato, dado que en su proyecto se incluían numerosas fotografías como testimonio gráfico del acontecer de la Universidad, que de acuerdo con su criterio, debería constituir el más fiel archivo histórico.

Recuerdo perfectamente la foto que nos hicimos los dos, en compañía del Gerente de la Universidad, en los terrenos donde se edificó posteriormente la Facultad de Farmacia, el día en que los arquitectos y otras autoridades ministeriales, verificaron sobre el terreno uno de los primeros trámites, el levantar el acta de replanteo.

Fue un gran día para nosotros, pues nos dábamos cuenta que todo el esfuerzo realizado hasta entonces había valido la pena, y que muy pronto veríamos las máquinas trabajando, como así fue.

Yo quiero pensar que el Prof. Martel al redactar este trabajo, lo que realmente estaba haciendo era volver la vista atrás y contemplar en su totalidad su quehacer de Rector de la Universidad de Alcalá de Henares, y

estoy seguro que sentiría no sólo satisfacción, sino también el orgullo por el esmero que puso en toda su labor. Su gran sueño era que por sus actos sus hijos y nietos pudiesen sentirse orgullosos de él, y a fe que su ejemplo debe permanecer perennemente en sus pensamientos, como la mayor y más hermosa herencia que se puede recibir.

La gentileza de sus hijos me ha permitido poder gozar de la lectura de innumerables folios que el Prof. Martel tenía redactados, y en todo momento he tenido la sensación de que estábamos manteniendo una más de las muchas conversaciones, que sobre los temas relativos a la Universidad de Alcalá, habíamos tenido en nuestros años de convivencia.

Es por eso que no me resisto a transcribir algunos párrafos, que vienen a ratificar cuanto hasta aquí hemos señalados sobre la personalidad del Prof. Martel.

En los comienzos de la obra se puede leer: *“No creo oportuno recitar logros que haya podido alcanzar en mi misión y sólo quiero decir que mi línea de conducta se basaba en el siguiente principio:*

Ser el Rector de todos, desde el más excelso profesor numerario a un becario, estudiantes en apuros o un bedel, investigador o personal encargado de la limpieza.

Esto suponía tener abierta la puerta de mi despacho a todos y a cualquier hora. Muy grande fue desde el principio la concurrencia y dura la tarea de obrar en justicia a la par de dar satisfacción. Pero si yo había tomado posesión del Rectorado, era justo que todos tomaran posesión de su Rector”

Ya hemos comentado antes con cuanta generosidad, daba cumplimiento a la línea de conducta que se había marcado al tomar posesión del Rectorado.

La satisfacción con que contemplaba el resultado de la obra bien hecha, se refleja en el siguiente párrafo:

“Al ser designado Rector en 1979, recibí la Universidad de Alcalá de Henares con un total de 1.319 estudiantes en huelga, desmoralizados y en constante conflicto, reflejado en las paredes de los edificios y accesos ferroviarios.

En 1983 se había alcanzado una inscripción de más de 6.000 estudiantes, que a lo largo de los últimos cinco años han trabajado en paz y con fruto, ganando muchos de ellos los primeros puestos en oposiciones y concursos a los diferentes estamentos del Estado”.

En la obra del Prof. Martel, puede leerse un gran número de sus intervenciones en diferentes actos académicos, y entre ellos he encontrado la correspondiente a la toma de posesión como Catedrático de Fisiología Animal, del recientemente fallecido Prof. D. Ángel Navarro, Académico Correspondiente de esta Real Academia, y al que quiero dedicarle, con esta referencia, mi más emocionado recuerdo.

Sus palabras en dicho acto se iniciaban así: *“Recibimos hoy en el seno de nuestra Universidad y le damos posesión de su cargo al Prof. Dr. Ángel Navarro Ruiz, primer Catedrático de Fisiología Animal de su Claustro, en esta segunda etapa de la vida de la misma, y a través de la querida Facultad de Farmacia.”.*

A continuación se extiende en una documentada disertación sobre los avances en la investigación tanto en lo referente a la Fisiología como a la Farmacología.

Es de resaltar los términos en que se refiere a *“la querida Facultad de Farmacia”*, sentimiento refrendado por los hechos, y de los que, como Decano de dicha Facultad puedo dar fe, a la vez que puedo afirmar de la reciprocidad de sentimiento de la Facultad a su Rector.

Al término de la obra, encuentro un capítulo que titula, *“A mis compañeros”* en el que da testimonio de su fe cristiana, y creo que es el mejor homenaje a su memoria reproducirlo en un acto como el que estamos celebrando. Estas son sus palabras: *“Al final de la mencionada y postrera lectura, he llegado a extraer dos conclusiones esenciales, como si fueran dos frutos alcanzados de inestimable valor.*

La primera ha sido el considerar con plena convicción el hecho patente, ya sabido e incuestionable, de que es la Divina Providencia la que, de modo misterioso pero evidente ha conducido mi vida por los caminos trazados según los designios inescrutables de Dios. Todo ha seguido la ruta que el Señor tenía previsto, y reconozco que mis intentos de “previsión de futuro” han quedado muchas veces como vanos

proyectos, cuando no como temerarios supuestos, fruto de imprudentes y necias osadías”.

Bellas y sinceras palabras de un gran hombre, que deben servir de reflexión para los que todavía estamos a tiempo de examinar nuestras conductas.

Circunstancias personales redujeron últimamente mis relaciones con el Prof. Martel a conversaciones telefónicas, con frecuencia muy emotivas, que me llevaban a profundas reflexiones. Pensaba yo con dolor, que para el Prof. Martel el tiempo se agotaba sin que pudiera beneficiarse de la realidad que ya se está palpando. Los quince años de “regalo” que ha dejado el siglo XX a nuestras vidas, de acuerdo con el pensamiento de Julián Marías, serán más, muchos más el “regalo” que deparará el siglo XXI.

Hubo un tiempo en la Academia en el que las sesiones dedicadas a la memoria de un Académico fallecido, se caracterizaban por la presentación de trabajos de investigación, con intervención de compañeros o discípulos del fallecido. Fiel a aquella tradición me voy a permitir hacer un breve comentario sobre un trabajo de Lanza y colaboradores (*Science*, 288: 665-669. 2000) que le permite cuantificar, teóricamente, ese “regalo” de años a la vida humana que puede deparar el siglo XXI.

Las experiencias han consistido en aislar células fetales de ternera, las cuales mantenían en cultivo, y replicándose, durante varios meses, hasta el punto en el que se supone han alcanzado el 95% de su tiempo de vida.

Estas células envejecidas presentaban todas las características de dicha situación: acortamiento de sus telómeros, presencia de desechos celulares, bajo nivel de expresión del gen EPC-1, etc. Pues bien, transferidos los núcleos de estas células envejecidas, a óvulos de vaca desnucleados, en una experiencia típica de clonación, se desarrollaban embriones de ternero, que tras ser implantados en el útero de vacas permitían la posterior maduración fetal. Con los fetos extraídos por cesárea a las seis semanas de gestación, les permitió hacer estudios comparativos con fetos de embarazos normales de idéntico tiempo.

Lo más trascendente de estos estudios comparativos lo encontraron en el hecho de que las células del feto clonado, puestas en cultivo eran capaces de efectuar divisiones sucesivas hasta un total, en término medio, de 93 veces, en tanto que las células fetales normales, en idénticas condiciones, tan solo eran capaces de replicarse por 61 veces. Este evidente incremento del tiempo de vida de las células clonadas, extrapolado al animal completo, permiten considerar como una “posibilidad real”, que el animal clonado debería tener una vida media superior en un 50% a la del animal normal.

Si partimos de la base que el límite de la vida humana está situado en los 120 años, las consideraciones anteriores nos llevarían, en el caso de experimentos similares en seres humanos, a que dicho límite se elevaría hasta los 180 o 200 años.

Otras experiencias demostrativas de la juventud de las células clonadas, que no olvidemos han tenido su origen en unas células envejecidas al límite, lo tenemos en que comparando el tamaño de los telómeros de las células sanguíneas procedentes de terneros clonados después de 5 a 10 meses de su nacimiento, estos eran significativamente mayores que los telómeros de células idénticas procedentes de terneros normales de la misma edad.

Y todavía un dato más, cuando ponían en cultivo fibroblastos de terneros clonados y de terneros normales de edades idénticas, encuentran que en los clonados la expresión del gen EPC-1 era cinco veces superior a la de los fibroblastos controles. Esto quiere significar que los fibroblastos derivados de los terneros clonados, a pesar de tener la misma edad que los controles, eran potencialmente más jóvenes que ellos.

Estas experiencias nos están diciendo, en palabras que todos podemos entender, que unos núcleos de unas células envejecidas, en el límite de su tiempo de vida, al ser transferidos al interior de un óvulo desnucleado no sólo seguirán viviendo, sino que darán origen a nuevas células pluripotentes originarias de un nuevo ser.

La pregunta inmediata de esta asombrosa realidad, es la de cuales son las señales, y de que tipo, las que recibe ese núcleo envejecido y diferenciado en el medio ambiente del óvulo desnucleado, para dar

marcha atrás en su reloj biológico, y convertirse en una célula joven y pluripotente

La posibilidad de reproducir estas experiencias con células humanas, ha creado grandes esperanzas desde el punto de vista clínico, en lo que se denomina clonación terapéutica, que no es más que utilizar dichas células pluripotentes, por ejemplo, para desarrollar células neuronales, que podrían acabar con los problemas derivados de la enfermedad de Alzheimer o el Parkinson, células sanguíneas, tejidos diversos etc. y que resolverán todos los problemas actuales respecto a los trasplantes de órganos y tejidos, incluidos los del rechazo inmunológico, al poder utilizar como punto de partida las células adultas del propio paciente.

Sin embargo, el gran escollo que plantea el desarrollo de estas técnicas viene dado desde un punto de vista ético, ya que la obtención de las células humanas pluripotentes lleva consigo la muerte del embrión humano de la que procede.

Quiero creer, y en esto el Prof. Martel estaría conmigo, que somos muchos los que pensamos que al mandato de Dios de *no matarás*, ninguna persona puede arrogarse el poder de establecer excepciones, al justificarse en este caso la muerte del embrión, por el buen fin de las células pluripotentes. Como tampoco es admisible, desde el punto de vista ético, que ante un diagnóstico prenatal de posibles alteraciones genéticas, en un feto, se aconseje el aborto con la justificación de que es *mejor prevenir que curar*, porque en este caso la prevención no es otra cosa que la muerte de un ser humano en gestación.

Otra cosa sería, en lo referente al tema de la clonación terapéutica, que se pudiese reproducir en un tubo de ensayo, el ambiente que encuentran los núcleos envejecidos en los óvulos desnucleados, que les permite esa marcha atrás de su reloj biológico, y se lograra con ello su transformación en células pluripotentes. En este caso, desaparecerían las objeciones que desde el punto de vista de la ética se plantean, al no existir embriones humanos para ser destruidos.

Pasará todavía algún tiempo antes de convertir en realidad esta esperanza de hoy, la de disponer de los medios necesarios para controlar el envejecimiento de las células de nuestro organismo humano. De ahí

con que se especule con la aparente “inmortalidad” que nunca puede ser sinónimo de invulnerabilidad, pues la muerte celular siempre podrá sobrevenir por las agresiones de agentes químicos o biológicos.

Desde el punto de vista de la Bioética la discusión está planteada en términos de si estos hallazgos beneficiarán a la población humana en general, o si quedará reservado a un grupo reducido de personas; en cuyo caso se preguntan si es éticamente aceptable utilizar grandes esfuerzos investigadores y abundantes recursos económicos, en beneficio de unos pocos.

Y ahora debo ya terminar mi intervención en este entrañable acto, que la Academia celebra para rendir el sincero homenaje a la memoria del Prof. Martel, Académico muy querido y digno de toda admiración. Para mí ha sido un gran honor participar en el mismo, lo que me ha permitido rememorar y valorar en su justa medida, esos años de amistad sincera.

Por todo ello, y con palabras que sólo encontrarán su significado los creyentes en la existencia de la Vida Eterna, quiero repetir aquí, ahora en voz alta, mis palabras de despedida que musité al Prof. Martel, cuando ya no podía oírme: adiós Manuel, mi amigo, hasta que volvamos a encontrarnos.



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA

www.ranf.com