

Anal. Real Acad. Nal. Farm., 2003,

Doctrina

PREMIOS NOBEL 2002 EN FISIOLOGÍA, MEDICINA Y QUÍMICA

Presentación de la Sesión Científica de la Real Academia Nacional de Farmacia

(5 de Diciembre de 2002)

JUAN-RAMÓN LACADENA CALERO

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Hace unos años la Real Academia Nacional de Farmacia tomó la decisión de institucionalizar la conmemoración anual de la concesión de los premios Nobel en Fisiología o Medicina y en Química en el convencimiento de que, dado el amplio espectro científico que cubre esta Corporación, todos los años, en uno u otro o en ambos, habría ocasión de hacer una glosa de los mismos en una sesión científica especialmente dedicada a ello. Este año 2002, la institución Nobel ha otorgado el premio en Fisiología o Medicina conjuntamente a los doctores Sydney Brenner, H. Robert Horvitz y John E. Sulston por sus descubrimientos sobre “la regulación genética del desarrollo de los órganos y la muerte celular programada” y el premio en Química conjuntamente a los doctores John B. Fenn, Koichi Tanaka y Kurt Wüthrich “por el desarrollo de métodos para la identificación y análisis estructural de macromoléculas biológicas”. Por encargo del Exmo. Sr. Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, nos hubiera correspondido al Dr. Guillermo Giménez Gallego (Académico Electo de esta Corporación) y a mí mismo

glosar en esta sesión científica los premio Nobel 2002 en Química y en Fisiología o Medicina, respectivamente, atendiendo a nuestras correspondientes afinidades científicas. Desgraciadamente, por razones familiares graves el Dr. Guillermo Giménez no pudo participar en la sesión científica del día 5 de diciembre de 2002, siendo sustituida su intervención por la de la Excm. Sra. Dña. María Cascales Angosto, Académica de Número, quien disertó sobre la apoptosis y su relación con la enfermedad.

CRÓNICA DE UNA MUERTE ANUNCIADA: LOS PREMIOS NOBEL 2002 EN FISIOLOGÍA O MEDICINA

JUAN-RAMÓN LACADENA CALERO

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

1. INTRODUCCIÓN

Cuando ingresé en 1995 en esta Real Academia Nacional de Farmacia, elegí como tema de mi discurso la “Historia ‘nobelada’ de la Genética: Concepto y método” (Lacadena, 1995) dado que se daba la casual circunstancia de que tanto la institución Nobel como la ciencia Genética nacieron con el siglo XX (en 1901 y 1900, respectivamente). Ello me permitió hacer un estudio de cómo la comunidad científica había reconocido la labor de excelencia de algunos científicos dentro del contenido formal (concepto) de la Genética y su metodología variante a lo largo de su historia. Contando ya este año 2002, se han concedido 29 premios Nobel a 63 investigadores por sus aportaciones relevantes en el campo de la Genética o materias afines. De los 29 premios, 23 son en Fisiología o Medicina, 5 en Química y 1 de la Paz. Todos estamos convencidos que esta relación es un “suma y sigue” por la importan-

cia que para la Ciencia y la Sociedad tienen las investigaciones genéticas que se vienen realizando desde hace algunas décadas. Me atrevo a profetizar que, antes o después, científicos implicados en investigaciones pioneras sobre células troncales embrionarias, transgénesis y recombinación homóloga en mamíferos (por ejemplo, los ratones *knockout*) o sobre clonación por transferencia de núcleos en mamíferos domésticos y de laboratorio o sobre genómica (el Proyecto Genoma Humano, por ejemplo) serán galardonados con el premio Nobel.

Coincidiendo con el centenario de la institución Nobel, Gura (2001) hacía un balance de esos cien años y se preguntaba si los galardonados reflejan el modo en que se hace la ciencia en el siglo XXI. Mi contestación, en lo que a la Genética se refiere, es afirmativa, tanto en lo que se refiere al contenido formal (concepto de la disciplina) como a la metodología (aquí podría recordarse el trípode básico que constituye la regla de oro de la investigación: plantearse una pregunta importante, en qué material biológico se va a tratar de responder la cuestión y con qué metodología experimental).

Con estas mismas palabras presenté el año pasado la sesión científica homóloga a ésta, por ello me he tomado la licencia de repetirlas en este momento.

La Asamblea Nobel del Instituto Karolinska decidió otorgar el Premio Nobel 2002 en Fisiología o Medicina conjuntamente a los doctores Sydney Brenner, H. Robert Horvitz y John E. Sulston por sus descubrimientos sobre “la regulación genética del desarrollo de los órganos y la muerte celular programada”. No debe resultar, pues, extraño que utilice como título de este artículo el mismo de la novela del también premio Nobel 1982 de Literatura Gabriel García Márquez –“Crónica de una muerte anunciada”– como sinónimo de la muerte celular programada.

2. APOPTOSIS O MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Apoptosis es un neologismo derivado directamente de la palabra griega (*αποπτωσις*) utilizada para significar la “caída de la hoja” –debido al

significado de “ptosis” (πτωσις, “caída”) y el prefijo “apo” (απο, “inducción a”)– referida a la pérdida otoñal de las hojas. Como dice el profesor Carlos Vicente Córdoba, catedrático de Fisiología Vegetal de la Universidad Complutense, hoy día se admite que hay muchos procesos fisiológicos que antes se relacionaban con percepción de señales externas de tipo estacional (temperatura, luz, etc.) pero que se han revelado como sistemas genéticos programados. La caída de las hojas, la dehiscencia de los frutos, la muerte del citoplasma de los elementos xilemáticos para formar los vasos, la formación de las glándulas de acumulación de aceites en el pericarpio de los cítricos, la pérdida de la capa de aleurona en los granos de los cereales, son otros tantos ejemplos de una muerte celular programada en el desarrollo de las plantas. Hay descritos más de 50 genes programados que conciernen sobre todo a enzimas tipo glucanasas, poligalacturonasas, metalotioneínas, inhibidores de proteinasas, etc. Tales genes entran en funcionamiento incluso en ausencia de los factores ambientales que tiempo atrás se creía que determinaban los hechos fisiológicos antes enumerados. Incluso podría recordarse aquí que la primera observación microscópica de las celdillas del corcho realizada por Hooke en 1665 correspondían a células muertas por un proceso apoptótico.

La Genética y la Bioquímica se han apropiado del significado griego original del término apoptosis, de manera que en la actualidad se identifica con el fenómeno genético de muerte celular programada y los procesos que de ella se derivan en la regulación del desarrollo. Así, nos encontramos con las siguientes definiciones:

- Diccionario de la Lengua Española de la RAE (22ª edición, 2001):
Apoptosis: f. *Biol.* “Modalidad específica de muerte celular, implicada en el control del desarrollo y el crecimiento”.
Asimismo incluye también el término ptosis: Del gr. (πτωσις, caída). f. *Med.* “Caída o prolapso de un órgano o parte de él”.
- Vocabulario Científico y Técnico de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (3ª edición, 1996):

Apoptosis: “Modalidad específica de muerte celular implicada en la regulación del desarrollo y crecimiento. El acontecimiento bioquímico más importante que la define es la fragmentación del DNA por la acción de una endonucleasa específica que corta la doble hélice en las regiones internucleosomales”

Como dice Hengartner (2000), a lo largo de dos siglos, la muerte celular programada fue descubierta y redescubierta en repetidas ocasiones por varios biólogos del desarrollo y citólogos, recibiendo distintas denominaciones (ver Vaux y Korsmeyer, 1999). De hecho, los biólogos del desarrollo se dieron cuenta que la muerte celular estaba implicada en el proceso de metamorfosis, tanto de insectos como de mamíferos. Así, por ejemplo, la expresión “muerte celular programada” fue introducida en 1965 por Lockshin para describir la muerte celular que ocurría durante la metamorfosis de insectos (Lockshin y Williams, 1965). Sin embargo, fue finalmente en 1972 cuando se adoptó el nombre de “apoptosis” como término elegido por Currie y colaboradores en un artículo publicado en la revista *British of Journal Cancer* (Kerr *et al.*, 1972) para describir un tipo común de muerte celular programada que los autores observaban en diferentes tipos de células y tejidos.

Mi intención en esta breve reflexión es hacer referencia a los trabajos genéticos de los premios Nobel que hoy conmemoramos más que a los datos bioquímicos y moleculares y a las aplicaciones clínicas derivadas de los conocimientos del fenómeno de la muerte celular programada o apoptosis porque sería arrogarme unos conocimientos que no tengo y que otros miembros de esta Corporación están sin duda más capacitados que yo para ello. Sin ir más lejos, en 1997 la Dra. María Cascales, Académica de Número de esta Real Academia Nacional de Farmacia, escribió un magnífico estudio sobre “apoptosis, enfermedad y terapéutica” en el primer número de los *Anales de las Real Academia de Doctores*. Las alteraciones de la apoptosis pueden contribuir a los procesos cancerosos y a enfermedades autoinmunes y degenerativas. La apoptosis es un tema apasionante de investigación bioquímica y clínica como se puede apreciar en un sinnúmero de revisiones como, por

ejemplo, las de Vaux y Korsmeyer (1999), Hengartner (2000) o el tratamiento especial hecho por la revista *Science* (vol. 281, núm. 5381, 28 agosto 1998), por citar algunas. Podemos hacernos una idea del interés científico que despierta la apoptosis indicando que el número de artículos sobre muerte celular programada aparecidos en revistas científicas pasó de ser solamente 22 en el período de tiempo entre 1966 y 1975 a casi 43.000 en el lapso comprendido entre 1997 a 2001 y más de 5.600 en los seis primeros meses del presente año 2002.

La apoptosis es un mecanismo de suicidio celular que permite a los metazoos controlar el número de células en sus tejidos y eliminar las células que ponen en peligro la supervivencia del organismo. Algunas células tienen en su superficie unos sensores especiales, denominados “receptores de muerte”, capaces de detectar la presencia de “señales de muerte” extracelulares y responder rápidamente poniendo en marcha la maquinaria apoptótica intrínseca de la célula (ver revisión por Ashkenazi y Dixit, 1998).

La apoptosis –que es una forma de suicidio celular evolutivamente conservada– requiere de una maquinaria especializada cuyo componente central es un sistema proteolítico que incluye a una familia de proteínas denominadas “caspasas” (por *cysteine aspartate proteases*) muy conservadas en la evolución. En la especie humana se han descrito más de una docena de caspasas. Estas enzimas participan en una cascada de acontecimientos como respuesta a señales pro-apoptóticas, culminando en la rotura de una serie de proteínas que da lugar a la desmembración de la célula. En la apoptosis, las caspasas funcionan tanto en la desorganización de la célula (efectoras) como iniciando dicho proceso como respuesta a señales pro-apoptóticas (iniciadoras). Los sucesos apoptóticos incluyen la fragmentación internucleosomal del ADN, la condensación de la cromatina, arrugamiento de la célula sin perder su membrana plasmática y, finalmente, su desmembramiento en vesículas envueltas por membranas que forman los llamados “cuerpos apoptóticos”, etc. (ver revisiones por Thornberry y Lazebnik, 1998; Hengartner, 2000). El proceso de apoptosis incluye varias fases distintas como son las de decisión,

ejecución, fagocitación y degradación. Es importante mencionar que no siempre la apoptosis es consecuencia de una muerte celular programada, sino que puede inducirse como resultado de ciertos tratamientos experimentales. Además, por otro lado, a veces puede ocurrir la muerte celular programada sin que tengan lugar los procesos apoptóticos generales antes mencionados.

Un segundo conjunto de proteínas –la familia *Bcl-2*– juega un papel regulador importante en los procesos apoptóticos. De acuerdo con sus semejanzas estructurales y criterios funcionales, las proteínas de esta familia están divididas en tres grupos: los miembros del grupo I tienen actividad anti-apoptótica, mientras que las de los grupos II y III promueven la muerte celular. El gen anti-apoptótico *Bcl-2* de mamíferos tiene su homólogo en el gen *Ced-9* del nematodo *C. elegans* que inactiva la acción apoptótica del gen *Ced-4*, a los que más adelante nos referiremos (ver revisiones por Adams y Cory, 1998; Hengartner, 2000).

El papel de las mitocondrias en la apoptosis es importante. Hay varios acontecimientos clave de la apoptosis que implican a las mitocondrias como, por ejemplo, la liberación de activadores de las caspasas (como el citocromo c), los cambios en el transporte de electrones, la pérdida de potencial transmembrana de las mitocondrias, la alteración de la oxidación-reducción y la participación de proteínas pro- y anti-apoptóticas de la familia *Bcl-2*. Las señales que actúan sobre las mitocondrias activando o inhibiendo tales sucesos y sus efectos en cascada permiten delinear varios patrones de muerte celular fisiológica (ver revisiones por Green y Reed, 1998; Hengartner, 2000).

En muchas ocasiones, las publicaciones científicas actuales sobre la apoptosis ignoran o silencian el origen genético de su concepto (ver, por citar un ejemplo, Marsden *et al.*, 2002). Posiblemente, a muchos investigadores que trabajan en el campo de la apoptosis ni siquiera les sonara los nombres de Sydney Brenner o de John E. Sulston al saltar a los medios de comunicación el día 7 de Octubre de 2002 cuando la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska emitió su comunicado de prensa anunciando la concesión del premio Nobel 2002 en Fisiología o Medicina. Sin embargo, según he podido consta-

tar en algunas revisiones importantes, a H. Robert Horvitz se le menciona más en tales trabajos.

Insisto, pues, que mi misión en esta sesión científica se concretará al comentario genético sobre los premios Nobel 2002 en Fisiología o Medicina por sus descubrimientos sobre “la regulación genética del desarrollo de los órganos y la muerte celular programada”, tal como explica el motivo de la concesión del galardón.

3. EL NEMATODO *CAENORHABDITIS ELEGANS* COMO MODELO EXPERIMENTAL

3.1. SYDNEY BRENNER

Sydney Brenner, nació en 1927 en la República de África del Sur, habiéndose trasladado al Reino Unido donde trabajó en el Medical Research Council de Cambridge. Tiene en la actualidad la nacionalidad británica. No hace muchos años se trasladó a los Estados Unidos donde fundó en 1996 en Berkeley, California, el Molecular Sciences Institute (MSI), un laboratorio de investigación independiente sin ánimo de lucro que combina la experimentación genómica con los modelos de computación. En palabras del propio centro, la misión del MSI es predecir el comportamiento de las células y los organismos en respuesta a cambios genéticos y ambientales definidos.

La figura científica de Sydney Brenner es extraordinaria, y no solamente por la que ha sido la razón de haberle otorgado ahora el premio Nobel; la verdad es que hacía ya 40 años que hizo méritos para ello como componente del grupo de científicos considerados como los fundadores de la Genética Molecular (ver Stent 1971; Stent y Calendar, 1978). Parece ser que él mismo decía con cierta amargura que era el único de ellos al que no se le había otorgado el premio Nobel. En una magnífica biografía periodística, Luis Corrochano –profesor de Genética en la Universidad de Sevilla que trabajó con Sydney Brenner a partir de enero de 1989– recordaba que Brenner había colaborado con el premio Nobel Francis H. Crick en la demostración

de que el código genético se lee en grupos de tres letras: los *codones*, según el término propuesto por el propio Brenner (Crick *et al.*, 1961). Asimismo, entre otras cosas, participó en la demostración experimental en 1961 de la existencia del ARN mensajero en colaboración con el premio Nobel François Jacob y Matthew Meselson (Brenner *et al.*, 1961) y en la demostración experimental (“principio de colinealidad”) en 1964 –utilizando las mutaciones *ambar* de los codones sin sentido en colaboración con Sarabhai (Sarabhai *et al.*, 1964)– de la “hipótesis de la secuencia” propuesta por Crick en 1958, que establecía la correspondencia entre la ordenación secuencial de las bases en el ADN y la secuencia de aminoácidos en las proteínas, que fue una de las ideas más fecundas de la historia de la Genética.

Como mencionaba anteriormente, la regla de oro de la investigación biológica, extensible obviamente a la investigación genética, se basa en los tres puntos siguientes: qué pregunta o problema se trata de resolver, en qué material biológico y mediante qué técnica y metodología. Como ya tuve ocasión de analizar en mi discurso de ingreso en esta Corporación (Lacadena, 1995), en la historia de los premios Nobel en relación con la Genética ha habido algunos galardonados que introdujeron nuevos organismos en la investigación, como son los casos de la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) introducida por Morgan, el moho del pan (*Neurospora crassa*) por Beadle y Tatum, los virus bacteriófagos (T-2, T-4) por Delbrück y Luria, las bacterias (*Escherichia coli*) por Lederberg y la levadura (*Schizosaccharomyces pombe*) por Nurse.

Este año de 2002 se ha otorgado el premio Nobel a Sydney Brenner, que tuvo la clarividencia de introducir en la investigación genética como nuevo organismo al nematodo *Caenorhabditis elegans* que, en palabras de la institución Nobel, es un organismo modelo experimental novedoso que proporciona una oportunidad única de unir el análisis genético a la división celular, la diferenciación y la organogénesis y que permitía seguir estos procesos bajo la observación del microscopio. Este gusano, de 1 mm de longitud, se cultiva en placas Petri sobre un medio de agar como las bacterias, tiene un

corto tiempo de generación (63 horas “de huevo a huevo”, a 20°C, según Sternberg y Horvitz, 1984) y, al ser transparente su cutícula, permite seguir los procesos de división celular bajo el microscopio con sistema de contraste de interferencia diferencial de Nomarski (en palabras de un comentarista, es como un “tubo de ensayo viviente”); además, se puede conservar en congelación por tiempo ilimitado. Biológicamente, este nematodo es hermafrodita con capacidad de autorreproducción, aunque también existen individuos masculinos. Su constitución cromosómica es $2n = 12,XX$ para los hermafroditas y $2n = 11,X0$ para los machos. Por su interés en la investigación genética, el genoma de *C. elegans*, de 97.000.000 pb, fue secuenciado en 1998 (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998) con la decisiva intervención, evidentemente no casual, de Sulston como Director del Sanger Centre de Cambridge. Su genoma contiene unos 19.000 genes, un número relativamente bajo tratándose de un organismo multicelular.

El paso decisivo en la comprensión de la muerte celular programada se debió a las investigaciones fundamentales realizadas por Brenner, Sulston y Horvitz con el nematodo *C. elegans* al descubrir que dicho proceso está regulado por unos genes concretos. En efecto, el organismo está formado por un número exacto de 1090 células somáticas de las que 131 morirán inexorablemente durante el proceso de desarrollo, de manera que esta muerte celular está controlada por un conjunto específico de genes. El individuo adulto está formado, pues, por 959 células.

Las bases genéticas del estudio del desarrollo del nematodo fueron establecidas por Brenner en 1974, demostrando que al inducir mutaciones con el mutágeno etil metanosulfonato (EMS) se podía establecer la relación biunívoca entre mutaciones génicas específicas con efectos concretos sobre el proceso de organogénesis. El trabajo de Brenner consistió en el aislamiento, análisis de complementación y mapeo de unas 300 mutaciones que afectaban a caracteres morfológicos y de comportamiento; unas 77 de estas últimas mutaciones alteraban el movimiento del gusano.

Según decía el propio Brenner en su trabajo pionero de 1974, él estaba interesado en el análisis genético del sistema nervioso, tratando de abordarlo con una metodología genética similar a la que se había utilizado con éxito en el análisis de las rutas biosintéticas de las bacterias o en los procesos de ensamblaje de los componentes proteicos de las cápsidas de las partículas virales. De hecho, en *Drosophila* ya Benzer había iniciado investigaciones con mutantes de comportamiento. Esta especie –que ostenta el honorífico atributo de ser una “reina fundadora” en la Genética– tenía la ventaja del profundo conocimiento genético que de ella se tenía, por un lado, y la posibilidad de utilizar el elegante método genético de análisis de mosaicos que permitirían descubrir las sedes anatómicas de las anomalías genéticas del sistema nervioso, por otro lado. Con estos antecedentes –decía Brenner– “hace unos ocho años, cuando me embarqué en estos problemas, decidí que lo que necesitaba era un organismo experimental que fuera susceptible para el estudio genético y en el que se pudiera determinar la estructura completa del sistema nervioso. *Drosophila*, con unas 10^5 neuronas, era demasiado grande y, buscando un organismo más sencillo, mi elección finalmente se decidió por el pequeño nematodo, *Caenorhabditis elegans*”. A partir de aquí concentró su trabajo en dos líneas de investigación: el desarrollo de métodos que permitieran determinar la estructura del sistema nervioso del gusano y establecer las características genéticas básicas de dicho organismo. En el primer estudio genético construyó el mapa genético mapeando unas cien mutaciones en los seis grupos de ligamiento de *C. elegans* (5 autosomas y el cromosoma sexual X). En 1974 publicó también otro trabajo, esta vez en colaboración con Sulston, también galardonado con este premio Nobel, en el que analizaban el ADN del gusano (Sulston y Brenner, 1974).

3.2. JOHN E. SULSTON

John E. Sulston, británico nacido en 1942, fue uno de los primeros colaboradores de Brenner para llevar adelante los estudios que éste había iniciado en *C. elegans*. Así, en el mismo año de 1974 publicaban juntos un artículo sobre la caracterización del ADN del nematodo, concluyendo que su

genoma tenía un total de 8×10^7 pb (20 veces el tamaño del de la bacteria *E. coli*), con un 83% de secuencias únicas y un contenido medio del 36% de (G+C) y cuantificando el número de secuencias correspondientes a genes que codifican para ARNt y ARNr mediante hibridación ADN-ARN (Sulston y Brenner, 1974). Muchos años más tarde, Sulston participaba como Director del Sanger Centre de Cambridge en el Consorcio Internacional que llevó a cabo en 1998 la secuenciación completa del genoma de *C. elegans* (97.000.000 pb), tal como he mencionado anteriormente.

Volviendo a la historia genética de *C. elegans*, la aportación fundamental de John E. Sulston consistió en desarrollar las técnicas que permitían seguir al microscopio todas las divisiones celulares que ocurrían desde el mismo cigoto hasta las 959 células somáticas que componen el organismo adulto. Sulston describió el linaje celular durante el desarrollo de parte del sistema nervioso del gusano, que supone un tercio del total de células somáticas del organismo, demostrando que es invariante; es decir, durante el desarrollo, todos los individuos de *C. elegans* siguen el mismo programa de divisiones celulares y diferenciación (Sulston y Horvitz, 1977; Sulston *et al.*, 1983).

De acuerdo con los trabajos de Sulston y de Horvitz, el desarrollo del nematodo puede resumirse de la siguiente manera (tomado de Gilbert, 2000; ver también Wolpert *et al.*, 2002): El cigoto de *C. elegans* experimenta una *división holoblástica rotacional*. Durante la división embrionaria temprana, cada división asimétrica produce una *célula fundadora* (denominadas AB, MS, E, C y D), que produce células descendientes diferenciadas, y una *célula troncal* (linajes celulares P1 a P4). En la primera división celular, el surco de división está desplazado asimétricamente hacia el polo posterior según el eje anterior-posterior, dando lugar a las células AB y P1. En la segunda división embrionaria, la célula AB se divide en dirección perpendicular al eje anterior-posterior, mientras que la célula P1 se divide transversalmente, dando lugar a otra célula fundadora (EMS) y a una células troncal posterior P2. El linaje

celular troncal siempre se divide transversalmente para dar lugar a una célula fundadora anterior y una troncal posterior que continúa el linaje celular.

Las células descendientes de cada célula fundadora se dividen en momentos específicos que son iguales en cualquier individuo en desarrollo hasta alcanzar el número exacto de 558 células en las larvas recién eclosionadas.

La determinación del eje anterior-posterior viene definida por la posición del pronúcleo espermático en el citoplasma del ovocito al producirse la fecundación. Otra nueva asimetría en el eje anterior-posterior es la debida a la migración hacia el polo posterior del cigoto de los gránulos polares (gránulos P) de compleja naturaleza ribonucleoproteica, que serán responsables de la diferenciación de las células germinales. En consecuencia, en la primera división los gránulos P quedan exclusivamente en la célula P1, los cuales, a su vez, pasarán a la célula P2 cuando se divida la célula P1. Sin embargo, durante la división de P2 y P3 los gránulos P se asocian con el núcleo que entra en el citoplasma P3. Finalmente, los gránulos P pasarán a la célula P4 cuya progenie celular dará lugar a los espermatozoides y óvulos del individuo adulto.

Por otro lado, la definición del eje dorsal-ventral se produce en la división de la célula fundadora AB que, al resultar más larga que ancha, lo cual produce un deslizamiento de las células hijas, dando lugar a una célula hija anterior (ABa) y otra posterior (ABp). Este deslizamiento hace que la célula ABp se coloque por encima de la célula fundadora EMS que resulta de la división de P1. La célula ABp define el futuro lado dorsal del embrión mientras que la célula EMS, precursora del músculo y del intestino, marcará la superficie ventral del embrión. Finalmente, el eje lateral derecha-izquierda se especificará en el estadio de 12 células cuando el blastómero MS (producido por la división de la célula fundadora EMS) entre en contacto con las "células nietas" de la célula ABa, distinguiendo el lado derecho y el izquierdo del cuerpo.

Como decía el comentario científico de la institución Nobel, como consecuencia de sus primeros estudios, Sulston llegó a demostrar que en el linaje celular se produce la muerte programada de determinadas células y que este suceso podía ser visualizado en el organismo vivo. Además, Sulston describió las etapas visibles de la muerte celular e identificó las primeras mutaciones de genes implicados en el proceso de muerte celular programada. Uno de estos genes, el *nuc-1*, codifica para una proteína necesaria para la degradación del ADN, que es una de las características del proceso.

3.3. H. ROBERT HORVITZ

La tercera fase de la historia genética del nematodo la llevó a cabo H. Robert Horvitz, norteamericano nacido en 1947, cuya aportación fundamental fue investigar si realmente existía un programa genético que controlara la muerte celular, identificando en 1986 los dos primeros “genes de la muerte” (*ced-3* y *ced-4*) cuya expresión es necesaria para que se produzca la muerte de la célula (Ellis y Horvitz, 1986). Posteriormente, Horvitz identificó otros genes, como el *ced-9*, que protegen a las células de la muerte interaccionando con *ced-3* y *ced-4*. Asimismo, identificó otros genes responsables de la eliminación de las células cuya muerte había sido genéticamente programada.

La proteína CED-4 es un factor activador de la proteasa CED-3 que inicia la destrucción de la célula. Las mutaciones que inactivan la proteína CED-9 originan la muerte de muchas células que deberían sobrevivir, pero que mueren al ser activados los genes *ced-3* y *ced-4*. Por el contrario, mutaciones de ganancia de función del gen *ced-9* permiten la síntesis de la proteína CED-9 de manera que sobreviven las células que estaban programadas para morir.

Las proteínas CED-3 y CED-4 constituyen el núcleo central de la ruta genética de la apoptosis que es común a todas las especies animales estudiadas. En mamíferos, las proteínas homólogas a la CED-9 son codificadas por genes de la familia *Bcl-2*, cuya semejanza funcional es tal que, por ejemplo, el gen humano *BCL-2* introducido en embriones de *C. elegans* impide la muerte programada de determinadas células durante el desarrollo embriona-

rio del nematodo (Vaux *et al.*, 1992). Este hecho pone de manifiesto que el proceso de apoptosis está evolutivamente conservado. De ahí la importancia que pueden tener las investigaciones llevadas a cabo en organismos como el nematodo para ser extrapoladas y aplicadas en la especie humana.

En este contexto es importante señalar que, como indican Vaux y Korsmeyer (1999), aunque el primer componente reconocido de un mecanismo de muerte celular fue el gen *Bcl-2* de mamíferos, la primera evidencia de que existía un programa genético específico para la muerte celular fisiológica se debió a los trabajos de Horvitz (Horvitz *et al.*, 1982; Ellis y Horvitz, 1986).

La proteína homóloga a la CED-4 en mamíferos es la Apaf-1 (por *apoptotic protease activating factor-1*) que participa en la activación dependiente de citocromo-c de las proteínas homólogas de la CED-3, la caspasa-9 y la caspasa-3.

Así como los nematodos deficientes para CED-4 son viables a pesar de tener un 15% más de células que los individuos normales, los ratones con mutaciones de pérdida de función en los genes que codifican para la caspasa-3 o la caspasa-9 sufren la muerte perinatal por crecimiento masivo celular del sistema nervioso. Por otro lado, ratones homocigotos para la delección del gen *Apf-1* presentan anomalías craneofaciales y sobrecrecimiento del cerebro, así como membranas interdigitales.

En los mamíferos existen varios patrones apoptóticos. Por ejemplo, la apoptosis de los linfocitos no es afectada por la delección de los genes *Apf-1* o *caspasa-9* y la cascada de acontecimientos genéticos apoptóticos se inicia por la proteína CD95 en la membrana plasmática del linfocito.

4. EPÍLOGO

Como señala Gilbert (2000), las 131 células que mueren como parte normal del desarrollo del nematodo podrían compararse con las 10^{11} células humanas que mueren diariamente en un individuo adulto y que son sustituidas por otras células, pudiéndose estimar que la masa celular perdida cada

año por muerte programada es equiparable al peso del individuo. Además, durante el desarrollo intrauterino se están generando y destruyendo células de forma continuada; incluso, se producen el triple número de neuronas de las que constituirán nuestro cerebro al nacer. La apoptosis es necesaria, no solamente para el adecuado espaciado y orientación de las neuronas sino, por ejemplo, para generar el espacio auditivo medio, la apertura vaginal o el espacio interdigital.

Como decía un comentarista de la revista *Nature*, algunos científicos ven en los premios Nobel de este año 2002 un significado de más largo alcance si los relacionamos con los premios Nobel en Fisiología o Medicina otorgados en 1995 y en 2001. Los primeros fueron los concedidos a Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard y Erick F. Wieschaus “por sus descubrimientos sobre el control genético del desarrollo temprano del embrión” en investigaciones realizadas en mutantes morfogenéticos de la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) y los segundos a Leland H. Hartwell, R. Timothy Hunt y Paul M. Nurse “por sus descubrimientos de los reguladores clave del ciclo celular” en investigaciones realizadas con levaduras (*Schyzosaccharomyces pombe*). En palabras de Gerald Rubin, “estos premios son el reconocimiento de que se pueden hacer importantes avances en la Medicina estudiando genéticamente organismos modelo dúctiles” como los insectos, las levaduras o los gusanos.

5. BIBLIOGRAFÍA

- (1) ADAMS, J.M.; CORY, S. (1998). The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science*, 281:1322-1326
- (2) ASHKENAZI, A.; DIXIT, V.M. (1998). Death receptors: Signaling and modulation. *Science*, 281:1305-1308
- (3) BRENNER, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77:71-94
- (4) BRENNER, S.; JACOB, F.; MESELSON, M. (1961). An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*, 190:576-580
- (5) CASCALES, M. (1997). Apoptosis, enfermedad y terapéutica. *Anales Real Academia de Doctores*, vol. 1, núm. 1:31-54

- (6) CORROCHANO, L. (2002). La especie humana, a vista de gusano. *El País*, 16 octubre 2002, pág. 35
- (7) CRICK, F.H.C. (1958). On protein synthesis. *Symp.Soc.Exp.Biol.*, 12:138-163
- (8) CRICK, F.H.C.; BARNNETT, L.; BRENNER, S.; WATTS-TOBIN, R.J. (1961). General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, 192: 1227-1232
- (9) ELLIS, H.M. ; HORVITZ, H.R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44:817-829
- (10) GILBERT, S.F. (2000). Developmental biology (Sixth edition). *Sinauer Associates, Inc. Publ., Sunderland, Ma.*
- (11) GREEN, D.R.; REED, J.C. (1998). Mitochondria y Apoptosis. *Science*, 281:1309-1312
- (12) GURA, T. (2001). Eyes on the prize. *Nature*, 413:560-564
- (13) HENGARTNER, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407:770-776
- (14) HORVITZ, H.R.; ELLIS, H.M.; STERNBERG, P.W. (1982). Programmed cell death in nematode development. *Neurosci. Commentaries*, 1:56-65
- (15) KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer*, 26:239-257
- (16) LACADENA, J.R. (1995). Historia “nobelada” de la Genética: Concepto y método. *Discurso de Ingreso como Académico de Número en la Real Academia de Farmacia*, 76 pp.
- (17) LOCKSHIN, R.; WILLIAMS, C. (1965). programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J. Insect Physiol.*, 11:803-809
- (18) MARSDEN, V.S.; O’CONNOR, L.; O’REILLY, L.A.; SILKE, J.; METCALF, D.; EKERT, P.G.; HUANG, D.C.S.; CECCONI, F.; KUIDA, K.; TOMASELLI, K.J.; ROY, S.; NICHOLSON, D.W.; VAUX, D.L.; BOUILLET, P.; ADAMS, J.M.; STRASSER, A. (2002). Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9-apoptosome. *Nature*, 419:634-637
- (19) SARABHAI, A.S. ; STRETTON, A.O.W. ; BRENNER, S. ; BOLLE, A. (1964). Colinearity of the gene with the polypeptide chain. *Nature*, 201:13-17

- (20) SULSTON, J.E. ; BRENNER, S. (1974). The DNA of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77 :95-104
- (21) SULSTON, J.E. ; HORVITZ, H.R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, 56:110-156
- (22) SULSTON, J.E. ; SCHIERENBERG, E. ; WHITE, J.G. ; THOMSON, J.N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, 100:64-119
- (23) STENT, G.S. (1971). Molecular Genetics. An introductory narrative. *W.H.Freeman and Co., San Francisco*
- (24) STENT, G.S.; CALENDAR, R. (1978). Molecular Genetics. An introductory narrative (Second edition). *W.H.Freeman and Co., San Francisco*
- (25) STERNBERG, P.W.; HORVITZ, H.R. (1984). Genetic control of cell lineage during nematode development. *Ann. Rev. Genet.*, 18:489-524
- (26) THE *C. ELEGANS* SEQUENCING CONSORTIUM. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science*, 282:2012-2018
- (27) THORBERRY, N.A.; LAZEBNIK, Y. (1998). Caspases: Enemies within. *Science*, 281:1312-1316
- (28) VAUX, D.L.; KORSMEYER, S.J. (1999). Cell death in development. *Cell*, 96:245-254
- (29) VAUX, D.L.; WEISSMAN, I.L.; KIM, S.K. (1992). Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science*, 258:1955-1957
- (30) WOLPERT, L.; BEDDINGTON, R.; JESSELL, T.; LAWRENCE, P.; MEYEROWITZ, E.; SMITH, J. (2002). Principles of Development (Second edition), *Oxford University Press, Oxford*

Anal. Real Acad. Nal. Farm., 2003, 69:

Bases moleculares de la apoptosis

MARÍA CASCALES ANGOSTO

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Introducción

La muerte celular programada es un proceso celular fundamental que es esencial para el desarrollo y para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos. Su misión es eliminar las células superfluas, dañadas, infectadas o transformadas. Esta forma de muerte celular o apoptosis se realiza mediante la activación de un programa intrínseco y se caracteriza por el mantenimiento de las membranas celulares intactas permitiendo así su eliminación por fagocitosis. Las células que sufren apoptosis exhiben una morfología característica que incluye condensación citoplasmática y nuclear, la rotura específica de proteínas celulares, la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos, y la rotura endolítica del DNA en fragmentos oligonucleosómicos. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos o incluso por células vecinas. Las señales que desencadenan la apoptosis incluyen, daño celular causado por radiaciones ionizantes, infección vírica o señales extracelulares. En el programa de suicidio celular interviene la transcripción de genes específicos y su traducción, lo cual permite suprimir tal suicidio inhibiendo tanto la transcripción como la traducción. Estos hechos demuestran que la muerte celular programada o apoptosis está mediada por mecanismos celulares intrínsecos.

La apoptosis implica una programación genética de la célula que promueve una cascada dependiente de energía de cambios morfológicos y bioquímicos en el interior de la célula que conducen a su muerte y eliminación

La mayor parte del conocimiento que hoy tenemos de la genética molecular de la apoptosis proviene de investigaciones sobre el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Se trata de un nematodo hermafrodita, cuyo ejemplar adulto, de 1 mm de longitud, se forma a partir de 1090 células somáticas de las cuales 131 mueren por apoptosis. En este gusano se han observado cuatro fases en la apoptosis: decisión si una célula ha de morir; muerte; fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por los macrófagos y degradación de los cuerpos fagocitados.

Necrosis y Apoptosis

A nivel celular existen dos formas de morir: por necrosis o por apoptosis. Por necrosis mueren las células accidentalmente cuando son lesionadas por agresión mecánica o tóxica. Por apoptosis mueren las células cuando son inducidas a suicidarse

En la muerte por necrosis se detectan una serie de cambios característicos:

- Las células y sus orgánulos se hinchan porque se altera la capacidad de la membrana plasmática para controlar el paso de los iones y el agua;
- las células se rompen y su contenido se vierte al espacio intercelular;
- se origina inflamación de los tejidos adyacentes.

Las células que son inducidas a sufrir apoptosis o suicidio celular presentan las características siguientes:

- reducen su tamaño,
- sus mitocondrias se abren y dejan salir el citocromo c,
- en la superficie celular surgen una especie de vejigas
- se degrada la cromatina (DNA y proteínas) de sus núcleos

- se rompen en fragmentos rodeados de membrana, denominados cuerpos apoptóticos
- La fosfatidil serina, fosfolípido que se encuentra en la cara interna de la membrana, se expone en la superficie
- La fosfatidil serina se une a receptores de las células fagocíticas (macrófagos y células dendríticas) que fagocitan los cuerpos apoptóticos
- Las células fagocíticas segregan citoquinas que inhiben la inflamación (Figura 1)

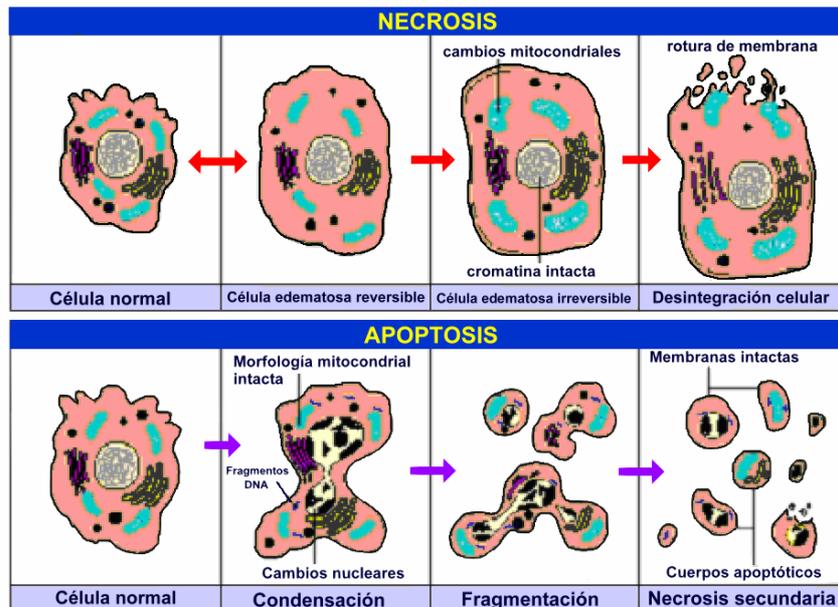


Figura 1.- Diferencia entre necrosis y apoptosis

En la muerte por apoptosis, la serie de acontecimientos sucede de manera tan ordenada, que este proceso de suicidio celular se denomina muerte celular programada. Pueden diferenciarse varias fases en la apoptosis:

Fase efectora, adopción sin retorno del compromiso hacia la muerte. Se caracteriza por el aumento en el contenido de Ca^{++} intracelular, que origina la activación de ciertos grupos enzimáticos (endonucleasas y proteasas -caspasas), junto con cambios en el citoesqueleto celular que producen cambios en el tamaño y forma celular.

Fase degradativa, se degradan las proteínas y los ácidos nucleicos y hay cambios en la membrana celular. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos impidiendo la salida del contenido celular al exterior y evitando inflamación. En esta fase las endonucleasas se encargan de fragmentar el DNA, las caspasas degradan las proteínas, se producen cambios marcados en el citoesqueleto, y se condensa la cromatina.

Fase de eliminación, los macrófagos fagocitan los cuerpos apoptóticos, atraídos por ligandos específicos de la fosfatidilserina, presentes en la superficie de las células apoptóticas.

Existen dos razones diferentes para explicar por qué las células mueren por apoptosis: La eliminación de células en exceso y la eliminación de células que representan un peligro para la integridad del organismo

Ejemplos de eliminación de células en exceso:

- La reabsorción de la cola de los renacuajos
- La eliminación de las membranas interdigitales en la formación de los dedos en el feto.
- Para llegar al estado adulto el nematodo el *C.elegans* tiene que perder por apoptosis 131 células
- La eliminación del endometrio al iniciarse la menstruación
- La formación de las sinapsis entre neuronas en cerebro requiere la eliminación por apoptosis de una serie de células.

Ejemplos de eliminación de células que representan un peligro para la integridad del organismo

- *Células infectadas con virus*, son destruidas por los linfocitos T citotóxicos.
- *Células del sistema inmune*. Después de la respuesta inmune, las células efectoras han de ser eliminadas para prevenir que ataquen a los constituyentes propios del organismo. Los linfocitos T citotóxicos inducen la apoptosis en cada una de las distintas células del sistema inmune e incluso en ellas mismas. Cualquier defecto en la maquinaria apoptótica de estas células inmunes, se encuentran asociados con enfermedades autoinmunes tales como el lupus eritematosus o la artritis reumatoide.
- *Células con DNA lesionado*. La lesión en su genoma hace que las células puedan llegar a desarrollar cáncer. Las células responden a la lesión al DNA incrementando la producción de p53, un poderoso inductor de la apoptosis. Las mutaciones en p53 producen una proteína defectiva que a menudo se detecta en células cancerosas.
- *Células cancerosas*. La radioterapia y la quimioterapia inducen la apoptosis en algunos tipos de cáncer.

Inducción de la apoptosis

Para que una célula sea inducida a morir por apoptosis se necesita que dicha célula deje de recibir señales de supervivencia y comience a recibir señales de muerte. Las señales estimuladoras de la supervivencia son necesarias para que las células se mantengan vivas. Estas señales han de ser continuas y proceden de otras células. Entre estas señales positivas están los factores del crecimiento y las hormonas. En ciertos tipos de células hematopoyéticas, el crecimiento y la supervivencia depende de la presencia continua de factores del crecimiento (CSF, factores estimuladores de colonias), y la eliminación de ellos conduce irremediablemente a la apoptosis en lugar de a la cesación del crecimiento.

Las señales de muerte que conducen a la apoptosis son muy diversas: elevados niveles de oxidantes en el interior de la célula; lesión del DNA por oxidantes, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, fármacos quimioterapéuticos, etc.; moléculas que se unen a receptores específicos

en la superficie de la célula y transmiten señales para iniciar el programa apoptótico. Entre estos activadores de muerte se encuentran el TNF α que se une al TNFR, el ligando Fas (FasL) que se une al receptor Fas, denominado también CD95, etc.

La apoptosis está conducida por dos clases de proteasas especializadas, las caspasas iniciadoras y las caspasas efectoras. Las caspasas, verdaderas guillotinas moleculares, son cisteína proteasas que se expresan como zimógenos inactivos y que se procesan a estado activo por proteólisis. Las caspasas iniciadoras se activan después de un estímulo apoptótico por autoproteólisis. Las caspasas efectoras o ejecutoras se activan por las caspasas iniciadoras en una cascada amplificadora. La activación de las caspasas es una etapa crucial para la activación de la apoptosis cualquiera que sea el estímulo. Son las verdaderas ejecutoras de la apoptosis y presentan las características siguientes:

1. son cisteína proteasas específicas de aspartato porque tienen cisteína como grupo nucleofílico para la rotura del sustrato y tienen un requerimiento específico por el residuo aspartato (D) de sus sustratos que los rompen en los enlaces D-X,
2. son sintetizadas como procaspasas que adquieren su actividad por proteólisis,
3. efectúan la proteólisis en una serie específica de sustratos, proceso que es irreversible y,
4. las caspasas y sus inhibidores siempre coexisten en las células normales, lo cual previene de una activación accidental que supondría una muerte innecesaria de células normales.

Las procaspasas (30-50kD) contienen tres dominios: un prodominio N- terminal, una subunidad grande (p20) y una subunidad pequeña (p10). Hasta la fecha se han identificado 14 caspasas de mamíferos. En base a la similitud de la secuencia entre los dominios de las subunidades, estas caspasas se dividen en tres grupos: El grupo *inflamatorio* que comprende a las caspasas -1, -4, -5, -11, -12, -13, -14, el grupo *iniciador* de la apoptosis que incluye las caspasas -2, -8, -9, -10, y el grupo *efector o ejecutor* de la apoptosis que incluye a las restantes

Las caspasas inflamatorias y las iniciadoras poseen prodominios largos, excepto para la 14 que no lo tiene o lo tiene muy corto. El prodominio largo contiene el dominio efector de muerte (DED) o el dominio de reclutamiento de las caspasas (CARD). DED y CARD se parecen al dominio de muerte (DD); y los tres pertenecen a la superfamilia de los dominios de muerte. Estos dominios median las interacciones proteína-proteína entre las procaspasas y sus adaptadores y juegan importantes papeles en la activación de las procaspasas. Por el contrario, los prodominios cortos de las caspasas ejecutoras no es probable que puedan mediar interacciones entre proteínas.

Ha sido determinada la estructura tridimensional de las caspasas -1, -3, y -8: Se componen de dos heterodímeros (p10 -p20) que se unen para formar un tetrámero dispuesto en dirección opuesta, con las dos subunidades pequeñas adyacentes rodeadas por las dos subunidades grandes. Cada heterodímero contiene un sitio activo al que contribuyen las dos subunidades con residuos necesarios para la unión al sustrato y la catálisis (figura 2).

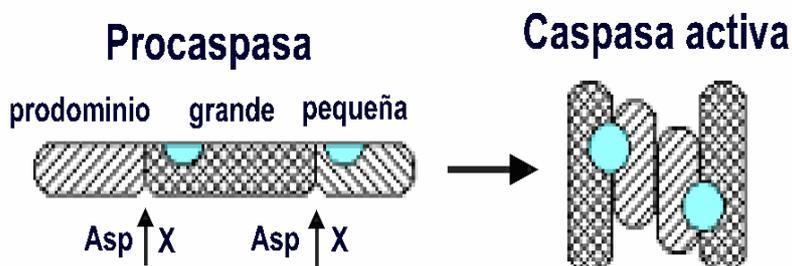


Figura 2. Activación of procaspasas. Procaspasa contiene tres dominios: un prodominio, una subunidad grande y otra pequeña. La procaspasa es inactiva y una vez que sufre dos roturas proteolíticas se separan las tres subunidades. La subunidad grande y la pequeña forman un heterodímero por unión de sus sitios activos. La unión de dos heterodímeros se verifica en dirección opuesta con dos subunidades pequeñas adyacentes rodeadas por las subunidades grandes.

La capacidad proteolítica de las caspasas activas conduce a la degradación de una serie de proteínas y lleva consigo las misiones siguientes:

- cortar contactos con células vecinas,
- reorganizar el citoesqueleto,
- activar las endonucleasas (fragmentación del DNA),
- desmantelar las láminas nucleares (condensación),
- expresar señales de fagocitosis (fosfatidilserina), y
- activar proteínas específicas para preparar a la célula para el cese de las funciones metabólicas.

En general, son dos las vías que conducen a la activación de las caspasas. Una es la mediada por ligandos que se unen a receptores en la superficie celular; y la otra es la mediada por estrés celular o por lesión en el DNA. Estas dos vías, también denominadas extrínseca e intrínseca, respectivamente, pueden solaparse, aunque, la transducción de señales es diferente.

La vía intrínseca, requiere la disrupción de la membrana mitocondrial y la liberación de proteínas mitocondriales tales como el citocromo c y smac/diablo. El citocromo c funciona uniéndose a Apaf-1 (factor activador de la proteasa apoptótica) para inducir la activación de la caspasa-9 y con ello la cascada de las caspasas, mientras que smac/diablo se une y antagoniza al inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP). La permeabilización de la membrana mitocondrial se regula por las acciones opuestas de los miembros de la familia Bcl-2. Las proteínas multidominios pro-apoptóticas Bcl-2, como Bax y Bak, pueden activarse directamente por interacción con la proteína Bid que posee solo el dominio BH3. Alternativamente, la unión de otras proteínas apoptóticas, solo BH3, como Noxa, Puma, Bad y Bim a las antiapoptóticas Bcl2 y BclXL, origina la inactivación de Bax y Bak. La liberación regulada de factores pro-apoptóticos de la mitocondria causa la inducción de las caspasas iniciadoras y efectoras o ejecutoras y una pérdida del potencial de membrana mitocondrial.

La extrínseca se inicia por unión de un ligando con su receptor transmembrana (FAS, TNFR, TRAIL, etc) para activar a las caspasas iniciadoras (caspasas-9 y -10), que a su vez, activan por proteólisis a las caspasas ejecutoras o efectoras, tales como las caspasas-3 y -7. Esta vía puede ser regulada por diferentes factores, entre ellos el inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP) que afecta a las caspasas iniciadoras y a las ejecutoras.

Apoptosis desencadenada por señales internas: vía intrínseca o mitocondrial

La apoptosis inducida por señales intrínsecas o apoptosis inducida por estrés, se inicia en la mitocondria con la salida del citocromo c. Los mecanismos de lesión mitocondrial en respuesta a diferentes situaciones de estrés es un tema que se encuentra en debate. Sin embargo, la activación de Bax, mediada por p53, parece que en la actualidad está ganando adeptos, y puede servir como paradigma para explicar la alteración mitocondrial activada por estrés. Bax se ha demostrado que se asocia con el complejo de poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (MPTPC), que se forma por el transportador de adenín nucleótido (ANT), el canal aniónico mitocondrial dependiente de voltaje (VACN) y la ciclofilina D. El poro MPTPC participa en la regulación del calcio, el pH, el potencial de la membrana ($\Delta\Psi_m$), y el volumen mitocondrial y funciona como un canal aniónico. Se ha demostrado que la proteína proapoptótica Bax puede inducir la apertura del poro al formar un complejo con ANT que se localiza en la membrana interna mitocondrial. La apertura del poro trae consigo un descenso en $\Delta\Psi_m$ y la salida de factores apoptóticos entre los que se incluye:

1. el citocromo c, que desencadena la activación de las caspasas,
2. el smac/diablo, que bloquea la acción de las proteínas inactivadoras de la apoptosis (IAP) y
3. el factor inductor de la apoptosis (AIF) que estimula la apoptosis a nivel nuclear independientemente de las caspasas.

La salida al citosol del citocromo c desencadena la apoptosis vía caspasa-9 y Apaf-1. Sin embargo, se han descrito muy recientemente va-

rios modelos alternativos para explicar la apoptosis mitocondrial. Por ejemplo, se ha demostrado que la salida del citocromo c puede ocurrir en momentos previos a la apertura del poro de permeabilidad transitoria y a la pérdida del potencial de membrana, y que Bax puede promover esta salida sin implicar al poro.

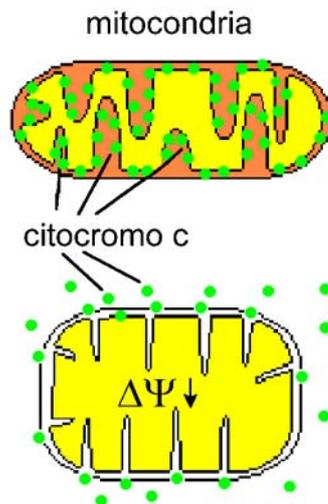


Figura 3. Salida del citocromo c de la mitocondria por apertura del poro de permeabilidad transitoria.

En una célula sana la membrana externa de la mitocondria expresa la proteína Bcl-2 en su superficie. Bcl-2 se une a una molécula de proteína denominada Apaf-1 (factor activador de las proteasas apoptogénicas). De esta manera Apaf-1 se mantiene en forma inactiva. Cualquier alteración del equilibrio interno de la célula, por ejemplo elevación de las especies reactivas de oxígeno, causa que la mitocondria libere citocromo c. A su vez Bcl-2 deja libre a Apaf-1 que se une al citocromo c

La salida de la mitocondria señala un nuevo papel para el citocromo c. Dentro de la mitocondria en la cadena de transporte electrónico, el citocromo c se encuentra generando energía necesaria para la vida de la célula. Fuera de la mitocondria el mismo citocromo c es un activador de

muerte. El objetivo citosólico del citocromo c es el homólogo del CED-4, el Apaf-1 (Figura 3).

El citocromo c en el citosol se une al terminal C del Apaf-1 en la región que contiene múltiples motivos WD-40. Esta unión facilita la unión del dATP a Apaf, la molécula se abre y expone una superficie de oligomerización. Apaf-1 oligomeriza lo cual va acompañado por un reclutamiento simultáneo de procaspasa-9 al motivo CARD del terminal N de Apaf-1. Parece ser que la activación de la caspasa-9 dentro del complejo apoptosoma se consigue mediante proteólisis autocatalítica.

Estudios de filtración sobre gel revelan que el Apaf-1 se incorpora a un complejo de elevado peso molecular después de activarse mediante la adición del citocromo c y dATP a su molécula. El Apaf-1 monomérico tiene un peso molecular de 130 kD. No está aún claro el número de monómeros Apaf-1 que oligomerizan. En la figura se muestra un heptámero. Se sabe que la relación entre las moléculas de procaspasa-9 y Apaf-1 es de 1:1, pero se desconoce la relación entre el Apaf-1 y el citocromo c.

Se sugiere que Apaf-1 es un regulador alostérico de la caspasa-9, ya que uno y otra funcionan como subunidades de un holoenzima, el apoptosoma, en el que la capacidad de las moléculas de Apaf-1 limita la actividad proteolítica de la caspasa-9. La procaspasa-9 sufre una autoproteólisis, se vuelve activa y activa, a su vez, a otras caspasas. La activación secuencial de una caspasa por otra, crea una cascada expansiva de actividad proteolítica, que conlleva la digestión de proteínas estructurales en el citoplasma, la degradación del DNA cromosómico y la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos.

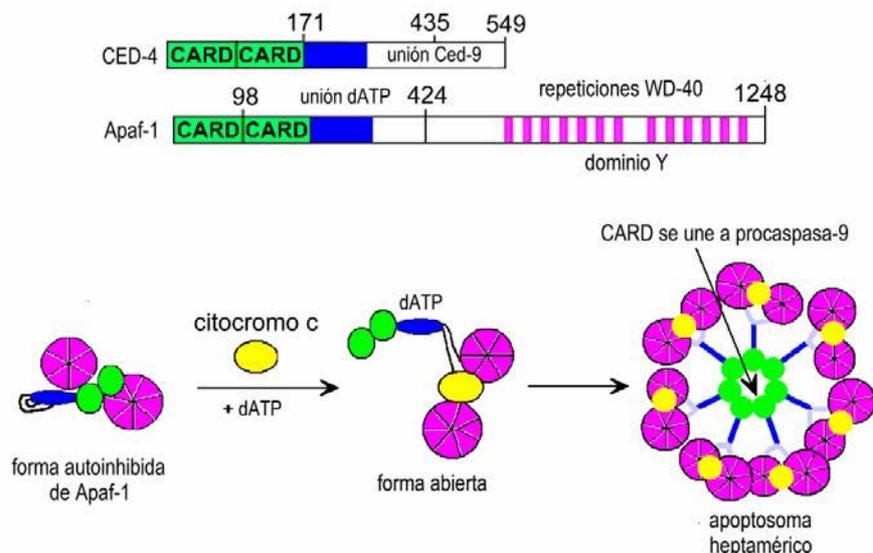


Figura 4. Formación del apoptosoma. El Apaf-1, factor activador de proteasas apoptóticas, está formado por tres dominios: dominio CARD o de reclutamiento de caspasas, dominio de unión al dATP y dominio Y de repeticiones WD-40. En condiciones normales se encuentra en el citosol en forma inerte. Una vez recibidas por la célula las señales de muerte, el citocromo sale de la mitocondria. Al unirse el citocromo c y el dATP a la molécula de Apaf-1, ésta se activa y se abre dejando al exterior la superficie de oligomerización. Varias unidades Apaf-1 se unen formando el apoptosoma. En esta figura son siete moléculas de Apaf-1 que se han unido dejando la zona CARD en el centro que es donde va a unirse el prodominio N-terminal de las procaspasas-9

Apoptosis desencadenada por señales externas: vía extrínseca mediada por receptor

Después de la activación de un receptor de los denominados de muerte, la proteína adaptadora FADD media la inmediata activación de la caspasa-8 (caspasa iniciadora). La caspasa-8 una vez activada, desencadena su vez, la activación de otras caspasas, entre las que se incluye la caspasa-3 (caspasa ejecutora). Sin embargo, paralelamente, la caspasa-8 puede activar la vía apoptótica mitocondrial al activar la proteína Bid, la cual puede promover la salida del citocromo c de la mitocondria y activar

la caspasa-9. Al igual que la caspasa-8, la caspasa-9 iniciadora activa a las caspasas ejecutoras.

Los receptores de muerte más conocidos son el Fas y el TNFR1 (receptor TNF). Son proteínas transmembrana con sus dominios receptores expuestos en la superficie de la célula (figura 6). La unión de un activador complementario o ligando, FasL y TNF (factor de necrosis tumoral), respectivamente, transmite una señal al citoplasma que conduce a la activación de la caspasa-8. La caspasa-8 al igual que la caspasa-9 inicia una cascada amplificadora de activación que conduce al desmantelamiento celular, a la formación de cuerpos apoptóticos y a la fagocitosis de la célula.

Son estos, por tanto, receptores de la superficie celular que transmiten las señales apoptóticas que se inician por unión del ligando específico. Estos receptores juegan un papel importante en la apoptosis ya que pueden activar la cascada de caspasas en pocos segundos después de la unión de ligando y receptor. Los receptores de muerte pertenecientes a la superfamilia de los factores de necrosis tumoral (TNF) poseen generalmente otras funciones además de la de ser apoptogénicos. Los mejores caracterizados son el FAS o CD95, el TNFR-1 y los TRAIL DR4 y DR5

La señalización por el TNFR-1 se produce en células T activadas por macrófagos en respuesta a infección. La unión de TNF α al TNFR-1 da lugar a la trimerización del receptor y a la agrupación de dominios intracelulares. Esto permite la unión de una molécula adaptadora denominada TRADD.

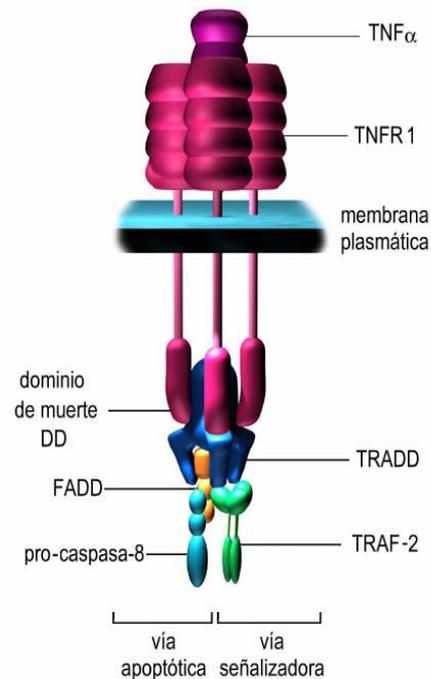


Figura 5. Señalización de la apoptosis por el receptor TNFR1

El factor TNF se produce por las células T y por los macrófagos activos en respuesta a la infección. La unión del TNF al TNFR1 ejerce diversos efectos (Figura 5). El efecto señalizador conduce a la activación de los factores de transcripción NF κ B y AP-1 lo que conlleva a la inducción de una serie de genes proinflamatorios e inmunomoduladores. En algunas células, sin embargo, el TNF puede inducir la apoptosis.

La unión de TNF α a su receptor TNFR1 origina la trimerización del receptor y el agrupamiento de dominios de muerte intracelulares. Esto permite la unión de un adaptador intracelular denominado TRADD o dominio de muerte asociado al TNFR, vía interacciones entre los dominios de muerte. El dominio TRADD posee la capacidad de reclutar una serie de proteínas diferentes en el receptor activo. La unión de TRAF2 o factor asociado al TNF origina la activación de la vía NF κ B y JNK/Ap1.

El dominio TRADD puede también asociarse con FADD y de esta manera se induce la apoptosis mediante el reclutamiento y rotura de la procaspasa-8.

Cuando las células T citotóxicas reconocen la célula objetivo (infectada), producen el ligando Fas (FasL) en su superficie. Éste ligando se une al receptor Fas en la superficie de la célula infectada, conduciéndola a la muerte por apoptosis. Las etapas tempranas en la apoptosis son reversibles. En algunos casos, la destrucción final de la célula solo puede ser garantizada después de su fagocitosis (Figura 6)

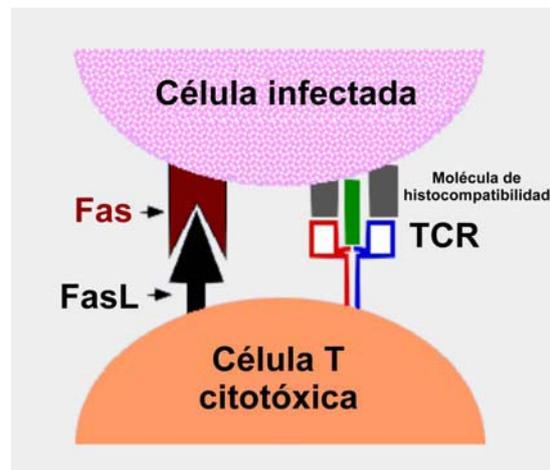


Figura 6.- Vía utilizada por las células T citotóxicas para inducir la apoptosis en células infectadas.

La señalización por el receptor Fas se verifica en estos tres casos:

- muerte de las células infectadas mediada por células T citotóxicas;
- deleción de células T activas al final de la respuesta inmune y
- destrucción de células inflamatorias e inmunes en sitios inmunes privilegiados.

La activación de la apoptosis a través de la señalización por FasL se verifica de manera similar a la del TNF. El ligando Fas (FasL) es un

trímero que en asociación con el receptor Fas promueve su trimerización que, a su vez, origina un agrupamiento intracelular de partes del receptor denominadas dominios de muerte (DD, death domains). Esto permite que una proteína adaptadora FADD (Fas-associated death domain) se asocie con el receptor mediante una interacción entre dominios de muerte homólogos sobre el receptor y sobre FADD. Además de contener un DD, FADD contiene un dominio efector de muerte (DED, death effector domain). Este permite la unión de la procaspasa-8. La pro-caspasa-8 se asocia al DED de FADD y se rompe para producir la caspasa-8 activa.

Factor inductor de la apoptosis (AIF)

Se ha clonado una molécula nueva asociada con la apoptosis denominada factor inductor de la apoptosis (AIF). Al igual que el citocromo c, AIF se localiza en la mitocondria y sale de ella en respuesta a un estímulo de muerte. Se ha demostrado recientemente que la inactivación genética de AIF vuelve a las células embrionarias resistentes a la muerte celular inducida por privación de suero (factores de supervivencia). Además, el AIF es esencial para la apoptosis en la morfogénesis del ratón. La muerte celular dependiente del AIF muestra características típicas de la apoptosis y puede ser desacoplada genéticamente de la expresión de Apaf1 y caspasa-9.

El AIF es una proteína que reside normalmente en el espacio intermembranal de la mitocondria. Este factor de 57 kD, posee una secuencia de aminoácidos que presenta homología con la ferredoxina bacteriana y con las NADH-oxidoreductasas. Procede de un propeptido de 67 kD que contiene una secuencia de localización mitocondrial entre sus 120 primeros aminoácidos. El AIF maduro contiene un MLS putativo (secuencia de localización mitocondrial). Cuando la célula recibe una señal o mediante la inducción de la apoptosis con estaurosporina, el AIF sale de la mitocondria, del mismo modo que el citocromo c, y se dirige al núcleo; allí se une al DNA y desencadena la destrucción del DNA y la muerte celular. En núcleos aislados, el AIF recombinante induce la condensación de cromatina y la fragmentación del DNA en fragmentos de 50 kb, pero no induce la rotura oligonucleosómica.

Efectos nucleares

La degradación del DNA cromosómico en fragmentos oligonucleosómicos es una de las características de la apoptosis. La fragmentación del DNA en células apoptóticas fue descrita por Willie en 1980. Estímulos apoptóticos como el etopósido, radiaciones UV o gamma, inducen la fragmentación del DNA que puede detectarse por electroforesis de gel de agarosa y observar las repeticiones de 200 kb en forma escalonada, que corresponden a las proteínas de las histonas en los cromosomas. Como las roturas en la doble cadena de DNA, aunque sean pocas, incapacita a la célula a sufrir mitosis, la fragmentación del DNA puede considerarse como una definición de muerte por apoptosis. Sin embargo, en algunos sistemas apoptóticos inducidos por Fas, se ha observado que las células enucleadas artificialmente pueden morir por apoptosis, lo que demuestra que el núcleo y la cromatina no son siempre necesarios.

La degradación oligonucleosómica del DNA en el núcleo de células apoptóticas se consigue mediante la acción de caspasas activas. El proceso de fragmentación lo realiza una DNasa activada por caspasa, denominada CAD. Cuando CAD se sintetiza, ICAD se une a la cadena nascente de CAD para permitir su correcto plegamiento. ICAD permanece formando complejo con CAD, lo cual inhibe la actividad DNasa de CAD y enmascara su señal de localización nuclear manteniendo a CAD en el citoplasma. Por tanto, en condiciones normales CAD existe como complejo inactivo formando complejo con ICAD (inhibidor de CAD). Cuando el estímulo apoptótico activa las caspasas, incluyendo a la caspasa-3, se rompe la unión ICAD/CAD, y una vez que CAD queda libre puede entrar en el núcleo y actuar como Dnasa con una elevada actividad específica, comparable o mayor que la Dnasa I o Dnasa II, y degrada rápidamente al DNA cromosómico. ICAD no es un inhibidor, más bien es una carabina molecular, porque CAD solo se expresa en presencia de ICAD.

Otros procesos se encuentran en asociación con la CAD para acelerar la apoptosis. Por ejemplo.

- la inactivación de enzimas implicadas en la reparación del DNA,

- la inactivación de enzimas implicadas en la replicación del DNA, y
- la rotura de proteínas nucleares estructurales.

El enzima poli(ADP-ribosa) polimerasa o PARP, fue la primera proteína identificada como sustrato de las caspasas. PARP está implicada en la reparación del DNA dañado, y funciona catalizando la síntesis de poli(ADP-ribosa), que se une a las cadenas rotas de DNA y modifica a las proteínas nucleares. Esta capacidad de reparar las lesiones del DNA desaparece por efecto de las caspasas.

La DNA topoisomerasa II es un enzima nuclear esencial para la replicación y reparación del DNA. Las caspasas inactivan este enzima y conducen a la lesión del DNA.

Las laminas son proteínas intranucleares que mantienen la forma del núcleo y median interacciones entre la cromatina y la membrana nuclear. La degradación de las laminas por la caspasa-6 origina la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear, normalmente observada en células apoptóticas.

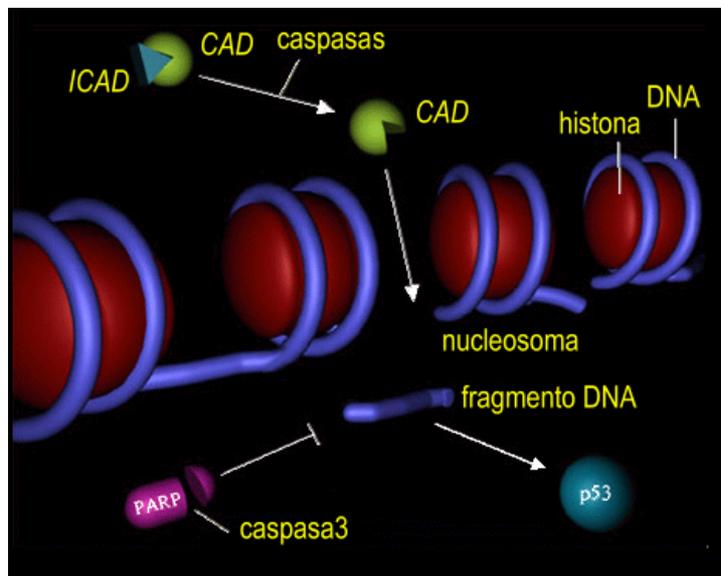


Figura 7. Degradación del DNA.

Activadores e inhibidores de la apoptosis

Siendo la apoptosis un proceso activo y estrictamente regulado, existen diversos activadores (citocromo c, smac/diablo, AIF, BIR3) y reguladores negativos (IAP, Hsp, Bcl-2 y BclXL, etc). La apoptosis puede ser bloqueada por inhibidores de la síntesis de RNA y proteínas, lo que demuestra que, para su iniciación y progresión, son necesarias una serie de proteínas. El análisis genético del *C. elegans*, ha revelado la existencia de una serie de genes y proteínas implicadas en el control de la apoptosis.

La activación del apoptosoma se encuentra estrechamente controlada por proteínas de la familia Bcl-2 asociadas a la mitocondria, algunas de las cuales son apoptóticas y otras antiapoptóticas. Las células están protegidas frente a los factores antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (relacionados con CED-9), los cuales limitan el reclutamiento de los componentes del apoptosoma. Son factores antiapoptóticos la proteína Hsp70 y las IAP. La Hsp70 secuestra Apaf-1 y con ello impide la formación del apoptosoma, y las IAP que bloquean la actividad de las propias caspasas.

La inhibición de la apoptosis es importante en el mantenimiento de la homeostasis de los organismos superiores. Durante el ciclo de vida normal la proteína inhibidora IAP, tiene una amplia capacidad *antiapoptótica* por silenciar la actividad de las caspasas. IAP fue identificada como proteína vírica que inhibe la muerte celular. Se caracteriza por poseer uno o más dominios muy conservados de 70 aminoácidos que contienen motivos de dedo de zinc, denominados repeticiones baculovíricas (BIR) esenciales para la actividad antiapoptótica. Existen unos cinco miembros de esta familia: cIAP1, cIAP2, XIAP, NAIP y survivina. Su acción es bloqueada por smac/diablo

El miembro prototipo de la familia Bcl-2 es un oncogen, identificado en leucemia humana de células B (B cell leukemia). Existen proteínas Bcl-2 proapoptóticas y antiapoptóticas, lo cual indica que miembros de la misma familia pueden actuar como oncogenes o como supresores de tumores. La familia Bcl-2 se divide en tres grupos según los dominios BH (Bcl-2 homology) que las integran:

1. Antiapoptóticas y oncogénicas, las que comparten homología de secuencia en los dominios BH1, BH2, BH3, y BH4. Ejemplos: Bcl-2 y Bcl-XL;
2. Proapoptóticas, las que comparten la homología de los dominios B1, B2 y B3. Ejemplos Bax y Bak;
3. Proapoptóticas, las que comparten la secuencia de homología solo en el dominio BH3. Ejemplos Bid, Bik y Bim.

Se ha demostrado que el dominio BH4 se requiere para la actividad apoptótica y que el dominio BH3 es esencial y suficiente para la actividad proapoptótica y supresora tumoral

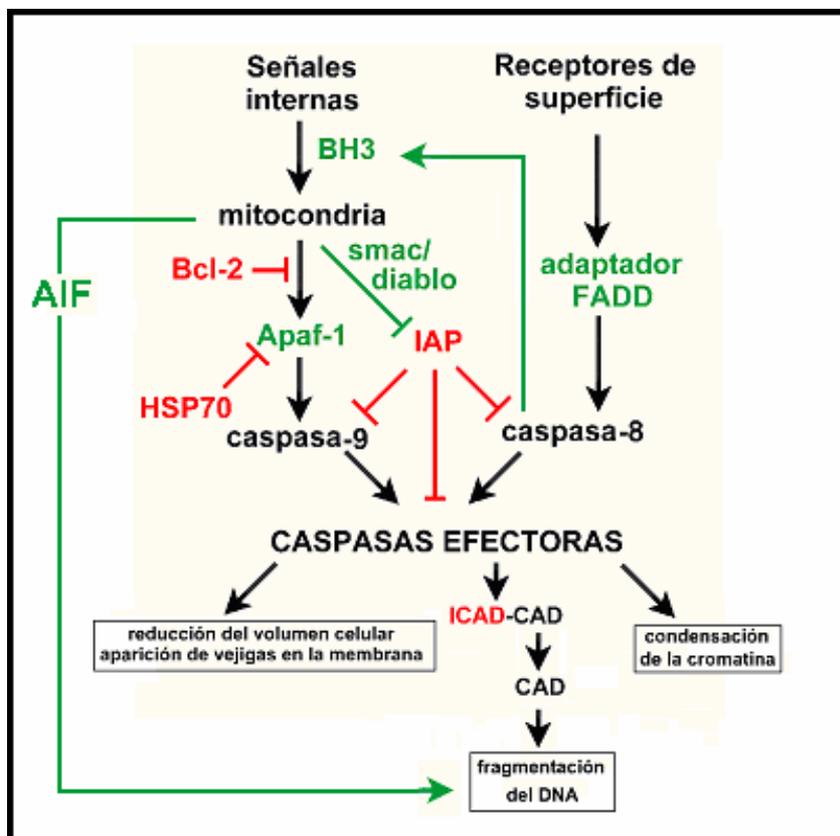


Figura.8. Las células están protegidas por los factores antiapoptóticos de la familia Bcl-2, los cuales limitan el reclutamiento de los componentes del apoptosoma, por la HSP70, que secuestra el dominio CARD de Apaf-1 y por IAP que actúa sobre las propias caspasas. La mitocondria inicia la cascada apoptótica liberando citocromo c, pero este efecto puede ser anulado si IAP mantiene su efecto inhibitorio sobre las caspasas. La señal apoptótica tiene que ser sostenida por la liberación de Smac/diablo. Smac/diablo es la segunda proteína mitocondrial activadora de la caspasa que se une directamente a IAP y antagoniza su función. Un tercer activador de la apoptosis de procedencia mitocondrial es AIF, se traslada al núcleo donde interviene en la condensación de la cromatina..

El suicidio celular defiende el organismo

La relación entre apoptosis y cáncer fue apreciada por primera vez, hace más de treinta años, por Kerr y sus colaboradores, quienes observaron

que el ritmo del crecimiento de los tumores era muy pequeño si se comparaba con sus índices mitóticos. Cuando se descubrió que otro proceso diferente a la necrosis podía ser responsable de este fenómeno, fue cuando comenzó la “era de la apoptosis”. Recientemente es mucho lo que se ha avanzado en el conocimiento de los mecanismos que relacionan apoptosis y cáncer y es ahora posible conectar las actividades de los reguladores de la apoptosis con el desarrollo tumoral. Es un hecho reconocido que las células cancerosas pueden evadir la respuesta apoptótica y sobrevivir para formar tumores. Así que existen ya evidencias que establecen una relación entre algunos genes que intervienen en la regulación de la apoptosis y los que intervienen en el desarrollo del cáncer. Los dos ejemplos más conocidos de estos genes son los que codifican la proteína p53 y los miembros de la familia Bcl-2 (figura 9).

La proteína p53 supresora tumoral es un factor de transcripción que controla el estado del DNA, e inhibe la progresión del ciclo celular si existe alguna lesión en esta molécula. La mutación de p53 se asocia con muchos cánceres humanos y los ratones knocked out en las dos copias de p53 desarrollan numerosas enfermedades malignas.

Una vez lesionado el DNA, por ejemplo por estrés celular, radiación gamma y fármacos genotóxicos, la p53 se eleva y las células en proliferación se detienen en G1. Esto proporciona un lapso de tiempo para que se verifique la reparación del DNA, antes de que se verifique la siguiente ronda de replicación. La parada del ciclo celular está mediada por estimulación de la expresión de la proteína p21^{CIP1}, inhibidora de la ciclina quinasa. De mantenerse las concentraciones elevadas de p53 por un prolongado tiempo se desencadena la apoptosis por inducción de la expresión de Bax y las proteínas BH3, Noxa y PUMA, reguladas por p53. Sin embargo, la sobreexpresión de Bcl-2 contrarresta el efecto apoptogénico de p53. Existe alguna evidencia que demuestra que p53 induce la producción de especies reactivas de oxígeno que pueden estimular la apoptosis mitocondrial.

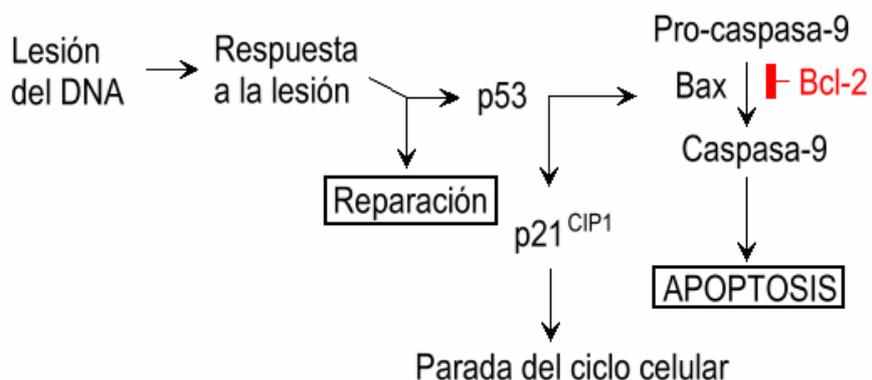


Figura 9. Papel de las proteínas p53 y Bcl-2 en la ejecución de la apoptosis.

CONCLUSIONES

Son hoy ya muchas las evidencias que conectan la apoptosis con la enfermedad. El desafío real ha de tomar esta información y traducirla en efectivas terapias. La terapia relacionada con la apoptosis ha de ser inducir la muerte celular de células no deseadas (por ejemplo, en cáncer), usando la apoptosis como una herramienta eliminadora, o preservar las células irremplazables (por ejemplo las neuronas) necesarias para mantener la función de un órgano. Los miembros de la vía mitocondrial son potencialmente excelentes dianas para terapias inducidas por apoptosis., ya que la mitocondria integra señales de vías de supervivencia (citoquinas, Bad) y de muerte (p53 y Bax). En cada ambiente celular la mitocondria responde de manera apropiada en base a los niveles de influencias presentes, estabilizando la membrana (Bcl-2, Bcl-XL) o distorsionándola (calcio, ROS, BAX). La mitocondria amplifica la respuesta apoptótica liberando inductores apoptóticos con capacidad de iniciar la cascada de las caspasas y la permeabilización de la membrana. Efectores de la apoptosis mitocondrial se encuentran en todos los tipos celulares y parece que se conservan incluso en las células tumorales.. Existe una serie de sustancias que inducen eficientemente la liberación del citocromo c mitocondrial, iones y pequeñas moléculas (calcio, NO, ROS). Finalmente, la

permeabilización de las membranas juega un papel crítico en los mecanismos de diversos agentes quimioterapéuticos y toxinas celulares.

Las terapias apoptóticas dirigidas a la mitocondria pueden ser útiles en enfermedades proliferativas, como el cáncer, sin embargo los agentes que actúan a nivel de mitocondria pueden no ser útiles en terapias donde la prevención de la apoptosis es el objetivo. La mitocondria juega un papel central en la vía apoptótica intrínseca, mientras que la vía apoptótica extrínseca es independiente de la mitocondria. Por tanto, puede ser más beneficioso bloquear el programa apoptótico en puntos comunes a ambas vías, por ejemplo en las caspasas.

Es un hecho reconocido que la mayor parte de los conocimientos acerca de los mecanismos moleculares que conducen a la muerte celular programada y las vías de señalización implicadas en dichos mecanismos, se han conseguido a nivel celular en experimentos *in vitro*. La apoptosis y su interacción con otros procesos, a nivel del organismo, es un problema mucho más complejo. Es imperativo que conozcamos estos mecanismos *in vivo* porque son muchas las enfermedades que se originan como consecuencia de defectos en la regulación de la apoptosis. Una vez que logremos estos conocimientos estaremos capacitados para diseñar estrategias terapéuticas encaminadas a la prevención y progresión de muchas enfermedades.

AGRADECIMIENTOS

Mi reconocimiento a los Doctores Evangelina Palaciós Aláiz, Isabel Sanchez Reus y David Andrés García por su inestimable ayuda en la revisión del manuscrito. También agradezco Dolores Velasco Pérez su eficaz colaboración en la preparación del texto y las figuras.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ACEHAN, D. *ET AL.* (2002). Three dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell* 9: 423-432.
- (2) ADAMS, J.M. AND CORY, S. (2001). Life or death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochem. Sci.* 26: 61-66.
- (3) ADRIAN, C. AND MARTIN S.J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochem. Sci.* 26: 390-397.
- (4) BAUD, V. AND KARIN, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology* 11: 372-377.
- (5) BEERE, H. *et al* (2000). Heat shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biol.* 2: 469-475.
- (6) CHAI, J. *et al.* (2001). Crystal structure of a procaspase-7 zymogen. Mechanisms of activation and substrate binding. *Cell* 107: 399-407.
- (7) CHAI, J. *et al.* (2001). Structural basis of Caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 104: 769-780.
- (8) COLEMAN, M.L. *et al.* (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK1. *Nature Cell Biology* 3: 339-345.
- (9) DENG, Y., LIN, Y. AND WU, X. (2002). TRAIL induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev.* 16: 33-45.
- (10) DU, C. *et al.*, (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33-42.
- (11) EARNSHAW, W.C., MARTINS, L.M. AND KAUFMANN, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 383-424.
- (12) ELLIS HM Y HORVITZ HR (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C.elegans*. *Cell* 44, 817-829
- (13) FINUCANE, D.M. *et al* (1999). Bax induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-X_L. *J. Biol. Chem.* 274: 2225-2233.
- (14) JOZA, N., SUSIN, S. A., et al., (2001). Essential role of the mitochondrial Apoptosis Inducing Factor in programmed cell death. *Nature*, 410, 549-554.
- (15) JUIN, P. *et al.* (1999). *c-myc* induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c. *Genes Dev.* 13: 1367-1381.
- (16) KERR JF, WYLLIE AH Y CURRIE AR (1972) *Br J Cancer* 26, 239-257.

- (17) KORF, I., FAN, Y.A. AND STROME, S. (1998). The polycomb group in *C. elegans* and maternal control of germline development. *Development* 125: 2469-2478.
- (18) KUMAR, S. AND COLUSSI, P.A. (1999). Prodomains, adaptors oligomerization: the pursuit of Caspase interaction in apoptosis. *Trends in Biochem. Sci.* 24: 1-4.
- (19) MARTINOUC JC Y GREEN DR (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 63-67
- (20) METZSTEIN, M.M. AND HORVITZ, H.R. (1999). The *C. elegans* cell death specification gene *ces-1* encodes a snail family zinc finger protein. *Molecular Cell* 4: 309-319.
- (21) OLSON M Y KORNBLUTH S (2001). Mitochondrial in Apoptosis and Human Disease. *Curr Mol Med* 1, 91-122
- (22) PANDEY, P. *et al.* (2000). Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J.* 19: 4310-4322.
- (23) RENATUS, M. *et al.* (2001). Dimer formation drives the activation of the cell death protease, caspase-9. *PNAS* 98: 14250-14255.
- (24) RIEDL, S.J. *et al.* (2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 104: 791-800.
- (25) SAITO, M. *et al.* (2000). Bax-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nature Cell Biol.* 2: 553-555.
- (26) SALEH, A. *et al.* (2000). Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature Cell Biol.* 2: 476-483.
- (27) SONG, Z. *et al.* (2000). Biochemical and genetic interactions between *Drosophila* caspases and the proapoptotic genes *rpr*, *hid* and *grim*. *Mol. Cell. Biol.* 20: 2907-2914.
- (28) STENNICKE, H.R., RYAN, C.A. AND SALVESEN, G.S. (2002). Reprieval from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends in Biochem. Sci.* 27: 94-101.
- (29) STRASSER, A., O'CONNOR, L. AND DIXIT, V.M. (2000). Apoptosis signalling. *Ann. Rev. Biochem.* 69: 217-245.
- (30) SUSIN, S. A., LORENZO, H. K., *et al.*, (1999). Molecular characterisation of mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF). *Nature* 397, 441-446.
- (31) SUZUKI, Y., NAKABAYASHI, Y. AND TAKAHASHI, R. (2001). Ubiquitin protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *PNAS* 98: 8662-8667.
- (32) VAUX, D.L. AND KORSMEYER, S.J. (1999). Cell death in development. *Cell* 96: 245-254.

- (33) VERHAGEN, A.M. *et al.* (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102: 43-53.
- (34) WIDLAK, P. *et al.* (2000). Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease, DFF40 (caspase activated DNase) on naked DNA and chromatin substrates. *J. Biol. Chem.* 275: 8226-8232.
- (35) WU, G. *et al.* (2000). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 408: 1008-1012.
- (36) YANG, X., CHANG, H. AND BALTIMORE, D. (1998). Essential role of Ced-4 oligomerization in Ced-3 activation and apoptosis. *Science* 281: 1355-1357.
- (37) YU, J. *et al.* (2001). PUMA induces rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol. Cell* 7: 673-682
- (38) WYLLIE AH, KERR JF Y CURRIE AR (1980). Cell Death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306

GLOSARIO

- **AIF**, (apoptosis inducing factor), factor inductor de la apoptosis que se encuentra en la mitocondria en el espacio intermembranas y sale al citosol en respuesta a una señal apoptótica. Induce la degradación del DNA cromosómico independientemente de las caspasas.
- **APAF-1**, factor activador de las proteasas apoptogénicas. Homólogo de la proteína CED-4 del *C. elegans*.
- **APOPTOSOMA**, complejo oligomérico formado por Apaf-citocromo c y dATP, cuya misión es el reclutamiento y activación de la procaspasa 9
- **Bak y Bak**, miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2
- **Bcl-XL**, miembro antiapoptótico de la familia Bcl-2. Se une y bloquea la activación de Apaf-1
- **Bcl-2**, miembro prototipo de la familia Bcl-2, identificado como producto del proto-oncogen *bcl-2* encontrado en ciertos linfomas de células B. Proteína de 25 kD, reside en la cara citoplasmática de la membrana externa mitocondrial. No promueve el crecimiento celular *per se*, pero promueve la supervivencia celular.
- **BH**, (homología Bcl-2). Segmentos alfa helicoidales que funcionan como motivos de interacción proteica
- **BH3**, dominio pro-apoptótico de la familia de proteínas Bcl-2.
- **BH4**, dominio antiapoptótico de la familia Bcl-2

- **Bid, Bik y Bim**, miembros proapoptóticos de la familia Bcl2 que comparten la secuencia de homología sólo en el dominio BH3
- **BIR**, (baculoviral IAP repeat) dominio muy conservado de 70 aminoácidos que es esencial para la actividad antiapoptótica de IAP
- **CAD**, desoxirribonucleasa activada por caspasa (caspase-activated deoxyribonuclease)
- **CARD**, dominio de reclutamiento de las caspasas
- **CASPASAS**, cisteína proteasas específicas de aspartato. Enzimas proteolíticas que contienen cisteína en su molécula y verifican la proteólisis en lugares previos a aspartato. Se conocen 14
- **CED-4** (cell death determining-4), proteína supresora extragénica de la ganancia de función de la EGL-1
- $\Delta\Psi$, potencial transmembrana de la membrana mitocondrial interna
- **dATP**, desoxiadenosin trifosfato
- **DD**, dominio específico de muerte situado en la porción intracelular del receptor, que se activa por cuando la unión del ligando extracelular induce la oligomerización (trimerización) del receptor.
- **DED**, dominio efector de muerte. El agrupamiento FADD con DED recluta la procaspasa-8, que también tiene DED en su porción N terminal (que corresponde a la CARD de la procaspasa-9)
- **DOMINIO**, porción discreta de una proteína que se une independientemente al resto de la proteína y posee su propia función. Unidad estructural que puede encontrarse sola o con otros dominios o repeticiones. Relacionada evolutivamente. Se define por su estructura
- **R5**, receptores de muerte a los que se une TRAIL
- **EGL-1**, proteína codificada por egl-1, el primer gen descubierto de el sistema de la muerte celular programada, como una mutación de ganancia de función, que causa la muerte no programada de dos neuronas que inervan la vulva, produciendo un defecto en la puesta de huevos (egg laying defective)
- **FADD**, dominio de muerte asociado a Fas
- **FAS**, receptor de muerte
- **FASL**, ligando del receptor de muerte Fas

- **GRANDZIMA**, serina proteasa segregada por los linfocitos T
- **IAP**, inhibidor de proteínas apoptóticas, identificado como proteína vírica. Posee uno o más dominios BIR críticos para su actividad. Su actividad es inhibida por smac/diablo.
- **ICAD/CAD**, heterodímero inhibidor/desoxiribonucleasa, que para actuar como desoxiribonucleasa activa necesita ser hidrolizado por caspasas para liberar CAD
- **MÓDULO**, elemento compuesto por múltiples motivos en un segmento de contiguas secuencias
- **MOTIVO**, región corta muy conservada en una secuencia proteica. Frecuentemente son partes muy conservadas de dominios
- **MPTPC**, complejo mitocondrial del poro de permeabilidad transitoria
- **NOXA**, proteína BH3
- **PARP**, poli (ADP-ribosa) polimerasa. Enzima reparador del DNA inactivado por las caspasas
- **PUMA**, proteína BH3
- **Smac/DIABLO**, inhibidor de IAP, es el segundo activador mitocondrial de la caspasa, /proteína que se une directamente y bloquea la acción inhibidora del IAP
- **TNF**, factor de necrosis tumoral que se une al TNFR-1
- **TNFR-1**, receptor del TNF
- **TRAIL**, ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF
- **VDAC**, (voltaje dependent anion channel), canal aniónico dependiente de voltaje
- **WD-40**, motivos
- **XIAP**, proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X. Es un modulador potente de la apoptosis. Posee tres dominios BIR y un motivo dedo de zinc circular. Un solo dominio BIR es suficiente para la actividad apoptótica. Se expresa en la mayoría de los tejidos.

Anal. Real Acad. Nal. Farm., 2003,

Métodos revolucionarios para el análisis de macromoléculas

GUILLERMO GIMÉNEZ GALLEGO

*Académico de Número Electo de la Real Academia
Nacional de Farmacia*

INTRODUCCIÓN

El premio Nobel de química del año 2002 ha ido destinado a premiar la puesta a punto, para adecuarlos al estudio de macromoléculas, de dos métodos analíticos muy populares en química: la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear. El premio por los desarrollos en espectrometría de masas ha sido concedido a los doctores John Fenn, Profesor de la Commonwealth University de Virginia y Emérito de la Universidad de Yale y Koichi Tanaka, Ingeniero de la Compañía Shimadzu. El de resonancia magnética nuclear ha sido concedido al Profesor Kurt Wütrich de la Escuela Técnica Superior de Zurich. El profesor Wütrich fue un estrecho colaborador del Profesor Ernst, de la misma institución, que recibió el premio Nobel el año 1991 por sus contribuciones al desarrollo de la resonancia magnética nuclear moderna.

LAS MACROMOLÉCULAS BIOLÓGICAS: INTERÉS DE SU ESTUDIO

Todos los organismos vivos contienen compuestos químicos de peso molecular superior a la decena de kilodaltons, a los que generalmente se suele englobar bajo la denominación de macromoléculas biológicas. Estas macromoléculas pertenecen a tres grupos químicos principales: las proteínas, los hidratos de carbono y los ácidos nucleicos. Con frecuencia

aparecen asociadas entre sí o con otros compuestos químicos de menor masa molecular formando complejos que pueden llegar a tener tamaños enormes. Las macromoléculas biológicas juegan un papel primordial en la química de la vida, ya sea “dirigiéndola” a modo de programa informático, caso de los ácidos nucleicos, ya sea como agentes ejecutores de las instrucciones de ese programa, caso primordialmente de las proteínas. Una vez dilucidado el genoma (el conjunto de macromoléculas que almacenan las instrucciones del programa que rige el funcionamiento de la célula) de una fracción importante de los principales organismos tipo, el problema ahora es determinar cómo esas instrucciones son ejecutadas por el resto de las macromoléculas y sus asociaciones. El estudio de las proteínas bajo esta perspectiva constituye el objetivo de esta moderna disciplina biológica de frontera conocida como Proteómica. Tanto la espectrometría de masas como la resonancia magnética nuclear, a través de las aproximaciones desarrolladas por los doctores Fenn, Tanaka y Wütrich constituyen en estos momentos una de las bases más sólidas de la Proteómica. De ahí lo justificado del premio.

LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE MACROMOLECULAS

La espectrometría de masas es una técnica que data de los comienzos del siglo XX. Esta técnica se desarrolló con vistas a determinar el peso molecular de los compuestos químicos. En la actualidad, la espectrometría de masas es una técnica de gran exactitud, sensibilidad y rapidez, y permite además llevar a cabo sus determinaciones en mezclas químicas complejas. Todo este conjunto de propiedades han convertido a la espectrometría de masas en una de las técnicas más potentes para identificar compuestos. Por ello ha encontrado aplicaciones amplísimas en la industria química y farmacéutica y en los procedimientos de controles de calidad.

La espectrometría de masas trabaja siempre con moléculas en estado gaseoso y con cargas del mismo signo. Una vez en estado gaseoso las moléculas son separadas en vacío de acuerdo con su relación carga/masa, por procedimientos físicos, y detectadas. Sin embargo la espectrometría de masas no resultó aplicable por muchos años a las macromo-

léculas biológicas por no ser de fácil aplicación a estas los procedimientos tradicionales de vaporización. Al hablar de macromoléculas biológicas estamos hablando de moléculas lábiles y, a veces, como hemos apuntado en párrafos anteriores, de meras asociaciones macromoleculares no mediadas por verdaderos enlaces químicos que van de las decenas a las centenas de kilodaltons. El Prof. Fenn contribuyó al desarrollo de la espectrometría de masas para macromoléculas modificando adecuadamente la técnica de *electrospray* para volatilizar en forma altamente cargada eléctricamente, y sin inducir alteraciones, las macromoléculas y sus asociaciones. Desarrolló también un método de interpretación de los espectros de masas que permite determinar el tamaño de la molécula/complejo volatilizado con gran precisión. El Dr. Tanaka desarrolló un nuevo método de volatilización -asociado a ionización- de macromoléculas mediante rayos láser suficientemente suaves como para no dañar la estructura química de las macromoléculas o sus asociaciones. La técnica desarrollada por el Dr. Tanaka es conocida por las siglas SLD (soft laser desorption). Esta técnica evolucionó rápidamente a lo largo de los años inmediatamente subsiguientes a su puesta a punto. Al final se ha impuesto la versión conocida por las siglas de MALDI (matrix-assisted, laser desorption ionisation). La técnica de *electrospray* es tan suave que puede utilizarse para separar partículas de virus completos sin que se disocien sus distintos componentes y sin que, consecuentemente, resulte afectada su capacidad infectiva.

LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS A PARTIR DE LA VOLATILIZACIÓN E IONIZACIÓN DE MACROMOLÉCULAS MEDIANTE ELECTROSPRAY

Los primeros experimentos describiendo el fenómeno de *electrospray* fueron llevados a cabo por el físico John Zeleny en 1917. Malcom Dole llevó a cabo una descripción más detallada del proceso en 1968. En 1976 Iribarne y Thomsom propusieron el modelo físico del fenómeno generalmente más aceptado en estos momentos. Fenn usó su experiencia en expansión de corrientes libres de gases para perfeccionar el método de Dole. En el proceso de *electrospray* desarrollado por el Prof. Fenn, la

solución del soluto a analizar es introducida en una cámara a un flujo de unos pocos microlitros por minuto a través de un capilar metálico. Este capilar es mantenido a una diferencia de potencial del orden de kilovoltios con respecto a las paredes de la cámara lo que lleva a una acumulación importante de cargas del mismo signo en la superficie de la solución que asoma a la cámara a través de este, al adquirir el potencial del capilar. Esta acumulación de cargas que se repelen por ser del mismo signo hace que la superficie de la solución estalle dispersándose en microgotitas de entre 0.5 y 1 micrometro, extremadamente cargadas, que se dirigen fundamentalmente hacia la pared de la cámara situada enfrente del capilar. Por esta cámara circula un gas inerte a una temperatura entre 50 y 70 grados centígrados que hace que las gotas empiecen a evaporarse rápidamente. Como consecuencia de ello aumenta la concentración de cargas de signo opuesto lo que lleva a que la gota estalle de nuevo en cuanto las fuerzas de repulsión superan a las de la tensión superficial. Esta explosión se conoce con el nombre de **explosión culómbica** o de **explosión de Rayleigh**. Las nuevas gotitas siguen evaporándose con lo que se producen nuevas explosiones sucesivas que van disminuyendo su diámetro. Llega un momento en que cuando la gota tiene un diámetro de unos 10 nanómetros, la densidad de carga es tal que los iones empiezan a desolvatarse mediante un proceso denominado **evaporación de iones**, a través de unas estructuras transitorias que se forman en la superficie de la gotita conocidas como **conos de Taylor**. Los iones que se desolvatan con van con frecuencia asociados a moléculas del soluto a analizar formando lo que se denomina iones “quasi-moleculares”. Gracias a la aparición de éstos, el soluto a analizar adquiere ya el estado gaseoso apropiado para el análisis de masas.

Los iones quasi-moleculares presentan una enorme variedad de carga: de 2 a 50. Esto da lugar a unos espectros complejos con numerosos picos de acuerdo con el número de iones que acompañan a la macromolécula. Estos espectros desconcertaron inicialmente a los espectrometristas, pero Fenn cayó en la cuenta de que se podía sacar partido de esta complejidad para aumentar la exactitud de la determinación del peso molecular. De la diferencia en masa aparente entre dos picos puede deducirse la naturaleza del ión que acompaña a la macromolécula (ordinariamente, H^+ ,

NH_4^+ , Na^+ o K^+). Conocido éste, por el efecto de desplazamiento que produce la diferencia de un ión más en la masa aparente de la macromolécula (la diferencia entre dos picos consecutivos), puede deducirse la masa real de ésta mediante un sencillo sistema de dos ecuaciones lineales, a partir de la ecuación $K_i - m_a = (M - im_a)/i$ (K_i , valor aparente de m/z ; m_a , masa del ión; M , la masa de la macromolécula; i , el número de cargas). Como esto puede hacerse con todos los pares posible de picos observados, se puede obtener la media de un número muy elevado de observaciones que es lo que da lugar al alto grado de precisión de la medida.

LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS A PARTIR DE LA VOLATILIZACIÓN E IONIZACIÓN DE MACROMOLÉCULAS MEDIANTE LASER

La idea tras esta técnica es que un pulso corto de radiación láser que incida en un volumen extremadamente pequeño y preciso de una solución debe provocar una vaporización rápida y extremadamente localizada del solvente de ese volumen. Esa vaporización llevará obviamente consigo el subsiguiente paso a estado gaseoso de los solutos localizados en ese punto al desaparecer el solvente. Este procedimiento se demostró que era verdad para el caso de solutos de pequeño peso molecular, pero parecía inviable para las macromoléculas, en concreto para las proteínas, hasta los trabajos de Koichi Tanaka. La clave del éxito de este ingeniero estuvo en escoger un láser de la longitud de onda adecuada (una longitud de onda a la que no es absorbido por las proteínas) y de la intensidad suficiente para vaporizar el solvente sin que llegara a transmitirse suficiente energía a las proteínas para que estas se degradaran. Koichi Tanaka utilizó un láser de nitrógeno que emite a 337 nanómetros (el máximo de absorción de mayor longitud de onda de las proteínas está situado a 280 nanómetros) e iluminaba con una energía de 20 mJ/cm^2 . Koichi Tanaka observó también que era fácil escoger las condiciones de la solución para que la macromolécula desolvatada presentase un número moderado de cargas, idealmente una o dos. Koichi Tanaka utilizó soluciones de proteína en glicerol en los estudios que presentó en el Simposio Chino-Japonés de Osaka de 1987 que son los que le han hecho merecedor del

premio Nobel de química del 2002. La técnica puesta a punto por Koichi Tanaka pasó a ser denominada como SLD de acuerdo con las siglas de su denominación en inglés: *soft laser desorption*. Un año después de su descripción en el simposio de Osaka, M. Karas y F. Hillenkamp, que habían sido pioneros en el uso de la radiación láser para volatilizar compuestos con vistas a la espectrometría de masas, pusieron de manifiesto que la técnica de Tanaka también funcionaba si las macromoléculas estaban embebidas en una matriz cristalina con un espectro de absorbencia que solapara con el de emisión del rayo láser con exactitud. Pusieron de manifiesto, además, que podía conseguirse también escogiendo la matriz adecuada que la macromolécula incorporara mayoritariamente una sola carga. Esta aproximación es hoy día la variante más popular de la técnica de Tanaka y es conocida como MALDI, acrónimo de su denominación en inglés: *matrix-assisted, laser-desorption ionisation*.

La técnica de Tanaka ha dado hoy día lugar a un tipo de espectrómetro de masas muy popular denominado MALDI-TOF. TOF son las iniciales de *time of flight*, en español, tiempo de vuelo. Esta última técnica fue propuesta por William E. Stephens en 1946. En esencia se basa en que si disparamos una serie de iones con la misma energía desde un punto preciso y medimos el tiempo que tardan en llegar a otro también bien determinado, podremos calcular la masa de estos iones a partir del tiempo invertido en la trayectoria, dado que el tiempo que cada uno de ellos tardará en cubrir el recorrido será inversamente proporcional a su masa. El problema que encerraba la aplicación de esta técnica estribaba en que dado que los tiempos de vuelo son extremadamente cortos (milisegundos), es preciso determinar con muchísima exactitud el momento del disparo. En la técnica desarrollada por Koichi Tanaka, esto es relativamente fácil dado que los pulsos de laser, por su precisión y brevedad (unos pocos nanosegundos), pueden utilizarse como una excelente referencia del momento del disparo de salida.

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE MACROMOLÉCULAS

Antes de los trabajos de Kurt Wüthrich la estructura tridimensional de las proteínas solo podía ser determinada a partir de los espectros de difracción de rayos X de sus cristales. Por mucho tiempo se buscó la forma de determinar estas estructuras cuando las proteínas estaban en solución, sin necesidad de cristalizarlas. Kurt Wüthrich puso a punto el método para ello, utilizando para ello la espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear se basa en que el núcleo de determinados átomos como los del H, el C^{13} y el N^{15} , tienen un cierto carácter eléctricamente dipolar. Estos núcleos al girar, generan un campo magnético cuyo momento coincide con eje del radio de giro. Como consecuencia de ello, se comportan como verdaderos imanes. Al introducir estos átomos en un campo magnético, sus núcleos se orientarán de tal forma que la dirección y sentido de su momento magnético sea la misma que la del vector del campo. Una vez creada esta situación, los átomos pueden ser desviados de esta posición la energía adecuada, energía que corresponde a la de las frecuencias de radio. Una vez que hemos dejado de aplicar esta fuerza, los átomos volverán a su posición inicial mediante un movimiento de precesión alrededor del eje definido por el vector campo magnético. Como consecuencia de ello emitirán una radiación electromagnética, por la que devolverán al medio la energía recibida al sacarlos de su posición inicial. La frecuencia de esta radiación es también el de las ondas de radio. El núcleo de estos átomos bajo un campo magnético se comporta pues como un trompo girando cuando al ser desviado de la vertical y adquiere un movimiento de precesión alrededor del eje de giro vertical original. Desde el punto de vista de las ondas que emiten los núcleos de estos átomos se comportan también como las cuerdas de un instrumento musical.

Las cuerdas de un piano o cualquier otro instrumento musical las podemos hacer vibrar de dos formas. Una, pulsándola directamente. Otra,

produciendo un sonido fuerte en su cercanía. En este último caso, si acercamos nuestro oído al instrumento, veremos que éste, sin haberlo tocado directamente emite también su sonido. Es más, en el caso de instrumentos con más de una cuerda, veremos que cada una de ellas emite su sonido propio, no el que provocó el que entraran en vibración. Es decir, en términos físicamente más precisos, cada cuerda comienza a vibrar con su frecuencia característica. Si en esta situación repetimos el sonido inicial que las puso a vibrar podríamos observar que siguen vibrando, pero que además su vibración se ha alterado un poco de forma que empiezan a vibrar también con una oscilación compuesta: la suya propia, y la de las cuerdas más próximas. Algo parecido ocurre cuando los núcleos con un cierto carácter eléctricamente dipolar de los átomos de una molécula en un campo magnético reciben un pulso de radiofrecuencia de una potencia adecuada. Todos ellos comienzan a precesionar. Pero no todos, incluso los de la misma naturaleza, con la misma frecuencia pues cada uno, por estar en un sitio distinto de la molécula, adquiere una precesión propia característica. Con la instrumentación adecuada podremos registrar estas vibraciones electromagnéticas que emiten. Los estudios originales de Wüthrich se llevaron a cabo midiendo las vibraciones de los núcleos de los protones de las proteínas. Por simplicidad, aquí nos referiremos sólo a este sistema. El procedimiento es extrapolable, sin embargo al estudio de proteínas en que no sólo se observa el comportamiento de los protones sino de los núcleos de C^{13} y el N^{15} .

Un análisis de Fourier de las vibraciones emitidas por una solución de proteína en campo magnético irradiada con un pulso de radiofrecuencia adecuada nos va a permitir identificar la frecuencia a la que emite cada uno de los núcleos de sus protones. Si a continuación irradiamos la solución de proteína con series distintas de pulsos sucesivos, observaremos que los resultados del análisis de Fourier son distintos (cambia la intensidad de la frecuencia propia de cada uno de los protones) en función de los trenes de pulsos que hemos dado. El efecto de estos trenes de pulsos sobre la intensidad de la frecuencia característica del núcleo de cada protón puede representarse y someterse también a un análisis de Fourier. El espectro de frecuencias obtenido por este procedimiento nos va a poner en evidencia todas las frecuencias adicionales a la suya propia a las que

precesiona cada uno de los núcleos de los protones de la molécula. Estas frecuencias añadidas, como en el caso del instrumento musical, corresponden a la de los núcleos de los protones (ya identificados a partir del primer análisis de Fourier) que están cerca. Por la intensidad de estas frecuencias añadidas a la fundamental de los núcleos de cada uno de los protones se puede calcular también la distancia a la que se encuentra el protón responsable de la frecuencia añadida. Identificados qué protones de una proteína quedan próximos, podemos determinar unívocamente su estructura, pues sólo hay una forma de plegar en el espacio la cadena lineal polipeptídica para que sus protones queden a la distancia que hemos calculado. El desarrollo de esta técnica de adquisición y análisis de datos de resonancia magnética nuclear de proteínas es lo que ha valido a Kurt Wüthrich el premio Nobel de química de este año. La primera determinación completa de la estructura de una proteína utilizando el método de Wüthrich fue en 1985. En la actualidad entre el 15 y el 20% de los pocos miles de estructuras tridimensionales de proteínas conocidas han sido ya determinadas por resonancia magnética nuclear.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BASUS, V. (1989) Proton nuclear magnetic resonance assignments. En *Methods in Enzymology*. Editores: Oppenheimer, N. J., y James, T. L. Vol. 177, pp. 132-149. academic Press, San Diego.
- (2) BRUINS, A. P. (1998) Mechanistic aspects of electrospray ionization. *J. Chromatogr.* 794-345.
- (3) FENN, J. B., MANN, M., MENG, C. K., WONG, S. F. AND WHITEHOUSE, C. M. (1989). Electrospray ionisation for mass spectroscopy of large biomolecules. *Science* 256- 64.
- (4) Información básica sobre la espectrometría de masas de macromoléculas volatilizadas e ionizadas mediante *electrospray* o por irradiación con rayos laser: <http://masspec.scripps.edu/information/intro/index.html>.
- (5) MANN, M., MENG, C. K., FENN, J. B. (1989). Interpreting mass spectra of multiply charged ions. *Anal. Chem.* 61 -1702.

- (6) SINCLAIR, B. (1999). MALDI-TOF goes mainstream: laser desorption mass spectrometers for multisample analysis. *The Scientist* 13-18
- (7) WÜTHRICH, K. (1989). Determination of three-dimensional protein structures in solution by nuclear magnetic resonance: and overview. En *Methods in Enzymology*. Editores: Oppenheimer, N. J., y James, T. L. Vol. 177, pp. 125-131. Academic Press, San Diego.
- (8) WÜTHRICH, K. (1990). Protein structure determination in solution by NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 265 - 22059.
- (9) WÜTHRICH, K. (2001). The way to NMR structures of proteins. *Nature Struct. Biol.* 8 -923.

Farmacia clínica del daño actínico. Evolución conceptual en la prevención y tratamiento de las fotodermatosis. Presente y futuro* .

DR. Q.F. COSME DE LOS SANTOS CARVALLIDO

*Académico Correspondiente por Uruguay y
Académico Delegado en Uruguay de la Real Academia
Nacional de Farmacia, Instituto de España.*

RESUMEN

Desde un punto de vista farmacéutico clínico, el daño actínico es definido como las lesiones cutáneas producidas por varias radiaciones electromagnéticas emitidas por el sol, capaces de atravesar la estratósfera, tales como UV-B (290-320nm), UV-A (320-400nm) y visible hasta 515 nm: daño agudo (quemadura solar); daño crónico, acumulativo (fotoenvejecimiento cutáneo); cáncer de la piel; dermatosis fotosensibles y reacciones cutáneas de fotosensibilidad. Las diferencias relativas entre el caudal electromagnético liberado por el sol; la energía total de cada rango ultravioleta; la energía transportada por los fotones de diferentes longitudes de onda y la penetración dentro de la piel, son considerados importantes parámetros implicados en la producción del fotodaño cutáneo.

Con el objetivo de comprender cómo los filtros solares atenúan la radiación ultravioleta, y de cómo optimizar la eficacia, son estudiados los más representativos de cada grupo.

La evaluación biológica de los fotoprotectores, es considerado un asunto muy importante en la prevención y tratamiento del daño actínico. El SPF (Factor de Protección Solar), es admitido como un estándar aceptado internacionalmente, no existiendo en la actualidad, diferencias significativas entre las Normativas FDA, COLIPA, Japonesa y Australiana. Por el contrario, los estándares para medir la protección contra el UV-A (320-400nm), no se encuentran armonizadas, existiendo varias metodologías *in vivo* e *in vitro*. Como estándares *in vivo*, son considerados: PPD (Permanent Pigment Darkening), que se corresponde con la normativa japonesa y UVA-PF (UV-A Protection Factor). Las metodologías *in vitro*, cada vez ganan más reconocimiento científico, como la Proposición de la CTFA (Cosmetic Toiletry & Fragrance Association) a la FDA, 1997, considerada una importante contribución, porque usando el Labsphere Ultraviolet Transmittance Analyzer, define una nueva magnitud, la λ_c or CW (Longitud de Onda Crítica), que provee información fotoprotectora cuantitativa en el UV-A; hacer una medida del SPF *in vitro*; y obtener también, relación de atenuaciones UV-A/UV-B, de acuerdo a la British Guidance.

La evolución conceptual de la prevención y tratamiento del daño actínico, su presente y futuro, es considerado una temática de gran interés farmacéutico clínico. El FDA Federal Register,

* Conferencia pronunciada el 28 de Junio de 2002, Madrid

1978, basándose en evidencia fisicoquímica, decretó que los filtros solares con SPF 15, eran suficientes para ofrecer fotoprotección completa durante todo un día de verano con cielo sin nubes, mientras que la FDA Tentative Final Rule, 1993, aceptando que había condiciones especiales de uso y fotodermatitis que requerían factores de protección más altos, elevó el SPF máximo de 15 a 30. En el mismo Federal Register, fue definido el nuevo atributo B.S.P. (Protección de Amplio Espectro), cualidad de un fotoprotector en conferir atenuación ultravioleta en el UV-B (290-320nm), más en el UV-A (320-400nm), siendo la primera vez que una oficina gubernamental, reconoció la importancia que los fotoprotectores atenuaran en el rango UV-A.

Es asignado una gran significación teórica y práctica, cuando en los EE.UU. de Norte América, fue demostrado y hecho público en 1997-1999, que el 80-90% de los filtros solares, no satisfacían los requerimientos que la CTFA Proposición hiciera a la FDA, 1997, al demostrar que tenían λ_c or CW (Longitud de onda Crítica) ≤ 370 nm, denunciándose, que la población norteamericana no se encontraba bien fotoprotegida con los productos disponibles en el mercado americano. Además, fue considerada la necesidad de terminar definitivamente con la “carrera galopante de los SPFs” sin el correspondiente incremento de la atenuación en el UV-A (320-400nm). A continuación, es examinada en profundidad, la FDA Final Rule, May 21 1999, la que en cumplimiento a la disposición mandatoria del Congreso de los EE.UU., decretó utilizando solo los SPFs, tres niveles de protección a la quemadura solar, y como estrategia para frenar la denunciada “carrera galopante de los SPFs”, decretó que los filtros solares con SPFs más altos que 30, debían rotularse SPF 30+ o SPF 30 Plus, y que los productos que después del 21 Mayo 2001, todavía no hubieran hecho la sustitución de rotulación, debían ser considerados adulterados y decomisados. A pesar de que la Final Rule, mantiene el atributo B.S.P., omite cuantificar la fotoprotección en el UV-A (320-400 nm), lo que recibió fuertes críticas de la CTFA y de la comunidad científica, determinando una primera postergación al 31 Diciembre 2002, seguido de una segunda, a no antes del año 2005, como forma de instrumentar nueva metodología para cuantificar factores de protección UV-A (320-400 nm) y también, nueva metodología para determinar SPFs en filtros solares con SPFs significativamente mayores de 30. El estatus actual en la Comunidad Europea, se puede deducir de las dos sesiones programadas en la European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association, 40 years of COLIPA Commemoration: A Fresh Look at UV-A Testing y COLIPA Recommendation on SPF Labeling, que tuvo lugar en Venecia, Italia, el día anterior a nuestra conferencia en la Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España.

En esta publicación,, son varias las conclusiones de interés farmacéutico clínico. En primer lugar, apreciar la evolución conceptual, que los filtros solares han tenido en los últimos veinticuatro años, como la evolución de cosméticos a “OTC-Drug Products”, y a medicamentos propiamente dichos, y la evolución de bronceadores, a fotoprotectores altamente eficaces contra diferentes clases de daño actínico.

Aceptar como un gran logro, que actualmente esté armonizada internacionalmente la metodología para determinar los SPFs, siendo oportuno señalar, que actualmente existe la necesidad de desarrollar nueva metodología para cuantificar los SPFs, cuando son significativamente más altos que 30, consecuencia de la creciente demanda de los mismos.

Considerar como muy importantes, los esfuerzos que se han hecho y se siguen haciendo, para desarrollar nuevas metodologías para cuantificar factores de protección UV-A (320-400nm), siendo recomendables las últimas tecnologías *in vitro*, ya que las *in vivo*, tienen limitaciones y pueden poner en riesgo la salud de los voluntarios sanos. La Spectroscopy Labsphere Transmittance Analyzer, debe ser considerada una metodología válida, por haber creado una

nueva magnitud, la λ_c or CW (Critical Wavelength), que no sólo cuantifica niveles de protección en el UV-A, sino que permite obtener SPF's y la relación de atenuaciones UV-A/UV-B, de acuerdo a la British Guidance.

Apreciar la Proposición de la CTFA (Cosmetic, Toiletry & Fragrance Association) a la FDA, condicionando la validez del atributo B.S.P. (Broad Spectrum Protection), a que la λ_c (CW) \geq 370nm, con la recomendación de que no se permita elevar los SPF's, sin el correspondiente incremento de la protección en el UV-A (320-400 nm). Esta metodología que nosotros hemos usado y presentado en forma de posters, con el objetivo de evaluar fotoprotectores con SPF 30+ or SPF 30 Plus, caracterizados por mostrar amplia y equilibrada atenuación en todo el espectro ultravioleta, también la hemos usado, para definir el atributo F.S.P. (Full Spectrum Protection), particularmente aconsejado para las pieles extremadamente fotosensibles y para la prevención y tratamiento de fotodermatitis muy exigentes.

Finalmente, promover que la rotulación de todos los fotoprotectores, tenga clara y precisa información de los niveles de protección, no sólo contra la quemadura solar, contra la UV-B (290-320 nm), como muy bien lo hace el SPF, sino también, de los niveles de protección contra la UV-A (320-400 nm), siendo recomendable hacerlo por la magnitud λ_c o CW, complementando con la especificación de los atributos B.S.P. o F.S.P., según corresponda, con el objetivo de brindar calificada información a médicos, farmacéuticos y usuarios, y facilitar una mejor práctica farmacéutica clínica.

Palabras clave: Daño actínico.–Filtros solares.–Fotoprotectores.–Fotodermatitis.– Farmacia Clínica.

SUMMARY

Clinical Pharmacy of Skin Photodamage. Conceptual evolution, prevention and treatment of photodermatoses. Present and future.

From a clinical pharmaceutical point of view, skin photodamage is defined as the skin lesions produced by several sun emitted electromagnetic radiations that are able to cross the stratosphere, such as UV-B (290-320nm), UV-A (320-400nm) and visible until 515 nm: acute damage (sunburn); chronic accumulative damage (photoaging); skin cancer; photosensitive dermatoses and photosensitive skin reactions. The relative differences among the whole electromagnetic caudal released by the sun; the total energy of each ultraviolet range; the energy transported by photons of different wavelengths and penetration into skin, and through the glass, are considered important parameters implicated on skin photodamage production.

With the objective to understand how sunscreens work, and how to optimize photodamage prevention and treatment, are studied the currently more used sunscreens.

The biological evaluation on sunscreen products, it is take into account as a matter very important in the prevention and treatment of skin photodamage. The SPF (Sun Protection Factor), is accepted as a harmonized international standard, not having significant differences between FDA, COLIPA, Japanese and Australian Guidances. Conversely, the measurement standards for UV-A (320-400 nm) protection efficacy, is not harmonized, being used nowadays, several *in vivo* and *in vitro* methodologies. As *in vivo* testing, are considered the most representatives: PPD (Permanent Pigment Darkening), Japanese Guidance and UVA-PF (UV-A Protection Factor). The *in vitro* testing, are gaining scientific recognition, such as the CTFA (Cosmetic Toi-

lety & Fragrance Association) Proposition to FDA, 1997, which must be considered an important contribution, because using Labsphere Ultraviolet Transmittance Analyzer, it is possible to obtain λ_c or CW (Critical Wavelength), a new relative magnitude that provides quantitative photoprotective information on UV-A; *in vitro* SPF measurements, and UV-A/UV-B attenuation ratio in accordance with the British Guidance.

The conceptual skin photodamage prevention and treatment evolution, present and future, is considered a matter of great pharmaceutical clinical interest. The FDA Federal Register, 1978, based upon physicochemical evidence, ruled that sunscreens with SPF 15 were sufficient to offer full protection against sun damage during all a summer day without clouds, however the FDA Tentative Final Rule, 1993, accepting that there were special use conditions and photodermatoses requiring higher sun protection factors, raised maximum SPF, from 15 to 30. In the same Federal Register, the Agency, issued a new photoprotective attribute, the B.S.P. (Broad Spectrum Protection), qualifying a sunscreen with the feature of conferring ultraviolet attenuation on UV-B (290-320nm) plus UV-A (320-400 nm), being the first time that a Governmental Guidance, recognized the importance that a sunscreen had attenuation on UV-A range.

It is assigned a large theoretical and practical significance, when in USA was demonstrated and made public in 1997-1998, that 80-90% sunscreen didn't fulfill the CTFA Proposition to FDA requirements, because their λ_c (CW) \leq 370nm and also stated, that it was necessary to avoid the uncontrollable called "SPFs horse race", without correspondence on UV-A (320-400nm) increased attenuation, revealing that the American population was not appropriately protected with the products available in the market. Next, it is examined in depth, the FDA Final Rule, May 21 1999, in order to overcome the situation previously denounced, using SPFs only, ruling three new categories based merely on sunburn protection levels, doing omission on quantitative UV-A (320-400 nm) protection, but maintaining B.S.P. attribute, tried to answer to the Congress mandatory issue, that gave origin to Final Rule. In addition, the Agency, as a means of controlling the called "SPF horse race", ruled that sunscreens with SPF higher than 30, should be labeled SPF 30+ or SPF 30 Plus, and that the product that after May 21, 2001, had not made the labeling substitution, will cause the product to be misbranded. Testing omission, received severe critics from CTFA and from scientific community, what determined a first postponement to December 31 2002, followed of a second one, until not before 2005, so the FDA could study new SPF testing for sunscreens with SPF higher than 30 and new methodology for UV-A protection factor assessment, what is a clear evidence of the importance that have sunscreens with SPF higher than 30, of the attenuation on UV-A (320-400nm) range, and that sunscreens have wide and balanced photoprotection all over ultraviolet range (200-400nm). The current European Community status is commented, because the day before to give this conference at Royal National Academy of Pharmacy, Spain, the European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association, 40 years of COLIPA Commemoration held at Venice, Italy, scheduled two sessions: A Fresh Look at UV-A Testing and COLIPA Recommendation on SPF Labeling.

In this paper, the conclusions are several. In first place, to appreciate the conceptual evolution that sunscreens have had throughout the latest twenty four years, from cosmetic to "OTC-Drug Product", to Drug strictly speaking, and from suntan to efficient sunscreens against different kinds of skin photodamage.

To accept as a great achievement that SPF (Sun Protection Factor) testing is internationally harmonized, but still remaining the necessity to develop new SPF testing for sunscreens with SPFs higher than 30, due to the increasing demand of sunscreens with higher SPFs than 30.

To consider very important the efforts that have been done and follow doing to develop new methodologies for measuring sunscreen ultraviolet A protection factors, specially the latest *in vitro* testing, since that *in vivo* methodologies have limitations and may endanger human volunteers health. The Spectroscopy Labsphere Transmittance Analyzer, is a very useful technology, due to have created a new photoprotective magnitude λ_c or CW (Critical Wavelength), that not only quantifies UV-A (320-400nm) protection levels, but that lets at the same time, to obtain SPF *in vitro*, and UV-A/UV-B attenuation ratios too, in accordance with British Guidance.

To appreciate the CTFA (Cosmetic, Toiletry & Fragrance Association) Proposition to FDA, 1997, conditioning as valid the attribute B.S.P. (Broad Spectrum Protection), when λ_c (CW) ≥ 370 nm, with the complementary recommendation avoiding to use higher SPFs without a equilibrated attenuation on UV-A spectrum. This methodology that we have used to evaluate sunscreens SPF 30+ or SPF 30 Plus, with broad and equilibrated attenuations all over the ultraviolet spectrum, also we have used it, to qualify F.S.P. (Full Spectrum Protection), a photoprotective attribute advised for extremely photosensitive skin and exigent photodermatoses to prevent and to treat.

Finally, to promote that all sunscreens labels, have clear information about the photoprotection level, not only against sunburn as SPF do it very well, but qualifying the photoprotective information on UV-A range, recommending to use λ_c or CW, in addition to the specification B.S.P. or F.S.P. as appropriate, in order to give information to physicians, pharmacists, users, and to encourage a better clinical pharmacy skin photodamage understanding.

Key words: Skin photodamage.—Sunscreens.—Photodermatoses.—Clinical pharmacy.

El sol es una fuente continua de emisión de radiaciones electromagnéticas, con diferentes longitudes de onda λ , lo que permite definir rangos de radiaciones, como el ultravioleta (200-400nm), el visible (400-800nm), el infrarrojo >800 nm, y otros de menor interés fotobiológico.

No toda la radiación emitida por el sol, atraviesa la estratósfera, lo que determina que las radiaciones con longitud de onda menor de 200 nm, queden retenidas, como la radiación ultravioleta UV-C (200-290nm), y radiaciones más tóxicas, como RX, R γ , Rcósmicos.

El espectro ultravioleta que atraviesa la estratósfera (290-400nm) es de gran interés farmacéutico clínico y en atención a sus efectos, se divide en dos grandes rangos UV-B (290-320nm) y UV-A (320-400nm), subdividido este último por razones biológicas, en UV-A II (320-340nm) y UV-A I (340–400nm).

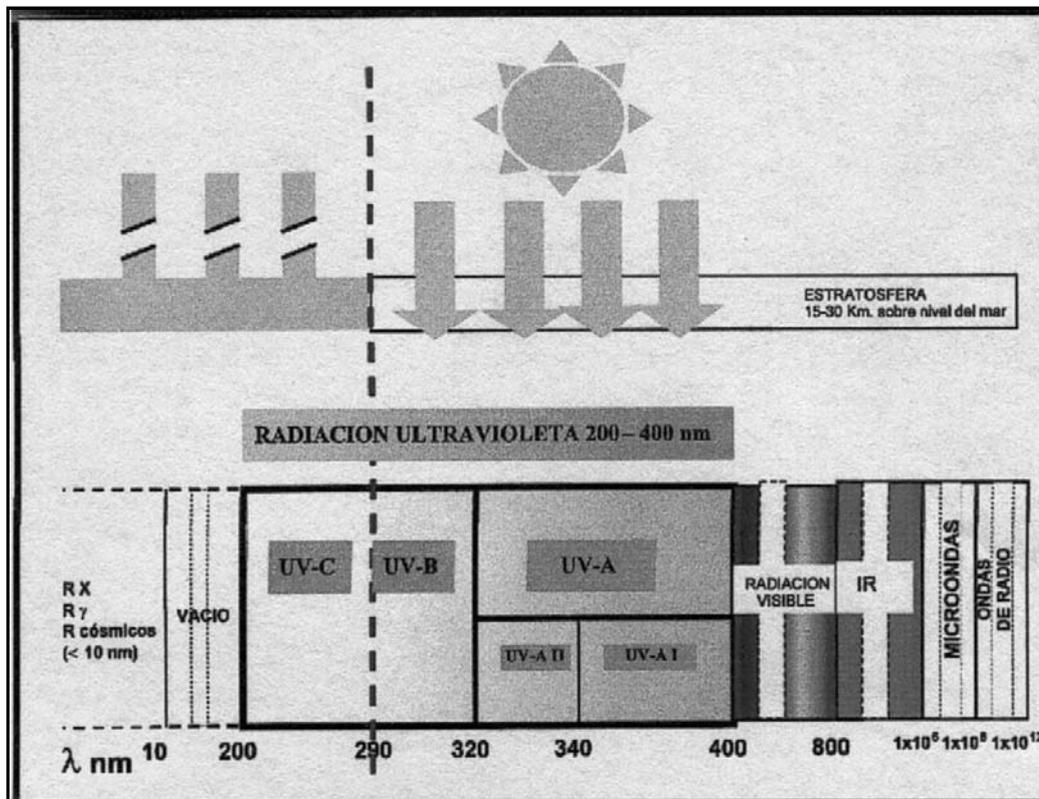


Fig.1: Radiaciones electromagnéticas emitidas por el sol.

DAÑO ACTINICO: entendemos las lesiones cutáneas producidas por las radiaciones que llegan a la superficie terrestre: UV-B (290-320nm), UV-A (320-400nm) y radiación visible hasta 515 nm. No es aceptado establecer correlaciones absolutas entre daño actínico y RUV, sí relativas, por lo que el fotodaño debe ser considerado en un marco de efectos aditivos.

Existen diferencias fotobiológicas relativas entre RUVs, que resultan ser de interés farmacéutico clínico: el caudal electromagnético emitido por el sol; la energía total transportada por cada rango ultravioleta, que llega a la superficie terrestre; la energía transportada por los fotones de cada radiación electromagnética; y el poder de penetración de la radiación.

Caudal electromagnético emitido por el sol, es directamente proporcional a la energía total transportada por cada rango UV.

λ	290 nm	320 nm	400 nm	800 nm	1×10^6 nm
	UV-B	UV-A	VISIBLE		
	0.1 %	4.9 %	39.0 %		56.0 %

Tabla 1: Caudal electromagnético emitido por el sol.

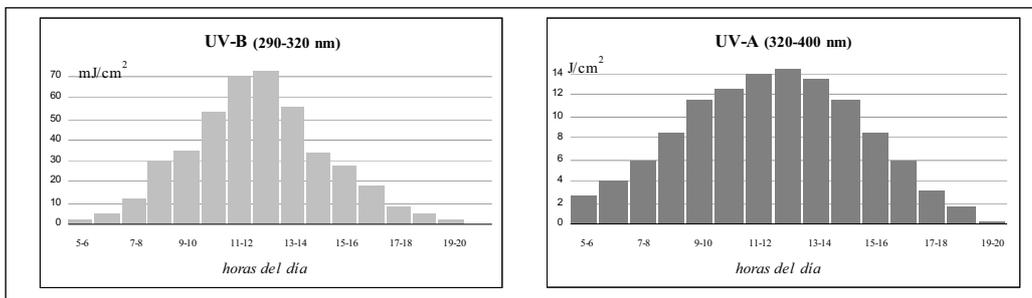


Fig. 2: Energía total transportada por cada rango UV, que llega a la superficie terrestre.

La energía transportada por los fotones de cada radiación electromagnética, es inversamente proporcional a la λ que la caracteriza:

$$E = h.c / \lambda$$

Energía relativa de los fotones de cada rango UV, resulta ser :

$$E_{UV-B (290-320nm)} > E_{UV-AII (320-340nm)} > E_{UV-AI (340-400nm)}$$

Penetración de las radiaciones según λ , a través de la piel y el vidrio son de significación biológica.

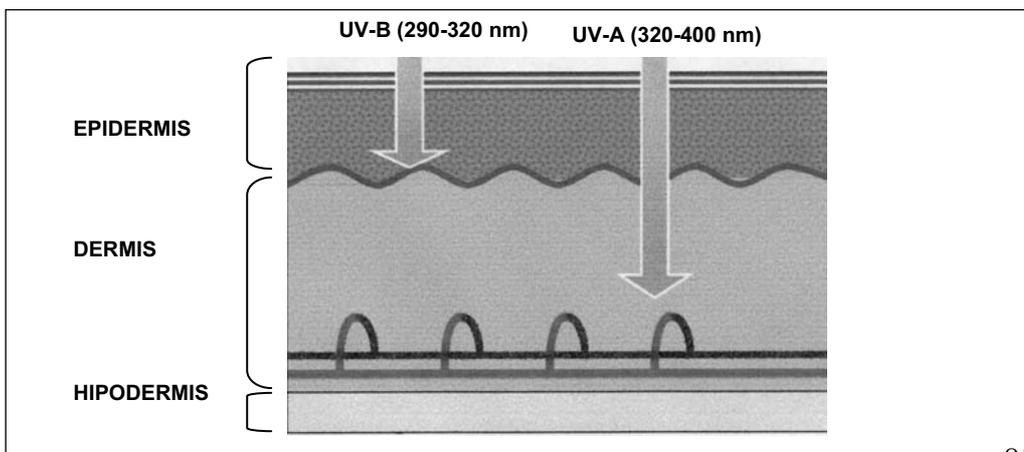


Fig. 3: Penetración de las radiaciones λ en los estratos cutáneos.

	UV-B (290-320 nm)	UV-A (320-400 nm)
VENTANA (3 mm)	3.5 %	85 %
PARABRISAS DE AUTO	9.8 %	70 %

Tabla 2: Transmisión porcentual de la radiación UV-A a través del vidrio.

Los parámetros fotobiológicos precedentes, son determinantes de tipo, intensidad y trascendencia del daño actínico resultante:

UV-B (290-320nm)

- quemadura (eritema) solar
- inmunosupresión
- cánceres cutáneos
- dermatosis actínicas en pieles fotosensibles
- reacciones fototóxicas y fotoalérgicas

UV-A (320-400 nm)

- fotoenvejecimiento cutáneo (heliosis)
- inmunosupresión
- cánceres cutáneos
- cataratas
- reacciones fototóxicas y fotoalérgicas
- dermatosis actínicas en pieles fotosensibles
- daño aditivo al producido por UV-B, especialmente por UV-AII (320-340nm)

QUEMADURA (ERITEMA) SOLAR, entendemos el proceso inflamatorio agudo producido por sobreexposición al sol (1-4). La quemadura solar alcanza su apex a las 24 hs., siendo uno de los estándares en las medidas del SPF.

SINTOMAS CUTANEOS

- enrojecimiento de la piel
- dolor
- edema
- vesiculación
- formación de ampollas
- necrosis, costras
- pigmentación desigual

SINTOMAS SISTEMICOS

“ENVENENAMIENTO SOLAR”

- fiebre
- náuseas
- vómitos
- severo dolor de cabeza
- postración
- shock
- muerte

ALTERACIONES MICROSCOPICAS

➤ A NIVEL EPIDERMICO

- edema intracelular
- vacuolización e hinchamiento de los melanocitos
- queratinocitos disqueratósicos (sunburn cells)
- migración de células de Langerhans

➤ A NIVEL DERMICO

- edema intersticial
- hinchamiento de las células endoteliales
- edema perivascular
- degranulación y pérdida de mastocitos (células cebadas)
- infiltración de polimorfonucleados y monocitos

MED (Dosis eritematosa mínima), es la energía/tiempo requerido para desarrollar un eritema mínimo en piel no protegida, leído a las 24 horas después de la exposición.

MED es función de la fuente de emisión recibida: solar; simulador solar, usado para determinar *in vivo*, los factores de protección al UV-B y al UV-A; UV-A (PUVA terapia); UV-B (UVB-295 nm terapia); UV-A + UV-B (terapia de amplio espectro). También es función del lugar, estación del año, condiciones climáticas durante la exposición: altura sobre nivel del mar; primavera/verano/resto del año; nubosidad.

La respuesta inflamatoria cutánea producida por UV-B, es mucho mayor que la debida a UV-A, por ser mayor la energía transportada por sus fotones, aunque el caudal y el total de energía emitida por el sol en el rango UV-B, sea significativamente menor. Los MEDs recibidos durante todo un día en verano, con cielo despejado, se estiman en 15 para el UV-B (290-320 nm) y 2.5 para el UV-A (320-400 nm), habiendo sido el fundamento fisicoquímico que la Food & Drug Administration utilizó en el período 1978-1993, para justificar que un fotoprotector con SPF 15, fuera suficiente para dar protección durante un día entero de exposición solar. El MED es función según Fitzpatrick, del fototipo de piel: Tipo I, se quema intensamente y nunca se broncea, al Tipo VI, piel de la raza negra (5).

DAÑO ACTINICO CRONICO, FOTOENVEJECIMIENTO CUTANEO (DERMATOHELIOSIS), es el daño actínico que se va desarrollando durante toda la vida, por prolongada exposición solar, sin racional fotoprotección, en pieles susceptibles. A la radiación UV-A (320-400nm), se le asigna principal responsabilidad, aunque no se minimiza la influencia de la UV-B (290-320nm) y para algunos autores, también de la RIR (>800 nm) (4, 6-8).

Existen diferencias entre las pieles envejecida naturalmente y la fotoenvejecida. La alteraciones superficiales son comunes: sequedad, rugosidad, pérdida de elasticidad, alteraciones de la coloración, arrugas, etc. En cambio, a nivel dermo-epidérmico, las diferencias son significativas. A nivel epidérmico, la piel envejecida naturalmente se muestra atrófica

(afinada), mientras que la fotoenvejecida se muestra acantótica (engrosada). A nivel dérmico, la piel envejecida fisiológicamente, se muestra hipocelular, con colágeno estable y matriz entrecruzada, mientras que en la piel fotoenvejecida, en la dermis, se observa proliferación de fibroblastos y mastocitos; vasos sanguíneos tortuosos y dilatados, y telangiectasias; degeneración de fibras elásticas, elastosis y significativo acortamiento del número de las divisiones en cultivo de queratinocitos y fibroblastos.

SOL Y CANCER CUTANEO, existe amplia evidencia científica, vinculante entre la inmunosupresión, las malignidades cutáneas y todo el espectro ultravioleta solar (9-10).

Se distinguen tres grupos: queratosis solar, lesiones premalignas superficiales, no invasivas; cánceres cutáneos no melanomas (NMSC), como el cáncer basocelular (BCC) y el espinocelular (SSC), intracutáneos, raramente metastásicos y el cáncer melanoma maligno (MM), intracutáneo, invasivo, metastásico, mortal.

Como referencia para enfatizar la importancia sanitaria de la interrelación sol-cáncer actínico, nos referiremos a las estadísticas norteamericanas del año 2001 (11). La incidencia de nuevos cánceres no melanoma (NMSC), es de 1.3 millones/año, equivalente a la incidencia de todos los otros cánceres del organismo combinados, estimándose que 1 de cada 5 americanos, desarrollarán por lo menos, 1 cáncer de piel en su vida. La incidencia del melanoma maligno (MM), es de 51.400 nuevos cánceres/año, con una incidencia que crece más rápidamente que cualquier otro tumor, resultando una mortalidad de 9.800 muertes en el año 2001 (11).

DERMATITIS ACTINICAS EN PIELES FOTOSENSIBLES, desórdenes cutáneos producidos o agravados por el sol en pieles fotosensibles (12-14).

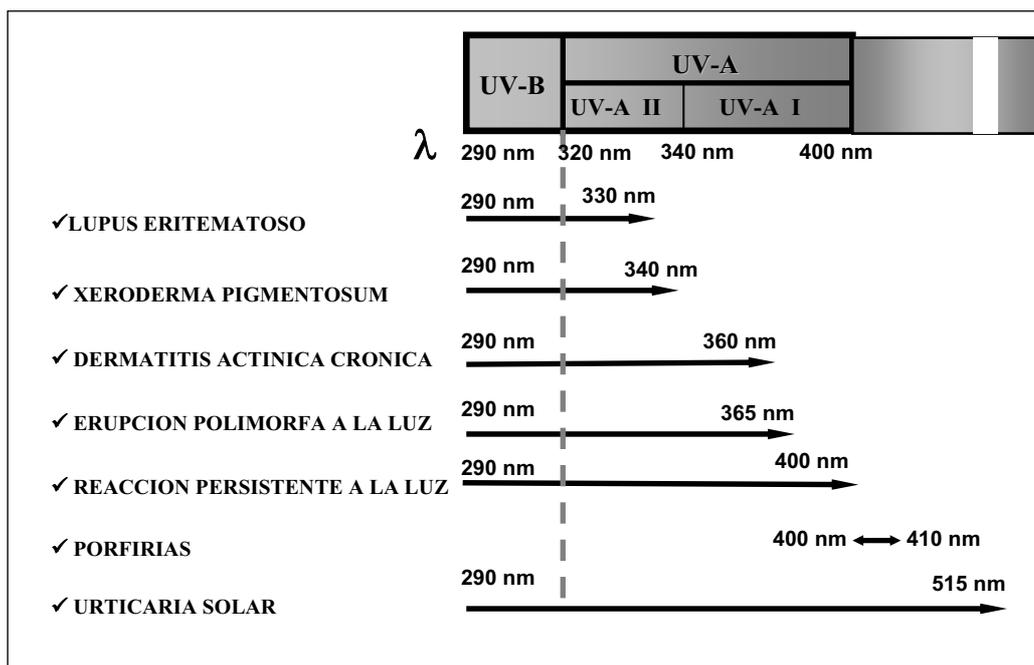


Tabla 3: Rango de radiaciones electromagnéticas que exacerbaban dermatitis actínicas en pieles fotosensibles.

REACCIONES CUTANEAS DE FOTOSENSIBILIDAD, producidas fundamentalmente por la radiación UV-A, se distinguen en dos grandes grupos, las reacciones fototóxicas, caracterizadas por tratarse de una reacción tóxica directa sobre la piel, sin participación del sistema inmunológico, producida por moléculas fotodegradadas: plantas, líquenes, esencias y perfumes, tretinoína, hidroquinona. El segundo grupo corresponde a las reacciones fotoalérgicas, caracterizadas por una reacción inmunológica retardada por medicamentos administrados sistémicamente, que se convierten en antígenos por la irradiación ultravioleta de la piel: citostáticos, antidepresivos, antihistamínicos, antimicrobianos, antiparasitarios, antiprocóticos, diuréticos, hipoglicemiantes, AINEs, filtros solares, otros varios

(12-15). Todo el espectro ultravioleta puede producir este tipo de reacciones, siendo la UV-A (320-400nm), de significativa importancia.

DE ACUERDO AL TIPO DE DAÑO ACTINICO A EVITAR, LA SELECCION DEL NIVEL, AMPLITUD Y EQUILIBRIO DE LA FOTOPROTECCION EN TODO EL ESPECTRO ULTRAVIOLETA, es de interés farmacéutico clínico, relacionar la patología actínica a proteger, con los rangos ultravioleta y visible que más específicamente son necesarios de atenuar (12-15).

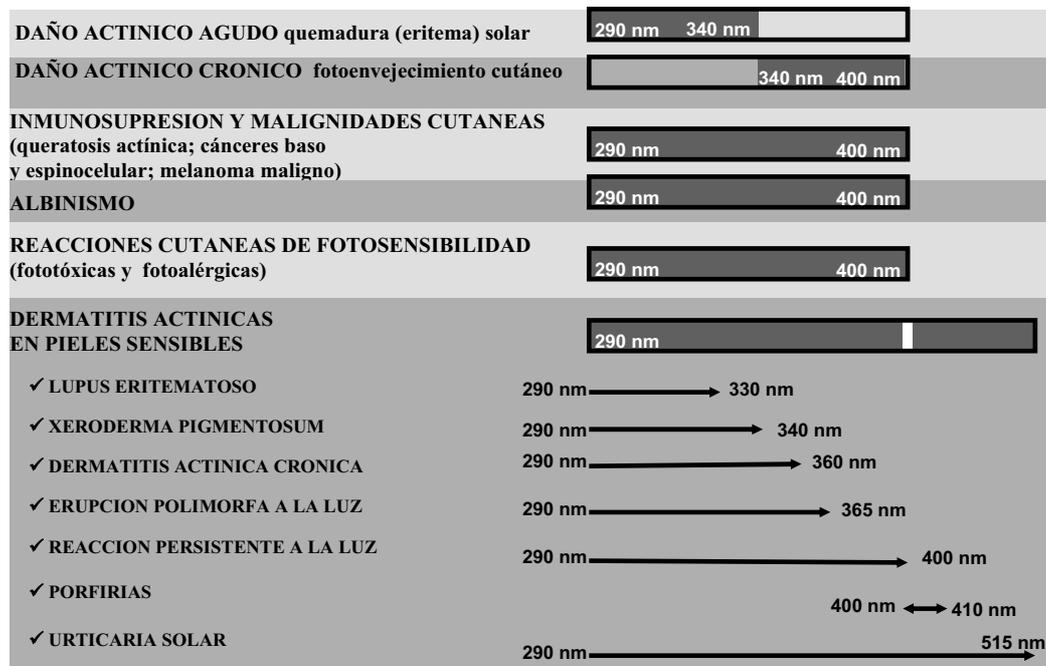
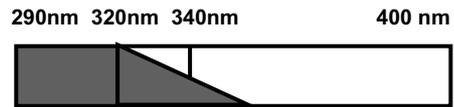


Tabla 4: Patología actínica y el rango UV más específicamente necesario de atenuar.

SE DISTINGUEN TRES GRANDES GRUPOS DE FOTOPROTECTORES:

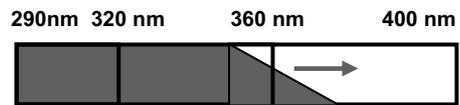
FILTROS SOLARES DE RANGO ESTRECHO

- atenuación reducida
- prototipo: PABA 5%



FILTROS SOLARES DE AMPLIO ESPECTRO

- atenuación extendida
- prototipo: oxibenzona



BLOQUEADORES FISICOS Y PANTALLAS SOLARES

- atenuación por pigmentos
- prototipo: petrolato rojo veterinario



EVOLUCION DE LOS FILTROS SOLARES DE RANGO ESTRECHO, ha constituido el primer gran progreso a nivel de la protección contra la quemadura solar (eritema), por UV-B (290-320nm) y parte de la UV-A II (320-400nm); en la prevención de la inmunosupresión y de los cánceres cutáneos por UV-B (290-320nm); y alcanzar filtros solares con altos SPFs.

- DERIVADOS DEL PABA
PADIMATE O (Octyl Dimethyl PABA) (USP)
- DERIVADOS DE LOS CINAMATOS
Octyl Methoxycinnamate (USP)
- DERIVADOS DE LOS SALICILATOS
Octyl Salicylate (USP)
- OCTOCRYLENO (USP)
- DERIVADOS DEL ALCANFOR
4-Methylbezylidene Camphor

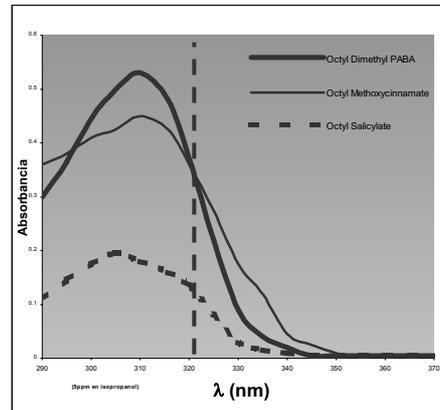


Fig. 4: Rango de atenuación de los filtros solares de rango estrecho.

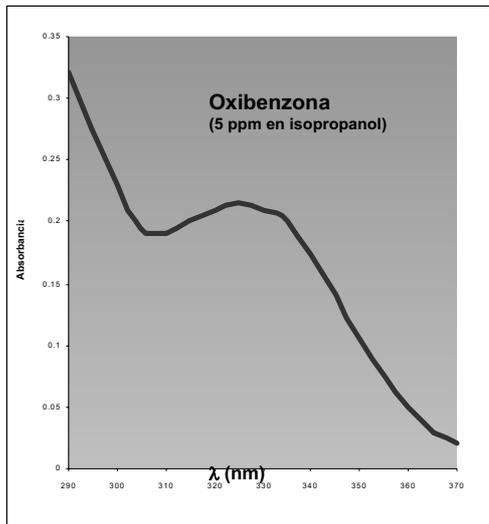


Fig. 5: Rango de atenuación ultravioleta de la benzofenona-3 (oxibenzona).

EVOLUCION DE LOS FILTROS SOLARES DE AMPLIO RANGO, con la introducción de la benzofenona-3 en la década de los años 60 (16-17), con la extensión de la curva de extinción hacia la derecha del espectro, se da un paso muy importante de interés farmacéutico clínico.

Con los filtros solares de amplio rango, se logra mejor y mas amplia fotoprotección, en una serie de fotodermatitis que no quedaban protegidas con los de rango estrecho y también en la prevención de cáncer actínico (ver Tabla 4).

A la benzofenona, siguen nuevos absorbentes de amplio espectro:

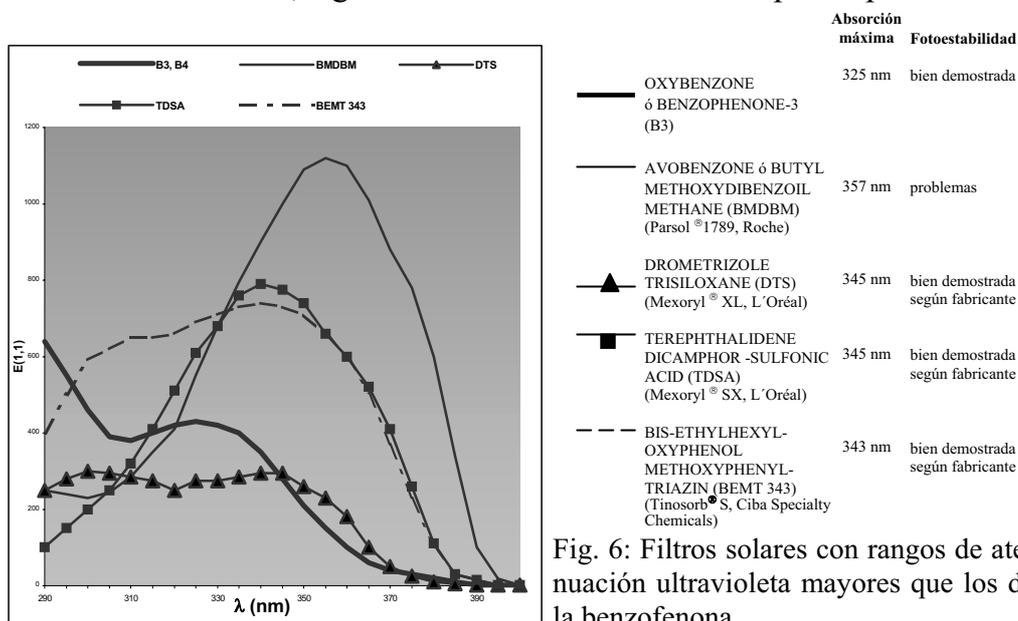


Fig. 6: Filtros solares con rangos de atenuación ultravioleta mayores que los de la benzofenona.

Los bloqueadores físicos y pantallas solares clásicos, producen la atenuación por pigmentos inorgánicos, como los óxidos de hierro, titanio y cinc. Es crítica la relación entre el tamaño de partícula de los pigmentos y los rangos ultravioleta que son atenuados (18), como se puede observar en la Fig.7, con el dióxido de titanio.

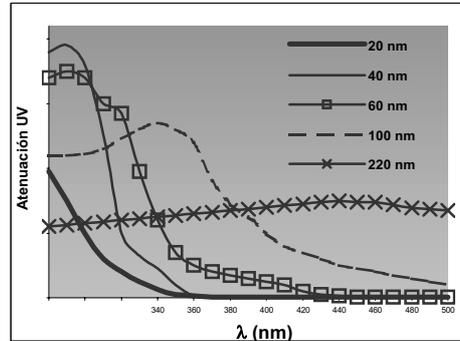


Fig. 7: Relación entre tamaños de partículas y rangos de atenuación del dióxido de titanio.

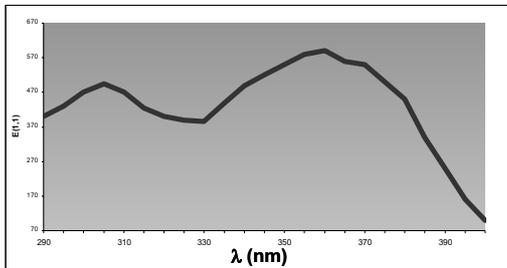


Fig. 8: Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol (BEMT 359) (Tinosorb® M, Ciba Specialty Chemicals).

Los pigmentos inorgánicos y orgánicos tienen aceptación cosmética variable (18).

Además de los pigmentos inorgánicos, debe considerarse un pigmento orgánico en partículas microfinas (19), con amplio rango de atenuación en todo el espectro ultravioleta, como el mostrado en la Fig.8.

Vale señalar, que los protectores solares que usan la calificación “pantalla solar” o “bloqueadores”, son cuestionados porque pueden inducir a falsas expectativas, razón por la que importantes legislaciones sanitarias, prohíben el uso de este tipo de calificativos.

CUANTIFICACION DE LA FOTOPROTECCION EN EL RANGO UV-B (290-320nm).

El SPF (**Factor de Protección Solar**) es la magnitud más conocida para cuantificar la fotoprotección en el rango UV-B (290-320nm).

$$\text{SPF} = \frac{\text{energía necesaria para producir 1 MED en piel protegida}}{\text{energía necesaria para producir 1 MED en piel no protegida}}$$

SPF, es obtenido en condiciones rigurosamente estandarizadas, que han ido evolucionando con el tiempo y que en el momento actual, permiten afirmar que los resultados obtenidos por las metodologías: FDA (Food & Drug Administration) y la del COLIPA (The European Cosme-

tic, Toiletry and Perfumery Association), no presentan grandes diferencias estadísticas, que no era lo que sucedía con el SPF por la norma DIN (20). SPF obtenido *in vivo*, es una magnitud exacta y reproducible. Con los valores altos (SPF>30), hay pérdida de exactitud y reproducibilidad, lo que actualmente es una preocupación por resolver.

El valor del SPF, es particularmente valioso para cuantificar la atenuación en el UV-B (290-320nm) y parte de UV-A II (320-340nm), o sea la fotoprotección contra el daño actínico por esta radiación: quemadura solar; inmunosupresión; cánceres cutáneos; fotodermatosis inducidas o exacerbadas por el sol.

El SPF no tiene valor para cuantificar la atenuación en el UV-A (320-340nm), o sea la fotoprotección contra el daño actínico crónico: fotoenvejecimiento cutáneo; inmunosupresión; cánceres cutáneos; fotodermatitis en pieles sensibles; reacciones fototóxicas y fotoalérgicas y daño aditivo al producido por UV-B.

El SPF como único factor de protección, ha conducido y sigue dando lugar a grandes confusiones de médicos, farmacéuticos y usuarios, teniendo la farmacia clínica, la oportunidad de ayudar a aclarar.

CUANTIFICACION DE LA FOTOPROTECCION EN EL UV-A (320-400nm), no se encuentra internacionalmente armonizada como con el SPF, aunque existen varias metodologías con diferente grado de aceptación y reproducibilidad.

La **metodología *in vivo*** (21), usa criterios semejantes a los practicados con el SPF, irradiando piel protegida y no protegida en el mismo sujeto, después de haber filtrado la UV-B (290-320nm) emitida por el simulador solar, y comparando puntos finales experimentales, como oscurecimiento y eritema cutáneo. Es una magnitud numérica, absoluta, no relacionada con el SPF, diferencia con la metodología *in vitro*.

Existen varias metodologías *in vivo* para cuantificar la fotoprotección en el UV-A (320-400nm): *PPD (Persistent Pigment Darkening)*, que es el estándar japonés desde 1984 y tiene la gran ventaja de mostrar un punto final estable; *UVA-PF (UV-A Protection Factor)*, se le critica por requerir mucha energía UV-A II (320-340nm) para producir eritema en piel Tipo I y que los resultados son difíciles de extrapolar al UV-A I (340-400nm);

IPD (Immediate Pigment Darkening), adolece del defecto de mostrar un punto final inestable; *PPF (Phototoxic Protection Factor)*, si bien se requiere menor energía y tiempos de exposición más cortos, no es recomendado por poder comprometer la salud de los voluntarios sanos. La PPD, IPD y PPF, usan como punto final de comparación, el oscurecimiento de la piel, mientras que la UVA-PF, practica el eritema (quemadura).

La **metodología *in vitro***, es una tecnología espectrofotométrica adaptada a la cuantificación de la atenuación producida en todo el espectro ultravioleta (290-400nm). La cuantificación de la atenuación en el UV-A (320-400nm), no se expresa por un número absoluto, como resulta de las metodologías *in vivo*, sino que es una magnitud vinculada al SPF, ya que relacionando las atenuaciones UV-A (320-400nm)/UV-B (290-320nm), es posible cuantificar la amplitud y equilibrio de la atenuación en todo el espectro ultravioleta.

La *metodología espectrofotométrica diseñada por Boots The Chemical Ltd (22-23)*, ha permitido en base a la relación de atenuaciones UV-A(320-400nm)/UV-B(290-320nm), expresar cuantitativamente el nivel, amplitud y equilibrio de atenuación en el UV-A (320-400nm), con respecto al SPF que ostenta el fotoprotector. El sistema de estrellas de Boots, ha dado lugar a la normativa británica de las cuatro estrellas (22):

$R = \frac{A_{UV-A(320-400nm)}}{A_{UV-B(290-320nm)}}$	★	≥ 0.2	baja
	★★	≥ 0.4	mediana
	★★★	≥ 0.6	alta
	★★★★	≥ 0.8	muy alta

cuantifica el nivel de atenuación en el UV-A (320-400nm), y conociendo el SPF, obtenido por la tecnología usual, es posible expresar la fotoprotección en todo el espectro ultravioleta.

En 1993, usamos metodología espectrofotométrica comparativa de atenuación UV-A (320-400nm)/UV-B (290-320nm), para demostrar los riesgos farmacéuticos clínicos de usar sólo el SPF (16-17).

La *metodología espectrofotométrica del Labsphere (23-25)*, se practica con un equipo computarizado diseñado para evitar el scattering de la luz transmitida, en base a la tecnología DRS (Diffuse Reflectance Spectroscopy). Mimetiza la metodología *in vivo*, aplicando 2 mg/cm², ya sea sobre un film hidrofílico, Transpore Film, 3M, o sobre un cultivo de piel artificial en marco apropiado a la lectura del equipo. Mediante el uso de

esta tecnología computarizada, se obtiene la curva de atenuación en todo el espectro ultravioleta (290-400nm), la que procesada por un software adecuado, permite calcular magnitudes de mucho interés en todo el espectro UV: una nueva magnitud, λ_c ó CW (Longitud de Onda Crítica), que corresponde a la longitud de onda λ , en que el 90% del área debajo de la curva de extinción (290-400nm), corta al eje de las abscisas correspondiente a λ ; SPF *in vitro*, equivalente al SPF obtenido *in vivo*, con un valor ligeramente superior, fácil de compensar y corregir y la relación de atenuaciones UV-A (320-400nm)/UV-B (290-320nm), de acuerdo a la British Guidance.

CATEGORIZACION DE LA FOTOPROTECCION Y SU EVOLUCION HISTORICA. PRESENTE Y FUTURO, muestra una evolución muy interesante desde un punto de vista fisicoquímico, fotobiológico y farmacéutico clínico.

1978 • *FDA FEDERAL REGISTER: SUNSCREEN PRODUCTS FOR OVER-THE-COUNTER* (26), donde por primera vez se definieron niveles de fotoprotección. El mayor, llamado Ultra Protección Solar, con SPF 15 máximo, estaba de acuerdo con el concepto de la época, de que con sólo SPF 15, la piel quedaba protegida contra todo el daño actínico que el sol podía producir, en un día completo de verano.

1984 • *METODOLOGIA DIN (ALEMANA), PARA DETERMINAR SPF* (19), fue la primera normativa europea, seguida por muchos países. No fue una normativa ampliamente usada, por falta de recomendación en el simulador solar usado (Osram Vitalux).

1990 • *COLIPA "TASK FORCE SUN PROTECTION MANAGEMENT"*, para normatizar la determinación del SPF (27), integrada por representantes de la mayoría de los fabricantes europeos de fotoprotectores y de laboratorios de ensayos para terceros.

1994 • *COLIPA SPF TEST METHOD* (28-29), define metodología europea para el SPF, con resultados que no muestran diferencias estadísticas significativas con los de la FDA, quedando en desuso la norma DIN.

1993 • *FDA FEDERAL REGISTER: TENTATIVE FINAL RULE* (30), con respecto al Federal Register de 1978 (26), el nivel más alto evoluciona de Ultra Protección SPF 15 a Ultra Alta Protección SPF 30, en coinci-

dencia con la evidencia de que existen pieles muy sensibles, patologías actínicas y condiciones especiales de uso, para las que el SPF 15 no era suficiente.

Lo que es interesante en la Tentative Final Rule, es la definición de un nuevo y valioso atributo para calificar la fotoprotección: *B.S.P. (Protección de Amplio Espectro)*, calidad adquirida por un fotoprotector, cuando contiene activos con amplio rango de protección (benzofenonas, pigmentos inorgánicos), dentro de los niveles de uso descritos en la Tentative Final Rule. El atributo B.S.P., está indicando que el fotoprotector da cobertura frente al daño actínico por UV-A (320-400nm), con la limitación de no hacerlo en forma cuantitativa, como lo hace el SPF.

B.S.P. (Amplio Espectro de Protección), es una creación compensatoria de las limitaciones inherentes a la metodología como se determina el SPF, la que prácticamente carece de alcance en el UV-A (320-400nm). B.S.P. es un atributo fomentado por la Skin Cancer Foundation, por el valor que representa en la protección del cáncer actínico (31). B.S.P., resulta ser un atributo cualitativo no vinculado al SPF que tenga el filtro solar, por lo que deja margen para que hayan en el mercado, productos con altos SPF e insuficiente amplitud de protección en el UV-A (320-400nm), lo que ha sido y no debe seguir siendo, mal aprovechado con fines de mercadeo cosmético.

El avance tecnológico, galénico, y la presión del marketing cosmético, no así el farmacéutico, condujo a que los SPF alcanzaran valores inimaginables -SPF 100 en Japón-, con la consecuencia de que los usuarios se sintieran extraordinariamente protegidos, cuando realmente podrían encontrarse: de sobreprotegidos frente a la UV-B (290-320nm), a indefinidamente desprotegidos frente a la UV-A (320-400nm), situación que ha dado lugar a un consenso cada vez mayor, de que no se puede continuar con este tipo de indefiniciones, que atentan contra la salud de la población.

1997• *CTFA (COSMETIC, TOILETRY & FRAGRANCE ASSOCIATION), PROPOSITION TO FDA*, conocida como CTFA Consensus Method (32), propone una novedosa metodología para cuantificar el atributo B.S.P. (Protección de Amplio Espectro). Valiéndose de la tecnología espectrofotométrica del Labsphere, descrita en la Cuantificación de la Fo-

toprotección en el UV-A (320-400nm), define el atributo B.S.P. (Protección de Amplio Espectro), cuando la λ_c (CW) ≥ 370 nm, la que por ser una magnitud relacionada al SPF, porque ambas magnitudes se obtienen de la misma curva de extinción (290-400nm), es posible: obtener una medición cuantitativa de la protección en el UV-A (320-400nm); obtener una cuantificación de la fotoprotección en todo el espectro ultravioleta (290-400nm); y determinar la relación de atenuaciones UV-A (320-400nm)/UV-B (290-320nm), según la normativa británica de las 4 estrellas, y así cuantificar la protección en el UV-A, que en la FDA Tentative Final Rule (30), no se había hecho, y hasta el presente sigue sin hacerse.

El uso de la normativa inglesa basada en la metodología de Boots, al igual que la Proposición de la CTFA a la FDA, son consideradas de gran valor para frenar la “carrera galopante” de los SPFs, sin la contrapartida del incremento de atenuación en el UV-A (320-400nm), lo que se pone en evidencia, cuando el número de estrellas es bajo, o el λ_c (CW) muestra valores menores de 370 nm.

1997-1998 PROBLEMATICA DE LOS PROTECTORES BSP SIN CUANTIFICACION, HACE ECLOSION, cuando la CTFA demuestra, y los resultados se hacen públicos (33), que los fotoprotectores disponibles en el mercado norteamericano, el 93% mostraron: λ_c (CW) ≥ 340 nm, evidenciando adecuada protección frente al daño actínico agudo (quemadura solar), pero el 80-90% mostraron: λ_c (CW) < 370 nm, poniendo en evidencia, que de acuerdo a la propuesta de la CTFA, los fotoprotectores del mercado norteamericano, en su gran mayoría, no alcanzaban el atributo B.S.P., es decir, no ofrecían una amplia y equilibrada protección en todo el espectro ultravioleta.

Este cuestionamiento sobre la calidad de fotoprotección disponible, tuvo eco en el Congreso de los E.E. U.U., quien emitió un “issue” mandatorio a la FDA, para que con fecha límite 21 de mayo de 1999, publicara una FDA Monografía Final (34).

En marzo de 1999, tres meses antes de que la FDA emitiera la Final Rule, comenzamos a investigar los niveles de protección y el balance de atenuación entre los rangos UV-A (320-400nm) y UV-B (290-320nm), en fotoprotectores de alta performance, formulados por nosotros, utilizando la metodología precedente, propuesta por la CTFA a la FDA (32),

con el objetivo de formular y certificar en forma cuantitativa, productos con alto nivel de protección, que tuviesen el atributo de Amplio Espectro de Protección (B.S.P.), buscando superar una temática que en ese momento, no estaba bien difundida en Ibero-América, ni Europa, como lo pudimos apreciar en el ICE de Miami-FL-USA, 1999, y en el XIV Congreso Ibero-Latino Americano de Dermatólogos, Málaga-España, 1999.

Los estudios realizados con la tecnología de la Labsphere Ultraviolet Transmittance (24-25), con el apoyo del Dr. David Fairhurst (UK-USA) y del Sr. Steve Rogers (USA), nos ha permitido validar dos tipos de fotoprotectores de alta performance: Fotoprotector de Alto Nivel de Protección, con el atributo B.S.P: SPF 30+ ó 30 Plus y λ_c (CW) 375 nm, o sea un fotoprotector con Alto Nivel de Protección y Balanceada Atenuación entre los Rangos Ultravioleta UV-B (290-320nm) y UV-A (320-400nm) (35), y también fotoprotectores con el atributo F.S.P. (Full Spectrum Protection), caracterizado por SPF 60 y λ_c (CW) 385 nm (36-37), particularmente indicados para la prevención y tratamiento de las pieles extremadamente sensibles, en la prevención y tratamiento del cáncer actínico, fotodermatosis y dermatitis agravadas por el sol, que requieren extraordinaria y equilibrada fotoprotección. El valor de expresar la fotoprotección en el UV-A (320-400nm), mediante λ_c (CW), es respaldada por la American Academy of Dermatology (38).

21/05/1999 FDA FEDERAL REGISTER: FINAL RULE. SUNSCREEN DRUG PRODUCTS FOR OVER-THE-COUNTER HUMAN USE, CONOCIDO TAMBIEN COMO FINAL MONOGRAPH (34), en la que aparece nueva conceptualización, que como se expondrá, ha sido severamente cuestionada en muchos aspectos.

La primera innovación cuestionada, ha sido reducir y limitar los niveles de protección, a sólo tres, referenciados exclusivamente a la quemadura solar, en base nada más que al SPF: SPF 2 a < 12 (Mínima Protección a la Quemadura Solar); SPF 12 a < 30 (Moderada Protección a la Quemadura Solar); SPF 30 o > 30 (Alta Protección a la Quemadura Solar), criterio que ha sido severamente cuestionado, porque omite cuantificar la protección en el UV-A (320-400nm).

Si bien la Final Rule reafirma el atributo de B.S.P., definido en la Tentative Final Rule de 1993 (30), sigue sin hacerlo en forma cuantitati-

va, lo que ha recibido múltiples cuestionamientos por no asegurar que la fotoprotección sea amplia y equilibrada en todo el espectro ultravioleta.

La segunda innovación cuestionada, ha sido hecha a la disposición de que la rotulación de los fotoprotectores con SPFs mayores que 30, quedase limitada a SPF 30+, SPF 30 Plus, criterio que fue severamente cuestionado por considerarse que no es una buena estrategia para controlar la “carrera galopante de los SPFs”, sin contrapartida de la fotoprotección en el UV-A (320-400nm). Además, la Final Rule especificó, que cualquier rotulación que estableciera numéricamente un SPF>30, determinaría que el producto fuera descalificado bajo la sección 502 de FDA, lo que recibió severos cuestionamientos, por considerar que es violatorio del derecho del ciudadano de disponer información calificada del producto que consume. Originalmente se establecía un plazo de 2 años para instrumentar la nueva rotulación, lo que también fue cuestionado, no sólo por los perjuicios de tener que rotular todos los envases, sino por la limitación informativa.

El criterio de resistencia al agua de un filtro solar: resistente y muy resistente al agua, ha tenido aceptación.

08/07/2000 *FDA POSPUSO LA ENTRADA EN VIGENCIA DE LAS NUEVAS NORMAS DE ROTULACION DEL 21/05/1999 AL 31/12/2002* (39), como consecuencia de la resistencia levantada por la comunidad científica a la Final Rule, sumada al cada vez mas desarrollado consenso internacional de que no se puede seguir siendo tolerantes con la inflación de los SPFs, es decir la protección contra la radiación fundamentalmente eritematogena UV-B (290-320nm), sin que se incremente paralelamente la atenuación sobre la radiación fototóxica UV-A (320-400nm) (33).

FEBRERO 2002, LA FDA ANUNCIA LA EXTENSION DE LA FECHA LIMITE PARA REROTULAR LOS FILTROS, extendiendo la fecha límite de aplicación a “no antes del 2005”, como consecuencia de la reclamación que la CTFA, hiciera frente a la justicia, reclamando protección por la Segunda Enmienda de la Constitución de los E.E. U.U. de Norteamérica, en defensa del derecho del ciudadano, de tener calificada fotoprotección. Esta segunda postergación, le permitirá a la FDA, desarrollar nueva metodología para cuantificar la fotoprotección frente al UV-A (320-400nm) y métodos precisos para determinar SPF en los productos

con SPF >30, lo que es un reconocimiento del valor de los mismos. Esta decisión de la FDA, es una demostración de la importancia que tiene no sólo la cuantificación en forma documentada de la fotoprotección en todo el espectro ultravioleta, sino la validez de los fotoprotectores con altos SPF.

Los fotoprotectores con SPF>30, con alta y equilibrada atenuación en el resto del espectro ultravioleta, tienen su justificación porque permiten contrarrestar la pérdida proporcional de efectividad, cuando sobre la piel se aplica menos de 2 mg/cm² de fotoprotector -estándar usado en la prueba de SPF y λ_c (CW)-, dando lugar a una situación que en la práctica es más frecuente de lo pensado, consecuencia de la moderna tecnología aplicada en los vehículos, que por ser más extensibles sobre la piel, dejan menos de 2 mg/cm². Los fotoprotectores con altos SPFs, mayores de 30, permiten mayor tiempo de exposición, sin necesidad de tantas re-aplicaciones; ofrecen mayor protección contra el daño actínico agudo y contra el daño crónico, en las horas en que la exposición es menos recomendada (10:00 a 15:00 horas); mayor coeficiente de seguridad frente al cáncer actínico; y ser los más indicados en pieles extremadamente sensibles o con gran facilidad para desarrollar fotodermatitis producidas o inducidas por el sol y en condiciones extremadamente exigentes de uso.

27/06/2002 *SITUACION DE LA CATEGORIZACION DE LA FOTOPROTECCION, EN LA COMUNIDAD EUROPEA*. The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association, 40 Years of Colipa, Venice, Italy, tenía en su programa dos sesiones referidas a la problemática que se le ha cuestionado a la Final Rule: A Fresh Look at UV-A Testing a las 12:30 hs., y Colipa Recommendation on SPF Labeling a las 14:30 hs., lo que es claro, que en la Comunidad Europea, la cuantificación y rotulación de la fotoprotección en todo el espectro ultravioleta, al igual que en los E.E. U.U., está por armonizarse.

CONCLUSIONES

Valorar positivamente, la evolución conceptual que la fotoprotección ha tenido en los 24 años, desde 1978 a la fecha. En primer lugar, la transformación de categoría sanitaria que viene ocurriendo, de cosméticos a

OTC-Drug Products, y en casos más especializados, a medicamentos propiamente dichos. En segundo lugar, la evolución de los filtros solares con baja protección a la quemadura solar, más bronceadores que fotoprotectores, a productos con eficaces y altos niveles de protección, contra el daño actínico agudo (quemadura solar) fundamentalmente por UV-B (290-320nm); el daño actínico crónico (fotoenvejecimiento cutáneo) fundamentalmente por UV-A (320-400nm); el cáncer actínico tanto por UV-B (290-320nm), como por UV-A (320-400nm); las dermatitis actínicas en pieles fotosensibles; las reacciones de fototoxicidad y fotosensibilidad.

La cuantificación de los niveles de protección, si bien es una problemática que ha presentado muchos cambios y aportes en los últimos 24 años, todavía presenta muchos aspectos no resueltos, que hay que solucionar. El SPF (Factor de Protección Solar), si bien es una magnitud armonizada internacionalmente (FDA; COLIPA; Normativas Japonesa y Australiana), comienza a cuestionarse su exactitud y reproducibilidad con los SPF's más altos. Se debe tener bien claro, que el SPF, si bien es excelente para cuantificar protección frente a UV-B (290-320nm), resulta totalmente insuficiente para el UV-A (320-400nm), y que tratar de validar fotoprotectores con Alto Nivel de Protección Solar sólo con el SPF, no sólo es insuficiente, sino peligroso. Hoy existe consenso, que es necesaria una metodología armonizada para cuantificar la protección en el UV-A (320-400nm). Tanta metodología disponible, λ_c (CW); PPD; UVA-PF; IPD; PPF, es una demostración de la necesidad de que hay que armonizarlas. La metodología *in vitro* Labsphere, nos parece excelente por darnos la λ_c (CW), en forma relacionada con el SPF, mientras que las metodologías *in vivo*, son cuestionadas por la energía o el tiempo de exposición que tienen que recibir los voluntarios sanos, o el riesgo de que queden sensibilizados. El PPD validado por la normativa japonesa, parecería comparativamente el mejor, por usar la pigmentación permanente como punto final estable. El UVA-PF, que usa el eritema como punto final, da resultados cuestionables en su extrapolación al UV-A I, de longitud de onda larga (340-400nm).

Valorar la importancia y trascendencia de la evaluación que se hiciera a los productos del mercado norteamericano, entre 1997-1998, según metodología propuesta por CTFA a FDA, lo que diera lugar y sigue dando, a

cambios trascendentes en lo científico y lo jurídico, como ha sido la primera postergación del 21/05/2001 al 31/12/2002, en la obligación de rotular los fotoprotectores SPF>30, como SPF 30+ ó SPF 30 Plus, seguido de una segunda, para no antes del año 2005, con el reconocimiento explícito de la necesidad de validar los fotoprotectores con SPF significativamente mayor de 30 y también, nuevas metodologías para cuantificar la protección en el UV-A (320-400nm), y así poder calificar cuando un fotoprotector brinda atenuación amplia y equilibrada en todo el espectro ultravioleta.

No escatimar esfuerzos, para que la fotoprotección sea amplia y equilibrada en todo el espectro ultravioleta. El atributo B.S.P. (Protección de Amplio Espectro), según proposición de CTFA a la FDA en 1997, que fuere recomendado por la Asociación Dermatológica Americana en su Meeting Anual del 2000, debe ser considerado atributo mínimo de un fotoprotector, el que se alcanza cuando para el SPF característico del fotoprotector, la λ_c (CW) \geq 370 nm. El atributo F.S.P. (Cuasi Total Protección en todo el Espectro Ultravioleta), que se logra con SPF 60 y λ_c (CW) 385 nm, es el aconsejable para condiciones muy exigentes de uso y para la prevención y tratamiento de las fotodermatosis producidas o inducidas por el sol.

Destacar las ventajas de los fotoprotectores con altos SPF's, es decir SPF>30, complementados con alta, amplia y equilibrada atenuación en todo el espectro ultravioleta, frente a hechos prácticos, como que la cantidad de fotoprotector aplicado sobre la piel, suele ser menor que los usados para la determinación de los valores de SPF y λ_c (CW), y muchas ventajas de uso, como mayor tiempo de exposición sin reaplicación, más alto coeficiente de seguridad en las horas de exposición menos recomendadas (10:00 a 15:00 horas), frente al cáncer actínico, en la prevención del fotoenvejecimiento, y en la prevención y tratamiento de las fotodermatosis producidas y/o exacerbadas por el sol.

No escatimar esfuerzos para que en defensa de médicos, farmacéuticos y usuarios, los filtros solares tengan clara y precisa información sobre el nivel de fotoprotección. Considerar válidos, el SPF para la protección en el UV-B (290-320nm); la λ_c (CW) para la atenuación en el UV-A (320-

400nm); el B.S.P. como atributo mínimo de un fotoprotector, o el atributo F.S.P., cuando corresponda.

Finalmente, destacar que la interpretación farmacéutica clínica de la problemática fotoprotectora, acompañado del adecuado asesoramiento al equipo multidisciplinario de salud; al paciente con patología actínica; al usuario general; y la participación en campañas nacionales de educación frente al sol, entendemos que son de valor en la prevención y tratamiento del daño actínico.

BIBLIOGRAFIA

- (1) American Academy of Dermatology Meeting, USA, 2002.
- (2) Boots The Chemistry Ltd. The Guide to Practical Measurement of UVA/UVB Ratios. The Boots Co. PLC, Nottingham, England.
- (3) BROWN M.W. (2002) The COLIPA SPF Test Method. The Devil is in the Detail. and European Trends. 8th Florida Sunscreen Symposium, SCC, 28th April.
- (4) COLIPA Sun Protection Factor Test Method, published by the European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (COLIPA), Brussels, Belgium, October 1994.
- (5) CRAIG E. (2002) Green Tea Polyphenols, 8th Florida Sunscreen Symposium, SCC, 28th April.
- (6) CTFA Consensus Method. Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association Proposition to Food and Drug Administration, August, 1997.
- (7) DE LOS SANTOS,C.; SALDOMBIDE,C. (2000) Alta Fotoprotección (SPF 30+ ó 30 plus) con Balanceada Atenuación entre los Rangos Ultravioleta UV-B (290-320 nm) y UV-A (320-400 nm). VI Congreso FeFaS (Federación Farmacéutica Sudamericana). Poster # 94, Montevideo – Uruguay, Abril.
- (8) DE LOS SANTOS,C.; SALDOMBIDE,C. (2000) Fotodermatitis y Dermatitis Agravadas por el Sol, que Requieren Extraordinaria y Equilibrada Fotoprotección. VI Congreso FeFaS (Federación Farmacéutica Sudamericana). Poster # 95, Montevideo – Uruguay, Abril.
- (9) DE LOS SANTOS,C.; SALDOMBIDE,C. (2001) The Full Spectrum Protectors (FSPs) for Extremely Sensitive Skin and Photodermatoses, Minimizing Very High Free Organic Sunscreen Concentrations. Pharmaceutical Congress of the Americas. Poster # 2413, Orlando FL-USA, Marzo.
- (10) DE LOS SANTOS-CARVALLIDO C. (1993) Fotoprotección de Subrangos Ultravioletas. Simposio: Fotobiología. IV Encuentro de Dermatólogos del Interior. Las Cañas, Río Negro-Uruguay.

- (11) DE LOS SANTOS-CARVALLIDO C. (1993) Lo Básico-Práctico y Real de las Pantallas Solares. XV Reunión Anual de Dermatólogos Latinoamericanos del Cono Sur. Buenos Aires.
- (12) Deutsches Institut für Normung: Experimentelle dermatologische Bewertung des Erythem-schutzes von externen Sonnenschutzmitteln für die menschliche Haut. DIN 65701, 1984
- (13) DIFFEY B.L., ROBSON J. (1989) A New Substrate to Measure Sunscreen Protection Factors Throughout the Ultraviolet Spectrum. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 40:127-133.
- (14) EPSTEIN J.H. (1990) Biologic Effect of Sunlight. En: (eds.) Lowe N.J. and Shaath N.A., *Sunscreens-Development, Evaluation and Regulatory Aspects*, 2nd edn., M. Dekker Inc., New York, págs. 43-54.
- (15) FAIRHURST D. (1999) Microfine Zinc Oxide in Sunscreens. International Cosmetic Expo'99. Miami, FL-USA.
- (16) FDA, Federal Register, Vol 43: 28269, Sunscreen Drug Products For Over-The-Counter Human Use, 1978.
- (17) FDA, Final Monograph, July 8, 2000, Sunscreen Drug Products For Over-The-Counter Human Use: Extension of Effective Date; Reopening of Administration Record.
- (18) FDA, Final Rule, Federal Register, Vol 64 N°98, May 21, 1999, Sunscreen Drug Products For Over-The-Counter Human Use; Final Monograph.
<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/052199b.pdf> pág. 1 a 28.
<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/052199b.txt> pág. 1 a 56.
- (19) FDA, Tentative Final Rule, Federal Register, Vol 58 N° 90, May 12, 1993, págs. 28194-28302.
- (20) FERGUSON J. (1997) European Guidelines (COLIPA) for Evaluation of Sun Protection Factors. En: (eds.) Lowe N.J., Shaath N.A., Pathak, M.A., *Sunscreens-Development, Evaluation and Regulatory Aspects*, 2nd edn., M. Dekker Inc., New York, págs. 513-525.
- (21) FITZPATRICK T.B. (1988) The Validity and Practicality of Sunreactive Skin Types I Trough VI. *Arch. Dermatol.*, 124:869-71.
- (22) GRANSTEIN R.D. (1999) Photoinmunology. En: (eds.) Freedberg I.M., Eisen A.Z., Wolff K. et al., *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, Mc-Graw Hill, New York, págs. 1562-1569.
- (23) HAWK J.L.M. (1998) Cutaneous Photobiology. En: (eds.) Champion R.H., Burton J.L., Burns D.A. and Breathnach, *Rook/Wilkinson/Ebling Textbook of Dermatology, Blackwell Science*, Oxford, UK, págs. 973-993.
- (24) HAWK J.L.M., NORRIS P.G. (1998) Abnormal Responses to Ultraviolet Radiation: Idiopathic. En: (eds.) Champion R.H., Burton J.L., Burns D.A. and Breathnach. *Rook/Wilkinson/Ebling Textbook of Dermatology, Blackwell Science*, Oxford, UK, págs. 1573-1386.
- (25) HEWITT, J.P. (2002) Formulating Strategies for UV Protection in Prestige Suncare and Skincare Products. 8th Florida Sunscreen Symposium, SCC, 28th April.
- (26) <http://www.labsphere.com>

- (27) KLIGMAN L.H., KLIGMAN A.H. (1997) Ultraviolet Radiation-Induced Skin Aging. En: (eds.) Lowe N.J., Shaath N.A., Pathak M.A., Sunscreens-Development, Evaluation and Regulatory Aspects, 2nd edn., M. Dekker Inc., New York, págs. 117-137.
- (28) KLIGMAN L.H., KLIGMAN A.H. (1999) Photoaging. En: (eds.) Freedberg I.M., Eisen A.Z., Wolff K. et al., Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, Mc-Graw Hill, New York, págs. 1717-1721.
- (29) KRAEMER K.H. (1987) Heritable Diseases With Incremented Sensitivity to Cellular Injury. En: (eds.) Fitzpatrick T.B. et al., Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 3rd edn., Mc-Graw Hill, New York, 1987, págs. 1791-1811.
- (30) Labsphere Ultraviolet Transmittance Analyzer. Fairhurst D., Rogers S., sunSmart, Inc. & Particle Sciences, Inc., USA.
- (31) LOWE N.J., FRIEDLANDER J. (1997) Sunscreen: Rationale for Use to Reduce Photodamage and Phototoxicity. En: (eds.) Lowe N.J., Shaath N.A., Pathak M.A., Sunscreens-Development, Evaluation and Regulatory Aspects, 2nd edn., M. Dekker Inc., New York, págs. 35-58.
- (32) LOWE N.J., FRIEDLANDER J. (1999) Abnormal Responses to Ultraviolet Radiation: Photosensitivity Induced by Exogenous Agents. En: (eds.) Freedberg I.M., Eisen A.Z., Wolff K. et al., Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, Mc-Graw Hill, New York, págs. 1589-1596.
- (33) LOWE, N.J. (1997) Ultraviolet-A Claims and Testing Procedures for OTC Sunscreens. A Summary and Review. En: (eds.) Lowe N.J., Shaath N.A., Pathak, M.A., Sunscreens-Development, Evaluation and Regulatory Aspects, 2nd edn., M. Dekker Inc., New York, págs. 527-535.
- (34) LUPIA J.A. (2002) Sun Protection Via Three Novel Chemistries and New Mode of Application, 8th Florida Sunscreen Symposium, SCC, 28th April.
- (35) MACKIE R.M. (1998) Epidermal Skin Tumor. En: (eds.) Champion R.H., Burton J.L., Burns D.A. and Breathnach S.M., Rook/Wilkinson/Ebling Textbook of Dermatology, Blackwell Science, London, UK, págs. 1651-1693.
- (36) MC-GREGOR J.M. (1999) Acute Effects of Ultraviolet Radiation on the Skin. En: (eds.) Freedberg I.M., Eisen A.Z., Wolff K. et al., Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, Mc-Graw Hill, New York, págs. 1555-1561.
- (37) PATHAK M.A.; NGHIEM P., FITZPATRICK T.B. (1999) Acute and Chronic Effects of the Sun. En: (eds.) Freedberg I.M., Eisen A.Z., Wolff K. et al., Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, Mc-Graw Hill, New York, págs. 1598-1606.
- (38) ROBERTS J. (1989) Exposure to the Sun. En: (ed.) Auerbach P., Management of Wilderness and Environmental Emergencies, 2nd edn., Mosby, St-Louis.
- (39) Skin Cancer Foundation
<http://www.skincancer.org> pág. 1 a 2
<http://www.skincancer.org/prevention/index.html> pág. 1 a 2.
<http://www.skincancer.org/prevention/spf.html> pág. 1 a 2.

Anal. Real Acad. Nal. Farm. 2003,

_____ **Artículo Original** _____

Deficiencias en piruvato quinasa y anemias hemolíticas*

AMANDO GARRIDO PERTIERRA Y
JOSÉ MANUEL BAUTISTA SANTA CRUZ

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Universidad
Complutense de Madrid*

RESUMEN

La piruvato quinasa cataliza la transformación de fosfoenolpiruvato y ADP en piruvato y ATP. La enzima, que aparece en toda las células vivas, es clave en la ruta central del metabolismo de carbohidratos. La deficiencia en piruvato quinasa, debida a una mutación en el gen PK-LR, origina alteraciones únicamente, en los eritrocitos, porque estas células no son capaces de compensar el defecto enzimático. Por ello, la deficiencia de esta enzima es causa principal de la anemia hemolítica no esferocítica que puede provocar incluso la muerte de los pacientes.

Las dificultades en la caracterización bioquímica de la PK nos ha llevado a estudiar la enzimopatía mediante técnicas de Biología Molecular. El trabajo se realizó sobre 10 pacientes con deficiencia en piruvato quinasa eritrocitaria. Mediante análisis molecular se han encontrado 11 mutaciones diferentes en los 17 alelos mutados: tres de estas mutaciones, G694A, A1150G y G1154A, no habían sido previamente descritas.

A las mutaciones que originan fuertes modificaciones en la estructura local de la molécula, observadas mediante estudios de modelización molecular, como consecuencia de

* Premio de la Real Academia Nacional de Farmacia 2002

un desajuste en el balance de las cargas eléctricas o por impedimento estérico, corresponden valores disminuidos de la actividad de la enzima en aquellos pacientes portadores de dichas mutaciones.

Palabras Clave: Enzimopatía eritrocitos.— Anemias hemolíticas.— Mutaciones PK

SUMMARY

Pyruvate kinase deficiencies and hemolytic anemias

The enzyme pyruvate kinase (PK) catalyses the transformation of phosphoenolpyruvate and ADP to pyruvate and ATP. The activity of this ubiquitous enzyme is essential for the central carbohydrate metabolism. Deficiency in PK activity causes non-spherocytic haemolytic anaemia, due to alterations in the metabolism of erythrocytes. The red cell lacks alternate metabolic pathways for pyruvate, and can not cope with the enzymatic fault by increasing the synthesis of the protein. Clinical symptoms in patients harbouring a PK deficiency with anaemia, which may lead to death.

Several difficulties appear in the biochemistry characterization of the enzyme, which led to the application of molecular biology tools. The present work was performed on 10 PK deficient patients. By means of molecular analysis, we have found 11 different mutations in the 17 alleles analysed, three of which, G694A, A1150G y G1154A, have not been previously reported.

Changes in the protein structure caused by mutations which introduce steric hindrance or substitutions in charged residues, analysed by molecular modeling, showed a clear correlation with the reduction in PK activity in the patients studied.

Key words: Erythrocyte enzymopathies.— Haemolytic anemias.— Mutations PK

Introducción

Los hematíes, eritrocitos o glóbulos rojos son células sanguíneas, que además de transportar el oxígeno desde los pulmones a los tejidos, realizan también otras funciones importantes y por ello contienen varios catabolitos y enzimas. Aunque los eritrocitos maduros no tienen núcleo, mitocondrias, ni retículo endoplásmico y por ello no puede sintetizar proteínas, glucógeno, lípidos, ni llevar a cabo la fosforilación oxidativa son capaces de metabolizar la glucosa y otros monosacáridos. En consecuencia, su metabolismo, muy reducido, queda limitado a la glucólisis, ruta de las pentosas fosfato, ciclo del

2,3-bisfosfoglicerato, reacciones de oxidorreducción para la desintoxicación de sustancias oxidantes y ciertos aspectos del metabolismo nucleotídico (Fig.1). Estas rutas y reacciones son justamente las precisas para mantener sus necesidades metabólicas durante su vida media celular y sintetizar ATP y NADPH. La glucólisis comienza con la incorporación de monosacáridos a la célula; la glucosa 6-fosfato que se forma se isomeriza a fructosa-6-fosfato, mediante la fosfohexosa isomerasa, iniciándose así la secuencia de reacciones características de la glucólisis hasta la formación de lactato como producto final (1,2).

Se conocen todos los valores de la actividad enzimática eritrocitaria en condiciones estándar de ensayo y saturantes de sustratos, en las que se consigue la máxima actividad; sin embargo estas condiciones raramente coinciden con la situación *in vivo*, puesto que las concentraciones de los sustratos, el pH o la temperatura empleados para su medida experimental no son los que existen en la célula. Asimismo, tampoco *in vitro* se tiene en cuenta el efecto activador o inhibidor de muchos metabolitos intracelulares o la interacción mutua de las innumerables proteínas presentes (3).

El control de la glucólisis en el eritrocito se ejerce mediante la acción de distintos metabolitos sobre las tres enzimas que catalizan reacciones irreversibles, y que cumplen con todas las condiciones para considerarlas reguladoras. El efector más importante es el ATP que, al sobrepasar determinados niveles, inhibe la actividad de la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa. (3,4,5,6)

En la ruta glucolítica de los eritrocitos existe una desviación a nivel del 1,3-bisfosfoglicerato en la que, a partir de esta sustancia, por acción de la bisfosfoglicerato mutasa, se produce 2,3-bisfosfoglicerato (Fig.1). La enzima requiere 3-fosfoglicerato como cofactor y es inhibida por el propio producto de la reacción, el 2,3-bis-fosfoglicerato. El 2,3-bisfosfoglicerato juega un papel esencial en la regulación de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno en los tejidos. El mecanismo de control se basa en la capacidad que tiene el 2,3-bisfosfoglicerato para unirse específicamente a los residuos

básicos de la cavidad existente entre las dos cadenas β de la desoxihemoglobina, pero no de la oxihemoglobina. El significado fisiológico del 2,3-bisfosfoglicerato se encuentra en su papel estabilizador de la estructura cuaternaria de la desoxihemoglobina (6).

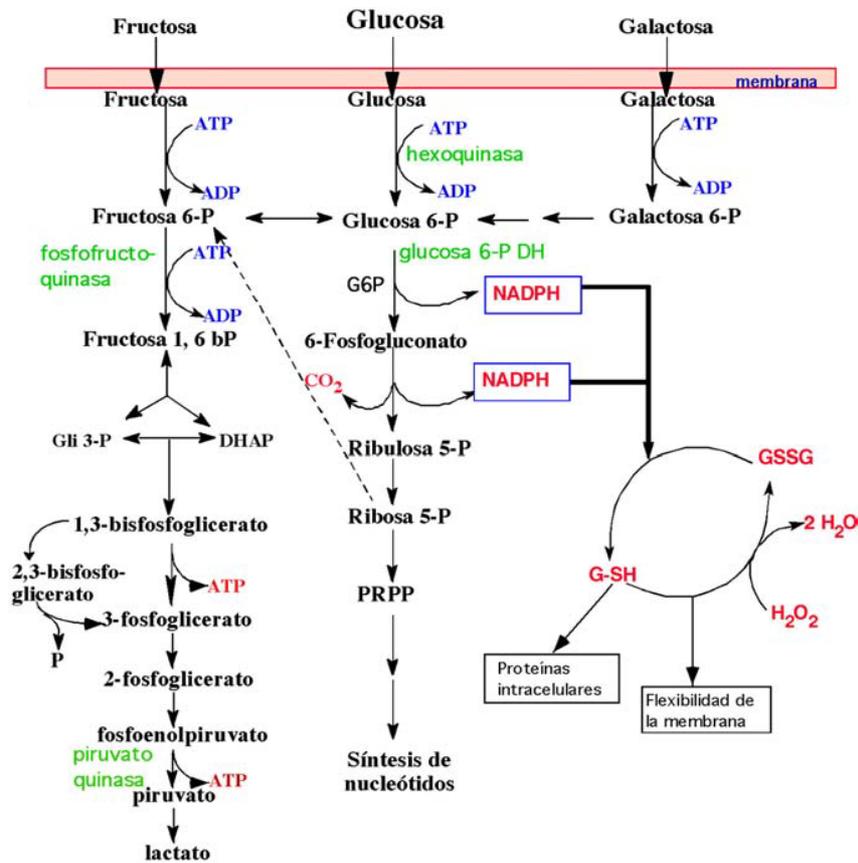


Figura 1. Rutas metabólicas en los eritrocitos. Las enzimas reguladoras se muestran en color verde.

Las anemias hemolíticas se originan por diferentes alteraciones de los eritrocitos, muchas de las cuales son hereditarias. Las células, que presentan gran fragilidad, se rompen al pasar por los capilares, especialmente en el bazo. En ocasiones el número de eritrocitos formados es normal, o incluso mayor de lo normal, pero su vida es tan corta que se produce una anemia grave (7, 8). Entre las anemias hemolíticas más frecuentes se encuentra las enzimopatías eritrocitarias las cuales son debidas a una deficiencia en algunas de las enzimas del metabolismo intermediario del eritrocito, generalmente las del metabolismo de la glucosa. Todas se caracterizan, en general, por la ausencia de esferocitosis y por valores no normales de la presión osmótica y la concentración de hemoglobina.

Los defectos enzimáticos pueden aparecer bajo formas homocigóticas o heterocigóticas, y acompañados de hemólisis celular, cuyo mecanismo desencadenante depende de la lesión molecular. El conocimiento de la sintomatología que presentan estas alteraciones ha resultado un escollo difícil de superar ya que aparecen diferentes tipos de anemias hemolíticas y, por ello, se han requerido numerosos estudios experimentales y clínicos. Los eritrocitos a lo largo de su vida realizan cerca de medio millón de ciclos, por lo que requieren un continuo suministro de ATP y equivalentes redox para mantener la estructura bicóncava, las concentraciones catiónicas intracelulares adecuadas y para conservar en estado reducido los iones de hierro de la hemoglobina, de los grupos sulfhidrilo de las enzimas, del glutatión y de los componentes de la membrana (9, 10).

La piruvato quinasa (ATP: piruvato 2-O-fosfotransferasa; EC 2.7.1.40) es una enzima que cataliza la transformación de fosfoenolpiruvato y ADP en piruvato y ATP. La reacción es la segunda de la ruta glicolítica que genera ATP. En los eritrocitos los iones potasio y los bivalentes manganeso son absolutamente necesarios para la actividad de la enzima, que es clave en la ruta central del metabolismo de los hidratos de carbono y aparece en todas las células vivas (10,11,12).

En la especie humana se han identificado dos genes codificantes de la piruvato quinasa, el PK-M y el PK-LR. En el proceso de transcripción, estos genes originan 4 isoenzimas diferentes con actividad piruvato quinasa, denominados M₁, M₂, L y R, las cuales se expresan de forma diferente en cada tejido u órgano (11, 13). Todas las formas consisten en tetrámeros con subunidades de unos 50-60 kDa, y muestran algunas propiedades moleculares y físico-químicas similares, pero difieren en sus propiedades cinéticas y reguladoras.

Las isoenzimas PK-L y PK-R se encuentra bajo el control del mismo locus genético (PK-LR) pero los proceso de traducción utilizan un ARN mensajero y promotores específicos diferentes. La PK-R es muy sensible a la modulación alostérica por la fructosa 1,6-bisfosfato y, cantidades micromoleculares de este intermediario, aumentan significativamente la afinidad de la enzima por el sustrato, PEP, convirtiendo la cinética sigmoide en hiperbólica. Las propiedades cinéticas de esta enzima, pueden explicarse fácilmente según el modelo concertado de enzimas alostéricas de Monod y col. (15). Así, la enzima, se puede encontrar en un equilibrio transicional entre dos conformaciones, $R \rightleftharpoons T$, relajada y tensada. La forma T no tiene afinidad por K^+ y muy poca por el PEP y su cinética es sigmoide, mientras la forma R tiene alta afinidad por K^+ y por PEP. A partir de los datos cinéticos, se ha llegado a la conclusión de que la unión K^+ es esencial para la posterior unión del PEP. Los efectores positivos fructosa 1,6-bisfosfato, fructosa 2,6-bisfosfato y 6-fosfogluconato disminuyen la cooperatividad de la PK-R hacia PEP, porque el equilibrio $R \rightleftharpoons T$ se desplaza hacia el estado R. Los efectores negativos, ATP y alanina, operan en sentido opuesto (16).

El gen PK-LR se localiza en el brazo largo del cromosoma 1 y en la posición 21. Su tamaño es de alrededor de 8600 pb y comprende 12 exones y 11 intrones (13, 17, 18). La cadena polipeptídica de PK-R de eritrocitos humanos tiene 574 aminoácidos de longitud y la PK-L 543. Esta diferencia de longitud entre las dos isoenzimas resulta de que el primer exón de la PK-

R codifica 33 aminoácidos, mientras que el primero de la PK-L codifica únicamente dos.

El promotor del gen PK de eritrocitos humanos, que no se puede considerar un verdadero promotor constitutivo, fue identificado comparando secuencias de ADN genómico clonado con cADNs específicos y con genes de rata caracterizados previamente (13,14). La expresión transitoria en células eritroleucémicas K 562 con varios promotores truncados construidos dirigiendo un gen indicador CAT demostraron que la secuencia de 270 bp adyacente al extremo 5' era esencial para la actividad del promotor. Esta secuencia contiene varios GATA y CAC que según parece dirigen cooperativamente la transcripción específica en los eritrocitos.

Hasta el momento actual no se han encontrado mutaciones en el ADN del exón 1(R) ni del exón 1(L) del gen PK-L. Las alteraciones en las funciones celulares por una deficiencia PK afecta únicamente a los eritrocitos porque estos no son capaces de compensar el defecto enzimático aumentando la síntesis de la enzima mutada ni utilizando otras rutas alternativas (19,20). Varios de los pacientes que sufren una enzimopatía PK se caracterizan por tener una baja actividad catalítica junto con la pérdida de sus propiedades alostéricas y un aumento de la afinidad por el PEP. En raras ocasiones se originan cambios en la afinidad por el ADP.

En España la primera deficiencia en PK de eritrocitos fue encontrada en 1977 por Kahn y col. (21), que, en ese mismo año, descubrieron también esta frecuencia en seis pacientes relacionados familiarmente (22). El cADN de la PK-LR ha sido clonado y secuenciado en 1988 (23). En la actualidad han sido identificados más de 400 variantes defectivas en piruvato quinasa y 142 mutaciones diferentes (24, 25, 26). Aunque puede parecer que la distribución de las mutaciones a lo largo del cromosoma es regular, hay una tendencia de las mutaciones a acumularse principalmente en los exones 8, 9, 10 y 11 (27). Mas aún, la gran multiplicidad de los mutantes PK surge del hecho de que los dos alelos de un paciente estén afectados por mutaciones distintas resultando un mutante con dos subunidades diferentes cambiadas, esto es un heterocigo-

to. Es de destacar que varias de las estas mutaciones están localizadas en regiones de los dominios C y A, entre los cuales se encuentra el centro activo y son responsables de la unión al K^+ y al Mn^{2+} (28, 29).

Un descenso de la actividad PK causa, a su vez, un descenso notable en la producción de ATP y un aumento en la concentración de PEP. Como consecuencia de este incremento en la concentración de PEP, se produce un aumento en las concentraciones intracelulares de todos los metabolitos de la ruta por encima del bloqueo, particularmente del 2,3-bisfosfoglicarato y 3-fosfoglicerato. Las concentraciones de 2,3-bisfosfoglicarato aumentan del orden de dos, tres y hasta cuatro veces por encima del valor normal, y esto es suficiente para cambiar la curva de disociación. Concentraciones elevadas de 2,3-bisfosfoglicerato pueden causar también efectos deletéreos inhibiendo otras enzimas que limitan el flujo metabólico de la ruta glucolítica, principalmente la fosfofructoquinasa y la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa y en la ruta de las pentosas fosfato la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (30, 31). Este hecho contribuye a la presencia de anemia hemolítica en individuos deficientes en PK que se agrava notablemente en periodos de infección o estrés metabólico.

Aunque es posible determinar, con una certeza casi completa, la secuencia de aminoácidos de una proteína a partir de la secuencia nucleotídica de un gen, no se puede conocer bien la relación entre la secuencia de aminoácidos y la conformación tridimensional nativa de una proteína. Se han obtenido las secuencias aminoacídicas completas de las isoenzimas de piruvato quinasa de varias especies, desde mamíferos a microorganismos. Las comparaciones evolutivas, de modulado y la acumulación de la estructura de bases de datos ayudan a predecir patrones de plegamiento a partir de la secuencia primaria. Sin embargo, la predicción de las estructuras terciaria y cuaternaria, deben ser confirmadas mediante los estudios cristalográficos (32). Debido a las dificultades inherentes a la metodología y a las características de las enzimas, hasta la fecha, sólo se han podido obtener cristalizadas y estudiadas mediante difracción de rayos X, dos piruvato quinasa: la de músculo de gato (33, 34)

y la de músculo de conejo (35). Las enzimas de las dos especies tienen el 94% de secuencia idéntica y, especialmente la región del centro activo, se encuentra muy conservada. Por ello, la inmensa mayoría de los estudios que se realizan sobre las estructuras de las piruvato quinasa, se hace tomando como modelo las homólogas de gato y de conejo.

La deficiencia en piruvato quinasa se encuentra muy extendida a lo largo de nuestro planeta, habiendo países y regiones en que ha sido bien investigada. Sin embargo, en nuestro país, en el que se ha considerado que aparece con una frecuencia del 0,24%, se han realizado muy pocos estudios. Sería interesante obtener más información acerca de la naturaleza de las mutaciones en una población tan heterogénea genéticamente como la española.

Por ello nos propusimos realizar un trabajo con el objeto de identificar y caracterizar mutantes en el gen PK-LR que origina fenotipos deficientes en la actividad piruvato quinasa de eritrocitos humanos y localizar y estudiar los efectos de las mutaciones en la estructura tridimensional de la enzima.

Materiales y Métodos

Material biológico. En el desarrollo del presente trabajo se han utilizado muestras de sangre proporcionadas por el Servicio de Hematología del Hospital Doce de Octubre de Madrid. Los pacientes fueron elegidos por ser portadores de anemia hemolítica no esferocítica y deficientes en piruvato quinasa. Los análisis hematológicos y las observaciones clínicas de los pacientes fueron realizados por dicho Servicio de Hematología. La deficiencia en piruvato quinasa fue diagnosticada según las normas del ICSH. Para este propósito se extrajeron unos 5 ml de sangre y se mantuvieron en tubos de polipropileno a 4°C hasta su utilización.

Aparatos y reactivos. Termocicladores automáticos : PCR system Perkin Elmer 2400 y Eppendorf Mastercycler gradient. Cabina : Microflow Laminer Flow Cabinet. Secuenciador Automático (ALF-Pharmacia-Biotech®). Transiluminador: ALF-Pharmacia-Biotech®. Las columnas de purificación

de ADN, las enzimas de restricción y la Taq. ADN polimerasa de Biotools. La Taq. Gold polimerasa y el Kit de aislamiento de plásmidos *High Pure Plasmid Isolation Kit* de Perkin Elmer. La proteinasa K de Gibco. Los Desoxinucleótidos (dNTPs) de Finnzymes OY, Biotools y Ecogen. Los cebadores, los oligonucleótidos y la Dynazyme de Perkin-Elmer, Cruachem y Pharmacia-Biotech. Las columnas de Chroma SpinTM de Clontech. El Kit para la extracción de ARN de Qiagen: El ladder-100TM de Pharmacia-Biotech. La T4 ADN ligasa y vector pGEM-T de Promega.

Extracción de ADN de células nucleadas humanas. El método seguido ha sido, fundamentalmente, el descrito por Millar y col. (36). La calidad del ADN extraído se valoró mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en TAE 1X.

Extracción de ARN total de sangre entera. Para la obtención del ARN de la sangre se ha utilizado un kit proporcionado por la marca QIAGEN y el procedimiento seguido fue el descrito en su manual de instrucciones Rneasy Blood Mini Handbook.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las disoluciones y los tampones que se utilizaron fueron: Tampón de reacción PCR: Tris-HCl, pH 9,0, 75 mM; KCl, 50 mM; KCl; (NH₄)₂SO₄ 20 mM y BSA al 0,001%. Disolución de nucleótidos: Contiene los 4 desoxinucleótidos fosfato (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) a una concentración de 10 mM. Disolución de cloruro de magnesio: La concentración de MgCl₂ es de 50 mM. Disoluciones de cebadores (primers): Cada disolución contiene un cebador a una concentración de 150 mg/ml.

Las secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados correspondientes a los once exones y el sentido de las cadenas han sido los siguientes:

EXON 1: Directa: 5' TATTCCATGGTCCCAGCAG 3'; Inversa 5' GGCTCCTAGTTTTCCACCCTC 3'. EXON 2: Directa: 5' GCATGGGGAGGAAGGGCAGG 3'; Inversa: 5' ATAGGCCCTGTGTGGCTGCA 3'

- EXON 3: Directa: 5' GGTTGCCTCTCATGTTCTGGG 3'; Inversa: 5'GGAAGGTGGCCAEXON
- EXON 4: Directa: 5' CGAGGTCCTGGCCACCTCC 3'; Inversa: 5' GGCCGCCTTTCCGGCCCTG 3'
- EXON 5: Directa: 5' GCAGGGGCGGGTCCCGGACT 3'; Inversa: 5' TGCCCAGCGCACG-GATGTGG 3'
- EXON 6: Directa: 5' CAACTGTGCCCCGTCCTCA 3'; Inversa: 5' GTGATGGGGAATAGCGA-CAG 3'
- EXON 7: Directa: 5' CACCTTTCTTCTCCTGCCTG 3'; Inversa: 5'CAGGTGTCCCTAAAACCCAC 3'
- EXON 8: Directa: 5' GTAGCTTGGGCAGGGTCCCC 3'; Inversa: 5' GGGCACTGGGGTATG-GAAGG 3'
- EXON 9: Directa: 5' CCTTCCATACCCCAGTGCCC 3'; Inversa: 5' GCCCACCCCTGACC-CAAAGC 3'
- EXON 10: Directa: 5' CTCGTTCACTTTCTTGC 3' Inversa: 5'GGGGCTCCTGATACAAATGG 3'
- EXON 11: Directa: 5' TGTGAGCCACCACACCTGTC 3'; Inversa: 5' CGAAGGGGCTAGATGA-CAGT 3'

La mezcla de reacción contenía por cada tubo de ensayo especial para PCR de 0,2 ml de capacidad: tampón de reacción PCR, 5 µl; disolución de NTPs, 1 µl; enzima Taq polimerasa, 1 µl y agua, 41 µl ; los volúmenes de las disoluciones de los cebadores y las concentraciones de MgCl₂ dependieron de las condiciones del programa y de la clase de enzima utilizada. El programa de amplificación por PCR consistió en las siguientes etapas:

1^a. Temperatura: 94°C. Tiempo: 5 min con la Taq de Biotools y 10 min con la Gold. Proceso: Inicio de la desnaturalización de la doble hélice de ADN. 2^a. Temperatura: 94°C. Tiempo: 30 seg. Proceso: Desnaturalización de la doble hélice de ADN en el proceso ciclico. 3^a. Temperatura: 95°C. Tiempo :20 seg. Proceso: Hibridación específica entre las cadenas del cebador y las de ADN. 4^a. Temperatura: 72°C. Tiempo: 20 seg. Proceso: Elongación de las cadenas sintetizadas de nuevo. 5^a Temperatura: 72°C. Tiempo: 3 min. Proceso: Elongación final. 6^a. Temperatura: 4°C. Tiempo: ∞ Proceso : Mantenimiento. Las etapas 2^a, 3^a y 4^a se repitieron durante 40 ciclos

Inserción y unión de los productos de PCR al vector pGEM[®]-T. Para determinar las secuencias nucleotídicas de los genes los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron insertados en el plásmido vector pGEM[®]-T. El procedimiento seguido ha sido el descrito en el Technical Bulletin, que acompaña al kit de Promega.

Transformación de células de Escherichia coli con el vector ADN ligado-pGEM[®]-T. El material utilizado en esta técnica ha sido: Células de *Escherichia coli* JM109 (*High Efficiency Competent*) con genotipo recA1, end A1, gyrA96, thi, hsdR17, relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacIqZΔM15]. El procedimiento seguido para la transformación ha sido el descrito en el *Technical Bulletin* de Promega.

Aislamiento de los plásmidos conteniendo los insertos. El aislamiento de los plásmidos conteniendo los insertos fue realizado mediante el método descrito por Sambrook y col. (37)

Aislamiento y caracterización de los insertos plasmídicos. Para aislar y caracterizar los fragmentos de ADN insertos en los plásmidos, los vectores ADN ligado-pGEM[®]-T fueron digeridos con las enzimas de restricción Pst I y Sph I, cuyas secuencias objetivo se localizan en el polinker.

Síntesis de ADN mediante la transcriptasa inversa. La síntesis de ADN a partir de ARN de leucocitos se realizó utilizando un Kit de Promega y siguiendo las instrucciones descritas en el *Kit Transcription System*. Los exones utilizados fueron:

EXON E12-CADN: Inversa: 5' AGGGTCAGGAATAGAGAAGAGAGG3'

EXON E8-RTPC: Directa: 5' GATTGGGCGCTGCAACTTGGC3'

EXON E9-RTPCR: Directa: 5' CTCCTCAAACGACTGCCGGTGG3'

Las condiciones del PCR fueron: 1^a. Temperatura: 95°C. Tiempo: 5 min. Pasado este tiempo se agregó 1 μl de la Taq de Biotools. 2^a. Temperatura: 94°C. Tiempo: 45 seg. Proceso: Desnaturalización de la doble hélice de ADN en el proceso ciclico. 3^a. Temperatura: 60° C. Tiempo :45 seg. Proceso:

Hibridación específica entre las cadenas del cebador y las de ADN. 4^a. Temperatura: 72°C. Tiempo: 1 min. Proceso: Elongación de las cadenas sintetizadas de nuevo. 5^a Temperatura: 72°C. Tiempo: 3 min. Proceso: Elongación final. 6^a. Temperatura: 4°C. Tiempo: ∞ Proceso : Mantenimiento. Las etapas 2^a, 3^a y 4^a se repitieron durante 35 ciclos.

La mezcla de reacción y las condiciones del segundo PCR fueron: Mezcla de la reacción del segundo PCR: Producto de la reacción del primer PCR. 1 µl; tampón de reacción PCR, 10 µl; Mg Cl₂ (50 mM), 3 µl; dNTPS, 2 µl; disolución de EPR, 2 µl; disolución de E8F, 2 µl y agua, 79 µl.

Las condiciones del PCR fueron: 1^a. Temperatura: 95°C. Tiempo: 5 min. Pasado este tiempo se agregó 1 µl de la Taq polimerasa. 2^a. Temperatura: 94°C. Tiempo: 45 seg. Proceso: Desnaturalización de la doble hélice de ADN en el proceso cíclico. 3^a. Temperatura: 65° C. Tiempo :45 seg. Proceso: Hibridación específica entre las cadenas del cebador y las de ADN. 4^a. Temperatura: 72°C. Tiempo: 1 min. Proceso: Elongación de las cadenas sintetizadas de nuevo. 5^a Temperatura: 72°C. Tiempo: 3 min. Proceso: Elongación final 6^a. Temperatura: 4°C. Tiempo: ∞ Proceso : Mantenimiento. Las etapas 2^a, 3^a y 4^a se repitieron durante 35 ciclos

Secuenciación automática de ADN. El procedimiento de secuenciación de ADN fue realizado con un secuenciador automático y según el procedimiento descrito por Sanger (38).

Construcción de modelos moleculares. Los estudios sobre la estructura tridimensional de las enzimas normal y mutadas están basados en los trabajos realizados por Allen y Muirhead (39) con difracción de rayos X sobre las enzimas homólogas cristalizadas de músculo de conejo y de gato. Las secuencias corregidas de los cADN del gen PK-LR fue alineada con la secuencia derivada de las estructuras PK-M utilizando el programa "Alignment of Multiple Protein Sequences" (AMPS) (40). Los programas utilizados en el estudio de la estructura, la localización de las mutaciones y los efectos locales de las sustituciones fueron el RasMolv.2.6 y el Swiss Model

(SwissPdbViewerv.3.1).

Resultados y Discusión

Manifestaciones clínicas de pacientes defectivos en piruvato quinasa. En la Tabla 1 se muestran los datos hematológicos y las observaciones clínicas de 10 pacientes con anemia hemolítica de edades comprendidas entre los 7 y 59 años. Se puede observar en todos los pacientes un aumento del número de reticulocitos y una disminución (excepto en el nº4) de la concentración de hemoglobina respecto a los niveles normales. Por otra parte, en todos los casos en que se ha determinado, los valores del índice de distribución estándar del volumen corpuscular (IDH) de los eritrocitos se encuentran dentro de los normales o son ligeramente superiores. Una disminución de la masa de hemoglobina circulante es un índice claro de anemia. El aumento de la cifra de reticulocitos permite clasificar la anemia de carácter regenerativo de tipo hemolítico, ya que este aumento es debido al aumento de la capacidad eritropoyética como consecuencia del acortamiento de la vida media de los eritrocitos. El hecho de que los valores de IDH estén dentro o próximos a la normalidad indica una población eritroide homogénea con ausencia de anisocitosis. El examen conjunto de los datos anteriores permite tipificar a los pacientes como portadores de una anemia hemolítica no esferocítica. Además, como los valores de la actividad piruvato quinasa de todos los pacientes son sensiblemente inferiores a los normales, se puede diagnosticar, de manera previa, que la anemia es consecuencia de una deficiencia en la enzima piruvato quinasa.

Los análisis realizados están basados en los métodos recomendados por la ICSH para la caracterización de pacientes con deficiencia en piruvato quinasa (41). La aplicación de estos métodos ha permitido identificar más de cuatrocientas variantes en dicha enzimopatía (27). Sin embargo, no existe una relación directa entre los datos hematológicos y las manifestaciones clínicas observadas. Así, los pacientes que muestra menor actividad piruvato quinasa en sangre (nº 3, nº 4 y nº 9) no son los que presentan los síntomas más

graves de anemia, ni tampoco el que mayor actividad tiene (nº 8) los síntomas más leves. Estos datos están de acuerdo con los obtenidos por otros investigadores (42, 43, 44) y demuestran la poca correlación que existe entre la gravedad de la anemia y el nivel de actividad de la enzima en las pruebas *in vitro*. Estas discrepancias se han intentado explicar como consecuencia de las diferentes propiedades químico-físicas y catalíticas que poseen las variantes deficientes en piruvato quinasa (7, 8), aunque muy posiblemente estén también relacionadas con el carácter recesivo de la enfermedad y la usual presentación de las mutaciones como dobles heterocigotos.

El defecto piruvato quinasa es el más frecuente de las anemias hemolíticas por deficiencia enzimática en los eritrocitos en Europa (45, 46, 47). El defecto aparece en todo tipo de poblaciones y se suele acompañar de ictericia y esplenomegalia (25, 45, 48, 49, 50). En España, en un estudio realizado en 1979 por García y col. (51) se encontró que la frecuencia con que aparece la deficiencia piruvato quinasa es del 0,24%.

Según se observa en la Tabla 1 el intervalo de manifestaciones de la anemia hemolítica es amplio e implica desde anemias severas que requieren esplenectomía y transfusiones de sangre ocasionales hasta estados hemolíticos compensados. En tres de ellos la anemia es de carácter leve y se presenta en un estado hemolítico compensado. En este grado la anemia no suele exacerbarse a lo largo de la vida si excluimos los episodios de hipoplasia eritroide debidos a infecciones como parvovirus B-19 y a mujeres en gestación (7, 8, 52).

Tabla 1. Datos hematológicos y clínicos de pacientes defectivos en piruvato quinasa con anemia hemolítica no esferocítica

Paciente n°	Edad (años)	Sexo	Hb (g/dL)	Reticulocitos (x 10 ³ /μL)	IDH* (%)	Actividad PK (U.I./g Hb)	Observaciones clínicas
1	30	V	10, 8	868	N.D.	4, ,6	Anemia crónica. Ictericia. Esplenectomía
2	16	H	9, 9	318	N.D.	2, 1	Anemia crónica. Ictericia
3	39	H	11, 2	150	N.D.	1, 9	Estado hemolítico compensado
4	35	V	13, 3	90	N.D.	1,9	Estado hemolítico compensado
5	7	V	10, 5	150	15, 9	4, 3	Estado hemolítico compensado. Ictericia
6	44	V	11. 5	144	15, 4	1, 8	Anemia crónica
7	-	H	10, 9	N.D.	12, 6	5,21	Anemia crónica
8	30	V	9, 4	2340	15,3	6, 8	Anemia crónica. Ictericia.

9	24	H	11, 2	316	13,1	1,4	Anemia crónica
10	59	V	11, 6	210	13,8	2, 0	Anemia crónica
Valores normales			12 -- 17	10 -- 20	11-15	12, 0 – 14, 0	

*Índice de la distribución estándar del volumen corpuscular de los eritrocitos

Cuando se obtuvieron los datos hematológicos de los familiares mas cercanos de los pacientes correspondientes a la Tabla 1 se observó que los valores de la concentración de hemoglobina se encontraban dentro de los límites considerados normales lo cual es un índice de la ausencia de anemia. Es evidente que el producto del alelo normal es suficiente para proporcionar unos niveles fisiológicos normales respecto a la actividad piruvato quinasa.

Caracterización molecular de pacientes con deficiencia en piruvato quinasa. La identificación bioquímica de pacientes con deficiencia en piruvato quinasa mediante análisis enzimáticos se ve dificultada por la frecuencia relativamente alta de personas heterocigotas que portan enzimas híbridas con propiedades diferentes y por las transfusiones. Estas particularidades nos ha llevado a estudiar la enzimopatía piruvato quinasa a nivel molecular puesto que es lógico pensar que anomalías fisiológicas observadas sean consecuencia de defectos en la molécula de ADN.

En la Tabla 2 se recogen las diferentes mutaciones encontradas en el gen PK-LR y que son causadas por la sustitución de un nucleótido. Todos los pacientes son heterocigotos compuestos o dobles y solo uno (nº 10) muestra las mutaciones en el mismo exón. La mutación G1529A (Arg \Rightarrow Gln), que es, junto con la C1456T, la más frecuente en el Norte y Centro de Europa (25, 45) ha sido encontrada solamente una vez en nuestro estudio. En tres de los pacientes (nº 2, nº 5 y nº 8) no se encontró un segundo alelo con mutación, pero presentan claros síntomas de anemia, lo que induce a pensar que la segunda mutación se debe encontrar en las regiones reguladoras del gen PK-LR.

Tabla 2. Características genéticas de pacientes con deficiencia en piruvato quinasa				
Paciente nº	Exón nº	Posición alelo 1 alelo 2	Mutación alelo 1	Substitución aminoacídica
1	8	1150	ACG ⇒ GCG	Thr ⇒ Ala
	10	1529	CGA ⇒ CAA	Arg ⇒ Gln
2	7	993	GAC ⇒ GAA	Asp ⇒ Glu
3	6	721	GAG ⇒ TAG	Glu ⇒ Stop
	10	1456	CGG ⇒ TGG	Arg ⇒ Trp
4	6	721	GAG ⇒ TAG	Glu ⇒ Stop
	10	1456	CGG ⇒ TGG	Arg ⇒ Trp
5	8	1175	GCC ⇒ ACC	Ala ⇒ Thr
6	10	1456	CGG ⇒ TGG	Arg ⇒ Trp
	11	1675	CGA ⇒ TGA	Arg ⇒ Stop
7	8	1154	AGG ⇒ AAG	Arg ⇒ Lys
	10	1492	CGG ⇒ TGG	Arg ⇒ Cys

8	6	721	GAG ⇒ TAG	Glu ⇒ Stop
9	5 10	694 1456	AGC ⇒ GGC CGG ⇒ TGG	Ser ⇒ Gly Arg ⇒ Trp
10	6 6	721 821	GAG ⇒ TAG GGG ⇒ CGG	Glu ⇒ Stop Gly ⇒ Arg

En los pacientes en que se ha encontrado mutaciones sustitutivas en los dos alelos se ha observado que los valores de la actividad piruvato quinasa encontrados en sangre son, en la mayoría, notablemente inferiores a los normales. Sin embargo, el cuadro anémico observado abarca un amplio espectro y es similar al descrito por Lenzner y col. (25) en estudios con pacientes defectivos en piruvato quinasa. Es lógico llegar a la conclusión de que no existe relación entre los datos moleculares obtenidos y la severidad de la enfermedad. Sin embargo, en este estudio como excepción a esta regla, hemos encontrado dos pacientes (nº 3 y nº 4) que tienen las mismas mutaciones sustitutivas y similar grado de anemia hemolítica. Claro que en este caso, los dos pacientes son hermanos y a la similitud de la expresión de los genes debe asociarse la semejanza del resto de factores que intervienen en la manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Distribución de la frecuencia de las mutaciones en piruvato quinasa. Cuando se representa la frecuencia de las 17 mutaciones correspondientes a los 10 pacientes deficientes en piruvato quinasa que cursan con anemia hemolítica no esferocítica en un histograma. Se puede observar que las

mutaciones mas frecuentes son la C1456T y la G721T, mutaciones sustitutivas que aparecen en el 23,5% de los cromosomas mutados. La mutación C1456T aparece en todos los casos con una segunda mutación en un estado heterocigoto compuesto. La mutación C1456T es la que también con mayor frecuencia se ha encontrado en otros trabajos similares realizados en España (50), Italia (42) y Chequia/Eslovaquia (25) y la segunda en frecuencia encontrada en pacientes de Inglaterra, Alemania y Estados Unidos (25, 36, 45, 53).

La mutación G721T aparece también con una frecuencia de 23,5% (4 de los 17 alelos mutados); es una mutación de naturaleza sin sentido que conduce a un codon de terminación de cadena. La G721T es la segunda mutación mas frecuente encontrada en pacientes de España y Francia (50, 54) y la tercera mas frecuente en Italia y Estados Unidos (42, 49, 45, 55). La mutación no ha sido encontrada en pacientes procedentes de Alemania, Inglaterra y Chequia/Eslovaquia ni en Japón y China, donde la mutación que predomina es la C1468T (56, 57, 58) que, por otra parte no ha sido descrita en los países de Europa.

El resto de las mutaciones, 9 alelos de 17 (53%) son todas diferentes, lo que indica la gran variabilidad genética de las deficiencias piruvato quinasa. Tres de estas mutaciones, G694A, A1150G y G1154A, son descritas por primera vez. Se puede deducir que las mutaciones en el gen PK que conducen a una deficiencia piruvato quinasa están muy distribuidas a lo largo del planeta. Quizás la única generalización que resulta de este hecho es que en Europa la mutación que predomina en el Norte es la G1529A en el Sur la más frecuente es la C1456T (25, 36, 46, 47, 50, 54, 55, 59). Las diferencias regionales y étnicas que se han podido observar respecto a las mutaciones PK sugieren que la mayoría de estas no pueden ser muy antiguas, al menos, mucho mas recientes que la separación de los grupos étnicos entre Europa y el Este asiático.

Herencia genética de las deficiencias piruvato quinasa: Genealogías. Los análisis del ARN mediante PCR demostraron que todos los alelos se expresa-

ron con normalidad. Se puede fácilmente constatar el carácter hereditario de las mutaciones que originan deficiencias piruvato quinasa. El paciente nº 1 es heterocigoto compuesto con dos mutaciones que se localizan en la posición 1150 que hereda del padre y la 1529 que hereda de la madre. Los pacientes nº3 y nº 4 son hermanos y ambos, heterocigotos compuestos, heredan la mutación 721 del padre y 1456 de la madre. El paciente nº 6 es portador de dos mutaciones, la 1456 que hereda de la madre y la 1675, que toda probabilidad procede del padre, del que no se tienen datos por fallecimiento. El paciente transfiere uno de sus alelos mutados a su hijo y el otro a su hija. El paciente nº 7 hereda la mutación 1492 del padre y la 1154 de la madre, es por lo tanto un heterocigoto compuesto. El paciente nº 9 también es un heterocigoto compuesto con un alelo mutado que procede de la madre y otro que presumiblemente procede de la madre.

Localización de las mutaciones en los exones y en las regiones del gen piruvato quinasa. En la Tabla 2 también se ha mostrado la localización de las mutaciones encontradas en el gen PK de eritrocitos humanos. Se puede observar que las diecisiete mutaciones obtenidas se encuentran entre los exones nº 5 y nº 11. De ellas seis se localizan en el exón nº 10 (35,5%) y cinco en el exón nº 6 (29,4%). Solamente se ha encontrada una en el exón nº 5, otra en el nº 7 y una tercera en el nº 11. Cuando se compara la frecuencia de la localización de las mutaciones en los exones asociadas a una deficiencia en piruvato quinasa descritas en España con las encontradas en Europa y en América y el Lejano Oriente, se puede comprobar que las mutaciones se encuentran desigualmente distribuidas a lo largo de la región codificante. Ninguna mutación ha sido detectada en el exón nº 1 que es específico de la isozima PK-R de eritrocito y que corresponde a la región reguladora del gen y solamente se ha encontrado una en el exón nº 2 (60).

También se pudo observar que, de forma general, las mutaciones aumentan progresivamente desde los primeros exones concentrándose el mayor número de ellas entre los exones nº 6 y nº 10 inclusive. En España los exones en donde se encuentra con mayor frecuencia mutaciones son el nº 7 y el nº 10

los mismos que en las mutaciones descritas en Estados Unidos. Contrasta notablemente el bajo número de mutaciones descritas en el exón nº 9 en los países europeos con los descritos en los exones adyacentes; este hecho no puede tener su base en la mayor probabilidad por el tamaño de los exones ya que el nº 9 (153 nucleótidos) es más de dos veces mayor que el nº 8 (66 nucleótidos).

Comparación de las secuencias aminoacídicas de diferentes especies. Cuando se comparan las secuencias aminoacídicas de las regiones en que aparecen las mutaciones de piruvato quinasa de eritrocitos humanos con las de, también de eritrocitos, ratón, rata y perro, las de músculo de gato, conejo, gallo y sapo, las de mosca y gusano y las de levadura (*Saccharomices cerevisiae*) y de *Escherichia coli*. Esta última es la más alejada de la especie humana de las que se conoce su estructura primaria. En *E.coli* han sido caracterizados bioquímicamente y genéticamente dos isozimas (I y II) con actividad piruvato quinasa (10, 12). La isozima I es sensible a la activación por fructosa 1,6-bisfosfato y, curiosamente, tiene unas propiedades cinéticas y reguladoras semejantes a las de los eritrocitos humanos.

El cambio Gly232→Ser, que corresponde a la mutación G694A, se encuentra en una posición conservada en los animales vertebrados salvo en el perro (61), pero flanqueada por secuencias de aminoácidos muy variables. Este hecho y el que el cambio producido sea a serina, que es el aminoácido que aparece en las secuencias de PK de otras especies como en la de gusano, hace pensar que la mutación no debe alterar significativamente la funcionalidad de la enzima. La mutación G821C origina el cambio de dos aminoácidos con un tamaño y propiedades químicas diferentes (Gly275 →Arg) y en una posición muy conservada en todas las especies incluidas las bacterias. Es previsible por tanto que el cambio afecte, de forma esencial, a la estructura tridimensional de la enzima.

La mutación G821C produce la sustitución de Asp331→Arg, esto es, de dos aminoácidos con cargas opuestas y en una posición y región muy conservadas en todas las especies. Además, el cambio está muy próximo a la

secuencia MVARGDL donde se encuentra el Asp339 uno de los ligandos a los que se une el Mn^{2+} (35), y por el que, como se sabe, la enzima tiene un requerimiento absoluto. Es lógico pensar que el cambio altere la actividad de la enzima. Las mutaciones A1150G, G1154A y G1174A originan los cambios sustitutivos de Thr384→Ala, Arg385→Lys y Ala392→Thr, respectivamente, en posiciones y en una región extraordinariamente conservados. Esta región se encuentra entre los aminoácidos Thr371, Gln372 y Glu406 los cuales participan en el proceso catalítico activamente. Así, en el transcurso del mismo, los dos sustratos de la enzima, PEP y ADP, se unen al K^+ , el cual a su vez se enlaza a la Gln372 y al Glu406. (33). Por su parte el Thr371 junto con la Lys313 posicionan y orientan el PEP en el centro activo (35). Por ello, es razonable que la sustitución aminoacídica en cualquiera de las tres posiciones conlleve graves consecuencias en el proceso catalítico.

Las mutaciones C1456T, C1492T y G1529A que originan los cambios Arg486→Trp, Arg498→Trp y Arg510→Gln, respectivamente, se encuentran relativamente próximos en la secuencia aminoacídica de la enzima. Van Solinge y col. (62) sugieren que la arginina en la posición 486 forma enlaces de hidrógeno con otros residuos aminoacídicos adyacentes en la estructura terciaria y que su sustitución ocasionaría graves alteraciones en la misma. Sin embargo, la posición no se encuentra bien conservada y en la de rata, cuya homología con la de humana es más del 99%, se encuentra sustituida por la glutamina, por ello no es lógico pensar que las conformaciones de esas dos enzimas sean muy diferentes. Lo mismo se podría argumentar en la sustitución de la arginina en la posición 498, pero además en este caso como veremos más adelante, el aminoácido se encuentra alejado del centro activo y otros aminoácidos con los que potencialmente pudiera formar enlaces de hidrógeno, por lo que no parece que este cambio pudiera alterar significativamente la estructura terciaria de la enzima.

La sustitución de glutamina por arginina en la posición 510 ha sido bien estudiada por Van Solinge y col. (63). Según estos investigadores la sustitución conduce a la formación de un nuevo enlace de hidrógeno que no aparece

en la enzima normal. Este hecho junto con el que la arginina se encuentra muy bien conservada en todas las especies induce a pensar que el cambio produce una importante alteración en la conformación de la piruvato quinasa.

Las sustituciones aminoacídicas y sus efectos en la actividad piruvato quinasa. Una primera aproximación a la relación estructura \Rightarrow función debería obtenerse del examen de las propiedades químicas de los aminoácidos que se intercambian en la secuencia aminoacídica de la proteína. Podría esperarse que las sustituciones de aminoácidos con propiedades químico-físicas mas diferentes podrían alterar en mayor medida la conformación de la enzima disminuyendo notablemente su actividad y provocando una mayor alteración fisiopatológica que cursaría con una manifestación mas severa de anemia hemolítica. Naturalmente, a dichos cambios hay que agregar los que conducen a una terminación prematura de la cadena polipeptídica. Siguiendo con esta pauta es lógico pensar que el cambio de un aminoácido polar con carga por otro con carga de sentido contrario originaría una alteración notable en la estructura de la enzima que se correspondería con un mayor descenso de la actividad y con una manifestación de tipo mas grave de anemia. Sin embargo, este razonamiento no siempre se cumple y, así, el cambio conservativo Asp \Rightarrow Glu que conlleva la piruvato quinasa del paciente n° 2 y que, debido a que la naturaleza química de los dos aminoácidos es semejante, se podía esperar una actividad enzimática similar a la de la normal y, como mucho, un estado hemolítico compensado. Sin embargo, la actividad enzimática es más de seis veces menor que la de la enzima normal y la deficiencia cursa con anemia hemolítica crónica. Lo que hasta ahora parece evidente es que los casos mas severos de anemia correlacionan con una pérdida significativa de la actividad enzimática y con un proceso de degradación complejo debido a la rápida eliminación de los péptidos inestables como consecuencia de la modificación de la estructura de la enzima. Lenzner y col. (59), señalan que la actividad piruvato quinasa en los eritrocitos depende, al menos, de dos factores: un factor constante, que es en esencia la mutación que origina una enzima con actividad reducida y/o estabilidad alterada, y un factor variable, que se basa en la actividad proteolítica

intracelular. Sin embargo, no deben dejarse de lado otros factores que aunque su influencia sea bastante menor son capaces de marcar diferencias en las manifestaciones clínicas incluso entre parientes próximos, como pueden ser padres e hijos o hermanos.

Podría resumirse que la situación de deficiencia piruvato quinasa es parecida a la que tiene lugar otros pacientes con otras enzimopatías o desordenes genéticos (63, 64). Y es que además del genotipo, los factores bioquímicos y fisiológicos del entorno juegan un papel clave en el grado de severidad de la enfermedad. Este hecho se pone de manifiesto en ocasiones en que pacientes, que son parientes próximos, con el mismo genotipo piruvato quinasa tienen unas manifestaciones clínicas parecidas de la enfermedad. Así, los pacientes nº 3 y nº 4 son hermanos, sus características genéticas respecto a la piruvato quinasa son idénticas, la actividad de las enzimas son iguales y el grado de severidad de las anemias hemolíticas similares.

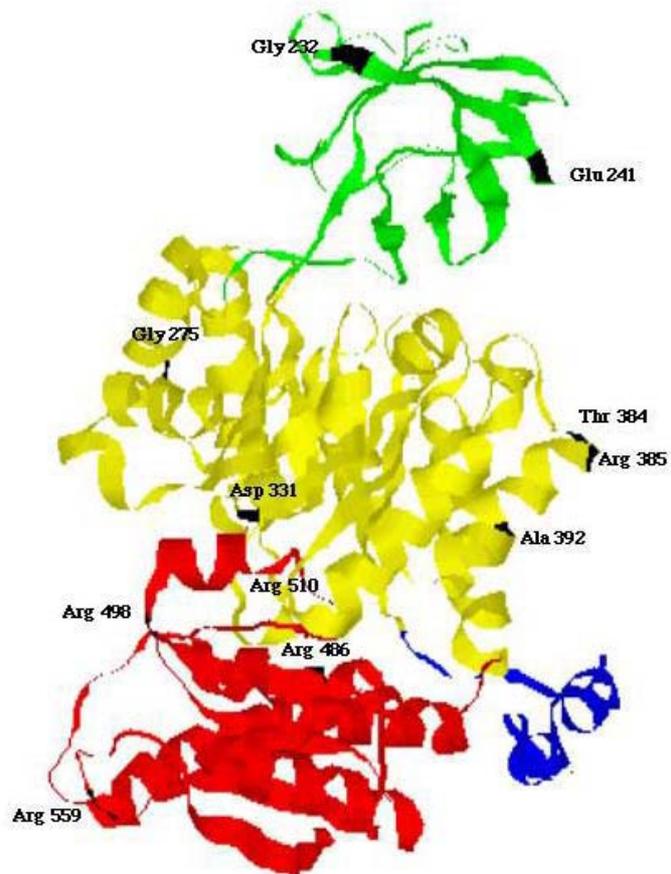
Efectos de las mutaciones sobre la estructura de la piruvato quinasa: Modelos moleculares. El conocimiento de la posición de las mutaciones piruvato quinasa en la secuencia aminoacídica junto con el análisis de la estructura cristalina y los efectos que producen en la conformación de la enzima puede ayudarnos a entender la pérdida de actividad de la enzima y predecir o, al menos, aproximarnos al entendimiento de alguno de los procesos que ocasionan las alteraciones clínicas en las deficiencias enzimáticas.

El progreso en el conocimiento de la estructura de la enzima PK ha sido posible gracias a los análisis de difracción de rayos X de las piruvato quinasa cristalizadas de músculo de gato (34) y de conejo (35) y que han sido resueltas con resoluciones de 2,6 y 2,9 Å, respectivamente. Se ha podido comprobar que la PK-M₁ de músculo de conejo y de gato muestran una homología muy significativa con la PK-R de eritrocitos humanos.

El estudio de las estructuras tridimensionales de las piruvato quinasa de músculo de conejo y de gato ha permitido conocer los sitios de unión de los

substratos, de los cationes esenciales y de los efectores y el mecanismo del proceso enzimático. También ha servido para predecir las modificaciones que sufre la estructura molecular de las enzimas debido a los cambios que originan la sustitución de un aminoácido por otro como consecuencia de una mutación. Siguiendo este criterio es lógico pensar que las sustituciones de los residuos aminoacídicos que se localicen próximos a los sitios de unión de los sustratos, o de unión de los cationes, tengan graves efectos ya que los cambios eléctricos y/o conformacionales que se originan en esas áreas directamente implicadas en la catálisis, llevan asociados acusados descensos de la actividad enzimática que se traducen, muy posiblemente, en alteraciones hematológicas y clínicas graves.

Se ha podido comprobar que en cada subunidad de la PK se diferencian cuatro dominios, N, A, B y C (Fig. 2), formados por cadenas unidas por segmentos polipeptídicos flexibles con una función o funciones determinadas (34, 35).



La mutación Gly 232 a Ser se localiza en el dominio B en una región molecularmente poco densa y a la que hasta ahora no se adscrito una función específica en la catálisis por lo que no es de esperar que la sustitución aminoacídica altere de forma importante la actividad enzimática. Sin embargo, el nivel de la actividad enzimática de la piruvato quinasa en sangre del paciente 9, que es el portador de la mutación, es muy bajo, cerca de la décima parte del valor normal. Podía pensarse que esta región contiene alguna estructura o sitio donde se fije algún regulador o que participe en los estados de transición de la enzima. Sin embargo el lugar donde se localiza el sitio de unión del activador más efectivo, la fructosa 1,6-bisfosfato, se encuentra en el dominio C (36, 65) y, se ha demostrado, que el dominio B es el más alejado del área de contacto entre las subunidades (33, 34). Aunque todavía no se ha asignado ninguna función determinada al dominio B en el contexto general del proceso catalítico su papel debe ser importante ya que una sustitución aminoacídica del tipo Gly→Ser origina una pérdida considerable de la actividad enzimática. Lo único cierto es que la sustitución aminoacídica origina un fuerte impedimento estérico del residuo de la Ser con el de Phe 235 que podría alterar notablemente la estructura terciaria en esa región y transmitirse al resto de la molécula (Fig. 3 A y B). Otra posibilidad lógica es que esa región constituya uno de los determinantes intrínsecos de la proteína. Se sabe que la conformación correcta de una proteína se origina casi simultáneamente a su síntesis y en un tiempo real infinitamente menor que el calculado por medidas químico-físicas. La clave de esta diferencia, conocida como paradoja de Levintal, se encuentra en que en el proceso de plegamiento se forman y conservan fragmentos o determinantes intrínsecos que sirven de centros o ejes de apoyo sobre los que se forma el correcto plegamiento de la proteína. Una alteración, por pequeña que sea, en esa región podría suponer un plegamiento imperfecto que implicaría a la totalidad de la conformación de la enzima.

La mutación G821C origina la sustitución en la posición 275 de un residuo aminoacídico de pequeño tamaño como es Gly por otro de tamaño considerablemente mayor como la Arg. Podía esperarse por tanto una alteración en la estructura de la hélice A α 3 simplemente por efecto estérico. A este hecho debe añadirse la proximidad del residuo Asp 277 que debe originar una atracción electrostática muy fuerte con el de Arg (Fig. 3, C y D) lo cual limitaría la movilidad de la cadena lateral de este aminoácido impidiéndole ocupar una posición estable y, por consiguiente, rompiendo la conformación de la proteína en esa región. Por otra parte, la posición 275 se encuentra relativamente próxima a la de los residuos Ser 286 y Phe 287 que intervienen directamente en la estructura del centro activo. Por ello es fácilmente predecible que la actividad de la PK se encuentre disminuida como así se puede observar en los análisis enzimáticos realizados en la sangre del paciente 10 que es el portador de la mutación G821C.

La mutación C993A ocasiona el cambio Asp→Glu en la posición 331 de la estructura primaria de la PK (Fig. 3, E y F). En la enzima normal el residuo de Asp se encuentra unido mediante dos enlaces de hidrógeno con el de Ile 310 y con un puente salino con la Lys 365, debido a la proximidad del grupo amino de la cadena lateral de este residuo (3,07Å) (35). En la sustitución del Asp por el Glu se rompe un enlace de hidrógeno pero permanece la distancia entre los grupos distintamente cargados lo que hace suponer que la fuerza del puente salino permanece intacta. La región en que se encuentra la mutación está situada entre la A α 5 y la lámina A β 6 una región espaciosa, pero la posición 331 se encuentra en la hendidura del centro activo y muy próxima al residuo Asp 339 que interviene directamente en el proceso catalítico. El paciente nº 2 es el portador de la mutación C993A que produce esta sustitución y la actividad de la PK en sangre es considerablemente menor que en la de individuos normales.

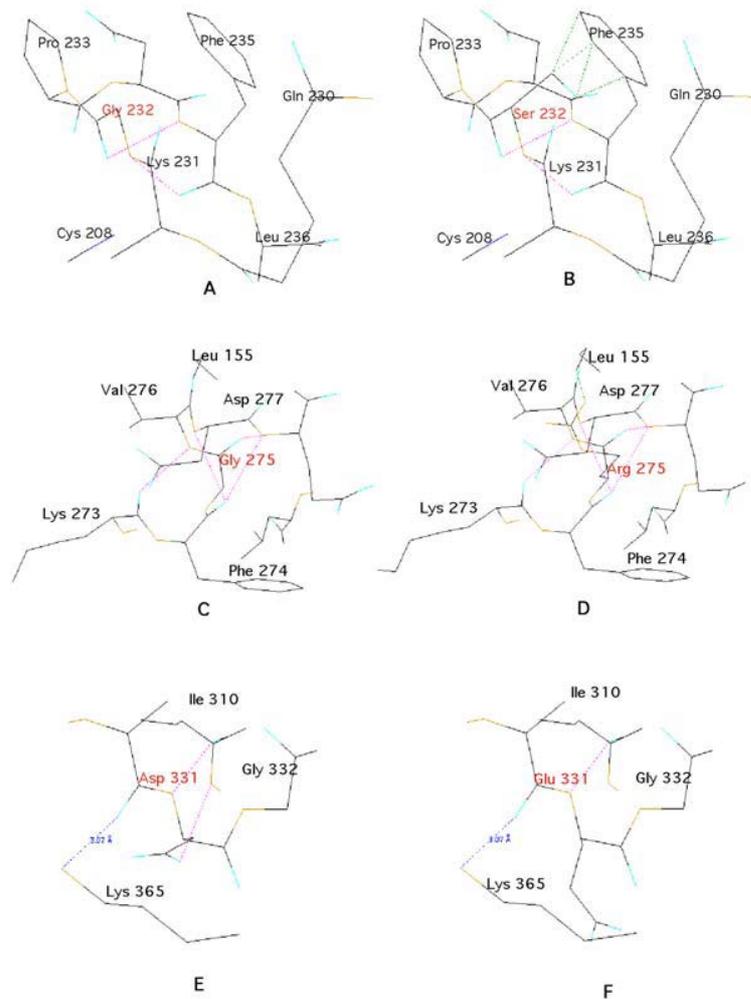


Figura 3. Estructura de las regiones próximas a los aminoácidos sustituidos correspondientes a las mutaciones G694A (A y B), G821C (C y D) y C993A (E y F). Los aminoácidos implicados en el cambio y la posición en la secuencia aminoacídica se muestran en color rojo

La mutación A1150G produce el cambio de Thr por Ala en la posición 384. La Thr se encuentra entre la Pro 383 y la Arg 385 en una zona inmediata a la hélice A α 7. La sustitución por Ala debe modificar la posición de dicha hélice respecto a las otras estructuras adyacentes del dominio A condicionando a su vez la posición del Glu 387 al que está unido por un enlace de hidrógeno y a la Gly 388 que interviene directamente en la conformación del centro activo (Fig. 4, A y B). Por ello se debe esperar que la actividad de la enzima se encuentre disminuida respecto a la normal. Este hecho se puede contrastar en la Tabla 1 donde el nivel de la actividad de la PK en sangre del paciente n° 1, que es portador de la mutación, es bastante menor que el de la sangre de individuos normales.

La mutación G1154A causa, en la posición 385 el cambio de Arg por Lys dos aminoácidos polares con carga positiva a pH fisiológico. El cambio se localiza en el inicio de la hélice A α 7 y en una región aparentemente, sin ninguna relación con otras estructuras de la enzima. Podría esperarse una atracción electrostática entre los grupos cargados de la Lys y el Glu 387; sin embargo, la orientación en la estructura proteica mantiene estos grupos alejados. Después de la sustitución, la distancia del grupo amino a la Pro 383 pasa de 3,74 a 9,45 Å (Fig. 4, C y D). Por ello, la posible alteración que pueda sufrir la conformación en esta región, por otra parte poco densa molecularmente, no debe influir de forma significativa en las regiones esenciales de la enzima para disminuir su capacidad catalítica.

La mutación G1174A origina el cambio de aminoácidos Ala→Thr en la posición 392. En la enzima normal la Ala se encuentra unida por tres enlaces de hidrógeno con la Val 395, Leu 396 y Ser 389 y en la enzima mutada aunque desaparece el de Ser 389 se forma uno nuevo con la Ile 424. (Fig. 4, E y F) La sustitución no parece alterar la conformación de la enzima de forma esencial, ya que además de que el tamaño de los aminoácidos es

similar, la estructura de la hélice α se mantiene compacta en una región relativamente distante del área de interconexión de los dominios A y C en la que se encuentra el centro activo (fig.2). Los datos hematológicos del paciente nº 5, que es portador de esta mutación, no varían significativamente respecto a los normales y el estado del paciente es del tipo hemolítico compensado.

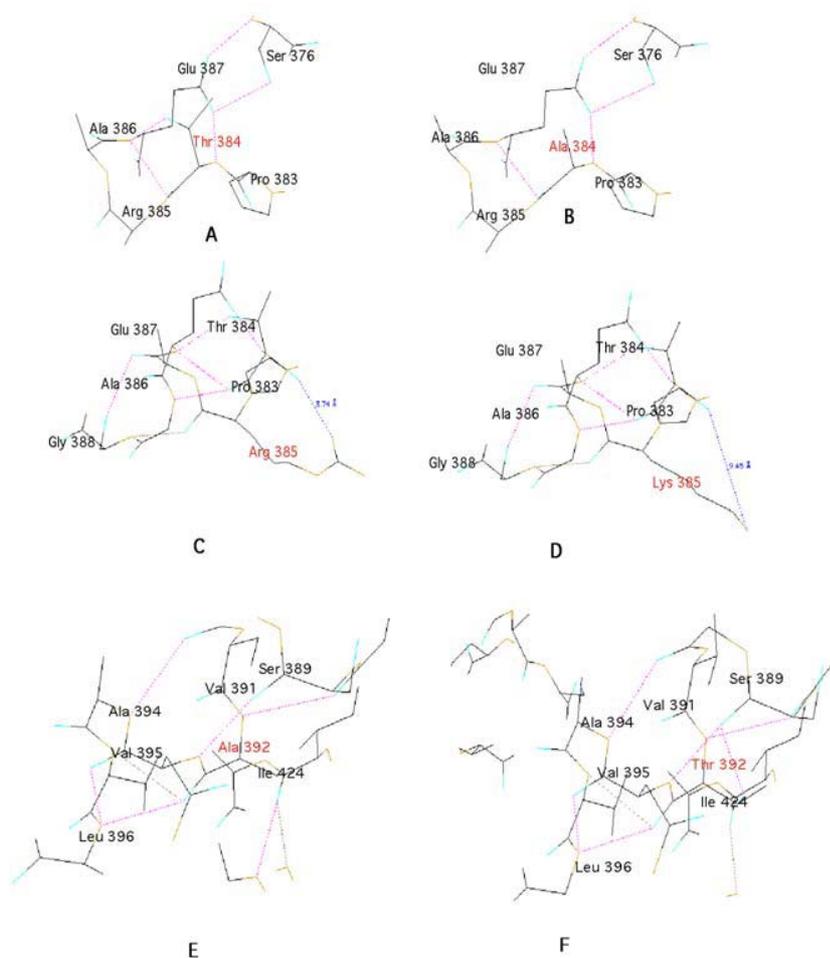


Figura 4. Estructura de las regiones próximas a los aminoácidos sustituidos correspondientes a las mutaciones A1150G (A y B), G1145A (C y D) y G1174A (E y F). Los aminoácidos implicados en el cambio y la posición en la secuencia aminoacídica se muestran en color rojo.

La mutación C1456T origina el cambio de Arg→Trp en la posición 486 localizada en la hélice 3 α del dominio C. La Arg forma un enlace de hidrógeno con la Gln 483 y otro con la His 482. La sustitución por Trp rompe el enlace con la Gln pero mantiene el de His (Fig. 5, A y B). De la diferencia de tamaño entre los dos residuos aminoacídicos puede esperarse una ruptura de la conformación de la hélice α y aunque la región es espaciosa se encuentra en la zona de interconexión entre los dominios A y C, de gran importancia ya que además de estar próxima al centro activo se encuentra el sitio de unión para el efector fructosa 1,6-bisfosfato (65). La inserción de este aminoácido de gran tamaño debe provocar, por tanto, efectos perjudiciales en la estructura de esta zona esencial para la actividad y regulación de la enzima. Estas alteraciones se ven reflejadas en que la actividad de la PK de la sangre de los pacientes 3 y 4, que son portadores de dicha mutación, es muy baja comparada con la PK normal.

La mutación C1492T causa el cambio Arg →Cys en la posición 498 de la secuencia aminoacídica de la proteína. En la enzima normal la Arg está unida con 5 enlaces de hidrógeno a cuatro aminoácidos vecinos (Glu 476, Asp 519, Pro 520 y Asp 528) (Fig. 5, C y D) lo que debe proporcionar a esta pequeña región de sólo tres aminoácidos sin estructura secundaria, y comprendida entre la lámina C β 2 y la hélice C α 4, una estructura relativamente rígida. La sustitución por Cys ocasiona la desaparición de 4 enlaces de hidrógeno, manteniéndose el del Glu 476 y formándose uno nuevo con la Cys 517, muy próxima a la posición 498. Esta proximidad hace suponer que, a pH fisiológico, se forme un puente disulfuro entre los dos residuos cisteínicos. Sin embargo dicha distancia, aunque pequeña, 5,73 Å, no parece lo suficiente para que los dos grupos SH reaccionen entre sí y la inserción de una Cys no parece implicar la formación de un enlace covalente -S-S-. La desaparición

de neta de tres enlaces de hidrógeno debe permitir mayor movilidad a C β 2 y C α (Fig.2), pero las nuevas posiciones que tomen en el espacio estas estructuras no deben ocasionar alteraciones importantes a la estructura terciaria de la enzima que afecten a su actividad catalítica.

La mutación G1529A produce el cambio de Arg→Gln en la posición 510. En la enzima normal la Arg forma un enlace de hidrógeno con la Ala 399 y otro con la Arg 488. Por otra parte la Thr 88 se encuentra en una posición muy próxima (4,2 Å) y como proponen Van Solingen y col. (63) debe existir un puente salino con la Arg 510. La sustitución por Gln aunque crea un nuevo enlace con el Asp 400 desaparece el de la Ala, la cadena lateral se pliega sobre si misma y la distancia con la Thr se incrementa mas del doble desapareciendo o, al menos, reduciéndose la atracción electrostática entre los grupos opuestamente cargados (Fig. 5, E y F). Estos hechos favorecen la libre conformación entre los dominios A y C, alterando la conformación de la proteína entre dichos dominios en una región que participa directamente en la unión con otras subunidades y con los efectores de la enzima. Como la transición desde el estado T (baja afinidad) al R (alta afinidad) requiere rotación de las 4 subunidades del tetrámero mediante goznes o bisagras flexibles, la formación y/o escisión de los puntos de contacto entre las subunidades podría enlentecer o interrumpir la respuesta de los efectores y con ello alterar la actividad y/o la regulación de la enzima.

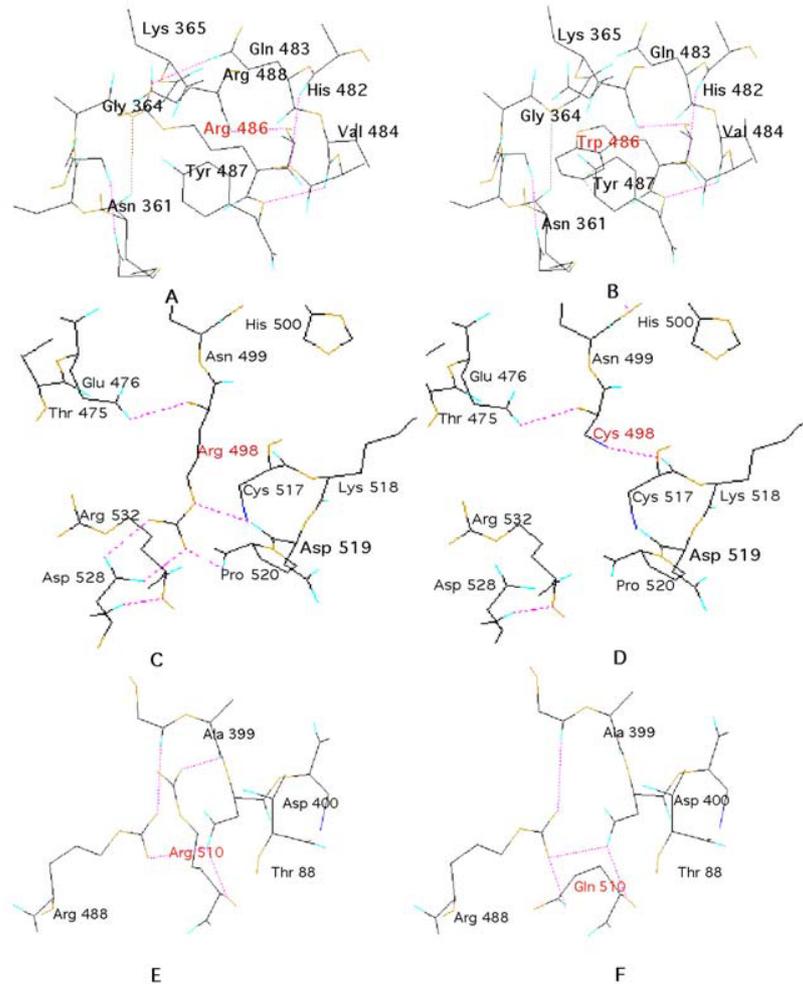


Figura 5. Estructura de las regiones próximas a los aminoácidos sustituidos correspondientes a las mutaciones C1456T (A y B), C1492T (C y D) y G1529A (E y F). Los aminoácidos implicados en el cambio y las posiciones en la secuencia aminoacídica se muestran en color rojo.

Bibliografía

- (1) BREWER G.J. (1980) *Med. Clin. North. Am.* **64**: 579-596.
- (2) BREWER, G.J. (1984) *Red Cell Metabolism and Function*, 3th ed., Plenum Press, NewYork.
- (3) BEUTLER, E. (1986) *Red Cell Metabolism. Methods in Hematology*, vol. 16, Churchill Livingstone. Edimburg.
- (4) LUQUE J., PINILLA M. ESCRIVÁ F. Y GIMÉNEZ A. (1991) *Bioquímica*. Vol. II. 2ª Ed. Herrera E., Interamericana McGraw-Hill.
- (5) YOSHIKAWA,H. AND RAPOPORT, S. M. (1974) *Cellular and Molecular Biology of Erythrocytes*. Medical and Technical Publications Co., London.
- (6) PERUTZ, M. F. (1990) *Ann. Rev. Physiol.* **52**: 1-25.
- (7) GILSANZ F. (1996) *Anemia: manifestaciones clínicas y clasificación*. Medicine. 7ª Serie. IDEPSA. Madrid. pp. 1169-1171.
- (8) GILSANZ F. (1996) *Anemia: manifestaciones clínicas y clasificación*. En: Medicine. 7ª Serie. IDEPSA. Madrid. pp. 1213-1216.
- (9) ZEREZ C. R. AND WEISS R. L. (1987) *Blood* **4**: 999-1005.
- (10) GARRIDO-PERTIERRA A. AND COOPER R. A. (1977) *J. Bacteriol.* **129**: 1208-1214.
- (11) GARCÍA-OLALLA C. AND GARRIDO-PERTIERRA A. (1987). *Biochem. J.* **241**: 573-581.
- (12) GARRIDO-PERTIERRA A. AND COOPER R.A. (1982) *FEBS* **162**: 420-422.
- (13) NOGUCHI T. YAMADA K. INOUE H. MATSUDA T. AND TANAKA T. (1987) *J. Biol. Chem.*: 14366-14371.
- (14) CONSLER T. G., WOODARD S. H. AND LEE J. C. (1989) *Biochemistry* **28**: 8756-8764.
- (15) MONOD J. CHANGEUX J. P AND JACOB J. (1963) *J. Mol. Biol.* **6**: 306-329.
- (16) IKEDA Y., TANAKA T. AND NOGUCHI T. (1997) *Journal of Biological Chemistry* **33**: 20495-20501.

- (17) TANI K., FUJII H. AND NAGATA S. (1988) *Pro. Natl. Acad. Sci. (USA)* **85**: 1792-1795.
- (18) TANI K., YOSHIDA M. C., SATOH H., MITAMURA K., NOGUCHI T. AND TANAKA, T. (1988). *Gene* **73**: 504-509.
- (19) KANNO H., FUJII H. AND MIWA S. (1994). *Blood* **84** (Suppl. 1), 13a.
- (20) KANNO H., MARIMOTO M., FUJII H., TSUJIMURA T., ASAI H., NOGUCHI T. KITAMURA Y AND MIWA S. (1995) *Blood* **86**: 3205-3209.
- (21) KAHN A. VIVES-CORRONS J. L., MARIE J. GALAND C. AND BOLVIN (1977). *Clin. Chim. Acta* **75**: 71-78.
- (22) VIVES-CORRONS J. L., MARIE J., PUJADES M .A. AND KAHN A. (1980). *Hum. Genet.* **53**: 401-408.
- (23) NEUBANER B., LAKONEK M., WINKER M., PARKE M. HOFFERBERT S. Y SCHRÖTER W. (1991). *Blood* **77**: 1871-1875.
- (24) KANNO H., FUJII H., WEI D. C., CHAN L. C., HIRONO A., TSUKIMOTO I. AND MIWA S. (1997). *Blood* **11**: 4213-4218.
- (25) LENZNER C. NÜRNBERG P., JACOBASCH G. GERTH C. AND THIELE B-J. (1997) *Blood* **89**: 1793-1799.
- (26) VALENTINE G., CHIARELL L.R. FORTIN R., DOLZAN M., GALIZZI A., ABRAHAM D.J. AND WANG C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**: 23807-23814.
- (27) MARTINOV M. V., PLOTNIKOV A. G. AND ATAULLAKHANOV F. L. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1474**: 75-87.
- (28) JACOBACH G. AND RAPOPORT S. M. (1996). *Mol. Aspect.* **17**: 143-170.
- (29) DEMINA A., VARUGHESE K. I., BARBOT J. FORMAN L. AND BUETLER E. (1998) *Blood* **2**: 647-652.
- (30) TANAKA K. R. AND PAGLIA D. E. (1971) Pyruvate kinase deficiency. *Semin. Hematol.* **8**, 367-369.
- (31) TANAKA K. R. (1985) Current therapy in Hematology-Oncology. Brain M. C. and Carbone P. P. (eds). Philadelphia. USA.
- (32) BRANDEN C. AND TOOZE J. (1991) Introduction to Protein Structure. Garland Pub.Inc. New York.

- (33) MUIRHEAD H. GRANT J. P. LAWTON C. A. MIDWINTER J. C. NOCTON J. C. AND STUART D. I. (1981). *Biochem. Soc. Trans.* **9**: 212-213.
- (34) MUIRHEAD H., CLAYDEN D. A., BARFORD D., LORIMER C. G., FOTHERGILL-GILMORE L. A., SCHILTZ E. SCHMITT W. (1986). *EMBO J.* **5**: 475.
- (35) LARSEN T. M., LAUGHLIN L. T., HOLDEN H. M. RAYMET I. AND REED G. H. (1994) *J. Biochem.* **33**: 6301-6305.
- (36) MILLAR S.A., DYKES D.D. AND POLESKY H. F. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**:1215
- (37) SAMBROOK J., FRITSCH E.F. AND MANIATIS E. F. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York
- (38) SANGER F., NICKLEN F. S. AND COULSON A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- (39) ALLEN Y MUIRHEAD (1998) *Acta Cryst D* **52**: 499-504
- (40) BARTON G. J. (1990). *Methods Enzymol.* **183**: 403-415.
- (41) MIWA S., BOIVIN P., BLUME K. G., ARNOLD H., BLACK J. A., KAHN A., STAAL G. E. J., NAKASHIMA K., TANAKA K. R. PAGLIA D. E., VALENTINE W. N. YOSHIDA A. AND BEUTLER E. (1979) *Br. J. Haematol.* **43**: 275-279.
- (42) ZANELLA A., BIANCHI P., BARONCIANI, L., ZAPPA, M., BREDI E., VERCELLATI C., ALFINITO F., PELISSERO G. AND SIRCHIA G. (1997) *Blood* **10**: 3847-3852.
- (43) MIWA S., KANNO H. AND FUJII H. (1993) *Am J. Hematol.* **42**: 31-35.
- (44) MIWA S. AND FUJII H. (1996) *American Journal of Hematology* **51**: 122-132.
- (45) BARONCIANI, L. AND BEUTLER E. (1993) *Pro. Nat. Acad. Sci. USA* **90**: 4324-4327.
- (46) BARONCIANI, L. AND BEUTLER E. (1995). *J. Clin. Invest.* **4**: 1702-1709.
- (47) BARONCIANI L., BIANCHI P. AND ZANELLA A. (1996b) *Blood Cells Mol Dis.* **22**: 259-264.
- (48) KANNO H., FUJII H., HIRONO A. OMINE M AND MIWA S (1992) *Blood* **79**: 1347-1350.
- (49) ZANELLA A., COLOMBO M. B., ROSSI F., MERATI G. AND SIRCHIA G. (1989) *Haematologica* **74**: 387-396.
- (50) ZARZA R., ALVAREZ, R., PUJADES, A., NOMDEDEU, B., CARRERA, A., ESTELLA, J., REMACHA, A., SÁNCHEZ, J. M., MOREY, M., CORTÉS, T., PÉREZ LUNGUMUS, G., BU-

- REO, E., AND VIVES CORRONS, J. L. (1998) *British Journal Haematology* **103**: 377-382.
- (51) GARCIA S. C., MORAGÓN A. C. AND LÓPEZ-FERNÁNDEZ A. (1979) *Hum. Hered.* **29**: 310-313.
- (52) GILSANZ F., VEGA M. A., GÓMEZ-CASTILLO E. RUIZ-BALDA J. A. AND OMEÑACA F. (1993). *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal* **69**: 523-527.
- (53) BARONCIANI L. , MAGALHAES L.Q. , MAHONEY D. H., WESTWOOD B. ADEKILE A. D. LAPPIN T. R. J. AND BEULER E. (1995). *Blood Cell Mol. Dis.* **21**: 49-55.
- (54) ROUGER H., VALENTIN C., CRAESCU C. T., GALACTEROS F. AND COHEN-SOLAL M. (1996) *British Journal Haematology* **92**: 825-830.
- (55) BARONCIANI L., BIANCHI P. AND ZANELLA A. (1996) *Blood Cells Mol Dis.* **22**: 85-89.
- (56) KANNO H., FUJIL H. AND MIWA S. (1992). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **188**: 516-523.
- (57) KANNO H., FUJIL H., TSUJINO G. AND MIWA S. (1993) *Biochem Biophys Res Commun* Wei D. C., Chan L. C., Mizoguchi H. Nakahata T. Narisawa K. Fujii H. and Miwa S. (1994). *Blood* **83**: 3506-3509.
- (59) LENZNER C., NÜRNBERG P., THIELE B. J., REIS A., BRABEC V., SAKALOVA A. AND JACOBASCH G. (1994) *Blood* **83**: 2817-2822.
- (60) UENAKA R., NAKAJIMA H., NOGUCHI T., IMAMURA K., HAMAGUCHI T., TOMITA K., YAMADA K., KUWAJIMA M., KONO N., TANAKA T. AND MATSUZAWA Y. (1995) *Biochem Biophys Res Commun* **208**: 991- 998.
- (61) WHITNEY K. M. GOODMAN S. A. BAILEY E. M. LOTHROP C. D. JR. (1994) *Exp Hematol* **69**: 866-870.
- (62) LUZZATTO L. AND MEHTA A. (1995): The metabolic and Molecular Basis of inherited Disease. Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S. and Valle D.(eds). New York. MacGraw-Hill.
- (63) VAN SOLINGE W. W. , KRAAIJENHAGEN R. J. RIJKSEN G., VAN WIJK R., STOFFER B. B., GAJHEDE M. AND NIELSEN F. C. (1997) *Blood* **12**: 4897-4995.
- (64) BAUTISTA J. M. AND LUZZATTO L. (1997): Protein Dysfunction in Human Genetic Disease. Swallow D.M. and Edwards Y.H. (eds) BIOS Scientific Publisher Ltd. Oxford. UK

A. GARRIDO, J.M BAUTISTA

ANAL. REAL ACAD. NAL. FARM.

- (65) JURICA M. S., MESECAR A., HEATH P. J. SHI W., NOWAK T. AND STODDARD B. L.
(1998) *Structure* **6**: 195-210.

—Artículo Original—

Design and development of oral controlled release microcapsules containing naproxen

DOMINGOS FERREIRA,^A BRUNO SARMENTO,^A HELENA AMARAL,^{A*} FRANCISCO VEIGA,^B AND JOSÉ MANUEL SOUSA LOBO^A

^(a) *Faculty of Pharmacy, University of Oporto, Rua Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal*

^(b) *Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Rua do Norte, 3000 Coimbra, Portugal.*

ABSTRACT

The aim of this work was to prepare microcapsules containing naproxen that could be used in the preparation of oral controlled released forms. The work consisted on the preparation of microcapsules by the solvent evaporation method. Different batches were prepared, in the first step, using different polymers (Eudragit RLPO and Eudragit RSPM) or mixtures of these polymers (Eudragit RLPO/Eudragit RSPM 1/3, 2/2 and 3/1) and, in second step, using Eudragit RLPO and 5% of Cutina (HR, KD 16 and MD). The film-forming properties of polymers and different types of Cutina were examined and the physicochemical factors that influence drug release from the films were studied. The evaluation of the release rate of these preparations was performed in pH 7.4 phosphate buffer solution, during 12 hours. The release studies of naproxen preparations demonstrated differences in the drug release properties depending on the polymer or the content of the polymer in the mixtures and also on the type of Cutina.

Key words: Microcapsules.— Naproxen.— Oral controlled release.

RESUMEN

Diseño y desarrollo de microcapsulas orales de liberación controlada de naproxeno

El objetivo de este trabajo fue preparar micro cápsulas de naproxeno que puedan ser usadas en la preparación de formas orales de liberación controlada.

Las microcápsulas fueron preparadas por el método de la evaporación del solvente. Diferentes lotes fueron preparados, primero usando diferentes polímeros (Eudragit RLPO y Eudragit RSPM) o mezclas de polímeros (Eudragit RLPO/Eudragit RSPM 1/3,2/2 y 3/1) y después usando Eudragit RLPO y 5% de Cutina (HR, KD 16 y MD).

Las propiedades de formación de películas por los polímeros y las diferentes cutinas fueron estudiadas bien como los factores fisico-químicos que influyen en la liberación del naproxeno por las películas.

El perfil de liberación del naproxeno en las diferentes formulaciones preparadas, fue estudiado en tampón de fosfatos a pH 7.4, durante 12 h.

Los estudios de liberación del naproxeno en las diferentes formulaciones demostraron diferencias en las propiedades de liberación del naproxeno, dependiendo del polímero utilizado, del contenido de las mezclas y del tipo de cutina usados.

Palabras-clave: Micro cápsulas.— Naproxeno.— Liberación oral controlada.

INTRODUCTION

Several drugs, have been microencapsulated to reduce gastric and other gastrointestinal tract irritations including indomethacin (1), aspirin (2) and biphenylacetic acid (3). In addition, most of the orally administered acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs are irritant to the gastric mucosa if taken for a prolonged period of time (4).

Naproxen, a non-steroidal anti-inflammatory agent with anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties, practically insoluble in water and freely soluble in alcohol, was selected since the drug exhibits all the required pharmacokinetic and physicochemical properties, which make it a good candidate to be incorporated in a controlled release dosage form (5).

Polyacrylate-polymethacrylate copolymers (Eudragits) are widely used as tablet adjuvants and coating polymers. These polyacrylate polymers were also used for drug microencapsulation as microcapsule

wall materials. In fact, acrylate polymers and their derivatives, collectively known as Eudragit polymers, origin films with excellent strength and good flexibility and aesthetics (6-9).

The two acrylic resins evaluated in this study included Eudragit RLPO and RSPM. The RL and RS acrylic resins are copolymers synthesised from acrylic and methacrylic acid esters with a low content of quaternary ammonium groups as chloride salts. The swelling capacity and the permeability to water and dissolved drugs were defined, which is pH independent. The RL resin is freely permeable whereas the RS resin is slightly permeable to water.

The three different types of Cutina, used as plasticizers, evaluated in this study included Cutina HR (Castor oil, hardened), KD 16 (self-emulsifying mixture of mono- and diglycerides of higher saturated fatty acids and potassium stearate) and MD (mixture of mono- and diglycerides of palmitic and stearic acid).

The aim of this work was to prepare microcapsules containing naproxen that could be used in the preparation of oral controlled release forms. The work consisted on the preparation of microcapsules by the solvent evaporation process. Different batches were prepared using two polymers or mixtures of polymers and adding three types of Cutina. The film-forming properties of polymers were examined and the physico-chemical factors that influence drug release from the films were studied.

EXPERIMENTAL

Materials

Naproxen was kindly supplied by Janssen Cilag and Eudragit RS PM and RL PO by Rohm Pharma GmbH. The different types of Cutina were purchased from Henkel. All other materials and solvents were of analytical reagent grade.

Preparation of naproxen microcapsules

After preliminary studies, the following optimal experimental conditions were chosen for the preparation of naproxen microcapsules on a dissolution apparatus (paddle method). Liquid paraffin (300 ml) was placed on a vessel at 37°C. A solution containing 0.75 g of naproxen, 2.5 g of polymer or mixtures of polymers, 0.0625 g of Cutina and 0.125 g of magnesium stearate in 60 ml of acetone was added to paraffin through a separating funnel. The mixture was stirred at 200 rpm. The resulting emulsion was agitated at 37°C for 4 h and during this time acetone was evaporated. The resultant microcapsules were isolated by filtration, washed with cyclohexan and dried at room temperature for 12 h.

The empty microcapsules were prepared using identical experimental conditions but in the absence of naproxen.

The prepared formulations are shown in Table 1.

Table 1. Naproxen microcapsules formulations prepared by the solvent evaporation process.

Components	Formulations							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Naproxen	0.750	0.750	0.750	0.750	0.750	0.750	0.750	0.750
Eudragit RS PM	2.500	1.875	1.250	0.625	-	-	-	-
Eudragit RL PO	-	0.625	1.250	1.875	2.500	2.500	2.500	2.500
Cutina (0.0625 g)	-	-	-	-	-	HR	KD 16	MD
Magnesium Stearate	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125

Naproxen content

Naproxen microcapsules were weighed, dissolved in chloroform and filtered. Naproxen was assayed by UV analysis using a calibration curve at 331 nm.

Microscopy studies and particle size distribution

Optical microscopy was used to evaluate the drug incorporation and the surface shape of the microcapsules. Particle size was determined by optical microscopy. Samples of microcapsules (200) were dispersed on a slide and its diameter was evaluated. The microcapsules particle size distribution was also evaluated by sieving.

Differential scanning calorimetry

Differential thermal analysis (heating cycles of 25°C-280°C) of pure naproxen, empty Eudragit and empty Eudragit/Cutina microcapsules, Eudragit and Eudragit/Cutina microcapsules containing naproxen, mechanical mixtures of naproxen, Eudragit, Cutina and magnesium stearate was carried out with a computer-interfaced Shimadzu differential scanning calorimeter, Model DSC-50. The samples (2.6-2.8 mg), which were stored in a desiccator prior to the analysis, were sealed in aluminum pans. The scanning rate throughout the investigation was 10°C/min. All tests were run in triplicate and the DSC cells were purged with nitrogen at 20.0 ml/min.

Release studies

The dissolution test was carried out using the European Pharmacopoeia apparatus at a basket speed of 100 rpm. The dissolution medium was 500 ml of a pH 7.4 phosphate buffer solution, maintained at 37°C ± 0.5°C. At appropriate time intervals (30, 60, 120, 240, 360, 480 and 480 min), 25 ml of each was withdrawn and equal volume of medium was added to maintain a constant volume. Samples were filtered, diluted and analysed by UV spectrophotometry at 331 nm on a Hitachi 2000 spectrophotometer.

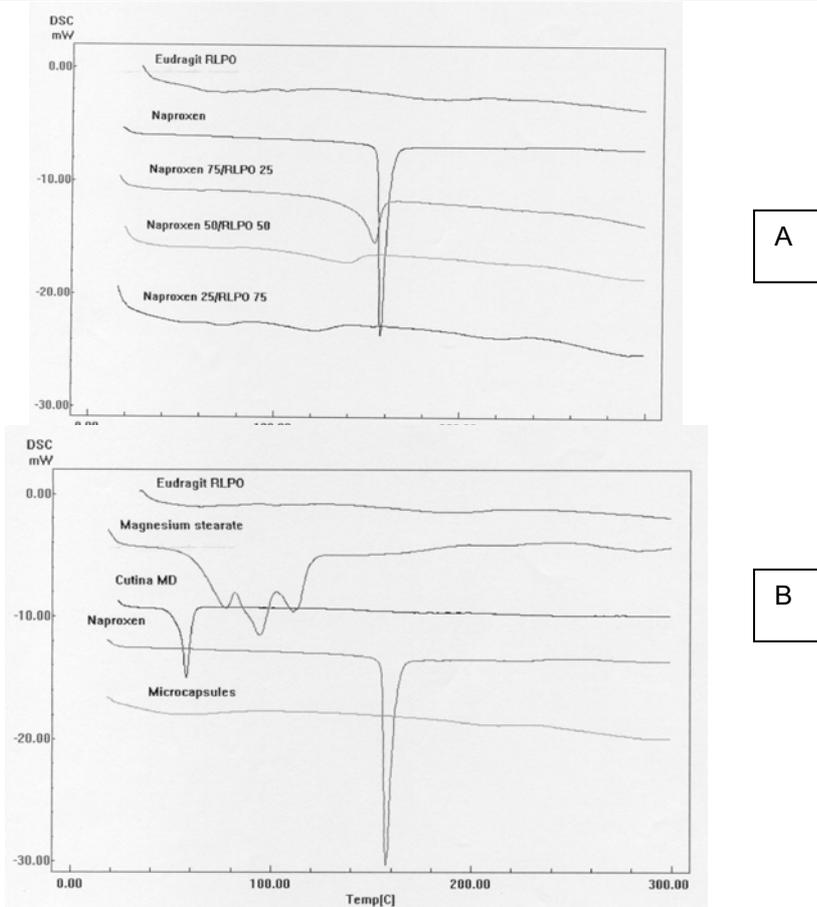
RESULTS AND DISCUSSION

The microcapsules loading of naproxen was theoretically calculated and the intended value was 22.2%. The naproxen content of the microcapsules varied from 14.8% to 15.3 % for microcapsules containing polymer. However, when the microcapsules included plasticizers the naproxen content was between 15.9% and 16.8%, as it can be seen in Table 2.

Table 2. Naproxen loading of the microcapsules.

Formulations	Loading (%)
A	14.8
B	15.2
C	14.8
D	15.3
E	14.9
F	16.8
G	16.1
H	15.9

Figure 1. DSC scans of pure naproxen, Eudragit RL PO microcapsules containing naproxen, Cutina MD and magnesium stearate (A), pure naproxen, mechanical mixtures of naproxen and Eudragit RL PO (B) at heating rate of 10°C/min.

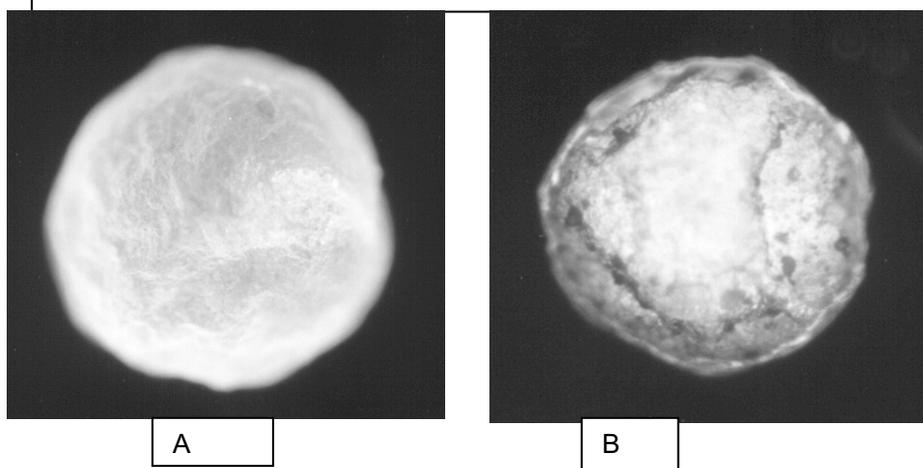


The differential scanning calorimetry (DSC) analysis (Figure 1) showed that there were no thermal events during the examination of

empty microcapsules. However, in the case of the melting phase transition of pure naproxen, a sharp endotherm was observed at approximately 155°C corresponding exactly to the melting point of naproxen. To shed further light on the nature of Eudragit-naproxen interaction, different mechanical mixtures were prepared and examined by DSC. When the naproxen content in the mixtures was decreased, the peak at 155°C decreased and became negligible at approximately 50% naproxen. When the microcapsules naproxen content was about 15%, the thermal behaviour of naproxen microcapsules was similar to the observed with pure Eudragit, as the peak at 155°C became negligible.

The microscopic analysis of microcapsules containing naproxen revealed its spherical shape. As it can be observed in Figure 2, the morphological examination of the microcapsules, performed at the beginning and at different times of the release study by optical microscopy, showed that the products were homogeneous with corrugated surfaces and pores. Higher magnification revealed surface shrinkage. After dissolution test the microcapsules did not change in shape, which suggests that naproxen diffused out through the minor pores and channels.

Figure 2. Scanning optical micrograph of naproxen microcapsules before (A) and after (B) dissolution test.



The results obtained in the sieving evaluation of the microcapsules particle size distribution are shown in Table 3. It is possible to verify that all batches presented a similar and regular size distribution.

Table 3. Microcapsules size distribution (%).

Characteristics (μm)	Formulations							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1000-1250	36	31	30	28	22	25	31	41
710-1000	50	49	45	50	53	15	36	16
520-710	14	20	21	18	21	21	27	28
250 - 520	-	-	4	3	2	32	5	12
< 250	-	-	-	1	2	7	1	3

The naproxen release profiles from the eight different microcapsules formulations are shown in Figure 3 and 4. The drug release profiles were plotted against time and some mathematical models (Zero-order, First-order and Higuchi Law) were applied.

Figure 3. Release profiles of A (RS PM), B (RL PO), C (RS PM/RL PO 75/25), D (RS PM/RL PO 50/50) and E (RS PM/RL PO 25/75) formulations.

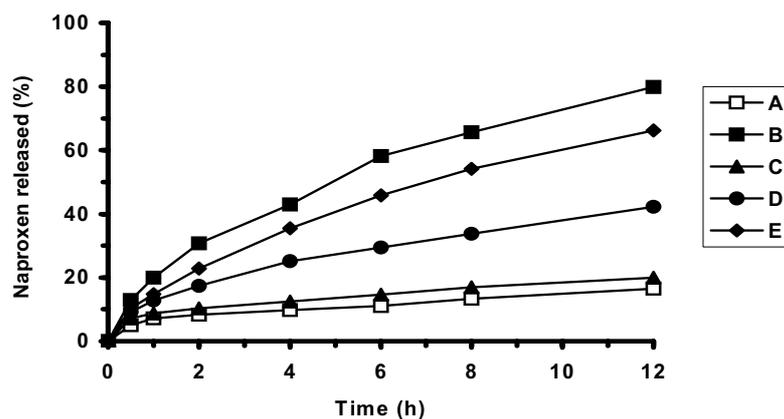
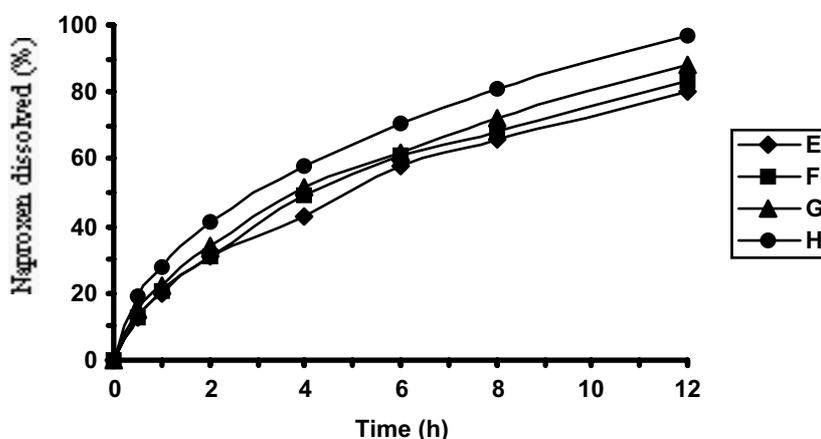


Figure 4. Release profiles of E (RL PO), F (RL PO/Cutina HR), G (RL PO/Cutina KD 16) and D (RL PO/Cutina MD) formulations.



The results obtained in the release studies are shown in Table 4. It is possible to observe that the release kinetics from the microcapsules containing naproxen followed the Higuchi equation up to 79.9% of the cumulative drug release.

As expected, a higher release rate was obtained when the Eudragit RS PM content decreased or when Eudragit RL PO increased. When 0%, 25%, 50%, 75% and 100% of Eudragit RS PM was incorporated into the formulations, the amount of released naproxen decreased to 79.9%, 66.3%, 42.2%, 19.9% and 16.5% after 12 h, respectively.

Table 4. Values of kinetic constant (k), y-intercept (b) and correlation coefficient (R^2) following linear regression of release studies.

		Formulations							
		A	B	C	D	E	D	E	F
Zero-order	k	0.913	5.795	1.076	2.790	4.761	6.085	6.329	6.670
	b	5.830	16.609	7.735	10.930	13.740	17.402	18.966	24.418
	R^2	0.969	0.956	0.979	0.965	0.950	0.947	0.955	0.950
First-order	k	0.089	0.144	0.083	0.121	0.146	0.147	0.142	0.129
	b	1.828	2.930	2.101	2.488	2.722	2.959	3.050	3.278
	R^2	0.883	0.823	0.920	0.855	0.796	0.807	0.818	0.823
Higuchi	k	3.814	24.654	4.519	11.826	20.272	26.018	26.968	28.487
	b	2.644	-4.484	3.934	0.864	-3.619	4.999	-4.154	-0.075
	R^2	0.975	0.997	0.994	0.998	0.992	0.997	0.999	0.998

According to the release studies results obtained, Eudragit RSPM microcapsules showed a naproxen release lower than Eudragit RLPO microcapsules. These results suggest that the nature of the polymer has a significant effect on the release rate of naproxen when incorporated into these microcapsules formulations. Therefore, the preliminary results suggest that in the experimental conditions and with the polymers used in the present study, it is possible to prepare microcapsules for an oral controlled release form of naproxen.

Acknowledgements

The authors would like to thank to Janssen Cilag (Portugal) and Rohm Pharma GmbH (Germany). The authors would also like to thank to Dr. Rui Lapa for the computer program that permitted to determine the release kinetics and Dra. Maria São José Nascimento for the microcapsules photographs. This work was supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Portugal) – Project SAU/1190/95 – Praxis 2/2.1.

References

- (1) BABAY, D., HOFFMAN, A. AND BENITA, S. (1988) *Biomaterials*. **9**: 482-488.
- (2) HILTON J. E. AND SUMMERS M. P. (1987) *Drug Dev. Ind. Pharm.* **13**: 1611-1624
- (3) INSEL, P. A. (1992) Analgesic-antipyretics and antiinflammatory agents, in *The Pharmacological Basis of Therapeutics* Vol. I, 26, pp. 642 L. S. Goodman and A. Gilman, Eds., MC Graw-Hill Inc.
- (4) KAWAATA, M., NAKAMURA, S., GOTO, S. AND AOYAMA, M. (1986) *Chem. Pharm. Bull.* **34**: 2618 (1986).
- (5) PONGPAIBUL, Y., PRICE, J. C. AND WHITWORTH, C. W. (1984) *Drug Dev. Ind. Pharm.* **10**: 1597-1616.
- (6) RAMADAN, E. M., EL-HELW, A. AND EL-SAID, Y. (1987) *J. Microencapsul.* **5**: 125-132.
- (7) SHOZI, Y., MIZUSHIMA, Y., YANAGAWA, A., SHIBA, T., TAKEI, H., FUJII, M. AND AMINO, M. (1986) *J. Pharm. Pharmac.* **38**: 118-121.
- (8) TODD, P. AND CLISSOLD, S. P. (1990) *Drugs*. **40**: 91-137.
- (9) ZIA H., FALAMARZIAN, M., RAISI, A., MONTASERI H. AND NEEDHAM, T. E. (1991) *J. Microencapsul.* **8**: 21-28.

Anal. Real Acad. Nal. Farm., 2003, 69,

Revisión

Urbanismo y Salud Pública en el espacio urbano (II)

SOFÍA MURO BENAYAS

Catedrática del IES “Joaquín Rodrigo” de Madrid.

RESUMEN

La segunda parte del estudio “Urbanismo y Salud Pública en el espacio urbano”(cuya primera parte ha sido publicada en el nº 4) trata de los contaminantes de Madrid y sus efectos sobre los monumentos del Paseo del Prado y en la salud de los madrileños.

La ciudad es un foco contaminante debido a los vehículos de motor, causantes de una gran parte de la contaminación atmosférica, y a la civilización del bienestar, que con sus calefacciones y aparatos de refrigeración aumenta la contaminación de la ciudad.

La degradación de los monumentos se produce fundamentalmente por el efecto hídrico de sus aguas, ya que su composición varía según la concentración de los contaminantes.

Respecto a la salud de los ciudadanos, lo que más se constata son alteraciones respiratorias.

El trabajo finaliza resaltando el papel de la educación ambiental para buscar soluciones al problema de la contaminación

Palabras Clave: Fuentes del Paseo del Prado.— Contaminantes.— Clima y Contaminación

SUMMARY

Urbanism and Public Health

This second part is about pollution in Madrid and their effects on the monuments along "El Paseo del Prado", and on the health of the citizens. It is remarkable that the degeneration of these monuments is mainly due to the effect of the water from their own fountains, because its composition depends on the concentration of the pollution. Considering the public health there are evidences of respiratory diseases.

Key words: Paseo del Prado's fountains.— Pollutants.— Climate and Pollution.

1. EL NEGATIVO IMPACTO DE LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL SOBRE LAS OBRAS DE ARTE DEL PASEO DEL PRADO Y LA SALUD DE LOS MADRILEÑOS

Al comienzo del s. XX Madrid rozaba la mítica cifra del millón de habitantes y, pese a que se construyeron otros lugares verdes para esparcimiento de los madrileños, como el Parque del Oeste, la atención popular y municipal siguió focalizada hacia el Paseo del Prado. Sin embargo, el incremento de vehículos de transporte privado y público transformó definitivamente el Paseo, que se convirtió en eje de circulación rápida que cruzaba la ciudad de Norte a Sur y que, en función de las necesidades del crecimiento urbano, fue prolongado durante la Segunda República hasta la zona de los Altos del Hipódromo.

En 1960 la Capital ya alcanzaba los 2.260.000 habitantes. Desde los años setenta el crecimiento demográfico del Municipio inició su ralentización a expensas de la periferia: se puso freno a la política de anexiones metropolitanas de municipios próximos, remitió la inmigración interior y comenzó el descenso de las tasas de natalidad, todo lo cual disminuyó el ritmo de su crecimiento.

El Paseo del Prado siguió siendo punto de cita obligado por su multifuncionalidad y requirió continua atención urbanística porque la utilización masiva del automóvil provocaba, y provoca, una contaminación creciente que ha acelerado el proceso normal de ensuciamiento de la ciudad, ocasionando lesiones en edificios y monumentos, con síntomas y causas diversas que es preciso acotar.

En esta parte del estudio examinaremos la contaminación atmosférica de Madrid y su repercusión en la salud de los madrileños así como en las fuentes de Los Tritones, Apolo, Cibeles y Neptuno, en las que aparecen pátinas de suciedad, debidas no sólo a la acumulación de contaminantes de la atmósfera sino también al negativo efecto hídrico, producido por el propio líquido que mana de ellas.

2. CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA DE MADRID: SU REPERCUSIÓN AMBIENTAL Y EN LA SALUD

Madrid cuenta en la actualidad con un gran cinturón metropolitano en cuyo centro (menos de 700 Km²) se alojan tres millones de personas formando un gran núcleo urbano.

En la ciudad confluyen hábitos personales, de trabajo cultura y ocio, de acuerdo con la estructura específica de la urbe, y todo ello en un marco de máximo aprovechamiento del suelo; lo que provoca gran repercusión en su medio natural, ya que aparecen sustancias que en determinadas concentraciones son capaces de producir desajustes en la composición del aire y causa efectos nocivos sobre la salud de las personas y el patrimonio artístico de la ciudad.

Así, en las normativas de protección del medio ambiente, se define comúnmente la contaminación atmosférica como presencia en la atmósfera de sustancias o de energía introducidas por la actividad del hombre, directa o indirectamente, que impliquen riesgo, daño o molestia grave para las personas, bienes de cualquier naturaleza y medio ambiente.

Pero ¿desde qué cantidad se puede estimar contaminación? Esto depende del compuesto considerado, pues numerosos estudios han demostrado que alteraciones graves en la composición de la atmósfera pueden provocar condiciones de asma o aumentar las ya existentes¹. Sin embargo, es casi imposible asegurar qué contaminantes son los responsables, porque la polución se compone de una mezcla de

¹ “La contaminación atmosférica causa estrechamiento en las arterias” Estudio de la Universidad de Toronto (Canadá) publicado en *El País* el 12 de Marzo de 2002.

sustancias.

2.-1 CONTAMINANTES DE MADRID

La contaminación atmosférica en las ciudades ha cambiado de una polución básicamente industrial a otra en que los principales agentes son la quema de combustibles fósiles en las calefacciones y en los motores de los vehículos.

Según el Departamento de Contaminación Atmosférica del Ayuntamiento de Madrid el 90% de la contaminación está motivada por:

- Monóxido de Carbono: CO.
- Óxidos de Nitrógeno, fundamentalmente el NO, y NO₂.
- Óxidos de Azufre, representados por SO_x pero es el SO₂ el que adquiere mayor relevancia.
- Partículas sólidas de compuestos no volátiles.
- Hidrocarburos y sus derivados.

Una vez emitidos a la atmósfera, se mezclan, sus efectos son mayores y son transportados por las masas de aire a distancias alejadas del foco emisor. Posteriormente pueden retornar a la superficie terrestre por sedimentación si se encuentran en fase sólida (deposición seca) o bien incorporados en el agua de lluvia (deposición húmeda). Durante el tiempo que están en la atmósfera, algunos de ellos pueden reaccionar y, junto con las radiaciones solares, se originan nuevos compuestos químicos, llamados cotaminantes secundarios, en contraposición a sus precursores o contaminantes primarios. Entre ellos podemos citar el Ozono y el Nitrato de peroxiacetileno o PAN (CH₃-CO-O-O-NO₂) que son muy oxidantes y reactivos.

-El ozono: O₃

Es el contaminante más característico de origen fotoquímico; y mientras que en la estratosfera realiza un papel fundamental, ya que absorbe las radiaciones ultravioletas ($O_3 + hv \rightarrow O_2 + O$) de efectos muy negativos para la conservación del medio ambiente y la salud humana, en

la troposfera es muy perjudicial por ser un poderoso oxidante.

El ozono troposférico es producido por la acción de la radiación solar al incidir sobre las capas bajas de la atmósfera en presencia de óxidos de Nitrógeno (NO_x) e hidrocarburos (HC). Es considerado un contaminante muy peligroso en concentraciones elevadas, ya que en dosis altas afecta a la vista y a los sistemas respiratorio, circulatorio y nervioso. En la zona del Henares y debido a la ola de calor sufrida durante algunos días del mes de Mayo del 2001 (la misma situación se ha repetido el 16 de Septiembre de 2001), se miden $187 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$. Por encima de $180 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ se considera que las autoridades deben avisar a la población, ya que ancianos, niños y personas con problemas respiratorios han de evitar el ejercicio físico al aire libre y tomar precauciones en la hora de mayor radiación.²

-El monóxido de carbono: CO

Es el contaminante más importante por su cantidad, pero su emisión es debida más que a la actividad humana a causas naturales, ya que la mayor parte procede de la oxidación del Metano (CH_4) producido a su vez en la putrefacción de la materia orgánica.

Entre las fuentes antropogénicas, la más importante es la combustión originada en los motores de los vehículos de gasolina, derivándose tasas importantes en las zonas urbanas de mucho tráfico, caso de las plazas de Cibeles y de Cánovas del Castillo.

El CO es muy tóxico, tiene efectos directos sobre el sistema circulatorio y respiratorio, lo que puede ser letal. Produce dolores de cabeza, perturbaciones síquicas y pérdida de reflejos.

Al reaccionar con la hemoglobina de la sangre forma carboxihemoglobina, reduciendo la capacidad de la sangre de transportar oxígeno. La dispersión en la atmósfera depende de factores meteorológicos y en las grandes ciudades, aunque se crean turbulencias y corrientes de aire, se dan estancamientos aéreos.

²*El Mundo*; 1 de Junio de 2001

Como es sabido, el CO se elimina por oxidación en la atmósfera, pasando a **CO₂**.

El transporte es también una fuente considerable de dióxido de carbono, ya que el tráfico urbano es el responsable del 30% del CO₂ atmosférico en las ciudades. Es un gas causante del efecto invernadero y productor de lluvia ácida, porque al “atrapar” agua de la humedad de la propia atmósfera o de las fuentes de los monumentos se convierte en ácido carbónico (H₂CO₃) que cae a la tierra por efecto de la gravedad. El ácido carbónico no es peligroso, pues es ácido débil (PH entre 7 y 5,6), pero al penetrar por los poros y fisuras de las rocas de los monumentos forma precipitaciones de carbonato cálcico³.

El efecto invernadero provoca un sucesivo incremento de la temperatura de la atmósfera y se prevé que, si la concentración mundial sigue aumentando a razón del 0,5 % al año, la temperatura de la Tierra aumentará entre 1,4 y 5,8 °C en los próximos cien años⁴ lo que causará un cambio climático apreciable no sólo en el entorno sino en la salud de las personas

-Óxidos de Nitrógeno: NO y NO₂

Proviene de procesos de combustión a altas temperaturas. La principal fuente de emisión son los vehículos de gasolina y los generadores de calor de carbón y gasóleo. Provocan irritación de ojos, nariz y bronquios. A título de ejemplo, podemos decir que una concentración de estos óxidos de 10 p.p.m. anula la fotosíntesis de las plantas por bloqueo de la clorofila, pero estos daños son reversibles si disminuye su concentración.

El proyecto APEA, realizado en varias ciudades europeas, publicado en 1997, demostró que a un aumento de 50mg.m⁻³ de NO₂ seguía un aumento de ingresos por asma de un 3%.⁵

³ Para las tasas permitidas de CO no existe directiva de la C.E., sólo un decreto de 1985 en el que se establecen como límites valores medios al día de 34mg.m⁻³ o máximos admisibles de 45mg.m⁻³ durante 30 minutos o 15mg.m⁻³ durante 8 horas seguidas.

⁴ “La cumbre del clima salva el protocolo de Kioto”, *El País*; 24 de Julio de 2001

⁵ *El País* 2 de Enero de 2001.

En situaciones anticiclónicas, pero con temperaturas elevadas y escasa humedad, la radiación solar descompone el NO_2 según la reacción: $\text{NO}_2 + h\nu \rightarrow \text{O} + \text{NO}$. Este oxígeno monoatómico junto con el molecular presente en el aire origina el O_3 troposférico.

Estos gases por la acción de oxidantes (como el O_3) y el radical hidroxilo (OH^\cdot) se convierten en el peligroso ácido nítrico que caerá a tierra como lluvia ácida.

En Madrid la concentración de estos óxidos tiende a aumentar debido a que la cantidad de vehículos en circulación sigue en aumento⁵ y en pequeña proporción al efecto de las incineradoras.

-Óxidos de Azufre: SO_2

Se originan por la combustión de sustancias que contengan azufre y por la oxidación del ácido sulfhídrico (H_2S) presente en la atmósfera como producto de la descomposición de la materia orgánica, de actividades industriales y también de emisiones volcánicas que, aunque se hayan producido a grandes distancias de Madrid, las masas de aire las han esparcido prácticamente por toda la superficie terrestre.

La fuente antropogénica más importante se debe a la utilización del carbón y el fuel-oil como combustible; de ahí la importancia de cambiar las calderas de calefacción a gas natural. Produce irritación en los ojos, aumento de enfermedades ORL y respiratorias (asma).

El SO_2 es poco estable en la atmósfera, se oxida a SO_3 que reacciona con el vapor de agua de la atmósfera para formar ácido sulfúrico, ácido muy corrosivo que se depositará en la tierra por efecto de la gravedad como lluvia ácida. Esta deteriora los monumentos al combinarse con los minerales de las rocas que forman la superficie más expuesta al aire.⁶⁶

Hidrocarburos no metánicos (H.N.M.)

⁶ La citada normativa comunitaria establece como límites los valores medios comprendidos entre 80 y $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y $120 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$

Existe en la atmósfera una gran variedad de contaminantes de este tipo, procedentes de la actividad humana, fundamentalmente de los gases de los vehículos con combustiones incompletas por el motor fuera de punto o muy gastado. Al inhalarlos producen efectos distintos, dependiendo del tipo de hidrocarburo. Los hidrocarburos aromáticos: benceno y tolueno son los más irritantes, ya que pueden causar lesiones importantes en las membranas mucosas. Los hidrocarburos no saturados son los más peligrosos por su facilidad de interacción con la radiación ultravioleta y formar oxidantes muy reactivos como el ozono y el P.A.N. Estas reacciones se ven favorecidas en situaciones anticiclónicas, porque dificultan la dispersión de contaminantes primarios.

También se vierten a la atmósfera compuestos cloro fluorcarbonados procedentes de aerosoles, extintores y circuitos de refrigeración. Estos compuestos se degradan fotoquímicamente en la estratosfera y son los responsables de la destrucción de la capa de ozono. No existe directiva comunitaria para la regulación de estos contaminantes.

Partículas sólidas de compuestos no volátiles.

Las partículas sólidas son muy variables en su composición y tamaño. La principal causa de este contaminante son los vehículos de gasoil y los generadores de calor con carbón. El plomo es el de mayor porcentaje debido a los carburantes, ya que se aplica como antidetonante de las gasolinas.

Las partículas sólidas caen a tierra por sedimentación o arrastradas por la lluvia.

Todos estos contaminantes tienen un efecto directo sobre la salud de la población, ya que pueden provocar alteraciones cardio-respiratorias e irritaciones en las mucosas.

2-2. ASPECTOS CLIMÁTICOS: INFLUENCIA EN LA CONTAMINACIÓN

Los aspectos climáticos más relevantes de Madrid son inviernos fríos, de 5 meses de duración, y veranos calurosos, de 4 meses; de tal manera que,

aunque la temperatura media anual está en torno a los 15°C, hay oscilaciones térmicas entre 4 y 45°C, al año, pudiendo llegar en un solo mes a variaciones de 29°C.

Los vientos suelen ser flojos del S.O. en un 25 o 30% y del N:E. en un 20 o 24% en época de invierno

La humedad relativa no nos afecta, puesto que nos centramos en el estudio de cuatro fuentes que como tales están al 100% de humedad.

Tanto los contaminantes como los datos meteorológicos de la ciudad producen un microclima que, junto con el relieve abrupto formado por los edificios a diferentes alturas, calles estrechas que impiden la correcta circulación del aire, y la absorción de la radiación solar por el suelo y los materiales de construcción (cemento, asfalto...), provocan un calentamiento mayor de las masas de aire a una determinada altura que las de capas inferiores, con lo que se produce el conocido fenómeno de inversión térmica. Como consecuencia, el movimiento vertical de las capas de aire disminuye y dificulta el descenso de la contaminación urbana. El estancamiento del aire provoca a su vez el aumento de concentración de partículas sólidas en suspensión y forma nieblas (smog).

En inviernos y en situaciones anticiclónicas los contaminantes que predominan son SO₂, NO, y NO₂, que con la humedad de la atmósfera dan lugar a la lluvia ácida. En veranos con escasa humedad, altas temperaturas, y también en situaciones anticiclónicas, predominan el NO₂ el O₃ y el PAN.

Con respecto a las precipitaciones la ciudad elimina rápidamente el agua a través de la alcantarillas, con lo que es difícil que se produzca evaporación y eliminar así la contaminación.

Los mapas de isotermas, bajo muy distintas condiciones de vientos, nubes y luz solar, muestran todos ellos las temperaturas más altas en el centro de la ciudad y las más bajas en forma radial hacia la periferia. Es preciso resaltar que todos estos aspectos tienen una gran repercusión sobre la permanencia de los contaminantes en Madrid.

3. DETERIORO DE LOS MATERIALES DE LAS FUENTES DEL PASEO DEL

PRADO DEBIDO A LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

Las fuentes están situadas en emplazamientos abiertos del Paseo del Prado y, por tanto, expuestas a condiciones ambientales adversas. Entre estas sobresalen las amplias oscilaciones térmicas y el alto contenido en contaminantes, que provocan un ennegrecimiento general que impide ver el modelado correcto de los monumentos, sobre todo en sus figuras más bajas, ya que es en ellas donde se deposita la mayor contaminación (fig.1). También hay que considerar el funcionamiento periódico de los surtidores de agua, que hace que se produzcan abundantes grietas repartidas por todos los sitios, cubiertas además por hongos, algas y musgo (fig.2).





El perjuicio de estas grietas se acentúa en las fuentes de Neptuno y Cibeles por la continua vibración a la que están sometidas a causa de la gran circulación de vehículos en la zona, y se agrava hasta el extremo en las cuatro fuentes de los Tritones, (las que están expuestas son réplicas, ya que las originales se retiraron en el año 2000 para su restauración) puesto que, al ser una zona adoquinada, la vibración se intensifica con la consiguiente agresión mecánica de la piedra, que junto con la erosión del agua y la intemperie, se ha producido la completa desfiguración de sus imágenes. Sin embargo, es la fuente de Apolo la que muestra mayor pérdida de piedra.

Los contaminantes sólidos determinados por el Ayuntamiento de Madrid son fundamentalmente partículas de hidrocarburos, carbón y hollín cuya concentración empieza a subir en Noviembre y alcanza sus valores más altos en Enero y Febrero. Estos contaminantes corresponden, sin lugar a dudas, al tránsito de autobuses y automóviles que utilizan gasóleo, así como a la existencia de calefacciones de gasoil y de algunas residuales que aún funcionan con carbón. También aparece monóxido de carbono (CO). Su

concentración muestra los mismos picos de subida que los anteriores contaminantes que, aunque es baja, desde el punto de vista sanitario, sí afectan al deterioro de los monumentos, pues con gran rapidez se transforman en CO_2 que incrementa el ya existente (procedente de los motores de explosión). El dióxido de carbono (CO_2) es un óxido muy soluble en agua. De forma casi inmediata se convierte en ácido carbónico (H_2CO_3) que reacciona con el material de los monumentos y forma depósitos de carbonatos.

Por otra parte, parece evidente que el agua que riega las fuentes, al estar en contacto directo con la piedra ornamental, sea la causa fundamental de su degradación. En algunos casos, filtrándose por los poros de la piedra, ha oradado las figuras, produciendo el efecto de verdaderos taladros (caso de las Cuatro Fuentes de los Tritones). El agua circula en circuito cerrado gran parte del año (185 días) y, según datos del Ayuntamiento, presenta un carácter bicarbonatado y sulfatado, lo que es explicable por la disolución de contaminantes de la atmósfera de ese lugar (CO_2 y SO_2).

Las aguas son renovadas cada 15 días; por tanto, su pH varía, lo que provoca periodos de mayor disolución de las sales (especialmente carbonatadas) y otros de precipitación de ellas sobre las figuras. Estas mismas aguas favorecen la proliferación de algas y musgos, en las zonas más húmedas, con lo que se aumentan la suciedad y la degradación de las rocas. Así se pone de manifiesto en la fuente de Apolo (fig.3) y en las de los Tritones (fig. 4).



Fig. 3 Fuente de Apolo



Fig. 4 Fuente de los Tritones

En cuanto a los materiales de construcción podemos destacar los mármoles dolomíticos (carbonatos de calcio y magnesio), compactos y de color rosáceo, procedentes de Montesclaros (Toledo), que son los que forman el cuerpo principal de las fuentes de Cibeles y Neptuno y mármoles calcíticos (carbonato de calcio) procedentes de Carrara (Italia) que son los constituyentes de los amocillos, la concha y el ánfora de la fuente de Cibeles. Son rocas muy blancas, a veces atravesadas por venas grisáceas, pero muy puros en su composición formada exclusivamente por calcita. También sobresalen los mármoles calcíticos procedentes de las proximidades de Redueña (Madrid), que son los que forman las fuentes de Apolo y los Tritones, son de piedra caliza clara y porosa; formada no sólo

por calcita sino también por minerales ricos en aragonito, magnesio y dolomita. Finalmente, los basamentos de las tres fuentes así como sus pilones se hicieron con rocas graníticas extraídas de la sierra de Guadarrama (Madrid). Los granitos son rocas con texturas cristalinas granuladas.

Al estudiar la degradación de los monumentos no sólo hay que tener en cuenta la calidad de la roca y su composición química (estudio que excede este trabajo) sino que las fuentes se ubican en un sistema abierto y que, por tanto, son las condiciones medioambientales las que regulan su deterioro.

La alteración que sufren los monumentos, incluso al margen de sus materiales constituyentes, cabe calificarla en tres tipos: física, biológica y química. La alteración física puede actuar por la acción del agua y su aumento de volumen (9%) en la solidificación agua-hielo; por la acción de cambios térmicos en materiales que posean minerales con coeficientes de dilatación muy diferentes entre sí; y por causa del viento y su acción mecánica como transportador de partículas sólidas que ejercen impactos sobre las superficies de los monumentos. No hay que olvidar la vibración del suelo debida al tráfico sobre el pavimento.

La alteración biológica se debe a la acción de las bacterias que actúan como catalizadores de los procesos químicos. La alteración química es la más importante que soportan las rocas sobre las que se labraron los monumentos. Aun más, el hecho de que los que estudiamos estén enclavados en zonas de altos índices de contaminación hace que dicha alteración química se acelere por la influencia que las atmósferas contaminadas ejercen sobre dichos procesos. En resumen, podríamos decir que **son las condiciones ambientales de oscilaciones térmicas y humedades, junto con los contaminantes, los causantes fundamentales del deterioro de los materiales de las fuentes.**

Hay que destacar que estudios petrofísicos de las rocas indican que los granitos son más porosos que los mármoles; por tanto, el agua que circula por ellos altera la roca en los poros de mayor tamaño. En los mármoles dolomíticos, cuya porosidad es menor que en el resto de las rocas, el agua se distribuye homogéneamente, originando pequeñas fisuras y enmugrecimiento debido a los humos. En los calcíticos, el agua se distribuye de forma desigual, se estanca en los poros más gruesos y provoca allí una

fácil disolución de la calcita, horadando la piedra.

En las fuentes de Apolo y en las de los Tritones hay una importante pérdida de material (fig.5), que sin duda será debida a disoluciones sufridas por la piedra.

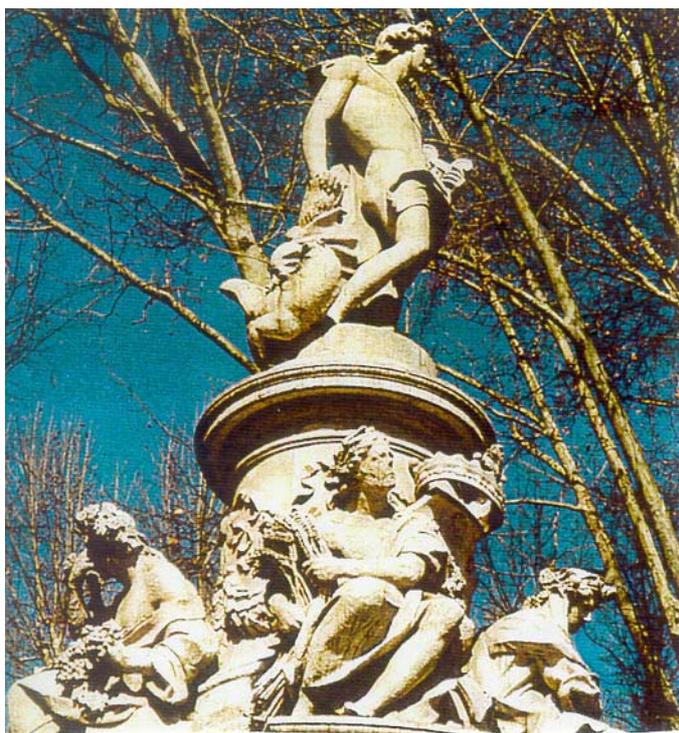


Fig. 5 Apolo

Estas fuentes también padecen una notable colonización de algas, musgos y hongos en las zonas próximas al agua estancada, cuya eutroficación se ve favorecida tanto por la arboleda del Paseo del Prado que hace de pantalla al viento y a la luz solar como por la cantidad de

excrementos de aves que sirven de nutrientes a dichas especies colonizadoras. Finalmente, hay que añadir que estos excrementos tienen un carácter marcadamente ácido, lo cual altera los materiales de mortero que unen las distintas partes de los monumentos.

4. HACIA UNA CIUDAD SOSTENIBLE

Madrid se caracteriza hoy por su enorme diversidad: junto a hermosas avenidas como la que estudiamos del Paseo del Prado hay barrios de marginación y pobreza. Los días despejados y con sol contrastan con otros irrespirables que nos afligen en ciertas épocas del año.

Para interpretar algunos aspectos de la Ciudad indicamos que es un sistema abierto en el que confluyen complejos ciclos de materia, energía, agua y contaminantes que evolucionan a través de un paisaje urbano, herencia de siglos de crecimiento con una mezcla de desorden y planificación.

Determinados indicadores muestran una evolución positiva en el abastecimiento de agua y saneamientos, mientras que otros no lo son tanto como el transporte urbano cada vez más intenso y la agresión a la salud, al medio ambiente y al patrimonio cultural. Y, como dice D Pedro Navascués, no podemos olvidar que “nuestro patrimonio artístico y cultural son bienes heredados que por imperativo legal tenemos la obligación de salvaguardar como herencia cultural para transmitir a las generaciones venideras, y que de no poner los medios ese legado se perderá irreversiblemente”⁷

4.1 ECOLOGÍA Y SALUD

La salud no puede definirse sólo como ausencia de enfermedad, también hay que considerar unas relaciones ecológicas equilibradas y favorables a la biología humana, en un proceso de adaptación-desadaptación del hombre a su ambiente. Salud o enfermedad son el resultado del éxito o el fracaso del organismo para adaptarse física, mental y socialmente, a las

⁷ *Medio ambiente y patrimonio* Pedro Navascués

condiciones de nuestro ambiente total.

La OMS dice: “La salud es un estado de bienestar completo-físico, psíquico y social- y no solamente la ausencia de enfermedad o de invalidez”. La ecología propone una concepción global de la salud: biológica, social y dinámica que permite una orientación de la acción, tanto en términos individuales como comunitarios y ambientales. La salud de una población no depende sólo del llamado “sistema de salud”, de la seguridad social, sino fundamentalmente de factores ecológicos ligados a las características genéticas y demográficas de la población y a las del ambiente de vida humano.

En este contexto la ciudad de una sociedad de producción-consumo no da calidad de vida. Su población tiene que enfrentarse a contaminación química: estudios epidemiológicos recientes ponen de manifiesto el incremento de cáncer, bronquitis crónicas, enfisemas, alergias, asma, trastornos de la visión, irritaciones crónicas, enfermedades cardiovasculares, etc. Y a una contaminación biológica: que produce y difunde enfermedades como el sida... Más otras que se podrían encuadrar en las mal llamadas enfermedades “de la civilización” entre ellas se podrían citar la hipertensión, la arteriosclerosis, el tabaquismo, la obesidad, los trastornos mentales y psicosomáticos, los accidentes, la pérdida de audición, la alteración del sueño y la fatiga.

4-2 NUESTRO PATRIMONIO ARTÍSTICO

En nuestra Comunidad Autónoma de Madrid se han aprobado recientemente (BOCM del 4 de noviembre de 1999) la relación de competencias de la Dirección General del Patrimonio Histórico-Artístico, cuyas actuaciones deben ir dirigidas a conservarlo, defenderlo, protegerlo, enriquecerlo y difundirlo.

La mala fama que tradicionalmente han tenido las gentes de Madrid en lo tocante a la falta de concienciación ciudadana sobre el medio ambiente y a la innata tendencia de sus habitantes a hacer de sus calles un vertedero público, unida, de otro lado, a su generosa capacidad de aceptación de gente foránea y que, en la actualidad, se está viendo incrementada con la llegada

de numerosos inmigrantes de diversas procedencias, pueden dificultar la conservación y protección del patrimonio de la ciudad, tanto por desconocimiento de su valor histórico-artístico, como por el de las consecuencias que el impacto medio ambiental puede tener sobre el mismo.

Por eso, parece prioritario que dicha concienciación por el entorno se convierta en uno de los nuevos valores de la sociedad del Tercer Milenio, de manera que se invierta la generalizada tendencia de la Opinión Pública a creer que la solución del problema ambiental compete al Gobierno, mientras que sólo una minoría asume que es problema de los ciudadanos⁸.

Por otra parte, en el ámbito de los países considerados ricos, se entiende que la ciudad debe ser un lugar donde, lejos de fomentar la incomunicación entre los que en ella viven, se debe recuperar la convivencia, ofreciendo lugares agradables de encuentro. Pero, una confluencia excesiva de gente y el no siempre adecuado uso de esos mismos espacios, así como la acción negativa de la contaminación antrópica y ambiental, pueden acabar definitivamente con alguno de los lugares más emblemáticos y castizos de nuestra ciudad, como es el caso del Paseo del Prado. A dicho proyecto sería deseable que se añadiera otro objetivo: el de la urgente necesidad de erradicar de la juventud madrileña -y de otros grupos no tan jóvenes- la costumbre de ensuciar suelos y sembrar los espacios abiertos con plásticos, botellas y otros excrementos orgánicos de origen vario en las noches y madrugadas de los fines de semana, así como la de pintar paredes y esculturas con sprays. A estas poco recomendables costumbres, por mucho que gocen de secular tradición, las autoridades municipales suelen responder dedicando a tareas de limpieza un capítulo del Presupuesto, cada vez más alto; pero se echan en falta campañas publicitarias orientadas hacia la concienciación ciudadana por la conservación de su entorno y la mejora de la salud ambiental.

⁸Encuestas del CIRES, donde contrastan las cifras de un 42% en la primera opción, frente a un 12% en la segunda (tomado de I.RICO: "Conciencia ambiental en las ciudades" *Humanidades Ingeniería y Arquitectura, II Ciclo de Conferencias de la Universidad Politécnica de Madrid (Octubre 1997-Junio 1998)*, Universidad Politécnica de Madrid, 1999, p.31).

Parece, pues, que ya ha llegado la hora de que este problema dejen de resolverlo basureros y empresas restauradoras dedicadas a la limpieza de fachadas y estatuas, y pase a ser un objetivo compartido por las Concejalías y Consejerías de Medio Ambiente y la Consejería de Educación y Cultura, con la colaboración de los Institutos de la Juventud. De cara al futuro la educación ambiental y para la salud debería ser una de las prioridades del sistema educativo obligatorio pues, sólo así, se convertirá en elemento permanente de la actividad personal⁹.

Hoy día se reconoce que las Humanidades, entendidas como un complejo de disciplinas que abarcan desde la Historia, la Literatura, la Filosofía, hasta las Bellas Artes, son tan necesarias como las Ciencias de la Naturaleza para la educación ambiental; pero a los ciudadanos se nos debe ofrecer e informar de un Proyecto para que, partiendo de una concepción unitaria, seamos capaces de interpretar y valorar cada una de sus partes desde la totalidad. Sobre todo a aquellos que siempre han oído en su casa los nombres de "la Cibeles" o Neptuno, tal vez ignorantes de que se trataba de dioses de la latinidad, y han utilizado sus estatuas como punto de cita deportiva, sin saber que la antigüedad de ambas les confiere un valor económico muy superior al que algún futbolista enardecido ha llegado a ofrecer como compensación a sus posibles desperfectos.

También hay que informar a aquellos otros vecinos que proceden de culturas muy diferentes a la nuestra latino-cristiana, y para quienes ni tan siquiera el nombre de las divinidades resulta familiar, pero que viven perfectamente integrados en el ambiente lúdico y deportivo de la Villa de Madrid.

Vecinos y foráneos deberíamos conocer la historia del Paseo del Prado, sus fines y usos, para comprenderlo y valorarlo; saber cómo afecta al conjunto la contaminación ambiental; y ésta, a su vez, a nuestra salud, y entender y asumir que no se puede hacer de dos obras de arte, como las fuentes de Cibeles y Neptuno, el objeto de las alegrías y decepciones

⁹JIMÉNEZ GÓMEZ,S.: "Educación ambiental ante el s. XXI", *Humanidades, Ingeniería y Arquitectura, II Ciclo de Conferencias de la Universidad Politécnica de Madrid (Octubre 1997-Junio 1998)*, Madrid, Universidad Politécnica, 1999, p.59.

deportivas populares, solamente por el hecho de no encontrarse encerradas en un Museo. Tal vez haya llegado la hora de que a nuestras esculturas y fuentes ornamentales se les ponga bien visible un cartel dónde conste su autor, y cuándo y de qué material fueron hechas, como ocurre con cualquier obra de arte custodiada en los museos. E incluso, de que se busquen y empleen medidas de seguridad disuasorias que impidan actos de vandalismo. Todo ello encaminado a que los que hoy son niños y jóvenes ejerzan mañana su sentido de la responsabilidad sobre el patrimonio Cultural y Artístico cuando sean adultos. Los que hoy lo somos, debemos terminar de hacer nuestras las teorías urbanistas, naturalistas e higienistas de finales del s. XIX. Valorar los aspectos positivos del sol y el aire puro sobre nuestra salud y la de los ciudadanos, y buscar posibilidades reales y objetivas de llevar a cabo un cambio hacia la sostenibilidad. Cambio que implica producir menos residuos, reciclar gran parte de lo que se produce, calentar los edificios sin ennegrecer la atmósfera y buscar medidas para un transporte fluido y no contaminante.

De nada servirán las medidas reparadoras y preventivas que lleve a cabo la administración local para conservar nuestro medio ambiente y patrimonio artístico si los ciudadanos no las asumimos como propias. En definitiva se trata de que consideremos **que toda mejora ambiental revierta en mayor calidad de vida de los habitantes de Madrid.**

BIBLIOGRAFÍA

- (1) AYUNTAMIENTO DE MADRID (1997): Anuario estadístico. pp.19-31.
- (2) AYUNTAMIENTO DE MADRID, Delegación de Cultura (1979-1981): Madrid Restaura: I Rehabilitación Urbana. II Restauración de Monumentos.
- (3) AYUNTAMIENTO DE MADRID, Dirección de Servicios del Gabinete de la Alcaldía Presidencia: Ordenanzas Municipales pp.1100-1109.
- (4) AYUNTAMIENTO DE MADRID, Plan de Rehabilitación de Monumentos, Fundación Rich (1995): Fuente de Neptuno.
- (5) AYUNTAMIENTO DE MADRID, Red de Control de Contaminación Atmosférica

- (1999): Datos estadísticos, 1989-1996, Madrid.
- (6) CRESPI, M.P. (1980): Acondicionamiento Ambiental, Madrid.
- (7) HERRERO, J.I (1961): Alteraciones de calizas y areniscas como materiales de construcción, Madrid.
- (8) LEÓN VALLEJO, F.J. (1990): Ensuciamiento de fachadas por contaminación atmosférica: Análisis y prevención, Valladolid
- (9) NAVASCUÉS, P. (1992): "La formación de la Arquitectura Neoclásica", en *Historia de España de Menéndez Pidal*, vol.XXXI, Madrid, pp.657-717.
- (10) " " : "La escultura y la pintura", *Historia de España de Menéndez Pidal*, vol. XXXI, Madrid, 1992, cap.V, pp.721-764.
- (11) RODRÍGUEZ ALBARRÁN, E. (1986): La Cibele y Neptuno vinieron de Montesclaros, Madrid, D.L.
- (12) RODRÍGUEZ RUIZ, D. (1988): "Arquitectura y ciudad", Carlos III y la Ilustración, Madrid, pp.319-322.
- (13) VV.AA. (1988): Catálogo de la exposición Carlos III y la Ilustración, Madrid, Ministerio de Cultura, 2 vols.
- (14) VV.AA. (1989): El arte en tiempos de Carlos III, Jornadas de Arte, Madrid, CSIC.
- (15) VV.AA (1988).: Carlos III Alcalde de Madrid 1788-1988, Madrid, Ayuntamiento de Madrid.
- (16) VV.AA. (1996): Dirigido por Francisco Mingarro Martín.: Degradación y conservación del Patrimonio Arquitectónico, (Cursos de verano de El Escorial), Madrid.
- (17) VV.AA .(1985): Diccionario de Química, Anaya.
- (18) VV.AA .(2000): Recursos Mundiales, 2000, Instituto de Recursos Mundiales, Madrid.
- (19) VV.AA .(2001): Nuevas fronteras en el conocimiento y gestión de residuos.. Cursos del Instituto de España, Madrid.

Memoria Anual de Secretaría correspondiente al año 2002

EXCMA. SRA. DÑA. MARÍA DEL CARMEN FRANCÉS CAUSAPÉ

Académica Secretaria

La Real Academia Nacional de Farmacia inició oficialmente las actividades correspondientes al Curso Académico 2002 con la celebración de la Solemne Sesión Inaugural el día 17 de Enero presidida por la Excma. Sra. Dña. Margarita Salas Falgueras, Presidenta del Instituto de España, y contando en la Presidencia con el Excmo. Sr. Presidente Honorario, D. Ángel Santos Ruiz, el Excmo. Sr. Presidente, D. Juan Manuel Reol Tejada, el Excmo. Sr. Secretario de Estado de Educación y Universidades, D. Julio Iglesias de Ussel, el Excmo. Sr. Secretario de la Real Academia Nacional de Medicina, D. Juan Jiménez Collado, el Muy Ilustre Sr. Vicepresidente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña, D. Francisco Taxonera Roca, y el Tesorero de nuestra Corporación, el Excmo. Sr. D. Segundo Jiménez Gómez. Primeramente, el Sr. Presidente dio la bienvenida a las personalidades invitadas y después la que esto suscribe leyó la **Memoria de Secretaría**. A continuación, la Excma. Sra. Dña. María Cascales Angosto dio lectura al **Discurso Reglamentario** titulado: "Proteínas del Estrés y Carabinas moleculares. Proyecciones clínicas y terapéuticas". En primer lugar, la Dra. Cascales justifica el interés del tema en la actualidad ya que cualquier alteración en las vías que conducen a la respuesta al estrés es causa de enfermedades, entre las que cabe destacar la artritis reumatoide, la isquemia, la infección, enfermedades autoinmunes y el cáncer. Asimismo en la introducción señala el importante papel que juegan las proteínas de respuesta al estrés en fenómenos relevantes en el aspecto clínico, entre los que se incluyen enfermedades degenerativas, oncogénesis, traumatismos de órganos y tejidos así como la respuesta inmune. La Dra. Cascales trata de los genes del Estrés y de la supervivencia observando que las secuencias genómicas singulares, organizadas en la superfamilia de genes del estrés, proporcionan al ser humano la capacidad de adaptarse al ambiente hostil y sobrevivir. En la primera parte del

discurso la Dra. Cascales explica el fenómeno de inducción de la respuesta al estrés que causa situaciones de estrés agudas o crónicas y que está regulado por una familia de factores de transcripción que se regulan por diversos mecanismos controlados probablemente por cuerpos nucleares localizados en el núcleo de las células humanas. Asimismo se ocupa de los mecanismos de adaptación al estrés que permiten a la célula reconocer y adaptarse a las situaciones adversas fisiológicas y ambientales.

En la segunda parte del discurso la Dra. Cascales trata de las Carabinas moleculares que en ocasiones actúan como proteínas del estrés mientras que algunas proteínas del estrés son carabinas moleculares por lo que afirma que la respuesta al estrés ha de considerarse en muchos aspectos como una amplificación de la función básica de las carabinas. Define cuales son las condiciones para que una molécula sea considerada una carabina molecular, del papel catalizador que ésta tiene sobre el plegamiento proteico, de su estructura, de su versatilidad que le permite intervenir en gran variedad de procesos como desunión de oligómeros, degradación proteica, y traslocación e interruptor redox. Pasa después a ocuparse de las proteínas de estrés que funcionan como carabinas moleculares en la reparación de las proteínas lesionadas así como del mecanismo de degradación proteica como un mecanismo estrictamente regulado y necesario tanto para el metabolismo como para el ciclo celular.

En la tercera parte del discurso, la Dra. Cascales se refiere a las Interacciones de la respuesta al estrés y su importancia en el destino final de células, tejidos, órganos y por tanto en la supervivencia. Se refiere a la apoptosis, al estrés oxidativo y al factor nuclear NF κ B.

La cuarta parte del discurso la dedica la Dra. Cascales a las Proyecciones Clínicas y Terapéuticas ocupándose de las diferentes patologías ocasionadas bien por plegamiento anormal de las proteínas, como son las enfermedades neurodegenerativas, y del papel protector de las carabinas moleculares; bien por concentraciones atípicas de HSP, como son la oncogénesis y el cáncer, y de las estrategias antitumorales; bien por el papel de la HSP microbiana, que da lugar a infecciones, y de los mecanismos protectores; Finalmente, se ocupa del sistema inmune y de los fármacos, agentes tóxicos y hepatotoxicidad, concluyendo que la terapéutica es una de las áreas que destaca por beneficiarse del conocimiento de la respuesta

al estrés y que la industria farmacéutica puede diseñar mejores fármacos sobre la base de proteínas naturales que ya existen.

Por último, se procedió a la entrega de los Premios del Concurso Científico 2001.

* * * * *

En el año pasado ha tenido lugar en la sede de la Corporación la Sesión Inaugural del Curso Académico 2002-2003 de las Reales Academias de Instituto de España el día 16 de octubre. S. M el Rey fue recibido en nuestra sede por el Excmo. Sr. Presidente de la Corporación, D. Juan Manuel Reol Tejada, El Excmo. Sr. Presidente del Tribunal Constitucional, D. Manuel Jiménez de Parga Varela, la Excma. Sra. Ministra de Educación, Cultura y Deporte, D^a Pilar del Castillo Vera, El Excmo. Sr. Alcalde de Madrid, D. José María Álvarez del Manzano y la que esto suscribe. Seguidamente pasó al vestíbulo donde saludó a la Excma. Sra. Presidente del Instituto de España, D^a Margarita Salas Falgueras, y a los miembros de la Junta de Gobierno de la Corporación procediendo después a descubrir una placa de mármol con una inscripción conmemorativa de esta Sesión Inaugural presidida por él que posteriormente se ha colocado en el Salón de Sesiones Solemnes. A continuación, S. M. el Rey, acompañado por el Excmo. Sr. Presidente de la Corporación y la Excma. Sra. Ministra de Educación, Cultura y Deporte, se dirigió al despacho de aquél donde firmó en el Libro de Honor de la Corporación y después se dirigieron al Salón de Sesiones Solemnes para abrir la Sesión la cual ha estado presidida por él, teniendo a su derecha a la Excma. Sra. Ministra de Educación, Cultura y Deporte y a su izquierda al Excmo. Sr. Presidente de nuestra Corporación. En el estrado a su derecha se sentaban las máximas autoridades del Estado, Excmos. Sres. Presidente del Tribunal Constitucional, Sra. Ministra de Sanidad y Consumo, D^a Ana María Pastor Julián, Alcalde de Madrid, Presidente del Consejo de Estado, D. Iñigo Cavero Lataillade, Presidente del Tribunal de Cuentas, D. Ubaldo Nieto de Alba y Secretario de Estado de Educación y Universidades, D. Julio Iglesias de Ussel; mientras a su izquierda se sentaban las máximas repre-

sentaciones del Instituto de España y de las Reales Academias, a saber: los Excmos. Sres.: D^a Margarita Salas Falgueras, Presidenta del Instituto de España, D. Víctor García de la Concha, Director de la Real Academia Española, D. Gonzalo Anes y Álvarez de Castrillón, Director de la Real Academia de la Historia, D. Ramón González de Aménzua, Director de la Real Academia de Bellas Artes de San Fernando, D. Ángel Martín Muncio, Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, D. Enrique Fuentes Quintana, Presidente de la Real Academia de Ciencias Morales y Políticas, D. Amador Schüller Pérez, Presidente de la Real Academia Nacional de Medicina y D. Rafael Navarro-Valls, Secretario de la Real Academia de Jurisprudencia y Legislación.

S.M. el Rey concedió la palabra al Excmo. Sr. Presidente de la Corporación, D. Juan Ramón Reol Tejada, quien recordó primeramente a las personalidades Académicas fallecidas y después hizo referencia a la labor más destacada realizada por las Reales Academias del Instituto de España durante el Curso 2001-2002. Hizo mención posteriormente a los nuevos Estatutos de nuestra Corporación “que son un instrumento para el diálogo interno, con la sociedad y con el mundo académico farmacéutico iberoamericano”, a la reflexión realizada sobre cuestiones que preocupan en los albores del siglo XXI: “el cáncer, el genoma, la farmacogenómica, los medicamentos genéricos, el medio ambiente, la seguridad alimentaria, la universidad y la investigación farmacéutica” contando con la colaboración de la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Hizo mención a las grandes figuras de la Farmacia del siglo XX y aludió a los importantes avances realizados por la industria farmacéutica en la investigación y aludió al hecho de que si bien el progreso científico persigue un avance sin límites; sin embargo tiene límites éticos y “En tiempos de encrucijadas culturales, científicas y éticas, las Academias tienen la obligación de “repensar” las teorías y prever las consecuencias”.

Finalmente expresó el agradecimiento de las Reales Academias del Instituto de España por “el especial honor que significa el alto patronazgo de Su Majestad, que hoy se hace evidente con Vuestra presencia en la inauguración de este Curso Académico.

A continuación, S.M el Rey concedió la palabra al Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza que pronunció el discurso inaugural titulado “Ética del Conocimiento” desarrollando aspectos relativos al Conocimiento y su aplicación. Lo factible y lo admisible; Ciencia, consciencia y conciencia; Ética como comportamiento basado en unos principios y valores; Memoria del pasado y del futuro. Actitud de comparación; Ética y conocimiento. Rigor científico; Conocimiento de la complejidad, de la globalidad y de la irreversibilidad potencial; Ética del tiempo. Conocimiento a largo plazo. Anticipación y prevención; Ciencia y poder; Ciencia y valores; Ciencia y toma de decisiones; Transferencia de responsabilidades; Ciencia y creencia; Planos físico y metafísico; Grandes desafíos científicos de hoy; Grandes retos éticos: la Bioética, la Genética y el Medio Ambiente; Ética del Agua, del Espacio, de las Energías; La Voz de las Instituciones Públicas en los Medios de Comunicación e Internet en un contexto democrático; Las Naciones Unidas como marco ético-jurídico a escala mundial.

Primeramente el Dr. Mayor Zaragoza destacó la importancia del tema puesto que las actuaciones del ser humano tanto en el campo científico como en el empresarial deben ser guiados por unos principios fundamentales, que respeten la dignidad del hombre. Señaló que el conocimiento es siempre positivo en tanto que le sean aplicados los principios éticos universales y en este sentido el referente ético son los Derechos Humanos establecidos en la Declaración aprobada por las Naciones Unidas en Asamblea General en 10 de diciembre de 1948.

El Dr. Mayor Zaragoza hizo hincapié en la importancia que tiene la ética pues permite establecer un equilibrio entre el derecho y la responsabilidad y por tanto en la actitud ética del comportamiento humano diario. En este sentido, la memoria del pasado es imprescindible pues no solo permite realizar ulteriores investigaciones sino tomar decisiones con el principio de precaución, salvaguardando el futuro, para no lesionar la condición humana. Asimismo afirmó que es imprescindible hoy en día la interacción entre Comunidades Académicas y Científicas y Gobiernos y Parlamentos ya que la relación entre Ciencia y Poder es imprescindible para la toma de decisiones teniendo en cuenta a la Humanidad y al ser humano.

Aludió el Dr. Mayor Zaragoza a las Declaraciones marco que tipifican las transgresiones éticas como son la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos, elaborada por el Comité Mundial de Bioética, aprobada por la Conferencia General de la UNESCO y la Asociación General de Naciones Unidas, la Carta de la Tierra y los documentos elaborados por la Comisión Mundial en la UNESCO sobre la Ética del Conocimiento Científico y Tecnológico.

Terminó el Dr. Mayor Zaragoza haciendo referencia a su maestro, el Dr. Ángel Santos Ruiz, y al papel social de las Reales Academias basado en el rigor científico de sus actividades.

Seguidamente S.M. el Rey concedió la palabra a la Excma. Sra. Ministra de Educación, Cultura y Deporte quién aludió a las claras resonancias universitarias de nuestro edificio puesto que fue construido en 1830, por suscripción de todos los farmacéuticos españoles, para impartir enseñanzas de Farmacia; hizo referencia al dinamismo del Sistema Universitario promovido por el Departamento ministerial que ella encabeza y que persigue la calidad de la educación universitaria, a la expresión de excelencia de las Reales Academias y sus miembros que son herederos del espíritu ilustrado del siglo XVIII, a la intensificación de los lazos científicos con los países iberoamericanos. Expresó el apoyo del Gobierno a las actividades de las Reales Academias “desde el convencimiento que se han consolidado por el gran mérito de sus miembros y por el ejemplo de su actividad constante”. Concluyó reiterando a S.M. el Rey el agradecimiento “por Vuestra presencia en este acto y por Vuestro constante apoyo a las Reales Academias del Instituto de España. Para todas las Academias el reconocimiento, la admiración y la gratitud al Gobierno de la Nación”.

S.M. el Rey cerró el acto señalando cómo las Academias están ligadas a la Corona desde sus orígenes, cómo la Real Botica enlaza con el Real Colegio de Profesores Boticarios que en 1737 es el antecedente preclaro de esta Real Academia Nacional de Farmacia, cómo las Reales Academias están cada día más presentes en la vida cultural y científica española y que así lo entiende esta Real Academia “tan ilustre por la personalidad y los méritos de sus miembros, la categoría de sus académicos correspondientes, y la densidad e interés de su actividad científica”. Reiteró

que el esfuerzo intelectual que se realiza desde las Reales Academias “es de trascendental interés para España, y debe ser ejemplo para sus jóvenes generaciones”. Por último declaró inaugurado el Curso Académico 2002-2003 de las Reales Academias del Instituto de España.

A la terminación del acto académico y en el Salón de Recepciones Solemnes S.M. el Rey fue saludado y departió con los diferentes invitados al acto durante largo tiempo para después ser despedido por las mismas personas que le recibieron a su entrada en nuestra sede.

Tanto a S.M. el Rey como a todos los invitados se les entregó como recuerdo del acto un díptico y un Facsímil del “Prontuario de Química, Farmacia y Materia Médica” del académico Pedro Gutiérrez Bueno, que en 1815 supuso la introducción en España de la nueva nomenclatura química.

* * * * *

Durante el año pasado ha tenido lugar la **Incorporación de Nuevos Miembros a nuestra Corporación**. Como **Académico de Honor** tomó posesión un Académico Electo: El Excmo. Sr. D. Eduardo Primo Yúfera, quién el día 12 de diciembre leyó su discurso titulado: “Nuevas tendencias en la lucha ecológica contra insectos: El caso de la *Ceratitis capitata*”. El Dr. Primo Yúfera, tras dar las gracias por el “altísimo honor que me han otorgado al hacerme miembro de esta docta Academia” y recordar la figura de D. Aurelio Gamir, fundador de los laboratorios Gamir, pasó a hablar de “La farmacia para las plantas” que tiene un interés económico y humano por su trascendencia en la producción de alimentos. Expuso que después de muchos años de estudio sobre la lucha contra insectos, se comprobó que el tratamiento con insecticidas producía un impacto sobre el medio ambiente por lo que se decidió utilizar el procedimiento de esterilización de los insectos porque tenía ventajas ecológicas y económicas considerables sobre aquél. Este procedimiento obligó a investigar primeramente sobre los atrayentes para obtener feromonas específicas; después sobre los emisores que tuvieran capacidad para emitir las

feronomas y en este sentido se obtuvieron sepiolitas y zeolitas, que han sido objeto de una patente de la Universidad Politécnica de Valencia, y cuyo uso se ha extendido en muchos países. Describe el caso particular de la *Ceratitis capitata*, que es la mosca de los frutos que constituye una plaga universal en los países de zonas templadas, y el medio de lucha contra ella desarrollando un tipo de trampa atrayente y esterilizante utilizando fenil benzoil ureas y realizando experiencias de campo patrocinadas por la Consejería de Agricultura de Valencia que vienen a demostrar la erradicación total de la plaga.

Por último, detalla otra vía de exterminio de la mosca de los frutos que es la utilización de un hongo entomopatógeno que provoca la muerte de aquélla. A pesar de la complicación que entraña preparar placas atra-yentes-contaminantes activas, señala que los resultados de los experimentos han sido espectaculares.

Concluye el Dr. Primo Yúfera que las investigaciones realizadas hasta la fecha permiten asegurar hoy día que la erradicación de la mosca de los frutos es posible. Fue contestado, en nombre de la Corporación, por el Excmo. Sr. D. Román de Vicente Jordana quien describió su biografía exaltando su figura de investigador que le llevó a ocupar la Presidencia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y destacando el gran número de profesores universitarios e investigadores que ha formado, así como que continúa desarrollando una gran actividad investigadora tal y como ha demostrado en su discurso.

Como **Académicos de Número** tomaron posesión dos Académicos Electos: El Excmo. Sr. D. Juan Abelló Gallo, quien el día 3 de octubre leyó su discurso titulado: “El Opio, su aprovechamiento. La Industria española de estupefacientes”. En primer lugar el Dr. Abelló recordó la personalidad del Dr. Arturo Mosqueira Toribio, su antecesor en la Medalla nº 20, así como a su padre el Académico de Número Dr. Juan Abelló Pascual. Después pasó a exponer la razón del tema escogido para su discurso, que ha sido debida a la tradición familiar y a haber sido objetivo fundamental de su ejercicio profesional, e hizo una referencia histórica a los orígenes de la utilización del opio como remedio de diversas afecciones. A continuación, se ocupa de los orígenes, desarrollo y momento actual de la industria española de estupefacientes que arranca en 1933 con

Laboratorios Abelló y se inicia en una segunda época, cuarenta años más tarde, con ALCALIBER. Continúa exponiendo las dos actividades complementarias que desarrolla esta industria: la agrícola y la industrial. Respecto a la primera, señala los aspectos técnicos y científicos del cultivo de la adormidera: botánicos, climáticos y edáficos, técnicas culturales, recolección y procesado, selección y mejora, herencia de caracteres agromorfológicos, herencia de caracteres químicos, mejora, variedades cultivadas en España, investigación y experimentación para la mejora y selección de variedades, recomendaciones en el empleo de fitosanitarios en el cultivo de la adormidera, programaciones de riego y ensayos de laboratorio que permiten establecer un estricto control de la semilla de siembra con el objeto de que el producto final sea una semilla de muy alta calidad y libre de microorganismos patógenos.

Respecto a la actividad industrial, el Dr. Abelló se ocupa de las diferentes fases de la instalación industrial de ALCALIBER como empresa productora de alcaloides del opio y describiendo el procedimiento utilizado para la obtención del Concentrado de Paja de Adormidera, de los procedimientos utilizados para la separación y purificación de los alcaloides, de los métodos analíticos utilizados así como de su evolución. Seguidamente trata de la farmacología de los opioides, de sus aplicaciones terapéuticas más representativas, del marco legal de los productos estupefacientes, en el ámbito internacional y nacional, así como de los aspectos sociológicos de su consumo mundial. Concluye el Dr. Abelló que esta empresa no solo ha garantizado el abastecimiento interior sino que ha constituido un importante proveedor de estupefacientes a otros países. Fue contestado, en nombre de la Corporación, por el Excmo. Sr. D. Juan Manuel Reol Tejada, quien destacó la “personalidad excepcional” del Dr. Abelló e hizo referencia a su trayectoria farmacéutica universitaria e industrial transformando los Laboratorios Abelló e impulsando un proyecto empresarial moderno para la fabricación de derivados del opio como es ALCALIBER. Asimismo subrayó algunos hitos que jalonan su trayectoria académica, empresarial y de mecenazgo que le han hecho merecedor de reconocimientos públicos y señaló por último “su antigua y silenciosa colaboración” con actividades de la Corporación.

El Excmo. Sr. D. Albino García Sacristán dio lectura el día 24 de octubre a su discurso de ingreso titulado: “La Neurotransmisión Química en la regulación del Sistema Urogenital”. En primer lugar, el Dr. García Sacristán dedicó unas palabras de recuerdo al Dr. Ángel Vián Ortuño, su predecesor en la Medalla nº 9, y después justificó la importancia del tema del discurso indicando que el conocimiento de la neurotransmisión química en el siglo XX ha permitido contar con opciones terapéuticas alternativas a las quirúrgicas. Seguidamente divide su discurso en tres partes bien diferenciadas, en la primera se ocupa de la neurotransmisión química definiendo el concepto “vegetativo” y neurotransmisión química, el concepto de receptor y la interacción neurotransmisor-receptor.

En la segunda parte, que titula la Neurotransmisión química en la micción y en la continencia urinaria, se ocupa de la fisiología de la micción y la continencia, de los neurotransmisores en el tracto urinario inferior, de la incontinencia urinaria: fisiopatología y control farmacológico.

La tercera parte la dedica el Dr. García Sacristán a la Neurotransmisión química en la función y disfunción eréctil y trata en ella de la fisiología de la erección, de los neurotransmisores en la regulación peneana, de la disfunción eréctil: fisiopatología y control farmacológico señalando que el tratamiento debe ser controlado y escalonado mediante agentes terapéuticos como son: activadores de la síntesis de AMPc, bloqueantes α -adrenérgicos, agonistas dopaminérgicos, inhibidores de fosfodiesteras y terapia génica. Concluye el Dr. García Sacristán que los avances científicos en el campo de la neurotransmisión química han permitido una eficaz alternativa farmacológica en el tratamiento de procesos patológicos del tracto urogenital y en particular en la incontinencia urinaria, la hiperplasia benigna de próstata y la disfunción eréctil. Le contestó, en nombre de la Corporación, el Excmo. Sr. D. Bernabé Sanz Pérez que destacó el perfil biográfico del beneficiario, sus méritos docentes y científicos así como su perfil humano “lleno de comprensión, sensibilidad y cordialidad”. Destacó la máxima actualidad del tema abordado en su discurso al que ha contribuido con sus propios trabajos sobre el sistema urogenital que han sido publicados en revistas especializadas de prestigio universal y subrayó que si su categoría científica ha quedado reflejada en el discurso, su categoría humana se resume en que “Es un hombre bueno”.

Hemos de mencionar que el 7 de marzo fue declarado Académico Electo en la Medalla nº 28, el Excmo. Sr. D. Guillermo Giménez Gallego.

Como **Académicos Correspondientes** se produjeron siete incorporaciones, seis de ellas de españoles y una correspondiente a una persona natural de un país con el que nuestra Academia mantiene relación científica. Así, el 7 de febrero el Dr. Lennart K. Paalzow, Profesor y Director del Departamento de Farmacia, División de Biofarmacia y Farmacocinética de la Universidad de Upsala (Suecia), leyó su discurso “Relationships between Pharmacokinetics and Pharmacodynamics”, y fue presentado por el Excmo. Sr. D. Benito del Castillo García; el 14 de marzo la Dra. M^a José Gómez-Lechón Moliner, de la Unidad de Hepatología Experimental de Cultivos Celulares del Hospital Universitario “La Fe” del Servicio Valenciano de Salud, leyó su discurso “Modelos celulares hepáticos para estudios de hepatotoxicidad y metabolismo de fármacos” y fue presentada por el Excmo. Sr. D. Emilio Fernández-Galiano Fernández; el 11 de abril el Profesor Dr. Manuel González Barón, Profesor Titular de Medicina y Jefe del Servicio de Coordinación Oncológica del Departamento de Medicina del Hospital Universitario “La Paz” en la Facultad de Medicina de la UAM, leyó su discurso “Cáncer colorectal en el anciano” y fue presentado por el Excmo. Sr. D. Domingo Espinós Pérez; el 18 de abril el Dr. Esteban Santiago Calvo, Catedrático del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra, leyó su discurso “El sistema inmunitario en las enfermedades autoinmunes” y fue presentado por el Excmo. Sr. D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo; el 13 de junio el Dr. Gustavo Barja de Quiroga Losada, Prof. Titular del Departamento de Biología Animal II de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, leyó su discurso “Los radicales libres mitocondriales como factores principales determinantes de la velocidad del envejecimiento” y fue presentado por la Excma. Sra. D^a María Cascales Angosto; el 17 de octubre el Dr. Juan Jesús Gestal Otero, Catedrático Jefe del Servicio de Medicina Preventiva y Salud Pública del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela leyó el discurso “Epidemiología y prevención de la intoxicación por toxina diarreica DSP” y fue presentado por el Excmo. Sr. D. Manuel Domínguez Carmona; y por último el 14 de noviembre el Excmo. Sr. Dr. D. Francisco

González Posada, Catedrático de Fundamentos Físicos en la Universidad Politécnica de Madrid y Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina, leyó el discurso “La Farmacia: de la Física a la Biología. Existencia de “Fantasmas”, y fue presentado por el Excmo. Sr. D. Manuel Domínguez Carmona.

* * * *

Hemos de hacer mención especial a la pérdida sufrida este año por la Corporación debida al fallecimiento del Académico de Número Excmo. Sr. D. Manuel Lora Tamayo, y de dos Académicos Correspondientes: el Dr. Álvaro Zugaza Bilbao y el Dr. Luis García Tabarés. Vaya para todos ellos nuestro afectuoso recuerdo y el deseo de que se encuentren en la Paz del Señor.

* * * *

Durante el Curso Académico 2002 nuestra Corporación ha mantenido sus actividades tradicionales. En **Sesiones privadas** se celebraron diez Juntas de Gobierno y siete Juntas Generales. De las restantes Comisiones Permanentes 20 de Gobierno Interior, cuatro de Hacienda, cuatro de Admisiones, cinco de Publicaciones, y dos de la de Aguas Minerales y Mineromedicinales. Asimismo las Secciones se reunieron en once ocasiones: ocho la de Salud Pública, Alimentación y Medioambiente y tres la de Historia, Legislación y Bioética.

Nuestra Corporación tiene desde el 9 de mayo de 2002 la denominación de Real Academia Nacional de Farmacia y cuenta con nuevos Estatutos por Real Decreto 367/2002, de 19 de abril (B.O.E. nº 110, 8-5-2002. Pág. 16580-16587). Esta normativa constituye un vehículo de modernización de la institución y transmite una imagen más actual de la misma a la comunidad científica y a la sociedad. En ella se modifica la denominación de su máximo cargo que pasa a llamarse Presidente, se le

otorga a la Junta General el protagonismo que le corresponde, se clarifican las competencias de la Junta de Gobierno, se limitan los mandatos de los cargos a dos periodos trienales consecutivos como máximo, se modifican las denominaciones y contenidos de las Secciones vertebrándose el trabajo científico de la Academia en las siguientes: 1ª Química y Física, 2ª Biología, Biotecnología y Farmacogenómica, 3ª Tecnología Farmacéutica, 4ª Farmacología y Farmacoterapia, 5ª Salud Pública, Alimentación y Medio Ambiente y 6ª Historia, Legislación y Bioética. Asimismo se modifican las denominaciones y contenidos de las Comisiones permanentes de carácter técnico que en la actualidad son dos: la de la Farmacopea y el Formulario y la de Aguas Minerales y Mineromedicinales. Se contempla una Comisión permanente de Informática y Comunicación que aplicará las nuevas tecnologías al mejor servicio de las Secciones y de las actividades de la Corporación. Además en ella se establece la equivalencia entre el grado de Doctor en Farmacia y Doctor por la Universidad en conformidad con la nueva terminología administrativa.

Respecto al Concurso Científico del año 2002, independientemente del Premio de la Real Academia de Farmacia, se ha pasado de ocho premios a doce, pues además de los tradicionales patrocinadores: Consejo General de Colegios, Colegio Oficial de Farmacéuticos, Faes Pharma, Carlos del Castillo Leiva, Santos Ruiz y “Elvira Moragas” de la Asociación Española de Farmacéuticos Católicos, se ha contado con seis más, a saber: ALCALIBER, CINFA, MABO, NORMON, PFIZER, y Juan Abelló. Desde aquí nuestro agradecimiento a todos ellos pues estimulan la labor científica de quienes participan en el mismo. Por otro lado, se han modificado las Bases Generales en el sentido de que los autores del trabajo que hayan obtenido Premio de la Real Academia de Farmacia no podrán optar a éste hasta pasadas dos convocatorias desde aquella en que obtuvieron el Premio.

* * * *

Como es tradicional en nuestra Corporación, se han llevado a cabo **Sesiones Científicas** una vez por semana, concretamente en jueves aun-

que el incremento de la actividad científica desarrollada ha obligado a efectuar en ocasiones varias sesiones en una misma semana. Los frutos de la intensa actividad llevada a cabo han sido las 44 Sesiones celebradas, entre ellas mencionaremos cinco Sesiones Extraordinarias: la celebrada el día 21 de mayo, coordinada por el Excmo. Sr. D. Antonio Portolés Alonso, para celebrar el Centenario del nacimiento del Excmo. Sr. D. José María Albareda Herrera y en la que intervinieron como conferenciantes los Académicos de Número Excmos. Sres. D. Antonio Portolés Alonso, D^a M^a del Carmen Francés Causapé, D. Gaspar González González y D. Federico Mayor Zaragoza, quienes disertaron respectivamente sobre “En recuerdo del Profesor Albareda”, “José María Albareda, una personalidad académica”, “Albareda, artífice de la Edafología en España” y “José María Albareda y el desarrollo de la Ciencia en Granada”. Asimismo intervinieron el Académico de Honor Excmo. Sr. D. Manuel Losada Villasante y el Académico Correspondiente Ilmo. Sr. D. Gonzalo Giménez Martín quienes pronunciaron las conferencias tituladas “Albareda y la Ciencia española” y “La investigación científica en José María Albareda”. El turno de intervenciones se completó con la disertación del Profesor Francisco Ponz Piedrafitá, Catedrático del Departamento de Fisiología y Nutrición de la Universidad de Navarra, sobre “José María Albareda, hombre de ciencia, Rector y sacerdote”. Intervino después el Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Profesor Martín Muncio y cerró el acto nuestro Presidente el Dr. Reol Tejada.

La del día 19 de septiembre tuvo por objeto la presentación de las dos últimas publicaciones de la Corporación: la Monografía “La Salud, prioridad en el Sexto Programa del Medio Ambiente de la Unión Europea” en la que intervinieron los Académicos de Número Excmos. Sres. D. Manuel Domínguez Carmona, Presidente de la Sección 5^a, y D. Segundo Jiménez Gómez; y el Volumen I de la obra del Excmo. Sr. D. Toribio Zúñiga y Sánchez-Cerrudo: “Historia de la Real Academia de Farmacia” en la que intervinieron los Académicos de Número Excmos. Sres. D. Antonio Portolés Alonso, Presidente de la Sección 6^a, y D^a M^a del Carmen Francés Causapé.

La del día 10 de octubre tuvo como fin rendir homenaje al Excmo. Sr. D. Ángel Santos Ruiz con motivo de su nonagésimo aniversario y en

ella intervinieron los Académicos de Número Excmos. Sres. D^a María Cascales Angosto, D. Federico Mayor Zaragoza y D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo, además de los Presidentes de las Reales Academias Nacional de Medicina y de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Excmos. Sres. D. Amador Schüller y D. Ángel Martín Municio respectivamente y la Presidenta del Instituto de España, Excma. Sra. D^a Margarita Salas Falgueras.

La del 21 de noviembre se celebró con motivo de la Presentación de la Segunda Edición de la Real Farmacopea Española, interviniendo los Académicos de Número Excmos. Sres. D^a M^a del Carmen Francés Causapé y D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé y el Ilmo. Sr. D. Fernando García Alonso, Director de la Agencia Española del Medicamento.

Y por último, la del día 5 de diciembre, coordinada por el Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero, que tenía por objeto conmemorar los Premios Nobel y en la que intervinieron como conferenciantes él mismo y la Académica de Número Excma. Sra. D^a María Cascales Angosto, quienes disertaron respectivamente sobre “Crónica de una muerte anunciada: el Premio Nobel 2002 de Fisiología y Medicina” y “Acontecimientos bioquímicos y moleculares en la apoptosis”. Asimismo el Excmo. Sr. D. Guillermo Giménez Gallego, Académico de Número Electo, ha contribuido al acto con un trabajo titulado “Métodos revolucionarios para el Análisis de Biomoléculas: el Premio Nobel 2002 de Química”.

También han tenido lugar dos Mesas Redondas en las que se expusieron diversos trabajos realizados sobre los Balnearios de “Alhama de Granada” y que completaron el estudio iniciado en el año anterior. La primera se celebró el día 9 de mayo y en ella intervinieron el Dr. Javier Mantero quien expuso el trabajo realizado en colaboración con la Dra. Blanca Martín del Amo sobre el “Estudio de la climatología”; La Dra. Ángeles Mosso que trató del “Estudio microbiológico del agua minero-medicinal”, realizado en colaboración con la Dra. Carmen de la Rosa; el Dr. Miguel Ladero que presentó el “Estudio sobre la Vegetación del entorno de las aguas”, realizado en colaboración con los Dres. Alfredo Asensi, Blanca Díez-Garretas y Francisco Valle; y el Dr. Antonio Ramírez que se ocupó del “Estudio de la Geología e Hidrogeología de las aguas”, realizado junto con el Dr. Juan Ignacio Pinuaga.

La segunda se celebró el día 26 de septiembre y contó con la intervención del Dr. Francisco Monturiol Rodríguez y el Dr. Juan Palomares López, quienes se ocuparon respectivamente del “Estudio de los suelos del término municipal” y “Análisis de la radiactividad en las aguas”.

A estas actividades hay que sumar las realizadas con el patrocinio de la Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación Caja Madrid. Así, continuando con el Ciclo de Conferencias de años pasados, el IV titulado “Investigación y siglo XXI” en el que el Dr. Fernando Peláez, Director del Centro de Investigación Básica de Merck Sharp and Dohne, pronunció el 31 de enero la conferencia titulada “El descubrimiento de fármacos a partir de productos naturales: el ejemplo de CASPOFUNGIN”. El conferenciante fue presentado por la Excm. Sra. D^a Regina Revilla, Académica Correspondiente de la Corporación.

Asimismo se han celebrado tres Mesas Redondas: la primera el día 28 de febrero, sobre el tema “La Universidad de hoy y los Farmacéuticos de mañana” que fue presentada por el Excmo. Sr. D. Benito del Castillo García, Académico de Número y Decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, con una intervención sobre “Farmacia y Universidad”. Como Ponentes actuaron los Dres. D. Javier Puerto Sarmiento, Académico Correspondiente y Catedrático de Historia de la Farmacia en aquella Universidad, D. Oriol Valls Planells, Catedrático de Físico Química en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, y el Dr. Francisco Zaragoza García, Catedrático de Farmacología de la Universidad de Alcalá, quienes trataron respectivamente de “Las Humanidades y los Estudios de Farmacia”, “Investigación y Farmacia” y “Los Planes de Estudio de Farmacia ¿Responden a las expectativas profesionales?”.

La segunda tuvo lugar el 31 de octubre sobre “Autocuidado de la Salud” y estuvo coordinada por la Asociación para el Autocuidado de la Salud (ANEFP) en la que intervinieron como Ponentes el Excmo. Sr. D. José Luis Valverde López, Académico Correspondiente y titular de la Cátedra Jean Monnet de la Unión Europea, “Europa de la Salud” de la Universidad de Granada, la Dra. Paloma Soria Valla, Jefe de Servicio en la Dirección General de Salud Pública del Ministerio de Sanidad y Consumo, y el Ilmo. Sr. D. Albert Esteve Cruella, Presidente de la Asociación

Europea de las Especialidades Farmacéuticas Publicitarias, quienes se ocuparon respectivamente del “Autocuidado y Medicamentos en Europa”, “Alimentación y Hábitos de Salud” y “Autocuidado y Medicamentos”.

La tercera se organizó el día 28 de noviembre sobre “Transferencias y Coordinación Farmacéutica” y contó como Ponentes con la Excm. Sra. D^a M^a del Carmen Francés, Académica de Número, el Ilmo. Sr. D. Pedro Capilla Martínez, Presidente del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, y M^a Victoria de la Cuesta García, Directora General de Farmacia y Productos Sanitarios del Ministerio de Sanidad y Consumo, y en cuyas intervenciones se ocuparon respectivamente de la “Política farmacéutica desde las Comunidades Autónomas”, “Asistencia farmacéutica y coordinación farmacéutica” y “La Farmacia en la Ley de Coordinación y Calidad del Sistema Sanitario”.

Además se celebraron otra serie de actividades como una Sesión Científica que tuvo lugar el día 21 de marzo para tratar sobre “Modificadores de la Respuesta Biológica” en la que participaron los Profesores de la Universidad de Alcalá Dr. D. Melchor Álvarez de Mon Soto, Catedrático de Medicina Interna, Dr. D. Agustín Albillos Martínez, Profesor Titular de Medicina y Dr. D. Luis Manzano Espinosa, Profesor Titular de Medicina Interna, los cuales disertaron respectivamente sobre “Moduladores, concepto, clasificación. Moduladores multiespecíficos”, “Los Interferones” y “Anticuerpos monoclonales y otros moduladores”. Y la presentación el día 27 de junio del libro titulado “Farmacoeconomía e investigación de resultados en la Salud: Principios y Práctica. Situación actual y perspectivas futuras en España”, acto en el que intervinieron los coordinadores: el Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, Académico de Número, el Dr. Javier Soto Álvarez, responsable de la Unidad de Farmacoeconomía e Investigación de resultados en Salud del Departamento de Medicina de Pharmacia Spain S.A., y la Ilma. Sra. D^a María Victoria de la Cuesta García, Directora General de Farmacia y Productos Sanitarios del Ministerio de Sanidad y Consumo.

En todas estas Actividades, el Coloquio que siguió tras la actuación de ponentes y conferenciantes contó con un gran número de intervenciones destacándose así el interés suscitado por los temas tratados en estas sesiones.

* * * *

Se han impartido en la Corporación diversos **Cursos** como son los tres **Cursos del Tercer Ciclo**, patrocinados por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte y coordinados por el Instituto de España, que han sido los siguientes: “Los recursos naturales en la promoción de la Salud” impartido por los Excmos. Sres. D. Segundo Jiménez Gómez, D. Gaspar González González y D^a M^a del Carmen Francés Causapé; “Bases Moleculares del estrés oxidativo” a cargo de los Excmos. Sres. D^a María Cascales Angosto, D. Ángel Santos Ruiz y D. Bartolomé Ribas Ozonas y “Los receptores y la cinética proteica en relación con la Glicobiología y la Inmunología” dado por los Excmos. Sres. D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo y D. David Martín Hernández.

Además se ha impartido un Curso sobre “Temas escogidos de Seguridad Alimentaria” del 4 al 7 de noviembre, coordinado por los Excmos. Sres. Académicos de Número D. Bernabé Sanz Pérez y D. Manuel Domínguez Carmona y que ha contado con la participación del siguiente profesorado: el día 4 con los Dres. Bernabé Sanz Pérez y Manuel Domínguez Carmona que se encargaron respectivamente de “Preocupación de los consumidores por la seguridad alimentaria” y “Los *E. coli* transmitidos por los Alimentos: Factores de patogenicidad y virulencia”. El día 5 con los Dres. D. Bartolomé Ribas Ozonas y D. Pablo Hernández Cruza que trataron respectivamente de “Residuos de plaguicidas en los alimentos” y “Prebióticos y Probióticos”. El día 6 con los Dres. D. Domingo Espinós Pérez y Segundo Jiménez Gómez que tuvieron a su cargo respectivamente los temas titulados “Alcohol y Sociedad” y “Desarrollo sostenible en la producción alimentaria”. El día 7 con los Dres. D. León Villanúa Fungairiño y D^a Esperanza Torija Isasa que se ocuparon de “Tratamientos industriales y culinarios como causa de sustancias tóxicas alimentarias”. La conferencia de Clausura estuvo a cargo de la Ilma. Sra. D^a María Purificación Neira González, Presidenta de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria quien trató de la Misión de este organismo.

También y contando con el patrocinio de la Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia y Gilead Sciences, S.R.L.; se organizó un “Curso práctico de Farmacoeconomía” en Granada del 21 al 23 de febrero de 2002 que ha sido coordinado por el Académico de Número Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé.

* * * *

Entre otras **Actividades Científicas desarrolladas por nuestros Académicos en otros foros** hay que destacar las realizadas en colaboración con el Instituto de España, que tuvieron lugar en la sede de dicha Institución, como la participación de los Excmos. Sres. D. Domingo Espinós Pérez, D^a M^a del Carmen Avendaño López y D. Gregorio Varela Mosquera en el Ciclo de Conferencias sobre “Anticipaciones Académicas del siglo XXI”, coordinado por el Excmo. Sr. D. Salustiano del Campo, interviniendo respectivamente los días 10 de abril, 24 de abril y 8 de mayo con las tituladas “Líneas de futuro de la Medicina”, “Futuro de los Medicamentos” y “Hacia un mundo sin hambre”.

Asimismo se han impartido dos Cursos, uno sobre “Cáncer” que se ha desarrollado del 11 al 21 de noviembre y ha sido coordinado por los Excmos. Sres. D. Pedro García Barreno, D. Domingo Espinós Pérez y D^a María Cascales Angosto y ha contado con la participación el día 11 de los Académicos Correspondientes Dres. Gonzalo Giménez Martín y Manuel Benito de las Heras que se ocuparon respectivamente de “Bases moleculares del ciclo celular” y “Genes supresores”; el día 13 del Académico de Número Electo D. Guillermo Giménez Gallego que trató de “Anti-angiogénesis”; el día 14 los Académicos Correspondientes Dres. Gustavo Barja de Quiroga y Miguel Fernández Braña quienes dieron respectivamente los temas “Estrés oxidativo y desarrollo tumoral” y “Multirresistencia a fármacos”; y el día 18 el Académico Correspondiente Manuel González Barón quien se ocupó de “Factores pronóstico en oncología”.

El otro Curso ha sido impartido del 9 al 13 de diciembre en su totalidad por la Excm. Sra. D^a M^a del Carmen Avendaño López y ha versado sobre “El poder de la Química. Como se transforma la información a nivel molecular en fármacos innovadores”.

Los Excmos. Sres Académicos D. Vicente Vilas Sánchez y D. Eugenio Sellés Flores han dirigido en la Universidad de Alcalá los Cursos de Verano dedicados respectivamente a “Especialista en Ortopedia para Farmacéuticos” y “Dermofarmacia y Cosmetología”.

Los Excmos. Sres. Académicos D. Juan Ramón Lacadena Calero, D. Manuel Domínguez Carmona y D. Segundo Jiménez Gómez han participado en los VII Cursos Universitarios de Verano que han tenido lugar en Lanzarote, ocupándose respectivamente de los temas sobre “Manipulación genética y bioética”, Medio Ambiente y Salud: Aire y Agua”. Asimismo el Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena intervino en los Cursos de Verano de El Escorial, organizados por la Universidad Complutense, dentro del Ciclo “Maestros Complutenses” tratando del tema “Genética, bioética y sociedad”. Nuestro Presidente, Dr. Reol, intervino en una Mesa Redonda, patrocinada por la Fundación Ciencias de la Salud, sobre “Innovación y Salud”, junto a la actual Ministra francesa Noelle Lenoir. Y en los XIII Cursos de Verano de la Universidad Nacional de Educación a Distancia, celebrados en Plasencia y en el titulado “Estrés oxidativo, intoxicación y enfermedad” participaron los Académicos de Número Dres. María Cascales Angosto, Bartolomé Ribas Ozonas, Albino García Sacristán, Juan Tamargo Menéndez y Manuel Domínguez Carmona que abordaron respectivamente los temas siguientes: “¿Por qué es tóxico el oxígeno?. La paradoja de la aerobiosis”, “Metales, metalotioneina y radicales libres”, “Óxido nítrico”, “Enfermedades cardiovasculares” y “Epidemiología”. También participaron la Académica Correspondiente Electa D^a Evangelina Palacios Alaiz quién trató sobre “Respuesta celular a la agresión oxidativa. Antioxidantes” y los Académicos Correspondientes D^a Margarita Lorenzo Balado y D. Manuel Benito de las Heras que hablaron sobre “Muerte celular. Apoptosis y necrosis” y “Senescencia replicativa y telomerasa”.

También algunos Académicos han participado en reuniones científicas, así el Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza tuvo a su cargo la

Sesión Inaugural de Simposio Internacional, organizado por la Fundación Ramón Areces, sobre “Nuevas formas de acción infecciosa. Priones, viroides y retrovirus endógenos” que se celebró los días 29 y 30 de abril.

La que suscribe intervino en la I Jornada Farmacéutica Hospitalaria, organizada el 15 de junio por el Servicio de Farmacia Hospitalaria del Hospital Virgen de la Luz de Cuenca impartiendo la conferencia magistral titulada “La Farmacia de Hospital a través de la Historia”.

El Excmo. Sr. D. Bernabé Sanz Pérez participó en las III Jornadas gastronómicas Al-Arbuli; que se organizaron por el Ayuntamiento de Arboleas del 9 al 13 de septiembre, teniendo a su cargo el Ciclo de Conferencias sobre “Salud y Alimentación”.

La Ilma. Sra. D^a Josefina San Martín Bacaicoa, representó a la Corporación en el 34 th Congress of the International Society of Medical Hydrology and Climatology, que se celebró en Budapest-Héviz del 14 al 19 de octubre, y en el que además formó parte del Comité Asesor y de la Presidencia de la Sesión dedicada a “Fisiología de la Terapia acuática”.

En el Seminario Internacional Complutense “50 Aniversario del Museo de la Farmacia Hispana”, organizado entre otros por el Académico Correspondiente Dr. Javier Puerto Sarmiento, durante los días 17 a 19 de octubre, intervinieron el Dr. Wolf-Dieter Müller Jahncke, Académico Correspondiente, que tuvo a su cargo la conferencia inaugural titulada “Les Musées Allemands de l’Histoire de la Pharmacie”; el Dr. José Luis Valverde López, Académico Correspondiente, quién presentó la comunicación “El Museo de Historia de la Farmacia de la Cátedra de la Universidad de Granada. Antecedentes. Situación actual”; la que suscribe que presentó la comunicación “El Museo de Farmacia de la Real Academia Nacional de Farmacia”, François Ledermann, Académico Correspondiente, que impartió la Conferencia Plenaria “Les drogues et la pharmacognosie, apothéose des collections naturalistes et pharmaceutiques” y Patricia Aceves Pastrana, Académica Correspondiente, a cuyo cargo estuvo la Conferencia de Clausura sobre “La antigua oficina de farmacia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de México”.

En las Jornadas de la Sociedad de Docentes Universitarios de Historia de la Farmacia de España, celebradas en Madrid los días 12 y 13 de

diciembre, la que suscribe pronunció la conferencia “La Historia de la Farmacia Española en el siglo XX”.

Algunos de los Académicos han pronunciado conferencias en diversos lugares, así en el Ateneo de Madrid, en el Seminario sobre “Magia y curanderismo en la España de la Edad Moderna”, el Dr. Javier Puerto Sarmiento, Académico Correspondiente, trató de “¿Ciencia o superstición?. Literatura demonológica en la España Moderna” el día 11 de febrero; en el Ciclo de Conferencias titulado “Ciencia y vida: homenaje a Pedro Laín Entralgo”, organizado por la Fundación BBVA, pronunció el 30 de abril la conferencia “Las manos de los dioses”: Laín Entralgo contemplado desde la Historia de la Farmacia”, y en el Ciclo de Conferencias del Ateneo de Madrid sobre “Españoles en el exilio (1939). Una aproximación desde la actualidad” se ocupó el día 11 de noviembre de “José Giral: profesor y presidente de la República”.

En el Ciclo de Conferencias sobre “Nutrición e Industrialización de los Alimentos”, dirigido por el Excmo. Sr. D. Gregorio Varela Mosquera, y organizado por el Colegio Libre de Eméritos entre el 6 y el 9 de mayo, han impartido sendas conferencias él mismo y el Excmo. Sr. D. Bernabé Sanz Pérez tratando respectivamente de “Victoria contra el hambre en el mundo” y “Alimentos funcionales”.

El Dr. Antonio Ramírez Ortega, Académico Correspondiente, pronunció el día 21 de mayo en la Casa de Galicia de Madrid la conferencia titulada “las aguas minerales de Galicia”.

Finalmente, el Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza ha presentado el Ciclo de Conferencias, organizado por la Fundación Ramón Areces los días 3 y 4 de junio, sobre “Política científica en Francia” y el día 2 de diciembre ha pronunciado en la III edición del Club de Debate Sanitario de la Fundación Aventis la conferencia titulada “El lenguaje de la vida: salud y enfermedad”.

Algunos de nuestros Académicos han participado en las actividades llevadas a cabo en Corporaciones como la Real Academia Nacional de Medicina, así el día 7 de mayo el Excmo. Sr. D. Manuel Domínguez Carmona quien el 7 de mayo pronunció la conferencia titulada “Los arborescentes de la personalidad”. En la Real Academia de Medicina de Sevilla

en la Sesión de 30 de octubre dedicada al recuerdo del Excmo. Sr. D. Manuel Lora Tamayo, quien fuera Académico de Honor de esa Corporación, el Excmo. Sr. D. Manuel Losada Villasante tomó parte en el Acto Académico con la intervención titulada “Manuel Lora Tamayo, Figura Insigne de la Ciencia Española”; y en la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid, en la sesión científica en homenaje al farmacéutico vallisoletano D. Pedro Calvo Asensio que tuvo lugar el día 13 de diciembre, participó la Dra. Rosa Basante Pol, Académica Correspondiente, tratando de la “Prensa científica farmacéutica en el siglo XIX”.

Por último, la participación de nuestros Académicos en la Real Academia de Doctores se ha dejado sentir en diversos actos, así la Excm. Sra. D^a María Cascales Angosto ha presentado al Dr. Mariano Turiel de Castro y ha contestado al discurso de Toma de Posesión del Dr. Alejandro Mira Moneris quienes ingresaban respectivamente como Académicos Correspondiente y de Número en esa Corporación los días 19 de junio y 20 de noviembre. Por otra parte, el Académico Correspondiente en Salamanca Dr. José M^a Medina Álvarez ingresaba como Académico de Número el día 11 de diciembre pronunciando el discurso titulado “Origen neoténico de la mente” siendo contestado por el Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Villanueva.

* * * *

Las relaciones con la **Real Academia de Farmacia de Cataluña**, han continuado intensificándose durante el Curso 2002 como lo demuestra el hecho de que en las Sesiones Inaugurales de aquella Corporación y de la nuestra así como en la Sesión Inaugural del Curso Académico de las Reales Academias del Instituto de España, celebrada en nuestra sede, hubo representación oficial. El 26 de junio François Ledermann tomó posesión como Académico Correspondiente Extranjero con el discurso titulado “La Pharmacie et la Science: Genève de 1800 jusqu’au debut du XXe siècle à l’exemple des Pharmaciens collectionneurs” y el día 21 de octubre tomó posesión el Dr. José M^a Calleja Suárez como Académico

Correspondiente pronunciando su discurso “Las Mareas rojas: un vivero de herramientas farmacológicas”.

* * * *

La **Sección de Galicia de la Real Academia de Farmacia**, ha incorporado un nuevo miembro el día 11 de marzo: el Excmo. Sr. D. José Miñones Trillo que pronunció en el Salón de Grados de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela, el discurso titulado “La Interfase Aire/Agua: Monocapas de Extensión”. Al acto asistieron el Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, Dr. Reol, y el Secretario General del Instituto de España, Profesor Pedro García Barreno.

Las gestiones de su Director, el Excmo. Sr. D. Jesús Izco Sevilla, a fin de constituir una Real Academia de Farmacia en Galicia se hallan muy adelantadas y por el momento tiene a su disposición como sede unos locales en el edificio de la Fundación Julián Francisco Suárez Freire de Santiago de Compostela. Nuestra Academia está apoyando en el Instituto de España y ante la Xunta de Galicia, la constitución de la Academia Gallega de Farmacia.

Las relaciones con nuestra Academia se han intensificado como lo demuestra el hecho de que el Presidente de aquélla la ha representado en la Solemne Sesión Inaugural del Curso Académico de las Reales Academias del Instituto de España celebrada en nuestra sede.

* * * *

Se ha creado la **Academia de Farmacia** “Santa María de España” en la Región de Murcia, cuya sede se ha establecido en Cartagena, y entre los primeros Académicos se cuenta la Excma. Sra. D^a María Cascales Agosto.

* * * *

Las relaciones con la **Academia Iberoamericana de Farmacia y las Academias Latinoamericanas** homólogas a nuestra Corporación se han continuado estrechando durante el curso 2002 contando con la participación del Dr. Cosme de los Santos Carvallido, Académico Correspondiente, en las actividades científicas con la conferencia que pronunció el día 28 de junio sobre “Farmacia clínica del daño actínico. Evolución conceptual en la prevención y tratamiento de las fotodermatosis. Presente y futuro”, además de haber contado con su presencia en la Sesión Inaugural del Curso Académico de las Reales Academias del Instituto de España celebrada en nuestra sede.

* * * *

Algunos de los miembros de nuestra Corporación han sido galardonados con diversas **Distinciones** o han sido designados para ocupar puestos de responsabilidad en algunos organismos según ha llegado a nuestro conocimiento; entre ellos mencionaremos por su relieve que la Excm. Sra. Dña. María Cascales Angosto ha recibido la Medalla de Oro al Mérito Doctoral durante la Sesión Solemne de Apertura de Curso de la Real Academia de Doctores, celebrada el 30 de enero; el Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza fue elegido Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina el día 5 de febrero, tomando posesión el día 12 de noviembre pronunciando el discurso titulado “Bases moleculares de las enfermedades metabólicas. Prevención” y siendo contestado por el Excmo. Sr. D. Ángel Santos Ruiz; el Excmo. Sr. D. Manuel Losada Villasante ha recibido la investidura de Doctor Honoris Causa por la Universidad de Huelva el día 5 de junio en cuyo acto pronunció la conferencia titulada “Bendita sea la Luz”.

Al Excmo. Sr. D. Emilio Fernández-Galiano Fernández le ha sido concedida por Real Decreto 583/2002, de 14 de junio, la Gran Cruz de la Orden Civil de Alfonso X el Sabio.

Los Excmos. Sres. D. Federico Mayor Zaragoza, D. Julio Rodríguez Villanueva, D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo, D. Manuel Ruiz Amil, D. Manuel Losada Villasante y el Profesor Santiago Grisolia García han recibido una placa de plata como precursores de la fundación de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular durante el Congreso que celebró esta Sociedad del 17 al 20 de septiembre en León.

El Excmo. Sr. D. Salvador Rivas Martínez ha recibido la investidura de Doctor Honoris Causa por la Universidad de Ancona (Italia) el día 18 de septiembre y con este motivo pronunció la conferencia “Síntesis Geobotánica integrada de América”.

La Facultad de Farmacia de la Universidad de Alcalá ha rendido un emotivo homenaje el día 20 de septiembre, con motivo de su jubilación, al Excmo. Sr. D. Vicente Vilas Sánchez, acto en el que intervino el Excmo. Sr. Presidente D. Juan Manuel Reol Tejada y en el que estuvieron presentes muchos compañeros Académicos. Posteriormente al Dr. Vilas le ha sido concedida la Medalla de Oro de esa Universidad.

En el mes de octubre el Excmo. Sr. D. Benito del Castillo ha ingresado el día 17 como Académico Correspondiente en la Academia Iberoamericana de Farmacia pronunciando el discurso “Política académica internacional y armonización curricular en farmacia”, además ha recibido el 7 de agosto la investidura de Doctor Honoris Causa por la Universidad Nacional de Asunción (Paraguay), ha sido nombrado Presidente de la Sección Académica de la Federación Internacional Farmacéutica en Niza (Francia) el 5 de septiembre de 2002, Vicepresidente Adjunto de la Conferencia Hispanoamericana de Facultades de Farmacia (COHIFA) el 2 de mayo en Campeche (México) y Miembro Correspondiente de la Sociedad Química del Perú el 31 de julio en Lima (Perú).

Al Excmo. Sr. D. Ángel Santos Ruiz le ha sido concedida la Medalla al Mérito en el Trabajo por Real Decreto 1362/2002, de 13 de diciembre. Y en este mismo día el Excmo. Sr. D. Juan Manuel Reol Tejada

recibió la Medalla de Oro del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Granada y el Título de Colegiado de Honor del Colegio de Madrid.

El Excmo. Sr. D. Gregorio Varela Mosquera recibió el día 18 de diciembre la Medalla del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.

El Excmo. Sr. D. Domingo Espinós Pérez ha sido nombrado Vicepresidente del Instituto de España y el Excmo. Sr. D. Francisco González Posada ha sido nombrado en 21 de febrero Académico de Honor de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Cádiz y Académico Correspondiente de las Reales Academias de Bellas Artes de San Fernando, en 1 de julio, y de la de Ciencias, Bellas Artes y Buenas Letras “Luis Vélez de Guevara” de Écija, en 8 de noviembre.

Vaya para todos ellos nuestra más cálida felicitación por las distinciones que les han sido concedidas en este Curso.

* * * *

En el Capítulo de Publicaciones, la Corporación ha editado las Monografías número VIII titulada “Proliferación Celular y Cáncer 2000”, coordinada por la Excma. Sra. D^a María Cascales Angosto y contando con el patrocinio de la Asociación Española contra el Cáncer; la número IX titulada “Antecedentes históricos de las Facultades de Ciencias Químicas, Biología y Farmacia de la Universidad de Salamanca”, coordinada por el Excmo. Sr. D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo; la número X titulada “Farmacoeconomía e Investigación de Resultados en la Salud: Principios y Práctica”, publicada en colaboración con la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia y coordinada por el Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé y el Dr. Javier Soto Álvarez; y por último la número XI titulada “La Salud, prioridad en el Sexto Programa de Medio Ambiente en la Unión Europea”, coordinada por el Excmo. Sr. D. León Villanúa Fungairiño, contando en parte con el patrocinio de la Fundación “José Casares Gil” de amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Asimismo se ha editado un Facsímil de los Discursos pronunciados en la Real Academia de Farmacia por el Excmo. Sr. D. José María Albareda Herrera y el Volumen I de la “Historia de la Real Academia de Farmacia” del Excmo. Sr. D. Toribio Zúñiga y Sánchez-Cerrudo, labor realizada por la que suscribe.

Se han editado tres números del volumen LXVIII de los “Anales” correspondientes al año 2002 estando el cuarto en trámite de impresión, habiéndose publicado además los números extraordinarios correspondientes a los discursos de la Sesión Inaugural del año 2002, el número 25, dedicado al Balneario de Alhama de Granada. También se ha publicado el número 54 del Anuario correspondiente al año 2002.

Con el patrocinio de la Fundación “José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia se han realizado las siguientes publicaciones: “Genómica y Farmacogenómica”, “La Universidad de hoy y los Farmacéuticos de mañana”, “Farmacoeconomía e investigación de resultados en la Salud: Principios y Práctica. Situación actual y perspectivas futuras en España” e “Infección por VIH y SIDA”.

* * * *

El Museo ha contado con numerosos visitantes y con varias donaciones de las que se da noticia en el Anexo de esta Memoria. Desde estas líneas expresamos nuestro agradecimiento a quienes han efectuado estos presentes para la Sala de Recuerdos de la Corporación.

* * * *

En la Biblioteca y Archivo se han contabilizado 1014 consultas efectuadas tanto presencialmente como por teléfono, correo postal o correo electrónico. Se ha contado con diversas donaciones de las que se da noticia en el Anexo de esta Memoria y por las que expresamos nuestro más vivo agradecimiento a los respectivos donantes.

* * * *

Hemos de constatar la **Cesión de dependencias de nuestra sede** para que se pudieran efectuar actos organizados por diversas Corporaciones, así la Real Academia de Doctores, la Asociación Española de Farmacéuticos de Letras y Artes y la Sociedad de Docentes Universitarios de Historia de la Farmacia de España. Particular relieve ha revestido el acto organizado por el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, patrocinado por la compañía farmacéutica Lilly que tuvo lugar el día 17 de diciembre y durante el cual se hizo entrega del I Premio Nacional de Atención Farmacéutica. El acto, que estuvo presidido por el Excmo. Sr. Presidente de la Corporación, contó con la presencia del Ilmo. Sr. D. Federico Plaza Piñol, Viceconsejero de Ordenación Sanitaria y Salud Pública de la Comunidad de Madrid los cuales intervinieron junto con los Ilustres Sres. D. José Enrique Hours Pérez, Presidente del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, D. Javier Ellena, Presidente y Consejero Delegado de Lilly y D. Pedro Capilla, Presidente del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.

* * * *

En cuanto al capítulo de **Mantenimiento y Conservación** se ha restaurado Zaguán y Vestíbulo colocando unas puertas de cristal con la medalla grabada al ácido, y se ha instalado un nuevo pasamanos en la escalera de Farmacia nº11. Además se han restaurado los Salones de Sesiones Ordinarias y Extraordinarias instalando en ambos pantallas de proyección y procediendo a su correcta iluminación. En el primero se han colocado nuevos cortinajes y en el segundo se ha procedido a restaurar el mobiliario y a colocar un nuevo sistema de audición.

Asimismo se ha culminado la obra de acondicionamiento de la Planta Noble y su amueblado con lo que el Sr. Vicepresidente y Vicesecretario disponen de despacho propio y junto a estos despachos se ha habilitado una sala de visitas. Además otro despacho está destinado a la

Comisión de Informática y Comunicación, una sala al personal administrativo y, tras un pequeño vestíbulo, las Secciones y Comisiones disponen de una amplia sala para sus reuniones.

También en la zona de Biblioteca se ha habilitado un despacho con armarios ignífugos para la custodia de libros antiguos y de documentación de archivo.

Asimismo se han llevado a cabo reparaciones urgentes de mantenimiento en el edificio y se han adoptado las medidas de seguridad necesarias que requiere éste.

Otra de las necesidades cubiertas ha sido la obligada renovación y adquisición de material diverso para poder realizar las actividades científicas que organiza la Corporación y para poder ejecutar los variados trabajos administrativos que se llevan a cabo.

* * * *

En el **Capítulo Económico, Protocolario y Artístico** hemos de hacer constar nuestro agradecimiento por la sensibilidad de las autoridades del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte puesto que los incrementos concedidos tanto en la subvención ordinaria como en la extraordinaria nos han permitido acometer las acciones antes citadas, por lo que desde aquí les damos las más expresivas gracias.

Asimismo hacemos constar nuestro agradecimiento tanto a las autoridades de Protocolo Real, como a las de Protocolo del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte así como al apoyo que nos han prestado con su personal las Reales Academias de Historia y Jurisprudencia y Legislación en la organización de la Sesión Inaugural del Curso 2002-2003 de las Reales Academias del Instituto de España.

Hemos de agradecer en particular al Museo del Prado las obras pictóricas que ha depositado para el embellecimiento de nuestra sede, lo cual ha sido posible gracias a la intervención del Excmo. Sr. D. Juan Abeillo.

Por último, hemos de dar nuestras más expresivas gracias al Instituto de España por su financiación para la publicación de los discursos pronunciados en la Sesión Inaugural de las Reales Academias del Instituto de España, celebrada en nuestra sede, así como para la edición del Facsímil del Tomo I del Diccionario biográfico y bibliográfico de autores farmacéuticos españoles del Excmo. Sr. D. Rafael Roldán Guerrero.

* * * *

En el Capítulo de **Personal** hemos de señalar que durante el año 2002 ha producido baja por jubilación D^a Herminia Bartolomé García, Ordenanza funcionaria del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte destinada en nuestra Corporación; y han causado alta D^a Beatriz Uriarte Pérez, en calidad de Auxiliar Administrativo, D. Francisco José Gálvez Pavón en calidad de Ordenanza, D^a Dolores F. Valle Perán en calidad de limpiadora; mientras que D^a María del Mar Montes Bartolomé ha pasado del nivel de Ordenanza al de Auxiliar Administrativo.

Por otra parte, se ha concedido permiso al objeto de que el personal pudiera seguir diversos cursos de perfeccionamiento, así D^a Josefa Ortega, D^a Mónica Villar, D^a Beatriz Uriarte y D^a M^a del Mar Montes han realizado un Curso de Dreamweaver, Flash y Photoshop; D^a M^a José Aliaga y D^a M^a del Mar Montes han efectuado un curso ABSYS de Administrador, subvencionado por el Instituto de España; D^a M^a José Aliaga ha asistido a un curso sobre Archivos y Documentación impartido por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte; y D^a M^a del Mar Montes ha asistido a un Curso de Catalogación avanzada impartido por el Instituto Madrileño de Estudios Documentales.

* * * *

Termino agradeciendo la colaboración prestada en las tareas académicas por todos los Académicos de Número y Académicos Correspon-

dientes, en particular a aquellos que han participado con su asistencia a las actividades llevadas a cabo en nuestra sede y a los que han intervenido con interesantes conferencias y con los textos que han suministrado y que han formado parte de nuestras publicaciones. Con ello han hecho posible de nuevo en el Año 2002 que la vida científica de la Corporación haya seguido su curso.

Asimismo agradezco la colaboración prestada por el personal que se ocupa de las tareas de gestión, administración, y servicios bajo la coordinación de la Administradora D^a M^a del Carmen García París pues con su dedicación, y a pesar de los inconvenientes que ha supuesto una casa en obras, han hecho posible que pudieran llevarse a cabo nuestras actividades en el curso Académico 2002 y que de ellas hubiera información al público mediante la página web de la Corporación.

Eso es todo. Muchas gracias por su atención.

Madrid, 16 de enero de 2003
La Académica Secretaria
Dra. M^a del Carmen Francés

Anexo
DONACIONES EFECTUADAS AL MUSEO
AÑO 2002

— Cabezas Fernández del Campo, José Antonio:

Material de laboratorio propio y familiar

— Müller-Jancke, Wolf-Dieter:

Medalla de Plata dedicada a Valerius Cordus. Con su certificado número 172/1500

— Ramírez Ortega, Antonio:

Thenardita de Villarrubia de Santiago (Toledo)

— Reol Tejada, Juan Manuel:

Un bote de cerámica Sargadelos

Un bote de porcelana conmemorativo del centenario del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Palencia

DONACIONES EFECTUADAS A LA BIBLIOTECA AÑO 2002

(por orden de recepción)

- Sra. Dña. MARÍA LUISA, VIUDA DE D. PEDRO ARTIGAS JIMÉNEZ: dos colecciones de la publicación periódica titulada *Medicamenta. Revista de Estudios y Trabajos Profesionales*: Edición para el farmacéutico y Edición para el médico. De la primera, los años 1949 a 1953 completos y varios números sueltos de 1951-1953 entre los que destacan 15 ejemplares del núm. 71 (20-XI-1952) con tres portadas diferentes. De la Edición para el médico, que la Biblioteca no poseía, los años 1950 y 1951 completos.
- DOÑA ROSA BASANTE POL y DON SANTIAGO AYALA GARCÉS: *Fuentelencina hermoso lugar de la Alcarria*. Guadalajara, Ayuntamiento de Fuentelencina, 2002.
- DON MANUEL DOMÍNGUEZ CARMONA: *Factores relacionados con las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes*, por Vicente Monge. Madrid, Universidad San Pablo – CEU, noviembre 2001
- DON JOSÉ ANTONIO CABEZAS-FERNÁNDEZ DEL CAMPO: *Actualités Pharmacologiques* . 25 série. Paris: Masson, 1972
Actualités Pharmacologiques . 27 série. Paris: Masson, 1974

Problèmes actuels de Biochimie Générale. Paris: Masson, 1972

Problèmes actuels de Biochimie Appliquée. 3 série Paris: Masson, 1970

Problèmes actuels de Biochimie Appliquée. 4 série Paris: Masson, 1972

Problèmes actuels de Biochimie Appliquée. 5 série Paris: Masson, 1973

Problèmes actuels de Biochimie Appliquée. 8 série Paris: Masson, 1976

Exposés Annuels de Biochimie Médicale. 28 série Paris: Masson, 1967

Exposés Annuels de Biochimie Médicale. 31 série Paris: Masson, 1967

- DOÑA MARÍA CASCALES ANGOSTO: *Cellular and Molecular Aspects of Glucuronidation.* Proceedings of the International Congress on Cellular and Molecular Aspects of Glucuronidation held in Montpellier (France). Edited by Gérard Siest, Jacques Magdalou, Brian Burchell. Colloque INSERM Vol. 173. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Paris, J. Libbey Eurotext Ltd, 1988.
- Liver cells and drugs.* Proceedings of the International Symposium on "Liver cells and drugs" held in Rennes. Edited by André Guillouzo. Colloque INSERM Vol. 164. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Paris, J. Libbey Eurotext Ltd, 1988.
- Citokines: a practical approach.* Frances R. Balkwill. New York, Oxford University Press, 1991.
- Twenty one year retrospective.* Jawaharlal Nehru University. School of Life Sciences R. Madhubala, N.Z. Baquer and R.N.K. Bamezai. JNU, New Delhi, 1992.
- Documento sobre células madre embrionarias.* Elaborado por el Grupo de Opinión del Observatori de Bioètica i Dret Parc Científic de Barcelona. María Casado y Joseph Egozcue (Coords.) Barcelona, Ed. Signo, 2001.

Documento sobre investigación con embriones. Elaborado por el Grupo de Opinión del Observatori de Bioètica i Dret Parc Científic de Barcelona. María Casado y Joseph Egozcue (Coords.) Barcelona, Ed. Signo, 2000.

Documento sobre donación de ovocitos. Elaborado por el Grupo de Opinión del Observatori de Bioètica i Dret Parc Científic de Barcelona. María Casado y Joseph Egozcue (Coords.) Barcelona, Ed. Signo, 2001.

Nuclear Hormone Receptors. Molecular Mechanisms, Cellular Functions, Clinical Abnormalities. Malcolm G. Parker. London, Academic Press, 1991.

— DON ANTONIO RAMÍREZ ORTEGA: Revista *Geo*, Año 2001-2002.

Revista *Bocamina*, Minerales y Yacimientos de España. Año 2002.

Las aguas subterráneas. Un recurso natural del subsuelo, por Juan Antonio López Geta, Juan M. Fornés Azcoiti, Gerardo Ramos y Fermín Villarroya. Madrid, Instituto Geológico y Minero de España – Fundación Marcelino Botín, 2001.

— DON LEÓN VILLANÚA FUNGAIRIÑO: Revista *Eidon*. Año 2002.

A.M.A. Revista Informativa de la Agrupación Mutual Aseguradora. Año 2002.

Mapfre seguridad, revista de la Fundación Mapfre, Año 22 (2002) y Número Monográfico sobre Prevención de Riesgos Laborales.

Cursos del Instituto de España: “Nuevas fronteras en el conocimiento y gestión de residuos”, coordinado por Segundo 2002 de la Asociación Española de Periodismo Científico. Madrid, AEPC-Ministerio de Ciencia y Tecnología, 2002.

— D. PEDRO LLORENTE CACHORRO: *La Sierra de Córdoba. El Campo Militar de Adiestramiento de Cerro Muriano y sus*

condiciones ambientales. Madrid, Dirección General de Infraestructura - Ministerio de Defensa, 2002.

- D. JOSÉ M^a MEDINA JIMÉNEZ: *Origen neoténico de la mente*. Discurso pronunciado en su toma de posesión como Académico de Número de la Real Academia de Doctores de España, el día 11 de diciembre de 2002 y Contestación del Académico Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Villanueva. Madrid, 2002.

- D^a JOSEFINA SAN MARTÍN BACAICOA: *Curas Jiménez*, Real Academia de Farmacia, Madrid, 2001. “Toma de decisiones en ambientes profesionales”, coordinado por Pedro García Barreno, Sixto Ríos García y Javier Girón González Torre, Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Madrid, 2001. “Envejecimiento y Cultura”, coordinado por Pedro García Barreno, Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y Alberto Portela Sánchez, Real Academia Nacional de Medicina, Madrid, 2001
Consideraciones de naturaleza prioritariamente física en torno a la Protección y Prevención de los Riesgos de la vida de la especie humana en un contexto cosmológico: Arquitectura e Ingeniería Sanitarias. Discurso para la recepción pública del Académico Electo Excmo. Sr. D. Francisco González de Posada, leído el día 1 de diciembre de 1998 y contestado por el Académico Numerario Excmo. Sr. D. Juan Jiménez Collado. Real Academia Nacional de Medicina. Madrid, 1998.
 Instituto de España. *Homenaje a la Antigüedad Académica*. Celebrado el 13 de diciembre de 2001 en honor del Excmo. Sr. D. Juan Berchmans Vallet de Goytisolo, Académico y Presidente de Honor de la Real Academia de Jurisprudencia y Legislación. Madrid, 2001.

- DON SEGUNDO JIMÉNEZ: Revista *La Tierra que todos deseáramos*, Publicación Medioambiental, S.L., varios números correspondientes a 2001.

Revista *Química e industria (QUIBAL)* , ANQUE y C.G. Colegios Oficiales de Químicos de España, (2002).

Revista *Estratos* , Empresa Nacional de Residuos Radiactivos (2002)

Informe Universidad 2000. Ejemplar mecanografiado. 3 vol.

- REAL ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA: *Los Oligoelementos en Geología y Biología*. Discurso para la recepción pública del Académico electo Excmo. Sr. Dr. D. José María Albareda y Herrera, leído el día 24 de mayo de 1952 y Contestación del Académico Numerario Excmo. Sr. Dr. D. Gregorio Marañón y Posadillo. Madrid, Real Academia Nacional de Medicina, 1952.
- DON MANUEL ORTEGA MATA, Revista *Panorama Actual del Medicamento*, ejemplares correspondientes a 2000 y 2001.
Revista Cuadernos de bioética, 2001 (vol. XII)
Catálogo de Parafarmacia 2001. Colección Consejo. Madrid, Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.
- D. ÁNGEL SANTOS RUIZ: *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*. Tome 186 (Año 2002).
- D. ALBERTO GIRÁLDEZ DÁVILA: Revista “Éxodo. Ciencia y Ética” núm. 62 (febrero 2002); incluye el trabajo titulado *Medicamentos para los países pobres*, del que es autor.
- D^a. M^a CARMEN FRANCÉS CAUSAPÉ: *Josef Antón Häfliger (1873-1954) Leben und Werk*. Frey, Patrick. Basler Dissertationen Zur Geschichte der Pharmazie und Naturwissenschaften, vol 15. Basel, Juris Druck+Verlag Dietikon, 1999.
Bulletin de la Association européenne des Musées d'Histoire des Sciences Médicales. AEMHSM, 2001, n. 30.
Revue d'Histoire de la Pharmacie. Bulletin de la Société d'Histoire de la Pharmacie. Vol. XLVIII (2000), n. 325.

El medicamento genérico o la importancia de la tecnología farmacéutica. Discurso de recepción del Académico de Número Muy Ilustre Prof. Dr. Josep M. Suñé i Negre. Discurso de contestación del Académico de Número Muy Ilustre Prof. Dr. Josep Cemeli i Pons. Ed. bilingüe. Barcelona, Real Academia de Farmacia de Cataluña, 2000.

Experiències entorn de la Química Farmacéutica. Discurso de recepción del Académico Correspondiente Ilustre Sr. Josep Miquel Ribalta i Baró. Barcelona, Real Academia de Farmacia de Cataluña, 2001.

Grans episodis tòxics per medicaments. Una evolució: del risc cap a la seguretat. Discurso de recepción del Académico Correspondiente Ilustre Sr. Jacint Corbella. Barcelona, Real Academia de Farmacia de Cataluña, 2001.

Per què han d'estudiar Física els farmacèutics. Discurso de recepción del Académico Correspondiente Ilustre Sr. Jordi de Bolòs. Barcelona, Real Academia de Farmacia de Cataluña, 2000.

Pharmacy in History. American Inst. of the History of Pharmacy. Vol. 42 (2000) n. 3-4.

2001 Calendar. Retrospective edition: Twelve years of AIHP pharmaco-historical calendars. American Institute of the History of Pharmacy. University of Wisconsin School of Pharmacy.

2002 Calendar. American Institute of the History of Pharmacy. University of Wisconsin School of Pharmacy.

La Historia de la Farmacia española en el siglo XX. Comunicación presentada en las Jornadas de la Sociedad de Docentes Universitarios de Historia de la Farmacia de España. Madrid, 12-13 de diciembre de 2002. Varios ejemplares

- DOÑA MONTSERRAT DOMÈNECH I BORRULL, Alcaldesa de Caldas de Montbuy: *Història termal de Caldes de Montbui.* Mercè Tatjer i Mir (Dir.). Barcelona, Patronato Municipal de Museos de Caldes de Monbui, 2002.

- INSTITUTO DE ESPAÑA: Sesión Conmemorativa de la Fundación del Instituto de España celebrada el 9 de abril de 2002: “Arquitectura y Universidad. Del Palacio de las Musas a la Ciudad del Saber”, por el Excmo. Sr. D. Antonio Bonet Correa. Madrid, Instituto de España, 2002.
- D. JUAN MANUEL REOL TEJADA: *El Medicamento en el mundo: Europa y Estados Unidos*. Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, Farmaindustria y “El Global”. Madrid, Contenidos e Información de Salud SL., 2002.
La Industria Farmacéutica en cifras. Edición 2001. Madrid, Farmaindustria, 2002.
Memoria Académica del siglo XX. Vicente Palacio Atard (ed.), Margarita Salas, M^a Carmen Francés, Juan M. Reol, et al. Madrid, Instituto de España, 2002.
Enfermedades Neurodegenerativas. Jose M^a Segovia de Arana y Francisco Mora Teruel (coord.) Farmaindustria, Serie científica. Madrid, 2002.
La Promoción integral de la Salud, un reto de futuro. H. Carlos Bando Casado. 2^a Ed. Madrid, GlaxoSmithKline, 2002.
Decálogo Xacobeo sobre la alimentación en el siglo XXI. Gregorio Varela (Coord.). Madrid, Fundación Española de la Nutrición, 2000.
Las Ciencias Sociales y la Modernización. La Función de las Academias. Miguel Herrero y Rodríguez de Miñón y Johannes-M. Scholz (Coord.). Madrid, Real Academia de Ciencias Morales y Políticas, 2002.
- COLEGIO OFICIAL DE FARMACÉUTICOS DE ZARAGOZA: *Jose María Albareda y Herrera, Farmacéutico aragonés. En el centenario de su nacimiento*. Zaragoza, COFZ, 2002.
- D^a MARÍA ROSARIO DE FELIPE ANTÓN: *D. José María Albareda, insigne científico, promotor del CSIC y de la Ciencia del Suelo en España*. Rosario de Felipe Antón y José Manuel Pozuelo Guanche. Separata de “Jose María Albareda y Herrera, Farmacéutico aragonés”. Zaragoza, Colegio Oficial

- Farmacéutico aragonés”. Zaragoza, Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza, 2002.
Homenaje a D. José María Albareda, en el centenario de su nacimiento. Consejo superior de Investigaciones Científicas – Monografías, 25. Madrid, CSIC, 2002.
- D. ROMÁN DE VICENTE JORDANA: *Hamdard- I- Sehat. Journal of Health, Hygiene and Social Service*. Monthly Hamdard- I- Sehat, Hamdard Foundation Pakistan. Karachi. Colección de 1998-2002.
Hamdard Islamicus. Quarterly Journal of Studies and Research in Islam. Bait al-Hikmah. Madinat al-Hikmah, Karachi. 2000-2001.
- D. JOSÉ IGLESIAS DÍAZ: *La sicología francesa a través del lenguaje*, obra de la que es autor. Madrid, Graf. Cóndor, 2002.
- THE BALKAN ACADEMY OF SCIENCES, NEW CULTURE AND SUSTAINABLE DEVELOPMENT “D. JERSOV”, a través del Académico Dr. D. MARIN R. MEHANDJIEV: Tres monografías de las que es autor:
Waste reduction and minimization in mining, ore-processing and metallurgical plants. Association of Bulgarian Ecologists’ Series in Science and Environmental Analyses. Cooperative Society Coopconsult. Sofía, Florir, 1996.
Cancer: enemy and future ally. A non-equilibrium thermodynamic approach to cancerous phenomena. Association of Bulgarian Ecologists’ Series in Science and Environmental Analyses. Elmira Georgieva – ICHY Co. Sofía, Onix Publ. House, 1994.
Thermodynamics of Accumulation processes in the affected systems. Part 1 y 2. Sofía, EAD – Chelopech, 1997.
- D^a M^a JESÚS ÁLVAREZ GONZÁLEZ: *Junta General del Principado de Asturias. Actas Históricas III. Libros de Actas desde el 25 de octubre de 1657 hasta el 13 diciembre de*

el 25 de octubre de 1657 hasta el 13 diciembre de 1671. Siero, Junta General del Principado de Asturias, 2002.

- D. JOSÉ M^a MARTÍN MORENO: Varios informes publicados por la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III, durante el año 2002:
Tomografía por emisión de positrones (PET) con 18FDG en Oncología Clínica. Revisión sistemática.
Efectividad de los apósitos especiales en el tratamiento de las úlceras por presión y vasculares.
Análisis Comparativo de la encuesta nacional de Salud. Año 1997.
Manejo Hospitalario de la Cardiopatía isquémica en España. Análisis de situación. Madrid, Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002.
- D. MANUEL CALVO HERNANDO Y D. SANTIAGO GRAIÑO KNOBEL: *Ciencia y Tecnología en 2001.* Anuario *Balnearias y Climáticas. Talasoterapia y Helioterapia.* San Martín Bacalco, J. y Armijo Valenzuela, M. Madrid, Ed. Complutense, 1994.
- INSTITUTO GEOLÓGICO MINERO DE ESPAÑA, a través de su Bibliotecaria Dña. MARGARITA GUTIÉRREZ GÁRATE: *Aguas Subterráneas, Paisajes y vida: Acuíferos de España*”. Madrid, Instituto Geológico y Minero de España, 2001.
- Doña ÁNGELES VIÁN: *Rector y humanista: homenaje a Ángel Vián Ortuño.* Madrid, Ed. Complutense, 2002.
- D. JUAN GESTAL OTERO: *Ourense Termal.* , Luis Rodríguez Míguez. La Coruña, Alva Graf. S.L., 2001.
- D. JOSÉ DE VICENTE GONZÁLEZ: *Boticas Monásticas, cartujanas y conventuales en España,* obra de la que es autor. La Coruña, TresCtres editores, 2002.

- Doña LETICIA AZCUE BREA: *Guía de Museos Militares Españoles*, de la que fue promotora en su calidad de Subdirectora General de Acción y Difusión Cultural. Madrid, Ministerio de Defensa – Dirección General de Relaciones Informativas y Sociales de la Defensa, 1995.
- D. TOMÁS GIRBÉS JUAN: *Religiosidad y Profesiones sanitarias en el Burgos del XVIII*. Burgos, Hermandad Médico-Farmacéutica de San Cosme y San Damián, 1999.
Historia de la Sanidad Marítima en España. Ramón Navarro y García. Madrid, Instituto de Salud Carlos III, 2001.
Historia y Medicina en España. Homenaje al Profesor Luis S. Granjel. Valladolid, Consejería de Cultura y Turismo, Junta de Castilla y León, 1993.
- D. IGNACIO BUQUERAS Y BACH: *La Sociedad Civil y la Clase Política*. Discurso de su toma de posesión como Académico de Número de la Real Academia de Doctores y contestación por Excma. Sra. Dña. Isabel Tocino Biscarolasaga. Madrid, 2002.
- REAL ACADEMIA DE MEDICINA Y CIRUGÍA DE SEVILLA, a través de su Académico Bibliotecario, Ilmo, Sr. D. Jose María Montaña Ramonet: *Memorias Académicas*. Años 2000 y 2001.

OTRAS DONACIONES

— Forteza, Nicolás:

Un cuadro al óleo sobre un paisaje mallorquín

— Martínez, Casildo:

Una acuarela sobre un paisaje con Digital

— Mosqueira Riera, M^a Dolores:

Una acuarela “Ramo de flores” debida a su padre el Dr. Arturo Mosqueira.

— Reol Tejada, Juan Manuel:

Dos medallones de Escayola Patinados debidos al escultor del siglo XIX: Enrique Duque Duque que representan a: Carlos IV y José Bonaparte los cuales proceden de la oficina de farmacia de su padre en Burgos.

RELACIÓN DE PREMIADOS EN EL CONCURSO CIENTÍFICO DEL 2002

PREMIO DE LA REAL ACADEMIA DE FARMACIA

AUTORES: D. Amando Garrido Pertierra
D. José M. Bautista Santacruz

TÍTULO: “Deficiencias en piruvato quinasa y anemias hemolíticas”

PREMIO DEL CONSEJO GENERAL DE COLEGIOS OFICIALES DE FARMACÉUTICOS (Entregado “*ex aequo*” a dos trabajos)

Primer trabajo

AUTORES: Dña. Ana Herranz Alonso
D. Antonio Idoate García
Dña. Mar Araluce Letamendía

TÍTULO: “Valor añadido del farmacéutico a la gestión de los Productos Sanitarios en el entorno hospitalario”

Segundo trabajo

AUTORES: Dña. Sonsoles Hortelano Blanco
D. Antonio Castrillo Viguera

TÍTULO: “Mecanismos implicados en la resolución de la inflamación. Búsqueda de nuevas perspectivas terapéuticas”

PREMIO DEL COLEGIO OFICIAL DE FARMACÉUTICOS DE MADRID

AUTOR: D. Tomás Girbés Juan

TÍTULO: “Nigrina B: una proteína inactivadora de ribosomas no tóxica del saúco. Utilidad farmacéutica en la construcción de inmunotoxinas y conjugados para la terapia del cáncer”

PREMIO ALCALÍBER

AUTORES: Dña. Blanca Laffon Lage
Dña. Beatriz Pérez Cadahía
Dña. Josefina Méndez Felpeto

TÍTULO: “Influencia de determinados polimorfismos genéticos de enzimas metabólicas en la genotoxicidad del estireno”

PREMIO CINFA

AUTOR: Dña. M^a Luisa Ojeda Murillo

TÍTULO: “Acción de la procalcitonina a nivel central sobre la temperatura corporal y la fiebre”

PREMIO FAES PHARMA

AUTORES: D. Brant Alan De Fanti
D. Fermín Milagro Yoldi

D. Alfredo Martínez Hernández

TÍTULO: “Inmuno-manipulación del apetito y metabolismo”

PREMIO MABO (Se ha decidido repartir el Premio de 3000 euros entre dos trabajos de los cuales al primero se le otorga la cantidad de 2400 euros y al segundo un accésit de 600 euros)

Primer trabajo

AUTOR: D. David Andrés García

TÍTULO: “Toxicidad de la ciclosporina A en hepatocitos. Efecto protector de la Vitamina E”

Segundo trabajo

AUTORES: Dña. Concepción González Huecas
D. Luis Moreno Merino
Dña. M^a del Carmen Martín Gómez
Dña. Gloria López Fernández
D. Antonio López Lafuente

TÍTULO: “Estudio de la influencia de los suelos contaminados por metales pesados en aguas naturales”

PREMIO NORMON

AUTOR: Dña. María Luisa García Hernández

TÍTULO: “Estudio teórico del modo de unión entre CDK2 y butirolactona I”

PREMIO PFIZER

AUTOR: Dña. Miriam Zeini Moreno

TÍTULO: “Mecanismos de regulación de la apoptosis en células de ateroma”

PREMIO JUAN ABELLÓ

AUTOR: Dña. M^a Asunción González Guillén

TÍTULO: “Actividad vascular de la raíz de *Scolymus hispanicus L.* : aislamiento de compuestos mediante fraccionamiento bio-dirigido”

PREMIO CARLOS DEL CASTILLO LEIVA (Entregado “*ex-aequo*” a dos trabajos)

Primer trabajo

AUTORES: D. Benito Jorge Rubio Retama
D. Enrique López-Cabarcos
Dña. Beatriz López-Ruiz

TÍTULO: “Propiedades y caracterización de micropartículas de poli-acrilamida y su aplicación al diseño de un biosensor de glucosa”

Segundo trabajo

AUTORES: D. Andrés León Leal
Dña. Laura Martín Carbajo

Dña. Ana Isabel Olives Barba
Dña. M^a Antonia Martín Carmona

TÍTULO: “Complejos de inclusión de harmano con hidroxipropil- β -ciclodextrina. Aspectos metodológicos relativos a su caracterización analítica”

PREMIO SANTOS RUIZ

AUTOR: Dña. María José Aliaga García

TÍTULO: “La Biblioteca de la Real Academia de Farmacia de Madrid desde su origen hasta 1946”

PREMIO “ELVIRA MORAGAS” DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE FARMACÉUTICOS CATÓLICOS

AUTOR: Dña. Hebbe Isabel Campero Carrasco

TÍTULO: “Análisis retrospectivo de las normas éticas y legales que rigen en la responsabilidad del farmacéutico en Bolivia”

CONCURSO CIENTÍFICO 2003

La Real Academia de Farmacia convoca el Concurso Científico del año 2003, de conformidad con las Bases Generales que se incluyen en esta convocatoria.

Instituido para farmacéuticos y cultivadores de Ciencias Afines.

Se reciben trabajos hasta el día **31 de octubre de 2003** a las nueve de la noche.

PREMIO DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Seis mil euros

TEMA: Libre, de investigación personal.

PREMIO DEL CONSEJO GENERAL DE COLEGIOS OFICIALES DE FARMA-CÉUTICOS

Tres mil euros

TEMA: Libre.

PREMIO DEL COLEGIO OFICIAL DE FARMACÉUTICOS DE MADRID

Tres mil euros

TEMA: Libre.

PREMIO ALCALÍBER

Tres mil euros

TEMA: Libre.

PREMIO CINFA

Tres mil euros

TEMA: “Farmacología, farmacoterapia y seguimiento fármaco-terapéutico”.

PREMIO FAES PHARMA

Tres mil euros

TEMA: Libre.

PREMIO MABO

Tres mil euros

TEMA: Libre.

PREMIO NORMON

Tres mil euros

TEMA: Nuevas Tecnologías aplicadas a los Medicamentos.

PREMIO JUAN ABELLÓ

Tres mil euros.

TEMA: Libre

PREMIO CARLOS DEL CASTILLO LEIVA

Seiscientos euros

TEMA: Libre, sobre Técnicas Instrumentales en Farmacia.

PREMIO SANTOS RUIZ

Abono de los derechos de un título de doctor a un doctorando que trabaje en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense. Este premio no se regirá por las bases generales, por lo que los interesados presentarán un ejemplar de la tesis con su nombre y dirección, así como un certificado de su expediente académico completo con notas, en el plazo del concurso.

BASES GENERALES

1º.- Podrán tomar parte en este concurso los farmacéuticos y los cultivadores de Ciencias Afines a la Farmacia.

2º.- Los trabajos serán inéditos de investigación o revisión redactados en español y estarán realizados específicamente para el premio a que optan.

3º.- Se presentarán escritos a máquina, a dos espacios, en A4, por una sola cara y cosidos. Si se acompañan ilustraciones, irán incorporadas al texto, y no separadas.

4º.- En la redacción se cuidará de lograr la mayor concisión posible, prescindiendo de consideraciones innecesarias y de copiar operaciones, cálculos y descripciones que estén ya publicados, consignando únicamente la cita de la obra donde consten. La bibliografía se limitará en lo posible, a las obras consultadas y aludidas en el trabajo, pudiendo también consignar las obras que la contengan más extensa. Se incluirá al principio un sumario de los capítulos.

5º.- Los trabajos que se presenten a los premios se distinguirán con el lema de una sola palabra, escrita en la cubierta, con el nombre del premio al que aspiren, que no podrá ser más que a uno sólo, y llevarán además un título que de idea del tema al que se refiere el trabajo. El autor o autores y sus apellidos (sin iniciales o abreviaturas), con su domicilio particular y número de teléfono, así como Centro donde se haya realizado el trabajo, deberá incluirse en un sobre cerrado que tenga las mismas consignas antedichas. No se autoriza el uso de pseudónimos.

6º.- La Academia, a propuesta de los Jurados, se reserva el derecho a otorgar premios, que pudieran quedar desiertos, a trabajos presentados que considere merecedores de Premio y no lo hayan conseguido específicamente.

Igualmente podrá desglosar el Premio en Premio y Diploma de Accésit en aquellos casos que así lo proponga el Jurado.

7º.- El Premio se otorga al trabajo, no singularizándose en ningún caso a los autores del mismo.

8°.- Los autores del trabajo que hayan obtenido el Premio de la Real Academia de Farmacia, no podrán optar a éste hasta pasadas dos convocatorias desde aquella en que obtuvo el Premio.

9°.- Será declarado nulo el Premio concedido a una memoria cuyo autor haya obtenido ya premio por el mismo o análogo trabajo.

10°.- Los concursantes enviarán dos ejemplares del trabajo y un extracto del mismo de no más de cinco folios.

11°.- Los trabajos premiados quedarán en propiedad de la Academia, aunque el autor haya renunciado al Premio.

12°.- La Academia se reserva el derecho de publicar o no los trabajos premiados, según dictamine la Comisión de Publicaciones con la extensión que se crea conveniente. El autor no podrá publicarlos sin autorización de la Academia.

13°.- Los envíos deben hacerse al Excmo. Sr. Director de la Real Academia de Farmacia (Farmacia, 11 -28004- Madrid) por correo certificado, o mediante entrega personal. En este caso le será facilitado un recibo que servirá para retirar el original si no resulta premiado. Para los envíos por correo certificado la devolución se efectuará mediante la presentación del impreso de certificación.

14°.- Los Académicos de Número no podrán concursar a estos premios.

15°.- Los originales no premiados podrán retirarse hasta el 31 de marzo de 2003, pasada esta fecha serán destruidos.

16°.- Las dudas que puedan presentarse en relación con los apartados anteriores, se resolverán por la Junta de Gobierno de la Academia.

Sesiones Científicas

9 de enero

A las 19,00 horas, Conferencia por la Dra. Gloria Frutos Cabanillas, Académica Correspondiente, titulada: “Técnicas de remuestreo en la comparación de curvas de disolución”.

16 de enero

A las 18’00 horas, Solemne funeral en la Iglesia Parroquial de San Ildefonso (c/ Colón, 20), por los Académicos fallecidos.

A las 19’00 horas, Solemne Sesión Inaugural del Curso Académico. Pronunciará el Discurso el Excmo. Sr. Don Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, titulado: “Terapéutica Farmacológica en el anciano”.

23 de enero

A las 19,00 horas, Conferencia del Excmo. Sr. D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo, titulada: “Glicopatología y Glicoterapéutica”.

30 de enero

A las 19’00 horas, Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Dr. Enrique Fernández-Caldas Rodríguez, Director de Investigación y Desarrollo de los Laboratorios C.B.F. Leti, S.A., quien pronunció su discurso titulado: “Importancia Alergológica del ácaro *Blomia tropicalis*”

6 de febrero

A las 19’00 horas, Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Dr. Bengt Ivar Bertil Fredholm, Profesor y Director del Departamento de Fisiología y Farmacología del Instituto Karolinska de Estocolmo, quien pronunció su discurso titulado: “Caffeine adenosine receptors and possibilities for a novel Therapy for Parkinson’s disease”.

13 de febrero

A las 19,00 horas, Conferencia por la Dra. Juana Lorenzo Vian, Doctora en Psicología, titulada: “Estudio multidisciplinar sobre la relación entre la proteína de estrés HSP70 y respuestas emocionales”.

20 de febrero.

A las 19,00 horas, Conferencia por el Excmo. Sr. D. Eugenio Sellés Flores, titulada: “Fundamento y actualidad de la Homeopatía”.

27 de febrero.

A las 19’00 horas, Conferencia por el Dr. Miguel Fernández Braña, Académico Correspondiente, titulada: “Inhibidores de CDKs”.

6 de marzo.

A las 19’00 horas, Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Dr. José Martínez Lanao, Catedrático de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Salamanca, quién pronunció su discurso titulado: “Estado actual y perspectivas de los estudios de distribución Tisular en Fármacos”.

13 de marzo

A las 19’00 horas, Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Dr. Antonio López Lafuente, Profesor Titular de Universidad en el Departamento de Edafología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, quién pronunció su discurso titulado: “El suelo en la biosfera y su repercusión en la salud ambiental”.

20 de marzo.

A las 19’00 horas, Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Dr. Enrique Fernández-Caldas Rodríguez, Director de Investigación y Desarrollo de los Laboratorios C.B.F. Leti, S.A., quien pronunció su discurso titulado: “Importancia Alergológica del ácaro *Blomia tropicalis*”.

27 de marzo

A las 19’00 horas, Sesión Científica en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Tema: “Células troncales: Aspectos científicos y éticos”. Moderador: Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero. Ponentes: el Dr. Carlos Alonso Bedate, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa del Centro Superior de Investigaciones Científicas, quién habló sobre: “Una visión ontológica y ética del embrión humano: ¿existen paradigmas plura-

les?"; la Dra. Natalia López Moratalla, del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina en la Universidad de Navarra, quién habló sobre: "La racionalidad terapéutica en la Medicina regenerativa con células troncales embrionarias o de adulto"; y el Dr. Pedro Cuevas Sánchez, del Dpto. de Investigación, Hospital Ramón y Cajal de Madrid, quién habló sobre: "Aplicación terapéutica de las células troncales adultas y embrionarias. ¿Mito o realidad?".

Noticias
34th World Congress of the
INTERNATIONAL SOCIETY OF MEDICAL HYDROLOGY AND
CLIMATOLOGY
BUDAPEST- HÉVIZ
14-19 Octubre 2002

ULTIMO DÍA DEL CONGRESO - VISITA AL BALNEARIO HÉVIZ

La visita a Bad Hévíz, en la zona oeste del lago Balatón, fue de gran interés.

El Lago Hévízi (“Agua Caliente”) está situado a unos 6 Km. en la orilla norte del Lago Balatón. Informe para presentar en la Real Academia Nacional de Farmacia, el 28 de Noviembre en la reunión de la “Comisión de Aguas Minerales y Mineromedicinales”

La Real Academia Nacional de Farmacia me otorgó el honor de nombrarme representante oficial de esta Corporación en el Congreso Mundial de la Sociedad Internacional de Hidrología y Climatología Médicas, lo cual agradezco muy sinceramente.

Hice entrega de los libros, en edición facsímil, regalo de esta Real Academia, al Prof. Pratzel, Presidente de la ISMH y al Presidente del Congreso Dr. Bender quienes agradecieron e hicieron elogios de los mismos.

La International Society of Medical Hydrology and Climatology (ISMH) es una sociedad constituida por la unión de médicos y otros científicos, instituciones y entidades relacionadas con el área de la Hidrología, Balneología, Climatología y Talasología Médicas. Fue fundada en Londres en 1921 por los Drs. Robert Fortescue Fox (Inglaterra), Ferreyrolles (Francia), Dastur (India), Herbert (Nueva Zelanda) y otros. Celebró su segunda y formal sesión inaugural en la Royal Society of Medicine en

Londres con setenta y un miembros, representando a trece países. El Dr. Fortescue Fox fue elegido su primer Presidente.

Cada cuatro años celebra un Congreso en distinto lugar del mundo y este año ha sido Hungría donde se ha celebrado del 34 Congreso Mundial de la ISMH. Budapest y Héviz han sido las ciudades que han acogidos a los congresistas, siendo Presidente de la Sociedad el Prof. Dr. Helmut Pratzel y Presidente del Congreso el Dr. Tamás Bender.

Dieciocho miembros pertenecientes a once países constituyen, en la actualidad, el International Advisory Board, al que tengo la responsabilidad y el honor de pertenecer.

Los temas tratados en el Congreso han sido muy variados, entre los que destacamos: Medicina basada en la evidencia, Ciencias básicas, Reumatología, Dermatología, Enfermedades Pulmonares Crónicas, Aguas radiactivas, Aguas carbogaseosas, Bioclimatología, Talasoterapia, Fitoterapia, Peloides.

Se presentaron: 4 Ponencias, 111 comunicaciones y 58 posters.

Intervinieron ponentes y comunicantes de treinta y un países: la mayoría de los países de Europa Occidental y del Este, Asia (Japón, India e Irán), América (USA, Canadá y Perú), África (South Africa).

Me correspondió presentar la ponencia en la Sección de Ciencias Básicas sobre "Physiology of aquatic therapy: resistance factors".

Los resúmenes de las Ponencias y Comunicaciones al Congreso han sido recogidos en un libro de Abstracts y un ejemplar ha sido entregado para esta Real Academia Nacional de Farmacia.

ASAMBLEA GENERAL

Se celebró la Asamblea General de la ISMH en la que, entre otros asuntos, se procedió a la elección de nuevo Presidente. A propuesta del Presidente saliente, Prof. Pratzel, fue elegido, por votación entre los asistentes, el Dr. Tamás Bender, quien será Presidente de la ISMH durante los próximos cuatro años.

Fue nombrado Vicepresidente al Dr. Z. Karagülle (Turquía) y Tesorero al Dr. Gutenbrunner (Alemania).

Se procedió a continuación a la elección de la sede para el próximo Congreso Mundial ISMH 2006. Se celebrará en Estambul (Turquía). Izmir y Anatolia podrían ser parte de la Sede del Congreso. La organización del mismo correrá a cargo del Dr. Karagülle, Vicepresidente de la Sociedad.

El Presidente entrante propuso el nombramiento de Miembros de Honor de la ISMH a:

- Dr. Orváth (Polonia)
- Dr. Aguishy (Japón)
- Dra. Ozner (Turquía)
- Dra. San Martín (España)

y Presidente de Honor al Dr. Pratzel, los cuales fueron aceptados por unanimidad.

Un lago de 47.500 m², cubierto de nenúfares en su mayor parte, de agua medicinal termal, cuyo cráter está a 36 metros de profundidad. Es el segundo mayor lago de agua termal del mundo.

Cada segundo surgen 420 litros de agua termal, radiactiva, sulfurada y otras sustancias minerales, a una temperatura de 36° C. Gran número de personas se bañan en sus aguas en cualquier época del año, siendo muy agradable incluso en invierno. Se crea a su alrededor un especial microclima. Se utiliza también el barro del fondo del lago, al que se le adjudican propiedades beneficiosas especialmente en personas con afecciones de aparato locomotor.

Las aguas de este extraordinario lago han venido siendo utilizadas desde 1795, tanto en baños como en bebida.

En nuestra visita-estancia en este Balneario se celebró una sesión clínica sobre la utilización de estas aguas y peloides como terapéutica. Visitamos el balneario, algunos congresistas se bañaron en el lago (con

flotador y alejados del crater de surgencia) y disfrutamos de los parques que rodean el lago y del ambiente en general.

Tanto en Hévíz como en Budapest los anfitriones nos obsequiaron con muestras de su folklore y costumbres, que hicieron pudiéramos conocer mejor este hermoso país y a sus gentes.

Josefina San Martín Bacaicoa
Académica Correspondiente

Representación oficial de la Real Academia en el Congreso

Calendario de Actividades

El III Congreso Nacional de Atención Farmacéutica tendrá lugar en Granada (España) del 18 al 20 de septiembre de 2003. estará organizado por la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada y la Fundación Pharmaceutical Care y con sede en el Palacio de Congresos y Exposiciones de Granada.

Durante el Congreso se celebrarán cinco Mesas Redondas que tratarán sobre: “Integración de la Formación en Atención Farmacéutica”, “Integración de grupos y colectivos para el desarrollo de la Atención Farmacéutica”, “Integración de la Atención Farmacéutica en los distintos niveles asistenciales”, “Resultados en Atención Farmacéutica” y “Repercusiones económicas de la Atención Farmacéutica”.

Además otras dos Mesas se ocuparán de resultados profesionales y otras dos de comunicaciones orales seleccionadas entre los póster presentados.

Los días previos al Congreso se impartirán seis cursos de formación organizados por la Facultad de Farmacia de Granada y la Escuela Andaluza de Salud Pública que versarán sobre: “Cómo desarrollar estrategias de educación sanitaria desde la Oficina de Farmacia”, “Atención Farmacéutica y Evidencia Científica: Pequeño catálogo de recursos útiles”, “Relación farmacéutico-paciente-médico: Hablando con los pacientes, negociando con los médicos”, “Seguimiento Fármaco terapéutico”, “Terapéutica Osteoarticular (artritis, artrosis y osteoporosis”, “Prevención y tratamiento de la obesidad”.

Los interesados pueden dirigirse a:

Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada. Telf. 958 24 06 50, Fax 958 24 06 04, Correo electrónico: congreff@ugr.es y página web: congresoatencionfarmaceuticagranada.org.

Necrológica

El Dr. Mariano Illera Martín, Académico Correspondiente en Madrid desde el 15 de noviembre de 1979, ha fallecido el día 8 de marzo de 2003. El Dr. Illera que ha ejercido como Catedrático de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid durante casi treinta años, era en la actualidad Presidente de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Madrid. El Dr. Illera mantuvo siempre un contacto continuo con la Corporación en cuya biblioteca figura su “Diccionario de Acrónimos con Símbolos y Abreviaturas para las Ciencias de la Salud”, obra de indudable interés y utilidad. Deseamos se encuentre en la Paz del Señor y expresamos nuestro pésame a los familiares.

Necrológica

El Excmo. Sr. D. Manuel Gómez-Serranillos Fernández ha fallecido en Talavera de la Reina el día 25 de marzo de 2003. El Dr. Gómez Serranillos ingresó como Académico de Número en nuestra Corporación el día 31 de mayo de 1979 en la Medalla nº 11. El Dr. Gómez-Serranillos ocupó la Cátedra de Materia Farmacéutica Vegetal en la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela y la de Farmacognosia General y Especial pasando después a la de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, desempeñando los cargos de Vicedecano en ambas Facultades así como los de Consejero adjunto del Patronato Alonso Herrera del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Administrador General de la Universidad de Santiago.

En los últimos años el Dr. Gómez-Serranillos formó parte de la Comisión de Hacienda de nuestra Corporación y presidió la Sección 3ª de Farmacología y Farmacotecnia. Nuestro sentimiento por su pérdida a sus familiares y el deseo de que descanse en la paz del Señor.

Bibliografía

El hombre en llamas. PARACELSO.- Puerto, Javier- 2001 – Científicos para la Historia nº 7/ Nivola libros y ediciones S.L – 155 páginas, ISBN: 84- 95599-24-4.

El libro recientemente publicado por el Profesor Javier Puerto en la colección Científicos para la Historia, glosa la figura de una de las más destacadas personalidades del Renacimiento en el área del medicamento: Teofrasto Bombasto Paracelso von Hohenheim, universalmente conocido por el apodo de Paracelso, quien tuvo una azarosa vida entre los años 1493 y 1541, por su carácter crítico hacia la tradición heredada del medioevo, lo que le valió el ser considerado por sus discípulos y seguidores como un renovador de la terapéutica de su tiempo, mientras era rechazado por las autoridades académicas a las que impugnaba con su vehemencia. Su personalidad contestataria, su acercamiento al pueblo tanto en el empleo de la lengua vernácula y en su atuendo, como en el apoyo a revueltas populares y sus actos histriónicos tales como la famosa incineración pública de la obra de Avicena, le crearon situaciones difíciles que sólo pudo resolver huyendo de una población a otra, abandonando cargos de privilegio y acabando casi en el anonimato.

Así y todo, pese a sus intuiciones novedosas, a los éxitos en curaciones difíciles y a las razonadas críticas de las prácticas acientíficas de su tiempo, no estuvo exento de una mentalidad alquimista e incluso contaminado de supersticiones.

Todo esto queda patente en el presente libro en el que el autor no se limita a la relación escueta de la vida del personaje, sino que dibuja el ambiente renacentista en que se centró la vida del mismo, a lo que añade el estudio de la influencia que ejerció sobre numerosos médicos y pensadores de épocas posteriores, a medida que se extendía el conocimiento de sus obras, varias de ellas de publicación póstuma.

El libro está salpicado no sólo de ilustraciones y viñetas ambientadoras, sino de abundantes textos complementarios recuadrados en forma destacada que glosan aspectos relacionados con el tema como: algunos tipos de medicaciones de la época – *Afrodisíacos y narcóticos, Nombres de algunas formas farmacéuticas, ...* -, teorías y definiciones – *Teoría de las singladuras, la iatroquímica, Los novatores, ...*-, precursores que influyeron en Paracelso – *Ramón Llull, Erasmo de Róterdam, ...*-, seguidores de sus doctrinas – *Gianbattista della Porta, Jhon Dee, ...*-, y otros textos de mayor importancia como: fragmentos de escritos del propio Paracelso – *del Libro de las entidades, Opus paramirum, Cuarto libro pagano acerca de las entidades morbosas, ...*- y en especial el que titula *El hombre en llamas*, en el que el autor da su propio veredicto sobre el personaje, del cual extraigo un párrafo definitorio: “*En la toma de postura de Paracelso influyó su sensibilidad, su apasionada manera de entender la ciencia, la medicina, la naturaleza y las relaciones humanas. Ese es, a mi parecer, su mejor ejemplo: un hombre en llamas, apasionado, inquebrantable, dispuesto a afrontar su propio destino...*”.

Valores también importantes del libro que comentamos son la información sobre las relaciones del personaje con España, los seguidores que en ella tuvo y la existencia de varias de sus obras en bibliotecas y museos nacionales.

ALBERTO GIRÁLDEZ

EL MEDICAMENTO EN EL MUNDO: Europa y Estados Unidos. Un recorrido por los sistemas Sanitarios de los países occidentales. – 2002.- Madrid.- Farmaindustria, Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid y “El Global”.- 136 págs.

Una vez más las publicaciones de Farmaindustria constituyen una ayuda importante para los que se interesen en distintos aspectos del mundo farmacéutico y sanitario en general, pues dan a conocer en números, gráficos y texto conciso, los principales parámetros del tema en cuestión, y no lo hacen de forma abreviada o parcial, sino exhaustiva. Este es el caso, pues, del volumen de 136 páginas editado bajo el patrocinio de Farmaindustria, del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid y del colectivo Contenidos-El Global.

Ya es sugestivo el índice que en doce apartados, cada uno de ellos subdividido en los pertinentes sub-apartados, recoge materias como: *Gasto farmacéutico en España* (causas y evolución), en *Europa* (comparación con el año 2000), *Hacia un mercado único en la Unión Europea*, los *OTC* en la misma, el *Copago en Europa* y la detallada descripción de los *Modelos Sanitarios* en los principales países occidentales (Estados Unidos, Alemania, Francia, Portugal, Bélgica, Reino Unido e Italia).

El desarrollo de cada uno de estos aspectos se hace, como queda dicho, en forma de Tablas y Gráficas en que figuran los datos y las relaciones que de ellos se deducen, todo lo cual viene comentado en el texto correspondiente que, siendo muy completo, no es excesivamente extenso, lo que facilita mucho su lectura, por lo cual resulta de extrema utilidad.

Para recoger los datos que aportan las 197 Tablas y las 41 Gráficas, que contiene el libro, se ha debido realizar una labor muy meritoria de recopilación y de consulta de las diversas fuentes, cuya identificación figura al pie de cada tabla.

Si a todo ello se añade la excelente presentación en papel *couché*, la claridad de las tablas con filas sobre fondo de color alternado para evitar la confusión de los datos y la acertada coloración de sus figuras, se puede calificar a esta publicación como de gran interés para quienes deseen tener una completa información de los temas epigrafiados.

ALBERTO GIRÁLDEZ

* * *

Aguas Subterráneas, Paisaje y Vida. Acuíferos de España.- del Pozo Gómez, Miguel y cols. - 2002, Instituto Geológico y Minero de España, 470 Págs. ISBN: 84-7840-429-5.

Este interesante libro, donado por la bibliotecaria del IGME D^a. Margarita Gutiérrez Gárate, trata de los acuíferos más importantes de España. En sus cinco amplios capítulos se describen las relaciones de sus aguas subterráneas que originan los grandes ríos españoles, como el Ebro, el Guadiana, el Mundo, el Guadalquivir y el Segura; la importancia que tienen sus aguas en el abastecimiento urbano, en las ciudades de Castellón, Jaén, Madrid y Palma de Mallorca; y su influencia en la transformación, que ha supuesto en la economía de distintos lugares de la geografía española, su aprovechamiento.

Es muy importante la relación muy detallada, que se refiere a los humedales y parques naturales tan diversos y extraordinarios originados por la acción de las aguas subterráneas y superficiales, extendidos por toda España. Entre ellos destacan: el Lago de Banyoles, la Laguna de Gallocanta, la Albufera de Valencia, el Delta del Ebro, el Parque de Doñana, los Picos de Europa, la Serranía de Cuenca y el Torcal de Antequera.

La explicación de todos esos lugares interesantes y la relación con sus propios acuíferos está realizada por unos expertos hidrogeólogos conocedores de la realidad de las aguas subterráneas de nuestro variado y admirable país.

Todos los capítulos están ilustrados con unas magníficas y sorprendentes fotografías, que muestran la belleza de todos esos lugares y además se añaden unos instructivos dibujos con los que se interpretan la circulación subterránea de las aguas de cada acuífero.

ANTONIO RAMÍREZ ORTEGA

La Responsabilidad contractual terapéutica en el siglo XXI.- Amarilla Gundin, M. y Amarilla Mateu, N.- 2002.- Madrid, P.E. European Pharmaceutical Law Group. ISBN: 84-607-5059-0.- 239 págs.

La obra se debe a Manuel Amarilla Gundin y Nuria Amarilla Mateu que ocupan respectivamente la Presidencia y la Secretaría del Grupo Europeo de Derecho Farmacéutico y está prologada por D. José Manuel Martínez-Pereda Rodríguez, Magistrado Emérito del Tribunal Supremo quien señala la oportunidad del tema tratado “porque si bien el fármaco ha acompañado a la Medicina y a los cuidados de la salud desde el origen de los tiempos, en época alguna ha alcanzado la extensión de la producción y consumo como en este siglo XXI”.

Tras la introducción, debida a D. Manuel Amarilla, en la que explica que el objetivo de la misma ha sido “un intento de debate sobre una cuestión bastante confusa, legislativa y jurisprudencialmente” y “un claro interés por aquellos proyectos dirigidos a la mejora de la asistencia sanitaria y farmacéutica”; siguen tres capítulos.

El primero de ellos se dedica al “Concepto Jurídico de Actividad terapéutica. Ámbito y situación” y en él D. Manuel Amarilla pone en evidencia que la necesidad de un cambio legislativo en esta materia se está produciendo social y políticamente en nuestra sociedad.

El capítulo II se dedica a “Responsabilidad contractual en la investigación, de fármacos mediante ensayos clínicos, de la fabricación de medicamentos, del registro farmacéutico y la farmacovigilancia, en la prescripción y dispensación de medicamentos. Salvo la parte dedicada a fabricación de medicamentos, realizada por D^a Nuria Amarilla, el capítulo está redactado por D. Manuel Amarilla.

Es interesante la perspectiva que ofrecen los autores respecto a la situación actual no solo en España sino en Estados Unidos de América y en la Unión Europea, la evolución legislativa y jurisprudencial y el análisis de las responsabilidades que incumben al médico y al farmacéutico.

El capítulo III se dedica a exponer las “Perspectivas de la Responsabilidad Contractual terapéutica en la Unión Europea” en el contexto social, legislativo y jurisprudencial actual en Europa.

La obra en su conjunto viene a mostrar, según D. Manuel Amarilla, que las diferentes etapas de la vida del medicamento deben ser reguladas con fórmulas nuevas de compromiso” entre todos los ciudadanos.

Este libro se completa con un Anexo en el que bajo el título “Tribunas” se reproducen diversos artículos escritos por D. Manuel Amarilla en diversos medios de comunicación desde 1999 hasta este año.

Obra pues interesante para los farmacéuticos y para el ciudadano que en algún momento de su vida será paciente y por tanto usuario de un bien público como es “el medicamento”. Ambas partes están unidas por una relación de carácter contractual y tienen unas obligaciones concretas que cumplir que quedan expuestas de forma detallada en la obra bajo el prisma de dos profesionales del Derecho.

M^a CARMEN FRANCÉS

Colección particular.- Olalla, J. Félix.- 2002.- Madrid.- Arte Infantas.- 86 págs.

José Félix Olalla, farmacéutico y poeta, nos ofrece en esta obra una visión personal, fraguada en su imaginación, de una obra pictórica distribuida en cinco salas: Entrada, Sala Central, Sala Tercera, Habitación privada y Galería de retratos. Los lienzos debidos a 32 pintores de diversas épocas y a artistas contemporáneos conocidos del autor le sugieren a través de sus bellas imágenes y entornos unas ideas poéticas que, como dice José María Cabodevilla en el epílogo o trastero, enseñan a “saper vedere” ya que es el “irrenunciable objetivo para pintores y poetas. Y José

Félix Olalla nos enseña a contemplar, a través de su poesía algunas de las obras pictóricas de autores diversos, entre las que figuran unas tan conocidas como: la primavera de Boticelli, el Niño mendigo de Murillo, Adán y Eva de Alberto Durero, la lección de Anatomía de Rembrandt, La Balsa de la Medusa de Géricault, la noche estrellada de Van Gogh, Bailarina en escena de Dégas, Pintura con tres manchas de Kandisky, Retrato de Giovanna Tornabuoni de Ghirlandaio, etc...

Con esta obra José Félix Olalla suma un libro más a su producción poética que tiene su lugar en el mundo de la cultura.

M^a CARMEN FRANCÉS

* * *

Genética y Bioética.- Lacadena Calero, Juan Ramón.- Cátedra de Bioética de la Universidad Pontificia Comillas. Madrid.- Editorial Desclée De Brouwer, S.A.- Impreso por RGM, S.A en Bilbao, España.- 719 págs.

Empezaré por decir que la calidad científica de este libro, digno de consultar con frecuencia, viene avalada por la capacidad docente e investigadora de su autor, D. Juan-Ramón Lacadena, Doctor Ingeniero Agrónomo. Catedrático y Director del Departamento de Genética de la Facultad de Biología en la Universidad Complutense de Madrid. Es Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia (RANF) y Correspondiente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Miembro del Comité Científico de la Sociedad Internacional de Bioética y Presidente de la Comisión de Bioética de la RANF. Ha escrito varios libros sobre Genética y tiene publicados más de cincuenta trabajos relacionados con la especialidad de Bioética. En 1985 fue nombrado Experto de la Comisión Especial del Congreso de los Diputados para el “Estudio de la Fecundación in Vitro y la Inseminación Artificial” y, desde 1998, mantiene una página web sobre Genética y Bioética, promovida por

el Centro Nacional de Información y Comunicación Educativa del MECD.

El autor, en su doble vertiente académica, se ha dedicado por entero y durante no pocos años a la profesión docente e investigadora en el campo de la Genética y se ha interesado, además, por las implicaciones éticas de esta Ciencia, tanto en lo referente al ser humano como en todo aquello que se relaciona con animales, plantas y medio ambiente. El propio autor declara en el prólogo su propósito de abarcar en esta publicación, desde un planteamiento puramente científico de la temática genética, hasta las posibles consecuencias éticas que la sociedad humana siempre está obligada a tener en cuenta.

La obra está estructurada en dieciséis capítulos con la bibliografía de referencia que le corresponde y dos apéndices en los que se informa de los posibles libros de consulta en español. En el capítulo primero, el lector se sentirá atraído por la clara exposición de cómo las leyes que intervienen en la transmisión de caracteres biológicos de padres a hijos y el papel de los genes resultan imbricados, a través de pautas de comportamiento, en los diversos aspectos culturales, religiosos y éticos de cada persona. Con ello, el autor justifica que una Ciencia imparable y dinámica como la Genética, esté obligada a cumplir ciertas condiciones que han dado lugar al nacimiento de la Bioética, cuyos orígenes y desarrollo histórico con amenidad relata; al mismo tiempo puntualiza cómo toda manipulación genética ha de atenerse a un conjunto de normas éticas y jurídicas que van a justificar la existencia del proceso bioético.

En los capítulos segundo al quinto, el Dr. Lacadena trata ordenadamente las distintas fases de la reproducción humana y hace interesantes consideraciones genéticas sobre cuando un ser humano, según los distintos puntos de vista científico, filosófico y religioso, se convierte en un individuo único y por tanto irreplicable. Seguidamente se ocupa de diversas técnicas de procreación por medios no naturales como la inseminación, fecundación y la tan polémica clonación, para la que tiene una dedicación muy particular en el capítulo quinto. Estos estudios sobre la reproducción humana se complementan, en el capítulo sexto, con un examen relativo al conocimiento genético diferenciador de sexo y comportamiento

desde el punto de vista de la sexualización del cerebro y de una participación hormonal en dicho proceso.

El capítulo séptimo está dedicado al estudio del proyecto genoma humano (PGH), así como al futuro del mismo hacia una Medicina Genómica y también al de una posible Farmacogenómica en beneficio de la humanidad, a la vez que analiza los problemas éticos y legales frente a la sociedad. A este estudio, siguen otros cuatro interesantes capítulos relativos a la práctica de una Terapia Génica y sus limitaciones éticas (capítulo octavo); a la Genética del Comportamiento y deficiencia mental con sus problemas de afectividad (capítulo noveno); a la problemática de la Eugenesia y del Asesoramiento Genético, al mismo tiempo que revisa los aspectos jurídicos y éticos (capítulo décimo); y también, al estudio de una Genética Forense (capítulo undécimo), en el que el autor analiza la problemática judicial derivada de asesoramientos sobre variabilidad genética y sus aspectos éticos y legales.

Otros aspectos bioéticos de la Genética que cabe considerar por separado en este trabajo del Dr. Lacadena, se incluyen en los capítulos decimosegundo y decimotercero, que están dedicados a la mejora genética de plantas, animales y alimentos con sus riesgos potenciales; así como la legislación relativa a estas prácticas biotecnológicas que tantos aspectos positivos tienen para la Economía en la nominada “evolución verde” y en el establecimiento de Granjas Farmacéuticas con aplicación al origen de animales utilizables como modelos de experimentación, y también para la producción de moléculas terapéuticas mediante manipulación genética en animales transgénicos. En todos estos casos habrá de tenerse en cuenta una Bioética global defensora de la biodiversidad y su influencia para el medio ambiente.

En el capítulo decimocuarto, dedicado a Mutagénesis y Sociedad se establece una relación entre los conceptos genotipo, fenotipo y ambiente y sus interacciones posibles. Todo ello, en una triple aproximación al problema, es lo que conduce al autor al concepto del “hombre como mediatizador de la evolución” para continuar, con un decimoquinto capítulo, en el que el Dr. Lacadena estudia la Evolución Biológica y Cultural de la Humanidad producida por las progresivas variaciones cuali y cuantitativas del ADN en las formas más primitivas de la vida, afectando a órganos

sensoriales hasta llegar a producir las consiguientes alteraciones del comportamiento social, que llevan a establecer un paralelismo entre evolución biológica y evolución cultural. Existe un decimosexto capítulo dedicado a documentos de ámbito internacional que se refieren a normativas aplicables a la Bioética.

Terminaré esta reseña señalando que el libro está cuidadosamente editado y cuenta con el respaldo de la Universidad Pontificia Comillas al incluirle entre las Monografías que su Cátedra de Bioética mantiene para temas relativos a normas éticas y jurídicas derivadas de esa realidad científica que la Genética representa. Cabe resumir que estamos ante una obra de consulta que por su relevancia documental puede servir de texto de referencia, tanto a profesores e investigadores como a todas aquellas personas que, aún ajenas a esta Ciencia, estén interesadas por el diálogo entre la Genética y la Moral desde el principio al final de la vida humana. Es muy útil para cuantos intenten atravesar el intrincado bosque de la manipulación genética, en el que opiniones – a veces contrapuestas y poco informadas- pueden conducir a errores en el campo bioético donde Ciencia y Moral siempre han de marchar de la mano. Produce una verdadera satisfacción el dedicar un tiempo a la lectura de esta magnífica obra.

ANTONIO PORTOLÉS ALONSO

* * *