

ANALES
DE LA
REAL ACADEMIA NACIONAL
DE FARMACIA
PUBLICACIÓN TRIMESTRAL

AÑO LXX	2004	Núm. 2
---------	------	--------

ISSN - 1697-4271

ÓRGANO RECTOR
LA COMISIÓN DE PUBLICACIONES
DIRECTORA:
Dra. M.^a CARMEN FRANCÉS CAUSAPÉ

Coden - **ARAFAY**

SUMARIO

Doctrina

- Recuerdo y desagravio a León Felipe: **Mariano Turiel de Castro** 279

Artículos Originales

- Estudio reológico de emulsiones semisólidas de aplicación cutánea: **Amalia M.^a Rodríguez Bayón, Inés M.^a Paños Pérez** 307
- Estudio teórico del modo de unión entre CDK2 y butirolactona I: **María Luisa García, Beatriz de Pascual-Teresa, Miguel Fernández Braña** 325
- Acción de la procalcitonina sobre la temperatura corporal: **María Luisa Ojeda Murillo** 357

Revisión

- El suelo en la biosfera y su repercusión en la Salud Ambiental: **Antonio López Lafuente, Concepción González Huecas** 381

Manejo farmacológico de las dislipidemias en la prevención de las enfermedades cardiovasculares: Carlos Calvo Monfil	417
---	-----

INFORMACIÓN ACADÉMICA

— <i>Sesiones científicas</i>	429
— <i>Noticias</i>	432
— <i>Necrológica</i>	435
— <i>Bibliografía</i>	439
— <i>Normas para la presentación de originales</i>	457

Depósito legal: M. 3.869-1958

Impreso en Realigraf, S. A - Pedro Tezano, 26. 28039 Madrid

ANALES
DE LA
REAL ACADEMIA NACIONAL
DE FARMACIA
PUBLICACIÓN TRIMESTRAL

AÑO LXX	2004	Núm. 2
---------	------	--------

ISSN - 1697-4271

ÓRGANO RECTOR
LA COMISIÓN DE PUBLICACIONES
DIRECTORA:
Dra. M.^a CARMEN FRANCÉS CAUSAPÉ

Coden - **ARAFAY**

SUMARY

Doctrine

León Felipe's remembering and amends: **Mariano Turiel de Castro** 279

Original Papers

Rheological study of semisolid emulsions for percutaneous application: **Amalia M.^a Rodríguez Bayón, Inés M.^a Paños Pérez** 307

Theoretical study of the binding mode between CDK2 and butirolactone I: **María Luisa García, Beatriz de Pascual-Teresa, Miguel Fernández Braña** 325

Procalcitonin action on body temperature: **María Luisa Ojeda Murillo** 357

Review Article

Soil in the biosphere and its impact on Environmental Health: **Antonio López Lafuente, Concepción González Huecas** 381

Pharmacological management of the dyslipidemia regarding prevention of the cardiovascular illnesses: Carlos Calvo Monfil	417
---	-----

ACADEMIC NEWS

— <i>Scientific sittings</i>	429
— <i>News</i>	432
— <i>Obituary notice</i>	435
— <i>Books review</i>	439
— <i>Rules for originals publication</i>	457

Recuerdo y desagravio a León Felipe *

ILMO. SR. DON MARIANO TURIEL DE CASTRO
Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional
de Farmacia

RESUMEN

En su discurso estudió y analizó la obra, el pensamiento y la personalidad del famoso poeta-farmacéutico León Felipe, dedicando sus palabras al recuerdo emotivo del autor y a la divulgación amorosa de su obra, para remarcar la talla que, en nuestros días, por fin, se le reconoce universalmente, señalándole como una de las voces más recias de la Hispanidad.

La figura de León Felipe, en un permanente contraste de luces y sombras, de sueños y duelos, de ilusiones y desencantos, encarna, como nadie, el alma, el ser de una Castilla recia y dura y, por extensión, de una España tremenda y difícil; y, sobre todo, el de una generación de autores de inmensos valores, a la que se ha desconocido, olvidado o escondido.

Al seguir su peripecia vital y la parición de sus obras, fue ilustrando las situaciones y apoyando sus argumentos, en el recitado de una preciosa selección de los versos de León Felipe.

Palabras Clave: León Felipe.— Biografía.— Farmacéutico.— Poeta.

ABSTRACT

León Felipe's remembering and amends

In his speech he studied and analysed the work, the thought and the personality of the famous poet-pharmaceutical León Felipe, dedicating his words to the author's moving memory and the loving popularisation of his work, to stress

* Discurso de toma de Posesión como Académico Correspondiente, pronunciado el día 19 de junio de 2003 en la Real Academia Nacional de Farmacia.

the size that, nowadays and finally, he is recognized universally, pointing out him like one of the heftiest voices in the Hispanity world.

The figure of León Felipe, in a permanent contrast of lights and shades, of dreams and bereavements, of illusions and disillusionments, shows as anybody, the soul, the being from a hefty and hard Castilla, as well as a tremendous and difficult Spain; and because of that, mainly, a generation of authors with huge values, which has been ignored, forgotten or hidden many times.

Because of following his vital and special life as well as his works, he could illustrate the situations and support their arguments, in the recited of a beautiful selection of the León Felipe verses.

Key words: León Felipe.— Biography.— Pharmacist.— Poetry.

Hace hoy, justamente, un año, que en el Salón Rojo de esta Casa, contiguo a éste hermosísimo en el que ahora nos encontramos, celebrábamos un acto muy singular y similar al de hoy; y, que por supuesto, yo consideraré de enorme trascendencia.

Decía entonces, que no me cabía la menor duda, de que alguien, desde el cielo, había hecho posible, para mí, tanta felicidad.

Y hoy, forzosamente, he de repetir algo parecido, porque no puede ser casualidad que, sin previo acuerdo, un año después, en la misma fecha, vuelva yo a esta Docta Casa, para ser recibido en el seno de una Corporación por la que siento, desde siempre, un enorme respeto, una inmensa admiración y una fidelísima devoción.

El acto es ciertamente similar; pero en esta ocasión, especialísimo. Porque esta Casa es, quizá, la sede más notable de la Farmacia Española. No podemos olvidar que en ella se impartieron, prácticamente, los primeros estudios de mi amada profesión farmacéutica; y en ella se rinde culto a la misma de la mejor forma que es posible hacerlo, con amor, con rigor, y con laboriosidad.

Por eso, no puedo continuar sin hacerles a todos ustedes una sencilla y sincera confidencia.

En pocas ocasiones, a lo largo de mi vida, me he sentido, a la vez, tan cohibido y tan satisfecho, como esta tarde, al tomar la palabra en este acto.

Cohibido, por la responsabilidad que contraigo al hablar ante tan ilustre auditorio; y por hacerlo en una ocasión tan solemne como es

la generosa recepción que se me hace, hoy, en esta Real Academia Nacional de Farmacia.

Y satisfecho, porque sería una evidente falsedad, negar el legítimo orgullo con que esta tarde me acerco a tan docta corporación, agradeciéndole su afectuosa acogida, y ofreciéndole, para siempre, en pago, con toda humildad, pero también con todo entusiasmo, mi más leal y voluntariosa colaboración.

Ciertamente creo poder afirmar, con total justicia y sinceridad, que, en realidad, yo no tomo hoy posesión en la Real Academia Nacional de Farmacia; sino al contrario, es la Academia la que toma posesión de mí, para todo y para siempre.

Hace muchos años, siendo un joven recién licenciado, y de la mano de mi maestra, la recordada y llorada Profesora Dra. Pilar Herrero, comencé a asistir a los actos académicos de la entonces Real Academia de Farmacia, donde quedé deslumbrado por la solemnidad de los mismos, el admirable marco donde se celebraban, la altura y rigor intelectual de los intervinientes, y la fama y el prestigio inigualables de los académicos que, poco a poco, tuve la inmensa fortuna de ir conociendo.

Aquellas figuras me parecían a mí, entonces, y siguen pareciéndome hoy, inalcanzables; y nunca pude soñar que un día llegaría a encontrarme tan cerca de ellas, aunque fuera ocupando el último y más humilde sitio al lado de tan ilustres y renombrados maestros.

Ha pasado mucho tiempo y han ocurrido muchas cosas. Y hoy, sin que acierte muy bien a explicarme el porqué, recibo el inmenso honor de incorporarme a la Real Academia Nacional de Farmacia y disfrutar de la vecindad, de la compañía, de la amistad, del consejo, la comprensión y la amabilidad de sus Académicos, que siguen siendo, como antes, las figuras más señeras de nuestra profesión, en todos sus campos y en todos sus aspectos.

Puesto a indagar sobre las causas que hayan podido confluír para propiciar mi ingreso, yo pienso que sólo pueden ser tres, a mi ver, las razones de mi acceso a este estrado.

Por un lado, y en primer lugar, la generosidad de esta docta corporación que me ha tendido su mano amiga para que ello sea así,

no tanto por mis posibles merecimientos, como por su constante y probada bondad.

Por otra parte, con ello veo hoy, desproporcionadamente, premiados mis muchos e ilusionados esfuerzos por defender, con amor, tesón e ilusión, mi profesión farmacéutica, y mi concienzudo, aunque humilde y sencillo, trabajo en los diversos campos de la misma que he cultivado.

Pero todo esto no se hubiera podido producir, si no hubiera tenido la fortuna de recibir, en el desarrollo de mi tarea, ese don especial y gratuito, esa «chispita» de acierto que sólo Dios nos puede dar cuando se lo suplicamos vehementemente.

Recordaba hace pocos días la Presidenta del Instituto de España, en su reciente y magistral discurso de ingreso en la Real Academia Española, que Max Delbrück, padre de la genética molecular, se preguntaba, allá por los años 1950: «Si uno no tiene cualidades para ser un artista. ¿qué otra cosa puede ser sino investigador?».

Pues bien, para romper este dilema, quienes distamos de ser artistas aunque amemos, valoremos y admiremos el arte, y tampoco podemos calificarnos de investigadores, en el sentido estricto y riguroso del término, tan sólo tenemos una salida, tan sólo nos queda un camino. Y ese camino es el del trabajo continuo, realizado en silencio, pero siempre con ilusión y constancia.

Y nuestro trabajo, sencillo pero exigente, tal vez sirva a otros, más sabios, como incitación y punto de partida para llegar adonde uno no alcanza. Ahí puede estar su mayor y mejor utilidad; y, por supuesto, su más alto premio y reconocimiento.

En este sentido, y para cumplir, de la mejor manera que sea capaz, el protocolo que impone este acto, desarrollaré, como está previsto, el tema titulado «Recuerdo y desagravio a León Felipe».

Quede claro que mi intervención no podría ser, tanto por razón de oportunidad como de capacidad, ni un estudio profundo ni un ensayo erudito sobre tan valioso poeta farmacéutico.

Mi misión, hoy, no puede ser otra que dedicar estos momentos al recuerdo emotivo de León Felipe y a la divulgación amorosa de su obra, para tratar de remarcar la talla que, en nuestros días, por fin,

se le reconoce universalmente, señalándole como una de las voces más recias de la hispanidad.

La figura de León Felipe es una figura especialmente atractiva para cualquier biógrafo. Su vida es un continuo contraste de luces y sombras, de sueños y duelos, de ilusiones y desencantos. Él encarna, como nadie, el alma, el ser de una Castilla recia y dura, y por extensión de una España tremenda y difícil; y, sobre todo, el de una generación de hombres de inmensos valores, a la que se ha desconocido, olvidado o escondido.

Pero permítanme que, antes de entrar de lleno en el tema de mi discurso, dedique, si quiera sea muy brevemente, unas palabras de agradecimiento profundo y sincero a quienes me han ayudado a llegar hasta aquí.

En primer lugar, quiero expresar mi gratitud a los Profesores Doctores D. Antonio Martínez Fernández, D. Angel M.^a Villar del Fresno y D. Manuel Ruiz Amil, que tuvieron la gentileza de ofrecermé su firma, tomando sobre sí la responsabilidad de proponerme.

Otros ilustres académicos se ofrecieron, igualmente para ello; y a estos les estoy, también, profundamente agradecido; pero, como es sabido, el reglamento limita a tres el número de los firmantes.

Mi gratitud, asimismo, y la más cordial, para el Presidente de esta Real Corporación, Dr. D. Juan Manuel Reol Tejada, que ha tenido la bondad de ocuparse de hacer mi presentación, con palabras tan exageradas como afectuosas.

A él, y a la Académica-Secretaria, Dra. Francés Causapé, antiguos y queridos amigos, debo constantes atenciones que hicieron más fácil la resolución del obligado expediente.

En este punto, me parece indispensable dedicar aquí unas breves, pero muy sentidas palabras de afecto y admiración al Dr. Reol. Porque sería ingratitud, por mi parte, no reconocer y agradecer públicamente que una personalidad de talla tan singular, y una figura tan preminente en la vida de la Farmacia Española actual, me haya distinguido siempre con su afecto y su atención, a los que él sabe que yo correspondo, desde lo profundo del corazón y de la forma más sincera.

Y para cerrar este capítulo de agradecimientos, pero no hacerlo de un modo protocolario, sino de forma veraz y sentida, nacida de lo más íntimo, tras reiterarle mi gratitud a la Real Academia Nacional de Farmacia, a mis proponentes, a mi presentador, y a todos ustedes por su gentil presencia y su amable compañía, quisiera dedicar también un cariñoso recuerdo, siquiera sea mínimo en amplitud, y breve en extensión, a todos aquellos a quienes tanto les debo.

Por un lado desearía referirme a todos los que, de un modo u otro, me han ayudado y han contribuido a mi formación, y, por ende, han propiciado mi llegada a esta Real Academia Nacional de Farmacia.

Son tantas las personas a las que debo agradecer su permanente colaboración y apoyo, que la simple relación de sus nombres haría interminable este apartado. Acepto, por tanto, de principio, que no puedo aquí recordarlos a todos; pero declaro públicamente que para todos guardo el más sincero y afectuoso reconocimiento.

Cumplo, asimismo, con satisfacción, el deber de recordar a todos los maestros que han conducido mis pasos por el camino del saber, desde mis profesores de Primera Enseñanza y Bachillerato, hasta los que me formaron profesionalmente, en las Facultades de Farmacia de Santiago de Compostela y de Madrid, así como en la Escuela Nacional de Periodismo.

No debo tampoco olvidarme de tantos compañeros a cuyo lado he trabajado, y de quienes he recibido no sólo ayuda y amistad, sino también valiosísimos ejemplos y enseñanzas.

Y por otra parte, no sería justo cerrar este sentido y sincero apartado de agradecimientos, sin señalar de forma destacada y de manera muy singular, cuanto y cuan eficazmente ha contribuido a mi formación, el cariño y el aliento infinitos recibidos, permanentemente, de toda mi familia, especialmente de mis padres y hermanos; y, ya más recientemente, también, de todos mis numerosos sobrinos.

De mis queridísimos e inolvidables padres he aprendido cuanto de bueno conozco, y de ellos lo he recibido todo, absolutamente todo, en este mundo; y sin ningún género de dudas, de ellos heredaré

mi constante y profundo amor y respeto por la verdad, la justicia y el trabajo; además de una auténtica adoración por la Farmacia.

Y de entre todos mis muy queridos hermanos, he de hacer, hoy, una mención muy especial a mi hermano Daniel, a Rula y a Mary, y al resto de la familia, así como a los muchos amigos que, venciendo dificultosos inconvenientes, han tenido la bondad de venir a acompañarme en un acto tan importante, que marca un hito destacado en la biografía de cualquier persona que haya dedicado su vida con empeño y vocación al estudio.

Por fin, y tal como está anunciado, al tomar esta tarde la palabra, para intervenir en este, para mí, tan emotivo e importante acto, he propuesto dedicar mi disertación al recuerdo y homenaje a León Felipe, nuestro querido poeta-farmacéutico; porque no estará de más insistir en que León Felipe, como muy bien dijo, en su día, y en esta misma tribuna, nuestro Presidente de Honor, el Profesor Santos Ruiz, no fue un farmacéutico-poeta, sino un poeta-farmacéutico, ya que en él lo sustantivo era la lírica y no el trabajo profesional, sin que ello reste importancia a lo adjetivo.

Y aprovecharé la oportunidad que se me brinda, y el honor que representa, para poder referirme a él, tratando de contribuir, así, a recordar y ensalzar la figura y la obra de uno de los poetas españoles, perteneciente al recientemente desaparecido siglo xx, más dignos de nuestra admiración; pero que, por tantos avatares, ha sido, durante mucho tiempo, abandonado al olvido, cuando no intencionadamente silenciado, y dejado, inclementemente, al desamparo de la más cruel e injusta intemperie intelectual.

Es verdad que esta situación no es nueva entre nosotros. Y el propio León Felipe, cual si augurara el porvenir que esperaba a su memoria y a su obra, había dejado escrito, proféticamente:

*Dejadme,
ya vendrá un viento fuerte
que me lleve a mi sitio.*

Su sitio, evidentemente, es el que hoy le asignamos, cuantos amamos el discurso del pensamiento, su expresión literaria, y más concretamente el sublime arte de la poesía. Su sitio, para todos

nosotros, es el que hoy le reservamos, en nuestro corazón, y en el altar de la historia de las letras, quienes nos hemos congregado esta tarde, para honrarle, y para prometerle que nunca más se perderá el recuerdo de su figura y de su ingente obra.

No tendrá ya, en adelante, justificación su verso:

*Los muertos vuelven,
vuelven, siempre, por sus lágrimas...*

Disponiendo, como es lógico en esta ocasión, de un tiempo limitado para evocar a nuestro autor, sólo me cabe hacer algunos sencillos apuntes sobre aquel farmacéutico que tuvo el valor de enfrentarse, un día, consigo mismo, y cambiar el rumbo de su vida, para dedicarla, por entero, a su verdadera e irresistible vocación andariega, que parecía estarle predestinada en su apellido paterno: Camino.

Camino que hizo en soledad, toda su vida, como un romero solitario:

*Cansábame de hacer, día tras día,
la jornada, tan solo y tan callado...
y me quedé apostado
en el recuesto, al borde de la vía,
esperando la santa compañía
de algún lento romero rezagado.
Nadie pasó.
Y esta canción traía
el viento sollozante:
Sigue tu ruta solo, caminante.*

Pero el incansable caminante un día acabará confesando:

*¡Que solo estoy, Señor;
que solo y que rendido,
de andar a la aventura
buscando mi destino!...*

Y es que su destino no acababa nunca de encontrarlo; aunque su camino era distinto cada día, como el de un peregrino, como el de un romero.

Lo escribió así el mismo León Felipe, bajo el título de «Romero solo»:

*Ser en la vida
romero,
romero solo que cruza
siempre por caminos nuevos;
ser en la vida
romero,
sin más oficio, sin otro nombre
y sin pueblo...
ser en la vida
romero... romero... sólo romero.
Que no hagan callo las cosas
ni en el alma ni en el cuerpo...
pasar por todo una vez,
una vez solo y ligero, ligero, siempre ligero.
Que no se acostumbre el pié,
a pisar el mismo suelo.*

Y, ciertamente, él lo cumplió. Y lo cumplió bien. De él se pudo decir, con verdad: llevas contigo el paisaje y el mundo entero es patria para ti. Un mundo en el que siempre estuvo dispuesto, como los viejos guerreros castellanos, a andar a mandobles con obispos y condes, para defender sus libertades.

La enorme y constante andadura de nuestro autor fue múltiple, y, sin duda, a veces, incluso disparatada.

Como piedra menuda (*piedra pequeña, piedra ligera, canto que rueda por las calzadas y por las veredas, guijarro humilde de las carreteras; ni piedra de un palacio, ni piedra de una audiencia, ni piedra de una iglesia*, según sus propias palabras), rodó por todos los caminos. «Unas veces huyendo —deudas, pobreza, horrores...— y otras buscando, buscando, y buscando. Siempre buscando».

León Felipe afirmaba que el destino del hombre, aprendido en los *Libros Sagrados*, es andar. Que podemos nacer en cualquier sitio, pero todos esperamos caminar y caminar hasta nacer de nuevo en una estrella; y añadía: en una estrella de paz, donde no haya, para nadie, espada ni veneno.

Porque la búsqueda de la paz, el afán permanente de encontrar la armonía, y el ánimo sincero de lograr el entendimiento universal, fueron, en suma, su constante preocupación; su maravilloso y eterno quehacer.

Y esa búsqueda la intentó por los mejores caminos que el hombre tiene a su disposición: el del limpio y sincero sentimiento profundo, y el de la más viva y hermosa expresión poética.

El propio León Felipe concluía que el hombre, todos los hombres, peregrinan a lo largo de toda su vida, incansables, hacia esa estrella. Nuestro destino, pues, es andar. Y no se cansaba de repetirlo y de darnos ejemplo de ello.

Y ese destino está escrito en el viento. En ese viento continuo, histórico, intemporal, que, según D. Claudio Sánchez Albornoz, nos trae permanentemente el eco de la voz de León Felipe. Una voz que se confunde con el propio viento:

«Tu voz es el eco del viento; el eco del viento en los encinares, los hayedos, los robledales, los pinares o las alamedas; el eco del viento en las caracolas, en los cuernos y las trompetas de las viejas gestas épicas; el eco del viento que recoge las voces de los mercaderes, los caminantes, los solariegos, los hombres de vehetrería, los clérigos, los juglares, los caballeros, los villanos, los abades, los infanzones o los condes».

Un viento que todos podemos escuchar, un viento que nos llega desde lejos pero con claridad meridiana. Cualquiera de nosotros podría, aún hoy, decirle, verázmente, al poeta-farmacéutico:

Yo he oído tu voz antes de ahora. La he oído resonar incluso en el silencio.

Bien dijo Andrei Sajarov que las voces que realmente cuentan son, muchas veces, las que menos se oyen.

León Felipe, nacido castellano viejo, en 1884, en el pueblo zamorano de Tábara (capital de la rica comarca del mismo nombre), tras unos trashumantes estudios de enseñanza primaria y Bachillerato, iniciados en Salamanca, se fue enamorando, día a día, desde bien pronto, de su tierra, en la que se fue enraizando, cada vez más profundamente.

Si el niño es realmente el padre del hombre que, con el tiempo, va a ser, sus correrías infantiles por Castilla, modelaron para siempre su alma de castellano viejo. Alma que nunca dejó de tener la inocencia propia de los niños, y de mantener la esperanza que caracteriza a los seres nobles y sensibles.

Un verso de León Felipe afirma: «*Que la cuna del hombre la mecen con cuentos*».

Y en esa cuna, y a través de esos cuentos, se va aprendiendo, poco a poco, y en primer lugar, la lengua con la que luego hemos de ser capaces de expresarnos; «...porque la lengua no la aprende el ser humano en el colegio ni en la Facultad. La lengua se aprende en la cuna, de boca de los padres. La lengua, mucho antes de que lleguen el libro y las aulas, entra por el oído. Aprendemos de oído a hablar, aunque luego nos enseñen a ponerlo por escrito...».

Este es el gran valor de la lengua, este es el gran valor de las palabras.

Decía Goethe, en su Fausto, por boca de Mefistófeles: «Doctamente discutís con palabras cada día y, con palabras se impone la teoría más sorprendente. Por eso, tened fe en las palabras: es tal su valor que no hallaréis otro igual».

León Felipe, según su biógrafo Luis Rius, desde bien joven dio tal valor a la palabra, que sus primeros escritos, aún sobre temas irrelevantes, asombran por su claridad y su pulcritud. Cabría añadir que las palabras y los sentimientos fueron, en todo momento, a lo largo de su vida, sus únicas, sus sencillas, pero suficientes e importantísimas armas.

Y aún las palabras le estorbaban para elaborar el verso y llegar a la esencia de la poesía, a la que León Felipe definía así en uno de los poemas de su primer libro:

*Deshaced ese verso,
quitadle los caireles de la rima,
el metro, la cadencia
y hasta la idea misma.
Aventad las palabras,
y si después queda algo todavía,
eso
será la poesía.*

El propio poeta dijo un día: «por hoy, y para mí, la poesía no es más que un sistema luminoso de señales».

Pero, volviendo a su biografía, en su momento (corría el curso académico de 1900 a 1901), comenzó su carrera en Valladolid; y se licenció en Farmacia, en Madrid, años después, en la entonces llamada Universidad Central.

La razón, o más bien las razones, de la elección de sus estudios han sido muy discutidas y puestas en cuestión; pero lo cierto es que, tras un parsimonioso periodo de cursos universitarios, el licenciado farmacéutico Felipe Camino Galicia, que tal era su nombre completo y verdadero, se establece en Santander, con botica propia. Y en ella, como no podía ser de otro modo, es visitado asiduamente por sus amigos y contertulios, que pronto hacen famosa su rebotica.

Pero su vocación por el teatro, aquella fuerte y juvenil vocación que tantas veces había sido la causa de innumerables disgustos para su padre, el serio notario Don Higinio, acaba por imponerse y arrastra al poeta-farmacéutico a la farándula, que tanto atraía a su espíritu bohemio.

El cambio de profesión de farmacéutico por la de actor tuvo el triste resultado previsible, y tras una larga temporada de obligado aislamiento, vuelve al ejercicio profesional, en muy diversos lugares, y en condiciones, a veces, muy poco ventajosas. Pero ese forzado recogimiento que tanto sacrificio le supuso, tuvo para él una virtud, de la que, con el tiempo, todos nos hemos beneficiado.

Así, se ha dicho que, con ocasión de su establecimiento en Almonacid de Zorita, «entra en esta villa el farmacéutico Felipe Camino Galicia, y de ella salió el poeta León Felipe».

De esa época es la tierna y emocionante anécdota de la niña a la que el poeta ve pasar todos los días por delante de su botica y a cuyo entierro, poco después, asiste conmovido.

El mismo nos lo dejó descrito en uno de sus más bellos poemas, situado «en esta tierra de España y en un pueblo de la Alcarria»:

*«¡Oh, esa niña!
Hace un alto en mi ventana siempre*

*y se queda a los cristales pegadas
como si fuera una estampa.*

El poeta la contempla

*¡Qué gracia
tiene su cara,
en el cristal aplastada,
con su barbilla sumida
y la naricilla chata!*

La contemplación revela una ternura conmovedora

*Yo me río mucho mirándola
y le digo que es una niña muy guapa...
Ella entonces me llama
¡Tonto! Y se marcha.*

De súbito el poema cambia de tono: la ternura se torna piedad

*Pobre niña. Ya no pasa
por esta calle tan ancha
caminando hacia la escuela
de mala gana,
ni se para
en mi ventana,
ni se queda a los cristales pegada
como si fuera una estampa;
que un día se puso mala,
muy mala,
y otro día doblaron por ella las campanas.*

Sentimentalmente el poema se abre a la realidad:

*Y en una tarde muy clara,
por esta calle tan ancha,
a través de la ventana
vi como se la llevaban
en una caja muy blanca.*

Y surge la comparación ventana-ataud:

*En una caja
que tenía un cristalito en la tapa.*

Y sigue la persistencia de la contemplación del rostro tras un cristal:

*Por aquel cristal se le veía la cara
lo mismo que cuando estaba
pegadita al cristal de mi ventana.*

Y la impresión ha quedado fija de tal modo en el poeta que se convertirá, para él, en visión existencial:

*Al cristal de esta ventana
que ahora me recuerda siempre
el cristalito de aquella caja tan blanca.*

Si tras leer el poema nos asomamos a la ventana de la botica de León Felipe, comprendemos porqué el poeta concluye:

*Todo el ritmo de la vida pasa
por el cristal de mi ventana.*

Es, pues, auténtico todo. Aquella niña existió y se murió; y el poeta sintió un sufrimiento sincero que dio lugar a tan hermosos versos.

Esta y tantas otras delicadas situaciones, reafirman, definitivamente, su fina pero firme sensibilidad de poeta.

Y bien puede decirse así, ya que por entonces nacieron los dos volúmenes de su primer libro, titulado «Versos y Oraciones del caminante», escrito en un amplio periodo que va desde 1917 al 29.

Pero León Felipe, como caminante impenitente, marcha a otros lugares; en primer término a Madrid, y poco más tarde, a diversos pueblos del Africa colonial española. Pero siempre vuelve a sus lugares de origen. A Valladolid, cuna de sus padres; a Palencia... A otras ciudades y pueblos de la meseta castellana volverá varias veces, en temporadas largas, donde se reafirmó su predilección castellanista, y el acorde de su espíritu con los paisajes y las gentes de la llanura.

A su definitivo regreso a la península, y tras una corta estancia en la capital, emigra a América, donde los Estados Unidos le reciben alborozados.

Allí fue un brillante profesor de literatura que ejerció notable influencia sobre sus numerosos alumnos, que se sentían inmediatamente atraídos por su enorme personalidad.

Clases, amistades, y hasta el matrimonio encuentra León Felipe en tierras americanas. Bertha Gamboa sería su compañera, fiel y amadísima, hasta su fallecimiento, ocurrido once años antes que el del poeta, que murió en Méjico en 1968.

Volviendo al recuerdo de su obra, hay que señalar que, en 1933, aparece un nuevo libro de León Felipe titulado «Drop a Star». Tanto en él como en los anteriores se hace bien patente la característica que había de dominar toda su obra de esta primera época: su expresión apasionada y torrencial que rompe todos los moldes del subjetivismo formalista, vigente en la época.

Casi no es necesario recalcar que la de León Felipe es una poesía prácticamente hablada, no escrita. Los rasgos sobresalientes de su estilo siempre corresponden, en efecto, a una expresión oral. En este sentido podríamos calificarla de poesía juglaresca, con la cual el poeta se dirige de viva voz a sus lectores, es decir, a su oyente, haciéndole intervenir en ella, a veces de un modo excesivamente directo. Y en ocasiones incluso preguntándole abiertamente. El carácter hablado de la poesía de León Felipe le da a ésta una gran movilidad que es, si bien se mira, donde radica su mejor virtud, su vitalidad eterna.

Como León Felipe sigue sin encontrar ubicación definitiva, la guerra civil le sorprende en España, en una de sus numerosas idas y venidas; y tras una larga peregrinación, que pasa por Valencia, Barcelona y París, cruza de nuevo el Atlántico, para establecerse, a finales de 1938, en Méjico, donde había de permanecer durante siete años.

«No comparte, por tanto, la lucha con un bando definido, pero se convertirá en portavoz de la España peregrina y desde la lejanía cantará a la patria entrañable».

Las experiencias de la guerra y del exilio nutren libros como: «El payaso de las bofetadas» (1938); «El hacha» (1939); «Español del éxodo y del llanto» (1939); «El gran responsable» (1940), y «Ganarás la luz» (1943).

La influencia de su gran amigo el famoso poeta americano Walt Whitman (de cuya obra publicó una admirable traducción en 1941) es visible en su poesía áspera e intensa, que muestra una voluntad realista y coloquial.

A partir de 1945 viajó por diversos países de América del Sur, y a este último periodo pertenecen obras como «La antología rota» (1947); «Llamadme publicano» (1950); «Belleza cruel» (1958), y «El Ciervo» (1958).

Su obra es amplia y variada, y en toda ella, su preocupación por la Patria lejana no le abandonará nunca, pese a la enorme distancia que le separaba de la misma. En Méjico dejó esculpidas sobre las hojas de un periódico mejicano, que supo navegar libremente por las dos orillas atlánticas, unas palabras tan duras como certeras, y a la vez tan tristes como esperanzadoras:

«Hermano... tuya es la hacienda... la casa, el caballo y la pistola... Mía es la voz antigua de la tierra. Tú te quedas con todo y me dejas desnudo y errante por el mundo... Mas yo te dejo nudo... ¡mudo!... Y ¿cómo vas a recoger el trigo y a alimentar el fuego si yo me llevo la canción?»

De los días de su llegada a Méjico, junto con la oleada de exiliados españoles, data una curiosa anécdota que me relató, de primera mano, el embajador de España D. Manuel García-Miranda y Rivas. Tras conocer que a varios compañeros de su grupo le habían ocurrido una serie de calamidades, en una conversación que el poeta mantenía con su gran amigo Alfonso Reyes, trataba éste, inútilmente, de animarle, ante la situación que se les presentaba. León Felipe cerró la conversación tajantemente: «No insistas Alfonso, estamos perdidos; porque Dios ya nos ha localizado».

Cuando él volvió a América, los españoles del «éxodo y el llanto» se miraban de reojo unos a otros, y se trataban entre sí con hostilidad; nunca se reunían a platicar fraternalmente; jamás se habían congregado en torno a una mesa. Tantas eran sus diferencias. Pero

llegó León Felipe y aquellas diferencias se borraron, para aplaudir, todos juntos, sus metáforas, sus apóstrofes, sus sarcasmos y sus versos. Desde entonces se les pudo ver sentados, todos juntos, y compartir con él el pan, y beber el vino del exilio. ¡Milagro, milagro suyo, milagro de su genio!

Por supuesto, no es posible, en esta ocasión, hacer una verdadera biografía de un personaje tan apasionante; ni menos aún un sucinto comentario de cada una de sus obras, ni casi tan sólo relacionarlas; pero no sería justo dejar de señalar que su voz, venida desde lejos, y escuchada con devoción a través de los años, envuelta aún en el misterio de los ecos intemporales, sigue siendo una de las más íntimas y hermosas, y a la vez, una de las más resonantes, convincentes y arrolladoras.

Su desprendimiento del tiempo y del espacio llegan a hacerse virtud en sus versos:

*«Yo no sé como soy...
y no sé lo que quiero...
y no sé a donde voy
cambiando, inquieto, siempre, de sendero...
Algo espero, sí, pero...
¡No sé, tampoco, lo que espero!»*

Esta duda, esta inquietud fue una constante en su vida; pudiera decirse, sin exagerar, que llegó a ser como un dogma de fe, en su programa vital.

Han pasado muchos años, y León Felipe ha sido, al fin, reconocido, estudiado, recordado y admirado.

Insisto en que no cabe aquí, tampoco, ni intentar un análisis de su estilo, ni acotar los temas de su preferencia; pero no se pueden silenciar, porque no se le pueden negar, ni ignorar, algunas notas que le definen y le singularizan.

Aunque, para juzgar sus versos, y sobre todo su intencionalidad, son suficientes sus propias palabras:

*¡Oh, pobres versos míos,
hijos de mi corazón,*

*que os vais ahora solos y a la aventura por el mundo.
 que os guíe Dios!
 Que os guíe Dios y os libre
 de la declamación:
 que os guíe Dios y os libre
 de la engolada voz;
 que os guíe Dios y os libre
 del campanudo vozarrón;
 que os guíe Dios y os libre
 de caer en los labios sacrílegos de un histrión.
 ¡Que os guíe Dios!... Y Él, que os sacará
 de mi corazón,
 os lleve
 de corazón
 en
 corazón.*

Queda claro que su sentimiento, su inspiración, su sueño, su deseo es lo único que cuenta.

Si es verdad que sólo porque D. Quijote cree verlo en una prosaica bacía de barbero, adquiere el yelmo de Mambrino su poesía encantada, para León Felipe todo es poesía o no es nada. Y así, cuanto escribe, sea verso o prosa, está inundado de poesía, poesía con la que supo cantar a la muerte y a la vida, al dolor, a la rabia, a la justicia, al misterio del hombre y al misterio de Dios. Poesía que nos trae los mensajes del más allá o del más acá, del nacer o del morir, y hasta del tronar de la nube tras la que grita Dios.

Al recuerdo del inmortal Quijote vuelve, una y otra vez, para identificarse con él y hasta para pedirle, ya abatido, que le acepte a su lado. Así lo expone en estos conocidísimos versos que han sido incluso musicados y convertidos en conocida canción popular:

*Por la manchega llanura
 Se vuelve a ver la figura
 De Don Quijote pasar...
 Va cargado de amargura...
 Va, vencido, el caballero de retorno a su lugar.
 Cuántas veces, don Quijote, por esta misma llanura*

*En horas de desaliento así te miro pasar...
 Y cuántas veces te grito: Hazme un sitio en tu montura
 Y llévame a tu lugar;
 Hazme un sitio en tu montura
 Caballero derrotado,
 Hazme un sitio en tu montura
 Que yo también voy cargado
 De amargura
 Y no puedo batallar.
 Ponme a la grupa contigo,
 Caballero del honor,
 Ponme a la grupa contigo,
 Y llévame a ser contigo
 Pastor...*

Porque según él mismo explicaba, triste y desencantado:

*Ahora a mi me sucede
 lo contrario que al hidalgo manchego:
 que tomo por rebaños
 los ejércitos.*

Sus temas son épicos, sociales, religiosos, ascéticos y siempre trascendentes; el viento castellano que habla por su voz no es una suave brisa musical de primavera, sino el rugir del huracán que precede y acompaña a la tronada. Su voz es la del viento que agita a las alamedas o los encinares castellanos, que dobla el trigo en flor, limpia la paja de la era, trae olor a tomillo o a romero, seca el adobe, hace girar las veletas de torres y espadañas, pobladas de plantas y cigüeñas, y aulla en las plazas y callejas de las ciudades, de las fortalezas y de los templos de Castilla.

Su voz, en consonancia con su carácter, recorre todo un amplio diapasón que va de las sacudidas eléctricas a la somnolencia y el letargo, que tras los ascensos bruscos preludia las caídas verticales, que acepta el fatalismo y se encara con todo, en claro desafío al mundo, que representa el ímpetu arrollador, como flecha disparada hacia el mañana, y admite las fuerzas estáticas que aprisionan la voluntad en el ayer. Como el eterno claroscuro de la historia, así es el alma y la poesía de León Felipe.

Por todo ello, él representa una lírica independiente, expuesta en una densa obra, comprometida con la realidad de su tiempo, íntimamente vinculada a cuanto le rodeaba, y sellada con la impronta de la sinceridad.

Con razón dijo, de él, Max Aub: «León Felipe es, él sólo, una generación aparte». Añadiendo: «Imagen viva, desolada y desollada de nuestra España, empalada en una misión sangrienta de la Historia».

Vicente Aleixandre le llamó «poeta en horas de tribulación, capaz de hablar al hombre como amigo supremo de la libertad».

Otro Nobel, Camilo José Cela, dijo de él que era «espejo en el que los hispanohablantes del mundo entero, que somos legión, debemos mirarnos, por su honestidad y por su valor».

Y otros dos Nóbeles más, éstos de la América Hispana, Pablo Neruda y García Márquez, dejaron bien clara su predilección por el poeta de Tábara. Para el primero, León Felipe era como «un infolio joven y amarillo en el que todos los versículos, la sabiduría y la ternura, estaban escritos».

Por su parte, Gabriel García Márquez, dijo una tarde, en Bogotá, en casa de Belisario Betancur, que León Felipe llevaba en sus venas toda la sangre del hombre, que estallaba a borbotones en sus versos. Y se preguntaba: «¿Será posible que con el renacer cultural que vivimos, nadie sea capaz de articular una fórmula para que no se disperse, ni se pierda, la obra de León Felipe? Algo así como una Casa de la poesía, o del Hombre Peregrino, ese que él fue, que acoga su obra, mística y castellana, y sea lugar de encuentro para los jóvenes creadores».

La preocupación de García Márquez, respecto al destino de la obra de nuestro autor, afortunadamente ya ha desaparecido. El Ayuntamiento de Zamora ha conseguido el milagro de recuperar la valiosísima documentación que se conserva sobre León Felipe. Documentos, biblioteca, enseres personales, y hasta recuerdos del poeta de Tábara están ya en Zamora, que los acogió, recientemente, y para siempre. Allí está la obra mística y castellana de León Felipe, el legado de un poeta, de un pensador, de uno de nuestros intelectuales más lúcidos y de más talento.

De este modo, el poeta farmacéutico, si quiera sea metafóricamente, ve cumplido su deseo de volver a Castilla la Vieja, a esa Castilla que no es ni épica ni guerrera, pero sí levadura de España.

Sus propios versos nos advierten claramente de su deseo:

*«¡Oh, luz, luz y amor de mi vida!
¡Luz altanera de Castilla!
¡Tú que me recibiste al nacer,
amortájame cuando muera!»*

León Felipe regresó definitivamente a su tierra zamorana. A través de su obra y de sus recuerdos, el poeta, desde hace algo más de un año, está de nuevo, y para siempre, entre nosotros.

Con ocasión de este hecho, el magnífico periodista Jesús Fonseca, se refirió a él como «el poeta más universal de Castilla».

Y Margarita Arroyo, nuestra Margarita Arroyo, también poeta y también farmacéutica, considera a León Felipe como alquimista de palabras, conceptos y sentimientos.

Por otra parte, no hace mucho, se ha publicado una tesis doctoral, de la que es autor nuestro compañero Ángel del Valle, en la que se estudia la vida y la obra de varios poetas farmacéuticos; y por supuesto, en dicha tesis, no falta un capítulo dedicado a León Felipe, con el mejor ánimo de contribuir a divulgar el conocimiento de su vida y su obra.

Sobre León Felipe se ha escrito mucho. Poeta caminante, poeta universal (como lo demuestra su influencia en las universidades americanas), son muchos sus vínculos con la generación «beat». Con ellos compartió el inconformismo político, el rechazo a la sociedad del hartazgo, la crítica a la soberbia occidental y, sobre todo, la vida errante, de estación en estación en el tren de su destino, abierto a cualquier horizonte humano.

Como para todo poeta, amor y soledad son, también para León Felipe, dos continuas fuentes de inspiración; pero que en este «infatigable Romero» (como le llamó Rafael Morales), se muestran del modo más auténtico, en un continuo esfuerzo en busca de la verdad, de la verdad desnuda y sencilla.

Su verso, tantas veces encuadrado en el tópico de la poesía moderna, da pie a la vieja controversia de la lírica y la poesía. Pero, para valorar seriamente al poeta del éxodo y del llanto, se ha de empezar por aceptar que tradición y modernidad son aliadas inseparables, y que toda auténtica renovación se fragua en el transcurrir del tiempo.

León Felipe, español hasta la médula, se rebeló ante las ruinas de su época; pero lo hizo mostrando su fe y su confianza en el futuro:

*«Se ha muerto un pueblo,
pero no se ha muerto el hombre».*

Añadiendo, en otros versos:

*«Españoles,
españoles del éxodo y del llanto:
levantad la cabeza
y no me miréis con ceño,
porque yo no soy el que canta la destrucción,
sino la esperanza...»*

León Felipe, al finalizar el poema inicial de «¡Oh, ese viejo y roto violín!», se autorretrata así:

*Y el poeta que escribe estos versos
también es viejo y feo...
Y también llora.
Y no sabe tampoco porqué llora...
Pero si no llora de verdad...
¡tampoco hay poema!*

Y es que el dolor, según escribió no hace mucho el joven novelista actual Juan Manuel de Prada, es el sentimiento más fértil de cuantos existen, más fértil incluso que el rencor, especialmente en la producción literaria.

Personalmente recibí, en momentos de gran desconsuelo, un consejo que entonces me pareció sin sentido y que hoy reconozco me fue utilísimo. Ante una desgracia familiar, mi gran amiga Blanca

Álvarez, conocida de todos los telespectadores españoles, me insistía una y otra vez: ¡escribe!, ¡escribe!, es la mejor manera de echar fuera el pesar que llevas dentro y es lo mejor que puedes dejar a los demás.

Finalmente, creo obligado poner de manifiesto lo que Gerardo Diego llamó su religiosidad fundamental. Por supuesto, León Felipe no era practicante, pero tampoco agnóstico, como se ha repetido.

Su coloquio con Dios era directo y constante.

Él declaraba: *«mi voz es opaca y sin brillo, y vale poca cosa para reforzar un coro. Sin embargo, me sirve para rezar yo sólo bajo el cielo azul».*

Si al decir de Séneca, en todo hombre bueno habita Dios, León Felipe nunca anduvo muy lejos de Él.

Prueba singular de ello es que, en todas sus obras, pero más frecuentemente en sus «Oraciones del caminante», son constantes sus miradas a lo eterno. Su Dios —vecino inabarcable— le hiere, y le signa, y le llama desde lejos. Y él le responde, aunque lo hace desde su altar de tierra. Pero nunca se olvida de él:

*«Nadie fue ayer,
ni va hoy,
ni irá mañana,
hacia Dios,
por este mismo camino
que yo voy.
Para cada hombre guarda
un rayo nuevo de luz el sol..
y un camino virgen
Dios».*

Y en unos sinceros y descarnados versos que el poeta tituló escuetamente «Oración», no se recata de afirmar paladinamente:

*Señor,
yo te amo
porque juegas limpio:
Sin trampas —sin milagros—;
porque dejas que salga*

*paso a paso,
sin trucos —sin utopías—;
carta a carta,
sin cambiazos,
tu formidable
solitario.*

Pocos hombres como León Felipe gustaron tanto de la poesía mística y ascética; y pocos poetas supieron, como él, inspirarse en la misma.

Un ejemplo explícito de todo ello, lo tenemos cuando glosa estos versos de Fray Luis de León:

*Y dejas, Pastor Santo
tu grey en este valle hondo, oscuro...*

Y compone este denso, sugestivo y hermoso poema:

*Aquí vino
y se fue.
Vino..., nos marcó nuestra tarea
y se fue.
Tal vez detrás de aquella nube
hay alguien que trabaja,
lo mismo que nosotros,
y tal vez las estrellas
no son más que ventanas encendidas
de una fábrica
donde Dios tiene que repartir
una labor, también.*

*Aquí vino
y se fue.
Vino..., llenó nuestra caja de caudales
con millones de siglos y siglos,
nos dejó unas herramientas...
y se fue.*

*Él, que lo sabe todo,
sabe que estando solos,*

*sin dioses que nos miren,
trabajamos mejor.*

*Detrás de ti no hay nadie. Nadie.
Ni un maestro, ni un amo, ni un patrón.
Pero tuyo es el tiempo.
El tiempo y esa gubia
con que Dios comenzó la creación.*

Al final de su vida reconocía: «soy un viejo pobre y un pobre viejo», pero, desde bien joven, la vida de León Felipe adquiriría un verdadero, un mayor y mejor sentido, al ser puesta, siempre, al servicio de los demás. Esto le marcaba, según sus propias palabras, «el ritmo de la vida y del alma». Por eso, también a él cabría aplicarle aquellas palabras de San Agustín: «Somos como niños jugando a la orilla de la eternidad, porque, querámoslo o no, Dios es nuestro Padre».

Y León Felipe, pese a sus dudas y hasta a sus negaciones, al reflexionar, tantas veces, ante la Cruz de Cristo, como síntesis del amor divino, nos deja entrever su pensamiento. Su palabra, desnuda de afectaciones, nos revela la sencillez de su pensar y de su sentir, de su alma y de su corazón. Y todo ello lo expresa en estos versos humanos y sinceros:

*«Más sencilla... más sencilla.
Sin barroquismo,
sin añadidos ni ornamentos,
que se vean desnudos
los maderos,
desnudos y decididamente rectos.
Los brazos en abrazo hacia la tierra,
el ástil disparándose a los cielos.
Que no haya un solo adorno
que distraiga ese gesto,
ese equilibrio humano
de los dos mandamientos.
Más sencilla... más sencilla;
haz una Cruz sencilla, carpintero».*

Finalmente, como hombre profundo, como hombre profundamente bueno y como hombre profundamente religioso, y según su propio testimonio, la última palabra que quiso pronunciar fue ésta: PERDÓN.

Y el testimonio es, por sincero, tierno y emocionante, pero, a la vez, conmovedor y desgarrador. Supone su verdadero testamento. El mismo, al principio de «Español del éxodo y del llanto» coloca un poema titulado precisamente así: «Un poema es un testamento», en el que empieza aclarando: *«Un poema es un testamento sin compromisos con nadie, y donde no hay disputas ni con el canónigo ni con el corregidor. Donde no hay política».*

Así pues, biografía y testamento se suceden. El poema es, primero, la biografía; y acaba siendo, después, el testamento. Dicho de otro modo, es la crónica de una vida. De ahí que él mismo añada otra definición en el poema «No me contéis más cuentos» de su obra «Llamadme publicano»: *«Se sabe que el poema es una crónica, que la crónica es un mito».*

De la biografía particular de un hombre se asciende a la colectiva de un pueblo, y así la obra de León Felipe puede ser, de algún modo, la crónica del exilio español. De hecho lo es, y será forzoso citarla siempre que se hable de aquellos que partieron al destierro para, en muchos casos, no regresar. Una crónica, por tanto, del llanto.

De acuerdo con todo ello, su testamento moral, lo encierra en estos significativos versos, donde su última y definitiva palabra es esta: «PERDÓN».

*«Soy ya viejo,
y se ha muerto tanta gente a la que yo he ofendido,
y ya no puedo encontrarla
para pedirle perdón.
Ya no puedo hacer otra cosa
que arrodillarme ante el primer mendigo
y besarle la mano.
Yo no he sido bueno...,
quisiera haber sido mejor.
Estoy hecho de un barro
que no está bien cocido todavía.»*

*¡Tenía que pedir perdón a tanta gente!...
Pero todos se han muerto.
¿A quién le pido perdón ya?
¿A ese mendigo?
¿No hay nadie más en España...,
en el mundo,
a quién yo deba pedirle perdón...?
Voy perdiendo la memoria
y olvidando todas las palabras...
Ya no recuerdo bien...
Voy olvidando... olvidando... olvidando...,
pero quiero que la última palabra,
la última palabra, pegadiza y terca,
que recuerde al morir
sea ésta: PERDÓN.
PERDÓN.
¡PERDÓN!».*

Al homenajear, hoy, a León Felipe, nosotros también le decimos: PERDÓN. Perdón por la incomprensión. Perdón por el olvido. Perdón por no haberle escuchado atentamente. Perdón por no haber entendido y valorado adecuadamente su mensaje. Perdón por no haber aprovechado sus hermosas lecciones. Perdón por no reivindicarle, en su día, y para todos, absolutamente para todos. Perdón por no haberle reconocido y honrado suficientemente. ¡Perdón por tantas cosas!...

Y con sincero ánimo de enmienda le añadimos: Te recordaremos siempre.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) LEÓN FELIPE (1983) Antología Poética de León Felipe. Alianza Editorial. Segunda edición.
- (2) LEÓN FELIPE. Obra Poética escogida. Espasa Calpe.
- (3) LEÓN FELIPE (1996) Antología Personal. Colección Visor de Poesías.
- (4) LEÓN FELIPE (1993) Versos y oraciones del caminante. Col. Visor de poesía.
- (5) LEÓN FELIPE (1982) El ciervo y otros poemas. Col. Visor de poesía.
- (6) LEÓN FELIPE (1993) El payaso de las bofetadas y el pescador de caña. Col. Visor de poesía.
- (7) LEÓN FELIPE (1984) El gran responsable. Col. Visor de poesía.
- (8) LEÓN FELIPE (1981) Nueva Antología rota. Col. Visor de poesía.
- (9) LEÓN FELIPE. Llamadme publicano. Ed. Finisterre.
- (10) LEÓN FELIPE. Rocinante. Ed. Finisterre.
- (11) *Pliegos de rebotica* (1984), número completo de la Revista, dedicado en homenaje a León Felipe correspondiente a Junio.
- (12) Actas del Simposio «León Felipe» (1987) León Felipe Poeta de la llama. Celebrado en Enero de 1984. Editorial de la Universidad Complutense.
- (13) Homenaje de Castilla la Mancha a León Felipe (1986) Libro editado por la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha.
- (14) LEÓN FELIPE VISTO POR 100 AUTORES (1991) Libro homenaje.
- (15) ALEJANDRO FINISTERRE (2002) León Felipe, de la universidad de Valladolid al exilio. Edición de la Universidad de Valladolid, con ocasión del Centenario del inicio de sus estudios universitarios en dicha Universidad.
- (16) CLAUDIO SÁNCHEZ ALBORNOZ (1973) Un castellano de pro, León Felipe. Brindis en homenaje al autor de los intelectuales y artistas españoles y argentinos en 1945. «Ensayos sobre historia de España». Madrid.
- (17) LEÓN FELIPE 1884-1968 (1998) Edición del Círculo de Bellas Artes, en colaboración con el Ayuntamiento de Zamora y el Ministerio de Educación.
- (18) AURORA DE ALBORNOZ, LEOPOLDO DE LUIS, EMILIO MIRÓ Y ARTURO DEL VILLAR (1984) El viejo pobre poeta prodigio León Felipe. Colección Los Libros de Fausto. Madrid.
- (19) ALEJANDRO FERNÁNDEZ POMBO. (2001) Almonacid de Zorita, el pueblo donde fue boticario León Felipe. *Pliegos de Rebotica* n.º 67, 2ª época. Julio-Septiembre.
- (20) ANTONIO LUCAS. Memoria y Desmemoria de León Felipe.
- (21) ÁNGEL SANTOS RUIZ (1984) El Centenario de León Felipe. Discurso en la Real Academia de Farmacia. Madrid, 1984.
- (22) NATIVIDAD PULIDO. El Largo Regreso de León Felipe.
- (23) LEOPOLDO DE LUIS. Aproximaciones a la Vida y la Obra de León Felipe.

————— *Artículo original* —————

Estudio reológico de emulsiones semisólidas de aplicación cutánea

AMALIA M.^a RODRÍGUEZ BAYÓN e INÉS M.^a PAÑOS PÉREZ

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.

Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

RESUMEN

En la formulación de formas farmacéuticas de aplicación percutánea, una de las características más importantes a estudiar son las propiedades reológicas, ya que éstas tienen repercusión en la extensibilidad del preparado sobre la piel, su facilidad de aplicación y su adherencia sobre la misma. Todo ello contribuye a la aceptación por parte del paciente de la formulación empleada.

En este artículo se realiza el estudio reológico de tres formulaciones semisólidas (emulsiones A, B y C) para ver las posibles diferencias que existan entre ellas.

La composición de las mismas es similar, sólo difieren en el agente emulsificante, que en el caso de las emulsiones A y B es Tefosé 63[®] y en la emulsión C es Tween 80[®] y, en el componente de la fase oleosa, que en las emulsiones A y C es vaselina filante (sólida) y en la emulsión B es vaselina líquida. Todas las emulsiones llevan ácido salicílico (1%) como componente activo.

Para ver las posibles diferencias reológicas que presentan entre ellas se realiza, a temperatura ambiente, la determinación de la viscosidad del preparado utilizando, para ello, un viscosímetro Brookfield de cilindros concéntricos (modelo RTV), aplicando todas las velocidades de cizalla (G) al semisólido. En todos los casos, los resultados indican que el coeficiente de viscosidad depende de la velocidad de cizalla aplicada. Estas determinaciones se llevan a cabo en las emulsiones recién preparadas (tiempo 0), a la semana y al mes de su elaboración, con el fin de observar, no sólo la influencia de los componentes de la formulación en las propiedades reológicas, sino también, la posible influencia del almacenamiento en dichas propiedades.

Con los datos obtenidos se deduce que, de las tres emulsiones ensayadas, la A es la más estable.

Palabras clave: Emulsiones.— Aplicación percutánea.— Reología.— Viscosidad.— Almacenamiento.

ABSTRACT

Rheological study of semisolid emulsions for percutaneous application

In the formulation of pharmaceutical forms of percutaneous application, rheological properties are amongst the most important characteristics to be studied, because of its influence upon extensibility, easiness of application, and adherence to the skin, all of which contribute best to patient compliance.

A rheological study on three semisolid formulations (emulsions A, B and C) is carried out in this paper to try to find out possible (rheological) differences between them.

The composition of all three emulsions being similar, they nevertheless differ on the surfactant agent, Tefose 63[®] in emulsion A and B and Tween 80[®] in emulsion C, and on the oil agent, white soft Vaseline in emulsions A and C and mineral oil in emulsion B. The active ingredient added to the formulations is salicylic acid (1%).

Viscosity determinations are implemented by using a concentric cylinder Brookfield-RTV viscosimeter and then applying at room temperature all shear rates (G) to the semisolid. In all cases, the results indicate that the coefficient of viscosity depends on the share rate applied.

Viscosity determinations are carried out at emulsion storage times 0 (fresh emulsion), 1 week and 1 month at room temperature in order to find out whether not only the composition of the emulsion, even the storage time has an influence on rheological properties.

From the data, emulsion A was found out to be the most stable of the three.

Key words: Semisolid emulsions.— Percutaneous application.— Rheology.— Viscosity.— Storage.

INTRODUCCIÓN

La absorción percutánea de fármacos depende no sólo de factores fisiológicos, sino también de otros factores inherentes a la propia formulación, como pueden ser la naturaleza y el tipo de excipientes, así como las características reológicas del mismo (1). De modo, que esas características influyen no sólo en la acción del preparado, sino también, en la aceptación del mismo por parte del paciente (2), en su facilidad de aplicación, extensibilidad y adherencia sobre la piel y además, también influyen en el tiempo de permanencia de la for-

mulación sobre el lugar de aplicación, para lograr que ejerza su acción farmacológica (3).

Por lo tanto, dada la importancia del papel de la reología, ésta debe estar presente en el desarrollo de la formulación del preparado, desde su comienzo hasta el final, así como, en el proceso de fabricación y acondicionamiento, en la evaluación de la estabilidad (4) y en la determinación de la calidad del producto terminado (5).

La reología también se puede aplicar al estudio del envejecimiento de esas formulaciones, comprobando como varían las características de las mismas en el transcurso del tiempo (6). Otra de las propiedades reológicas que puede ser útil para la determinación de la estabilidad de un preparado de aplicación percutánea es la tixotropía; además, esta propiedad nos proporciona información sobre la facilidad de manejo, acondicionamiento, estabilidad e incluso aceptación por parte del paciente (7).

Entre los preparados semisólidos que se utilizan como formas de aplicación percutánea se encuentran algunos tipos de emulsiones, por ejemplo, las cremas. En estos casos, puede ser útil ver el efecto que produce la consistencia del vehículo en la cesión del principio activo del preparado, para así poder predecir o estimar su posible absorción a través de la piel, lo cual nos daría una idea de su biodisponibilidad (7, 8).

Por todo lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente trabajo es el estudio reológico de tres formulaciones semisólidas de aplicación cutánea. En todos los casos se trata de emulsiones (cremas) óleo-acuosas (O/A).

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los productos empleados son de grado analítico y se utilizan tal y como se reciben, sin posterior purificación. Estos productos son:

Vaselina filante (Montplet & Esteban, Barcelona).

Vaselina líquida y Tween 80® (Panreac Química, S. A., Barcelona).

Labrafil M-2130-CS[®], Tefosé 63[®], y Labrafil M-1944-CS[®] (Gatfosse España, S.A., Madrid).

Ácido salicílico (Merck, Darmstadt, Alemania).

Agua destilada, calidad Milli-Q (Waters, Madrid).

Labrafil M-2130-CS[®]: glicéridos saturados poliglicosolados de aceite de palma hidrogenado.

Labrafil M-1944-CS[®]: ésteres PEG-6 de aceites de la semilla del albaricoque.

Tefosé 63[®]: estearato de PEG-6, glicol cetoestearato y estearato de PEG-32.

Tween 80[®]: monooleato de polioxietilen (20) sorbitan. Atlas Chemical.

1. Formulaciones

La composición de las distintas emulsiones empleadas en el estudio se recoge en la tabla 1.

TABLA 1. *Composición de las emulsiones*

	<i>Emulsión A</i>	<i>Emulsión B</i>	<i>Emulsión C</i>
1. Vaselina filante	40 %	–	40 %
1. Vaselina líquida	–	40 %	–
2. Labrafil M-2130-CS [®]	10 %	–	10 %
2. Labrafil M-1944-CS [®]	–	10 %	–
3. Tefosé 63 [®]	5 %	5 %	–
3. Tween 80 [®]	–	–	5 %
4. Agua destilada c.s.p.	100 %	100 %	100 %
5. Ácido salicílico	1 %	1 %	1 %

Modus operandi:

Para obtener las distintas emulsiones se sigue un protocolo estandarizado (9) en el que se han introducido ligeras modificaciones. En general, el procedimiento que se sigue es:

- 1. Emulsión A:** Fundir en un vaso de precipitados, que se encuentra en un baño termostatizado a 80°C, los componentes 1, 2 y 3. Una vez fundidos disolver, en esa mezcla líquida, el ácido salicílico. Añadir el agua destilada calentada a 80°C. Emulsionar y homogeneizar a 20.000 r.p.m. durante un minuto, y a 6.000 r.p.m. durante los dos minutos siguientes (Polytron PT-3000). Dejar reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y volver a homogeneizar a 6.000 r.p.m. durante dos minutos. De este modo se obtiene una emulsión semisólida, cremosa, de aspecto agradable.
- 2. Emulsión B:** Se sigue el mismo procedimiento anterior, pero en este caso, la emulsión se obtiene agitando a 3.000 r.p.m. durante 8 minutos; a continuación, se introduce en un baño de agua fría y se agita a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos y, a 1.000 r.p.m. durante 2 minutos más; así se obtiene una emulsión cremosa de menor consistencia que la anterior.
- 3. Emulsión C:** Se prepara de la misma forma que la emulsión A, pero en el presente caso los componentes sólidos de la fase oleosa (vaselina filante y Labrafil M-2130-CS) se funden juntos, en el mismo vaso, a 72°C. La emulsión que se obtiene es semisólida, cremosa, de consistencia semejante a la primera, pero de aspecto no tan blanco, ni brillante.

De cada formulación se preparan 200 g., que se almacenan a temperatura ambiente y en la oscuridad, en los mismos vasos de vidrio en los que se obtiene cada emulsión.

2. Ensayos

1. Caracteres organolépticos

Los caracteres organolépticos se determinan mediante observaciones visuales.

2. *Determinación del signo de la emulsión*

La determinación del signo de cada emulsión preparada, se realiza por los métodos del colorante y de la gota (10).

3. *Determinación de las propiedades reológicas*

La determinación de las propiedades reológicas se realiza, a temperatura ambiente, utilizando un viscosímetro de cilindros concéntricos (Brookfield-RTV), aplicando todas las velocidades de cizalla (G) que puede imprimir el aparato: 0,5 - 1,0 - 2,5 - 5,0 - 10,0, 20,0 - 50,0 y 100,0 r.p.m.

Con objeto de no introducir modificaciones en ese sistema, y al igual que hacen otros autores (5, 11), las determinaciones reológicas se llevan a cabo sin transvasar el semisólido, sino directamente en los mismos vasos en que se obtiene cada emulsión, siguiendo un protocolo estandarizado (12) que, básicamente, consiste en colocar en el viscosímetro la varilla adecuada a la viscosidad de cada emulsión y una vez acoplada la aguja, someter al semisólido, durante dos minutos, a cada una de las velocidades de cizalla, comenzando por la velocidad más baja (G = 0,5 r.p.m.) y finalizando por la más alta (G = 100 r.p.m.).

Las viscosidades correspondientes a cada velocidad (G) se calculan a partir de las lecturas del dial del viscosímetro, utilizando los factores de transformación correspondientes a la aguja empleada en el ensayo, la n.º 6 para la emulsión A, la n.º 4 para la B y la n.º 7 para la C (13). Después, a partir de los datos de viscosidad, se realiza el cálculo de los valores correspondientes de fuerza de cizalla (F), simplemente, aplicando la ecuación $F = \eta \cdot G$.

Al representar esos valores de fuerza de cizalla (F) frente a sus correspondientes velocidades de cizalla (G), se obtiene la curva ascendente del reograma. Para calcular los valores del trazado descendente, se opera del mismo modo que se acaba de describir, pero comenzando por la velocidad más alta (G = 100 r.p.m.) y finalizando por la más baja (G = 0,5 r.p.m.). De esta forma se obtiene el reograma completo, característico de cada una de las formulaciones elaboradas.

Estos reogramas se obtienen, no sólo para las emulsiones recién preparadas (tiempo 0), sino que también se realizan esas determinaciones, después de transcurrir una semana y un mes de almacenamiento a temperatura ambiente y en la oscuridad.

En nuestro caso, la primera determinación (tiempo 0) se realiza después de dejar 24 horas en reposo la emulsión recién preparada, con objeto de permitir que el sistema se estabilice; otros autores emplean también ese tiempo con el mismo fin (14, 15); sin embargo, hay otros que dejan transcurrir 48 horas para que la emulsión se estabilice totalmente antes de realizar los ensayos reológicos (16).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características organolépticas y tipo de emulsión

Todas las preparaciones obtenidas son semisólidos, de textura cremosa y de aspecto más o menos brillante, muy agradable. Su color es blanquecino o ligeramente marfileño. Inodoras o con un ligero olor, típico de los componentes grasos de cada formulación y, en todos los casos, son emulsiones de fase externa acuosa (O/A).

Recién preparadas, las emulsiones A y C, tienen una consistencia similar, prácticamente iguales a simple vista, aunque la A tiene un color algo más blanco. Además, las características organolépticas observadas no se modifican a lo largo del período de almacenamiento estudiado. Sin embargo, la emulsión B se distingue de las dos anteriores por ser menos viscosa, lo que le confiere menor estabilidad. Al poco tiempo de su preparación se observa separación de fases pero, con una simple agitación, el sistema se recupera. En todos los casos el tipo de emulsión (O/A) se mantiene a lo largo del almacenamiento.

Estudios reológicos

Con objeto de caracterizar el tipo de flujo, el perfil estructural y la estabilidad de cada emulsión, se representan en ordenadas los valores de fuerza de cizalla (F) y las velocidades de cizalla (G) en abcisas, para obtener los correspondientes reogramas.

1. *Emulsión A*

Con los datos obtenidos a tiempo 0, a una semana, y a un mes de almacenamiento de esta emulsión a temperatura ambiente, se construyen los reogramas de la Figura 1.

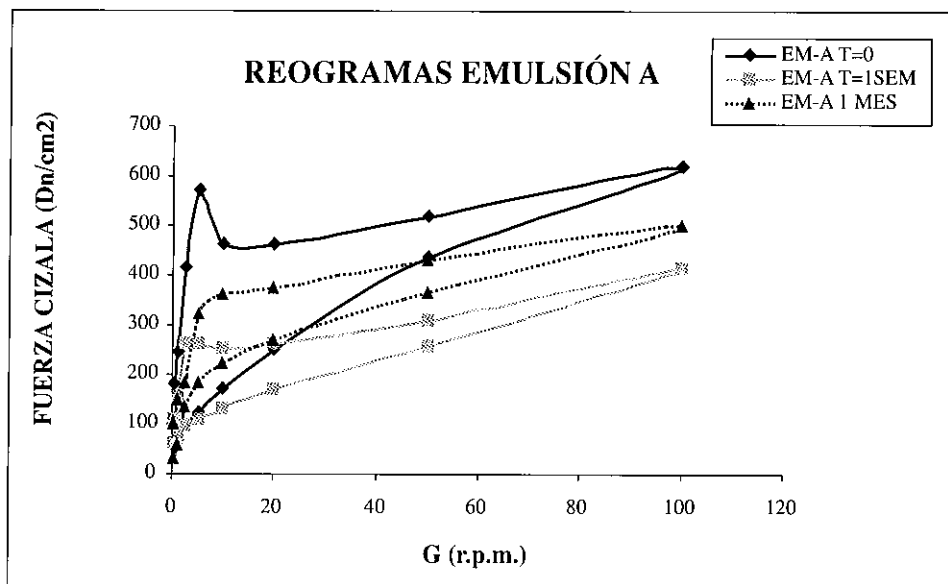


FIGURA 1. Reogramas de la emulsión A a distintos tiempos de envejecimiento.

Al observar estos reogramas, se deduce que la emulsión A es un sistema no-Newtoniano, que presenta un flujo plástico-pseudoplástico con tixotropía: las curvas ascendente y descendente no coinciden, describen un ciclo de histéresis que define el grado de tixotropía que presenta el sistema. Además, la curva ascendente de esos reogramas muestra un espolón, que indica la diferencia que existe entre la modificación lenta de la estructura del sistema, y la desorganización de la misma. En la literatura también se pueden encontrar reogramas que presentan espolones como los de esta emulsión, característicos de muchos de estos sistemas semisólidos (14,16).

Al estudiar el reograma obtenido a tiempo 0 (Figura 1), se observa la presencia de un espolón de flujo (*spur*) que se corresponde con un valor de fuerza de cizalla de 57×10^2 dinas/cm². Sin embargo,

al cabo de una semana, ese espolón disminuye hasta un valor de $26,2 \times 10^2$ dinas/cm² y, prácticamente, desaparece al mes de almacenamiento a temperatura ambiente y en la oscuridad.

En cuanto al valor de cesión (*yield value*) que presenta esta formulación, se observa, que también disminuye durante el almacenamiento, desde un valor de 18×10^2 dinas/cm², obtenido a tiempo 0, hasta los 10×10^2 dinas/cm², correspondientes a los ensayos de la formulación al cabo del mes de su almacenamiento.

2. Emulsión B

Los resultados obtenidos al realizar los mismos ensayos anteriores con la emulsión B se muestran en la Figura 2, donde se representan los reogramas correspondientes a los tiempos de: 0 días, una semana y un mes de almacenamiento de la emulsión B a temperatura ambiente.

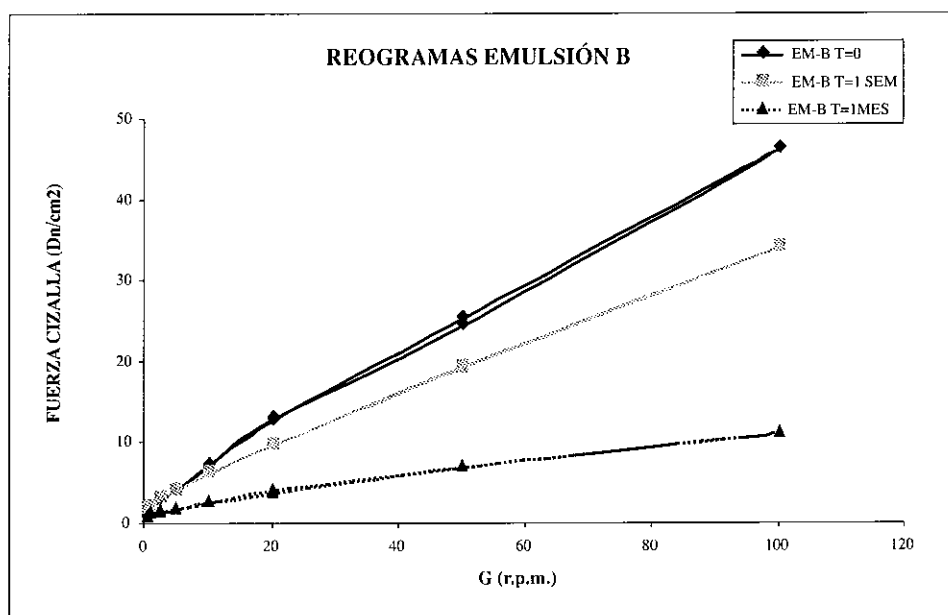


FIGURA 2. Reogramas de la emulsión B a distintos tiempos de envejecimiento.

Al observar esos reogramas se deduce, que la emulsión B, al igual que ocurría en el caso de la emulsión A, es un fluido no Newtoniano

que presenta un flujo pseudoplástico con una ligera tixotropía en la emulsión recién preparada ($T = 0$), que se hace mínima con el transcurso del tiempo de almacenamiento; pero a diferencia de lo que ocurre con la emulsión A, el tipo de reograma que se obtiene es mucho más sencillo, no muestra espolones, ni modificaciones con el almacenamiento (Figura 2).

En cuanto a la fuerza de cizalla que se necesita aplicar para que el sistema comience a fluir (*yield value*), los valores que se obtienen no disminuyen con el almacenamiento, como en el caso de la emulsión A, sino que, al principio aumentan, desde un valor de 10 dinas/cm² ($T = 0$) hasta 17,5 dinas/cm² ($T = 1$ semana) y, luego, después de transcurrir un mes de almacenamiento, disminuye hasta un valor de 7 dinas/cm².

3. Emulsión C

Los resultados obtenidos al realizar los ensayos reológicos con la emulsión C se muestran en la Figura 3, donde se representan los reogramas obtenidos a los tiempos de almacenamiento de: 0 días, 1 semana o un mes.

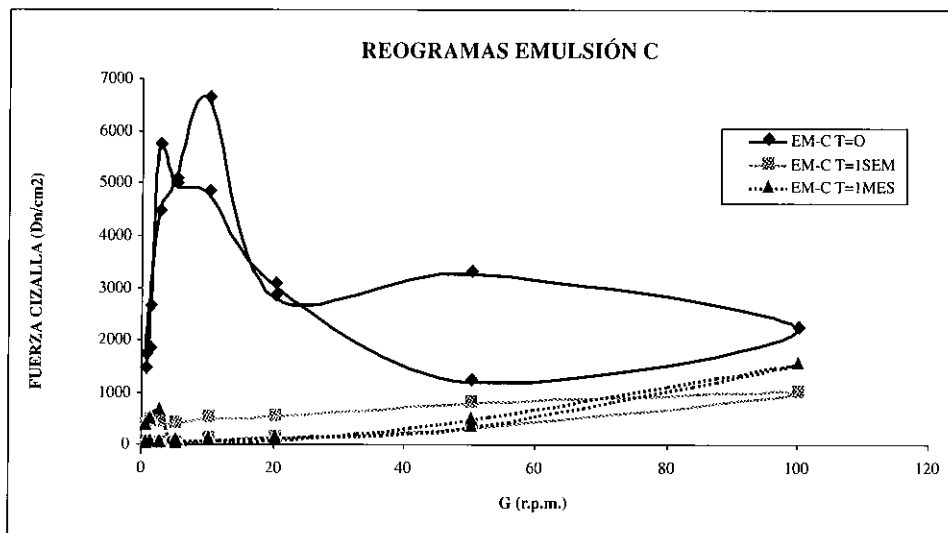


FIGURA 3. Reogramas de la emulsión C a distintos tiempos de envejecimiento.

Al observar estos reogramas se deduce que, como en los dos casos precedentes, la emulsión C, es un fluido no Newtoniano que presenta flujo plástico-pseudoplástico, con tixotropía, mucho más acusada en la emulsión recién preparada y mínima al cabo del mes de almacenamiento.

Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con la emulsión A, y sobre todo con la emulsión B, el tipo de reograma que se obtiene con la emulsión C recién preparada es más complicado e inusual que todos los anteriores; aparecen entrecruzamientos de las curvas ascendente y descendente del reograma, en sentido inverso a las agujas del reloj. No obstante y a pesar de todo lo expuesto, en la literatura también aparecen descritos reogramas de estas características (14, 15, 17).

Al estudiar detenidamente ese reograma, se observa que, en esas curvas, aparecen dos espolones. El primero, espolón de flujo (*spur*), se produce en el trazado ascendente, a una velocidad de cizalla $G = 10$ r.p.m. y un valor de fuerza de cizalla de $F = 66 \times 10^2$ dinas/cm². El segundo, se produce en el trazado descendente, a una velocidad de cizalla de 2,5 r.p.m. y una fuerza de cizalla de 57×10^2 dinas/cm².

Al ser el primer espolón (*spur*) tan acusado, indica que se produce una gran desorganización en la estructura del sistema al aplicar la velocidad de cizalla de 10 r.p.m. Al comparar los valores con los de la emulsión A, que es la única de las dos comentadas que presenta espolones en sus reogramas, se observa que, para el mismo tiempo de envejecimiento ($T = 0$, recién preparada la emulsión), los valores correspondientes son: $G = 5$ r.p.m y $F = 57 \times 10^2$ dinas/cm², ambos inferiores a los de la emulsión C.

Sin embargo, ese sistema evoluciona de tal forma que, con el paso del tiempo, la emulsión C presenta reogramas mucho más sencillos, sin entrecruzamiento de las curvas ascendente y descendente, aunque en todos los casos se mantiene el espolón de flujo (*spur*); aún así, su valor disminuye hasta 44×10^2 dinas/cm² o 40×10^2 dinas/cm², al cabo de, respectivamente, una semana o un mes de almacenamiento. La emulsión A evoluciona de una forma similar a la C: con una disminución, e incluso desaparición del espolón de flujo al mes del almacenamiento. La magnitud de éste (26×10^2 dinas/cm² a $T=1$ semana) es prácticamente la mitad del correspondiente valor de C (44×10^2 dinas/cm²).

Con respecto al valor de cesión (*yield value*) que presenta la emulsión C, se observa que, al igual que sucede con la emulsión A, disminuye con el almacenamiento, siendo sus valores: 17×10^2 dinas/cm² para la emulsión recién preparada; $3,6 \times 10^2$ dinas/cm² al cabo de la semana y 3×10^2 dinas/cm² al mes de envejecimiento. Además, también se aprecia que, a partir de la semana de almacenamiento, de todas las emulsiones ensayadas, la C es la que presenta los valores de cesión más bajos.

Asimismo, se puede apreciar que el tipo de flujo que presentan las tres emulsiones no se modifica durante su envejecimiento; en todos los casos presentan un comportamiento de fluido no-Newtoniano y al aplicar la ley de Ostwald (18) a los datos correspondientes a los distintos tiempos de almacenamiento, se obtienen valores de índice de flujo inferiores a uno, que confirman el comportamiento pseudoplástico de estas emulsiones (Tabla 2).

TABLA 2. Índices de flujo, en función del tiempo de almacenamiento, obtenidos al aplicar la ley de Ostwald

Tiempo (días)	Emulsión A	Emulsión B	Emulsión C
0	0,46926	0,71526	-
7	0,34393	0,57629	0,82681
30	0,48651	0,51267	0,45774

Con la emulsión B se aprecia, al igual que ocurre con la emulsión A, que el tipo de flujo no se modifica durante el almacenamiento ya que, en todos los casos, presenta un comportamiento de fluido no-Newtoniano; además, la aplicación de la ley de Ostwald a los datos correspondientes a los distintos tiempos de almacenamiento, proporciona valores de índice de flujo (Tabla 2), que aunque mayores a los obtenidos con la emulsión A, son inferiores a uno, lo que confirma la característica de pseudoplasticidad de la emulsión B. No obstante, al contrario de lo que sucede con la emulsión A, en que el índice de flujo sufre poca variación con el almacenamiento, en la B, se aprecia una disminución de ese índice en el transcurso del tiempo.

A diferencia de lo que ocurre con las emulsiones A y B, en la C, los resultados obtenidos a tiempo 0 al aplicar la ley de Ostwald, no se ajustan a esa ley, por lo que en la Tabla 2, no aparece recogido el valor de índice de flujo correspondiente a la emulsión C recién preparada. No obstante, al evolucionar ese sistema con el tiempo se obtienen reogramas más sencillos que permiten aplicar la ley de Ostwald y obtener los índices de flujo correspondientes a la semana y al mes de almacenamiento de la emulsión C (Tabla 2). En ambos casos, por ser esos índices inferiores a uno, se confirma el carácter pseudoplástico de esta emulsión.

Del mismo modo, al aplicar la mencionada ley de Ostwald a los datos experimentales obtenidos con las tres emulsiones, se tienen valores de consistencia comprendidos entre, aproximadamente, 2 y 3 Poises, cuando se ensaya la emulsión A; el valor mayor (2,8 Poises) corresponde a la emulsión recién preparada ($T = 0$) y el menor (2,2 Poises) a la misma después de una semana de almacenamiento. Esa consistencia se mantiene, prácticamente constante, a lo largo del resto del tiempo, ya que, al cabo del mes el valor de consistencia es de 2,3 Poises que, aunque ligeramente superior al anterior, no difiere mucho de él.

Asimismo, si se sigue el mismo procedimiento con los datos experimentales de la emulsión B representados en los reogramas de la Figura 2, se obtienen valores de consistencia inferiores a los obtenidos con la emulsión A y, a diferencia de lo que ocurre con aquella, no se mantienen constante a lo largo del almacenamiento, sino que, también, disminuyen al envejecer el sistema, aunque esa disminución sea mínima en la primera semana de almacenamiento de la emulsión B.

Los valores de consistencia que se obtienen al ensayar esta emulsión son: 0,89 Poises ($T = 0$); 0,87 Poises ($T = 1$ semana) y 0,47 Poises ($T = 1$ mes), que comparados con los correspondientes a la emulsión A para esos mismos tiempos (2,8 - 2,2 y 2,3 Poises, respectivamente), nos indican que la emulsión B es 3 veces menos consistente que la A recién preparada, y 5 veces menos, después de un mes de almacenamiento de ambas emulsiones a temperatura ambiente.

También, mediante la aplicación de la ley de Ostwald, se determinan los valores de consistencia de la emulsión C durante el alma-

cenamiento; esos valores son: 0,95 Po, a la semana y 1,09 Po al mes de preparada. Al compararlos con los obtenidos, a esos mismos periodos de almacenamiento, con la emulsión A (2,2-2,3 Po) y con la B (0,87-0,47 Po), se ve que, aunque los de la C son inferiores a los de la emulsión A y superiores a los de la B, a diferencia de lo que ocurre con esas dos emulsiones, el valor de consistencia de la emulsión C aumenta claramente durante el almacenamiento.

Las tres emulsiones estudiadas presentan tixotropía, definida por el bucle de histéresis que describen las curvas ascendentes y descendentes de los reogramas de todos los casos ensayados.

Como se puede observar en esos reogramas, la tixotropía es máxima en el inicio del almacenamiento, por ello a ese valor se le asigna el 100%, pero decrece rápidamente con el tiempo (Tabla 3); así, por ejemplo, la emulsión A, a la semana de preparada, sufre un brusco descenso en el valor de tixotropía (51%), para al cabo del mes de almacenada, recuperarla hasta alcanzar un valor de 56% con respecto al inicial.

TABLA 3. Comparación de la Tixotropía de las emulsiones ensayadas

<i>Tiempo (días)</i>	<i>Emulsión A</i>	<i>Emulsión B</i>	<i>Emulsión C</i>
0	0,14754 (100%)	0,01448 (100%)	0,15203 (100%)
7	0,07579 (51%)	0,00999 (68%)	0,04706 (31%)
30	0,08345 (56%)	0,00871 (61%)	0,03248 (21%)

Igualmente, si se compara la emulsión A con la B, y se observan los valores de tixotropía que aparecen recogidos en la Tabla 3, al ser los correspondientes a la emulsión B tan bajos nos indican que esa emulsión apenas presenta tixotropía, hecho que se puede también constatar al observar los reogramas de la Figura 2. Sin embargo, aunque la escasa tixotropía que presenta la emulsión B disminuye durante el almacenamiento, no lo hace de una forma tan brusca como en la emulsión A, ya que la B al mes de almacenada aún conserva más de un 60% de la tixotropía inicial, valor superior al correspondiente a la emulsión A (56%) para el mismo periodo de almacenamiento.

De las tres emulsiones ensayadas la C es la que presenta el mayor valor de tixotropía en el inicio del almacenamiento (0,15203), pero también es la que sufre un descenso más brusco de éste durante el envejecimiento; así, a la semana de preparada el valor de tixotropía es 0,04706, que representa un 31% con respecto al valor inicial y, desciende hasta un 21% (0,03248) después de un mes de almacenada a temperatura ambiente y en la oscuridad (Tabla 3).

Para comparar las propiedades reológicas de las tres emulsiones estudiadas se realizan distintas representaciones gráficas.

En la Figura 4 se representan en forma de histogramas los valores de tixotropía que aparecen recogidos en la Tabla 3 y que corresponden a los resultados obtenidos al ensayar las emulsiones A, B y C a los distintos tiempos de almacenamiento: recién preparada la emulsión (T = 0 días), a la semana o después de transcurrido un mes de almacenamiento a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

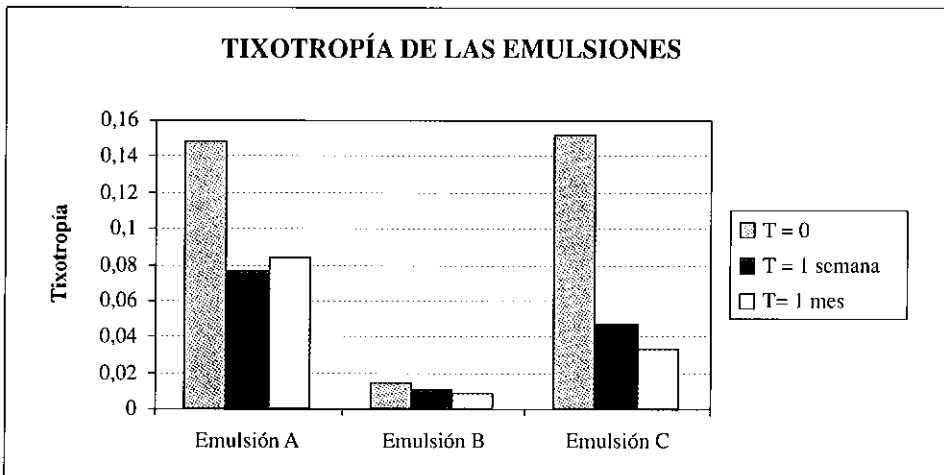


FIGURA 4. Tixotropía de las distintas emulsiones ensayadas a los distintos tiempos de envejecimiento.

Como se aprecia en esa figura 4, y se acaba de comentar, la máxima tixotropía la muestra la emulsión C y la mínima la B, ambas recién preparadas y, aunque en las dos emulsiones se observa una disminución de la tixotropía con el almacenamiento, en la C, que llega a perder más de un tercio del valor inicial, ese descenso de

tixotropía es mucho más brusco que en la B. Sin embargo, eso no ocurre con la emulsión A ya que, después del descenso de tixotropía de la primera semana, el sistema se recupera y mantiene su tixotropía durante el resto del tiempo de almacenamiento estudiado.

Por otro lado, al ser las emulsiones estudiadas fluidos no-Newtoniano la viscosidad no es constante, sino que es una viscosidad aparente (η_{ap}), que depende de la velocidad de cizalla que aplique el viscosímetro, en cada momento, a la formulación: $\eta_{ap} = f(G)$.

En todos los casos estudiados, la viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de cizalla aplicada sobre cada una de las emulsiones. Luego, si se quieren comparar valores de viscosidad, para los distintos tiempos de almacenamiento o, para distintas emulsiones o formulaciones, habrá que especificar las condiciones de temperatura de trabajo y velocidad de cizalla aplicada por el viscosímetro y utilizadas en el cálculo de esa viscosidad aparente.

En la Figura 5 se representa la evolución de la viscosidad aparente de cada una de las emulsiones estudiadas a lo largo del tiempo de almacenamiento.

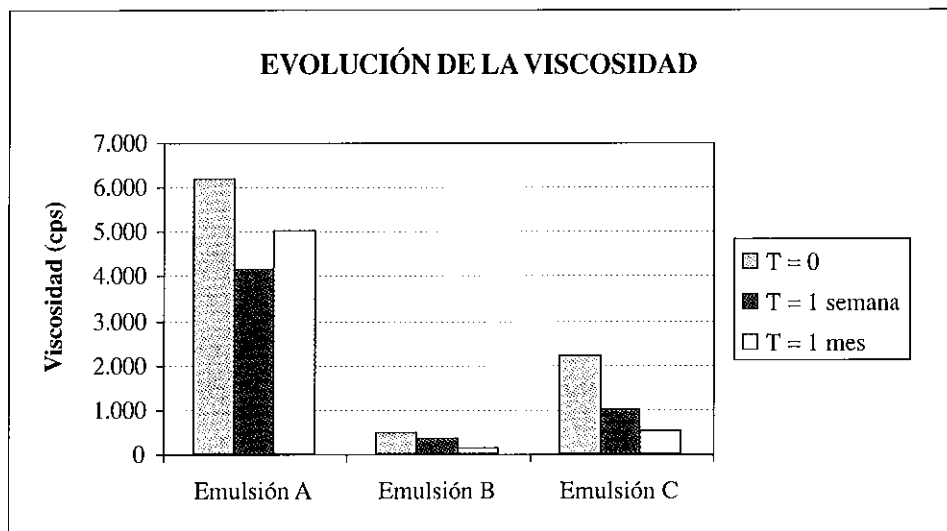


FIGURA 5. Comparación de la evolución de la viscosidad (cps) de las emulsiones ensayadas, a los distintos tiempos de almacenamiento, cuando son sometidas a una velocidad de cizalla $G = 100$ r.p.m.

Esas viscosidades se obtienen como resultado de la aplicación, sobre cada una de las emulsiones estudiadas, de una velocidad de cizallamiento, $G = 100$ r.p.m, que es la máxima velocidad que se puede aplicar con este tipo de viscosímetro. Como se ve, las formulaciones B y C evolucionan durante su almacenamiento hacia una disminución de su viscosidad, mientras que la emulsión A, por el contrario, experimenta un aumento de la misma con el almacenamiento.

CONCLUSIONES

La emulsión A es la que presenta una menor variación en los índices de consistencia y flujo durante el almacenamiento, seguida de la B y la C.

La emulsión B es la que menos modificaciones en el flujo presenta a lo largo del almacenamiento, seguida de la emulsión A y de la C, que es la que tiene los reogramas más complicados y dispares entre sí, ya que en la primera semana de almacenamiento sufre modificaciones profundas, pero transcurrido ese tiempo, se estabiliza y los reogramas obtenidos son más sencillos y semejantes entre sí.

A pesar de que la emulsión B es a simple vista la más inestable, y es la que presenta menores valores de viscosidad y tixotropía, la inestabilidad que posee es reversible, por lo que podría seguir utilizándose sin problemas. Además, aunque la tixotropía que presenta es muy baja, es la que muestra menos modificaciones de este parámetro reológico, seguida de la A y de la C.

No obstante todo lo expuesto, debido a su elevada viscosidad, la emulsión más estable al envejecimiento es la A.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a Gatefossé España, S.A. el suministro de los excipientes: Labrafil M-2130-CS y M-1944-CS, y Tefosé 63, de forma gratuita.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ZATZ, J.L. (1993) Skin Permeation-Fundamentals and Application. Allured Publishing Corp. Wheaton, IL (USA).
- (2) BLOCK, L.H. (1989) «Emulsions and Microemulsions» en Pharmaceutical dosage forms: Disperse systems. Vol 2. Editado por H.E. Lieberman, M.M. Rieger y G.S. Banker. Marcel Dekker. Nueva York, NY (USA).
- (3) WELIN- BERGER, K.; NEELISEN, J.A.M. y BERGENSTAHL, B. (2001) *Eur. J. Pharm. Sci.* 13: 309-318.
- (4) GONSALVES DOS SANTOS, D.F.; GUEDES BAHIA, M.F. y LOPES SILVA, J.A. (2002) *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 68: 251-265.
- (5) JIMÉNEZ SORIANO, M.M.; FRESNO CONTRERAS, M.J. y SELLES FLORES, E. (1996) *Boll. Chim. Farm.* 135 (6): 364-373.
- (6) MOES, A.J. (1983) «Propietes des emulsions: Rhéologie, granulométrie, influence de différents facteurs» en Galénica 5: Les systèmes dispersés. Editado por F. Puisieux y M. Séller. Técnica et documentation. Lavoisier. París (Francia).
- (7) TAKAMURA, A.; ISHII, F.; NORO, S. y KOISHI, M. (1984) *J. Pharm. Sci.* 73: 676-681.
- (8) BARRY, B.W. (1983) Dermatological Formulations. Marcel Dekker. Nueva York, NY (USA).
- (9) FRANCO GIL, M.E. y RODRÍGUEZ BAYÓN, A.M. (1994) *Eur. J. Pharm. Sci.* 2: 186.
- (10) RAWLINS, E.A. (1977) Textbook of Pharmaceutics. 8.^a edición. Baillière Tindall. Londres (UK).
- (11) MARQUARDT, D.; PEDRUSIO, R.; HERZOG, B. y SUCKER, H. (1997) *Pharm. Dev. Techn.*, 2 (2): 123-133.
- (12) RODRÍGUEZ BAYÓN, A.M. (1989) Difusión y envejecimiento de pomadas-emulsión. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- (13) BROOKFIELD. Engineering Laboratories. Manual de instrucciones. Stoughton, MA (USA).
- (14) DAVIS, S.S. (1969) I. *J. Pharm. Sci.* 58 (4): 412- 417, y II. *J. Pharm. Sci.* 58 (4): 418-421.
- (15) BARRY, B.W. y GRACE, A.J. (1971) *J. Pharm. Sci.* 60 (6): 814-820.
- (16) FRESNO CONTRERAS, M.J.; JIMÉNEZ SORIANO M.M., y SELLES FLORES, E. (1997) *Ann. Pharm. Fr.* 55 (4): 174-180.
- (17) CEREZO, A. y EL HALABI, M.K. (1983) Actas II Congreso Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Vol. 3: Farmacia Industrial. Barcelona, p. 1007.
- (18) PORÉ, J. (1992) Emulsions. Microemulsions. Emulsions Multiples. Editions Techniques des Industries des Corps Gras. Neuilly (Francia).

————— *Artículo original* —————

Estudio teórico del modo de unión entre CDK2 y butirolactona I*

MARÍA LUISA GARCÍA, BEATRIZ DE PASCUAL-TERESA,
MIGUEL FERNÁNDEZ BRAÑA

Departamento de Ciencias Químicas. Sección Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud. Universidad San Pablo CEU. Madrid

RESUMEN

Las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) juegan un papel importante en la regulación de la división del ciclo celular, lo que supone una prometedora diana para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos frente al cáncer. Se ha realizado un gran esfuerzo durante los últimos años en la búsqueda de pequeñas moléculas que pueden actuar como inhibidores químicos de las CDKs. Estos inhibidores bloquean la progresión del ciclo celular y presentan una interesante actividad antitumoral.

La butirolactona I, un producto natural aislado de *Aspergillus terreus*, que ha mostrado actividad antiproliferativa frente a carcinoma de colon y de páncreas en líneas celulares. Se comporta como un inhibidor competitivo del ATP, mostrando alta afinidad y selectividad frente a CDK1 (cdc2) y CDK2. Debido a la complejidad de la estructura de dicho compuesto, no se conoce bien su modo de unión a la diana farmacológica.

Mediante técnicas de modelización molecular, hemos llevado a cabo un estudio que nos ha permitido proponer un modo de unión de dicho compuesto a su diana farmacológica. El complejo de más baja energía obtenido por este procedimiento fue posteriormente sometido a una simulación de dinámica molecular en presencia explícita del disolvente en torno al sitio de unión del ligando. El análisis de dicha simulación indica la formación de un complejo estable, que proponemos como posible modo de unión, y que ha servido como base para el diseño racional de otros ligandos que han sido sintetizados en nuestro laboratorio.

* Premio Normon 2002 de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Palabras clave: Modelado molecular.— Docking.— CDK2.— Inhibidor químico.

ABSTRACT

Theoretical study of the binding mode between CDK2 and butirolactone I.

Cyclin dependent kinases (CDKs) play a central role in the regulation of the cell division cycle, which makes them a promising target for the development of therapeutic agents in cancer. Efforts have been made in the last few years in the search for small molecules that can act as chemical inhibitors of CDKs. These inhibitors block cell cycle progression and display interesting antitumor activities.

Butirolactone I, a natural product isolated from *Aspergillus terreus*, has shown antiproliferative activity against colon and pancreatic carcinoma cell lines; it behaves as an ATP competitive inhibitor, displaying a high affinity and selectivity towards CDK1 (cdc2) and CDK2. Due to the structural complexity of this compound, little is known about its binding mode to the pharmacological target.

In this work, computer-based design techniques have been used to study the binding mode of butirolactone I to CDK2. The lowest energy complex predicted by these means was later submitted to molecular dynamics simulations in the presence of solvent around the ligand's binding site. The analysis of this simulation indicates the formation of a stable complex, which we propose as a possible binding mode. This has been used as a starting point for the rational design of other ligands that have been synthesized in our laboratory.

Key words: Molecular modelling.— Docking.— CDK2.— Chemical inhibitor.

INTRODUCCIÓN

Cualquier acción farmacológica tiene su inicio en la formación de un complejo entre el fármaco y su sitio receptor en la macromolécula biológica diana. Por lo tanto, la especificidad de la respuesta a un fármaco dado viene determinada en gran medida por la capacidad de los distintos receptores celulares para reconocerlo como agonista o antagonista y provocar o no una respuesta (1).

Este proceso de reconocimiento molecular tiene lugar tanto entre fármacos y receptores, sustratos y enzimas o entre las llamadas moléculas huéspedes (guest) y hospedadores (host) que han abierto nuevas perspectivas en la denominada química supramolecular (2), por lo que de forma general nos referimos a los complejos ligando-receptor.

En consecuencia, el receptor debe ser contemplado como un sitio capaz de distinguir entre posibles ligandos, y moléculas que no poseen afinidad de unión.

El diseño y síntesis de nuevas sustancias capaces de interactuar con receptores específicos es el objetivo prioritario de la Química Farmacéutica. Hasta hace poco tiempo estas síntesis se realizaban al azar, o en el mejor de los casos guiadas por el estudio más o menos cuantitativo, del efecto que diversas modificaciones introducidas en la estructura de distintos fármacos o ligandos, ejercían sobre una determinada acción farmacológica. En gran medida esto era la consecuencia del desconocimiento existente sobre la estructura de los receptores.

En los últimos años el panorama ha cambiado gracias al avance de diversas disciplinas, que han hecho posible la identificación de numerosas macromoléculas diana y en algunos casos de la elucidación a nivel atómico de su estructura y la de sus complejos con ligandos.

A medida que se fueron cristalizando y analizando complejos macromolécula-ligando, se fueron estableciendo las características generales de la unión ligando-receptor. Pronto se puso de manifiesto que el ligando se mantiene en posición debido a las interacciones con los diferentes grupos del receptor, grupos que en el caso de las proteínas pueden estar ampliamente dispersos en la secuencia de aminoácidos. También se apreció que una función importante de la estructura molecular en su conjunto es precisamente mantener estos grupos en la orientación relativa adecuada para definir las características de la cavidad y constituir un sitio de unión específico. Las contribuciones individuales de cada grupo a la energía total de unión pueden ser débiles, pero la suma de todas ellas puede hacer que un ligando se una muy firmemente. Como consecuencia de esta interacción, pueden aparecer cambios alostéricos que, por ejemplo, en el caso de las enzimas, o incluso en el de la hemoglobina, son de importancia fundamental para comprender el mecanismo de acción de la proteína.

La simulación de la interacción de un fármaco con su receptor es un problema en el que se hallan implicadas muchas fuerzas de asociación intermolecular: hidrofóbicas, dispersión o de Van der Waals, enlaces de hidrógeno y electrostáticas.

Las fuerzas que más participan en la unión parecen ser las interacciones hidrofóbicas, pero la especificidad en la unión parece estar controlada, fundamentalmente, por los enlaces de hidrógeno y las interacciones electrostáticas.

La simulación de las interacciones intermoleculares en un complejo ligando-proteína resulta difícil, ya que existen una gran cantidad de grados de libertad e insuficiente conocimiento del efecto del disolvente en la asociación.

La técnica manual de modelado de complejos ligando-receptor trata inicialmente a este último como si fuera rígido, mientras que la orientación del ligando se va ajustando tanto por movimientos de traslación y rotación, como mediante giros de enlaces rotables dentro del ligando. Esta maniobra de acoplamiento se denomina «*docking*», por su analogía con el atraque de los buques en el puerto.

Como el proceso de docking no deja de ser un rompecabezas tridimensional (3) se han desarrollado algunos métodos que intentan explorar las diversas alternativas de forma automatizada.

En el proceso de *docking* de un ligando en su receptor, se intenta imitar el curso natural de la interacción del ligando con su receptor a través de la ruta de mínima energía. Normalmente, el receptor se representa rígido, como ya hemos indicado, mientras que al ligando se le permiten cambios conformacionales. En casos favorables las dos moléculas pueden ser aproximadas por los planos que contienen los centros de interacción, y luego mover los planos mientras se calculan las energías de interacción. Las moléculas se aproximan físicamente la una a la otra y la conformación preferida en el encaje de las dos moléculas se minimiza.

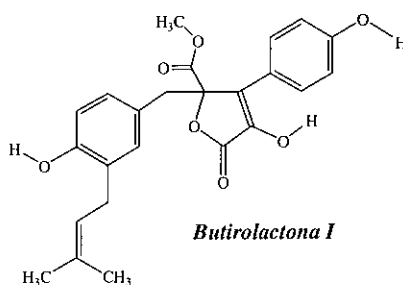
Localizar los complejos de mínima energía ligando-receptor presenta sobre todo el problema de que los receptores poseen formas complicadas y ajustables y de que existen muchas formas de encajar un ligando flexible dentro de ellos.

Existen diversos métodos que tratan de resolver este rompecabezas de forma automatizada y que se pueden agrupar en dos categorías (4): a) Los métodos de superposición, que están basados en la complementariedad. El ejemplo más conocido es el programa DOCK (5), que primero caracteriza los surcos y las invaginaciones de

la superficie de la macromolécula que pueden constituir sitios o centros diana para el ligando (o sitios alostéricos, o sitios sin función conocida), los cuales llena con conjuntos de esferas cuyos centros sirven para crear una imagen negativa del sitio. b) Los métodos basados en la energía. En ellos se combina un método de exploración conformacional para el ligando con el cálculo de potenciales de afinidad, en los puntos de una malla tridimensional en la que se encuentra incluida la macromolécula. Una vez modelado el complejo se utiliza la mecánica molecular para obtener la energía de dicho complejo. El ejemplo más conocido es el programa *autodock* (6), una técnica de docking flexible, que ha sido la utilizada para la realización de este trabajo.

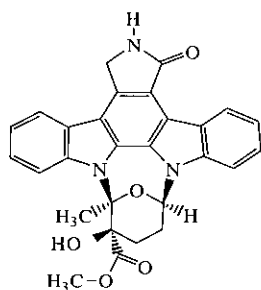
Butirolactona I

La butirolactona-I [α -oxo- β -(*p*-hidroxi-*m*-3,3-dimetilalilbencil)- γ -metoxicarbonil-butiro lactona]; (C₂₄H₂₄O₇); fue aislada inicialmente en 1977 como un nuevo tipo de metabolito procedente del *Aspergillus terreus* variedad *africanus* y posteriormente del *Aspergillus* cepa F-25799 (7), y su estructura fue establecida ese mismo año (8) mediante técnicas de UV, IR, FAB-MS, 1 H-RMN y 13C-RMN. Sin embargo, su actividad biológica no fue descrita hasta 1993, constituyendo un interesante ejemplo de descubrimiento de la actividad de un compuesto natural previamente descrito. En estas pruebas se ensayaron diversos productos de microorganismos como inhibidores selectivos de CDK1 (*cdc2*) por ensayos *in vitro* utilizando el complejo ciclina B-CDK1 altamente purificada procedente de células de ratón FM3A y de péptido sintético AKAKKTPKKAKK (Péptido S1) como sustrato específico, comprobándose que un producto presente en la cepa F-25799 presentaba una fuerte acción inhibitoria frente a la CDK1. El inhibidor fue identificado como la butirolactona I. Posee una interesante actividad antiproliferativa frente a líneas celulares de carcinoma de colón y de páncreas. Actúa como inhibidor competitivo del ATP,



mostrando además una alta afinidad y selectividad frente a CDK1 y CDK2 (7, 9).

La butirolactona I es un inhibidor que interacciona con el complejo CDK-ciclina a través del sitio de unión del ATP. Inhibe CDK1 con una IC_{50} de 0.68 μM y CDK2 con una IC_{50} de 0.82 μM (10) y es específico frente a otras quinazas, incluyendo CDK4 (7) (tabla 1).

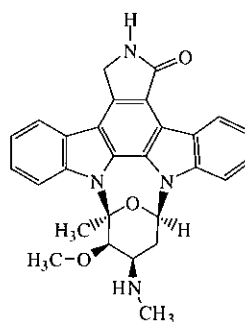


K252a

En esta tabla se compara la actividad de la butirolactona frente a la de K252a y estaurosporina, compuestos que han mostrado una interesante actividad inhibitoria frente a diferentes quinazas. Como se puede observar la butirolactona mostró una mayor selectividad frente a CDK1.

Las propiedades señaladas para este compuesto, la potencia y la selectividad de su acción, han llevado al estudio de su comportamiento dentro de las principales líneas de aplicación terapéutica señaladas para los inhibidores de ciclinas.

En este sentido, se han desarrollado estudios como el de Nishio y colaboradores, en el que se pone de manifiesto el efecto antitumoral sobre cáncer de hígado en diversas líneas celulares con valores de IC_{50} del orden $\mu\text{g/ml}$, no observándose resistencia cruzada a otros fármacos (11).



Estaurosporina

También se ha estudiado el efecto de la butirolactona I sobre la expresión de los genes de la albúmina y la α -fetoproteína (AFP) en células de hepatoma HuH-7. La butirolactona I inhibe el crecimiento de las células y detiene el ciclo celular en la fase G2/M (12). Estos resultados son especialmente interesantes en la lucha contra el carcinoma hepatocelular, uno de los cánceres más dañinos.

Hasta el momento no se ha descrito ningún otro derivado de butirolactona I que presente dicho perfil de actividad, por lo que constituye un interesante prototipo para el diseño de nuevos inhibidores de

Tabla 1. Efecto inhibitor de la butirolactona I frente a varias protein-quinasas, comparado con los de otros inhibidores. (Valores de IC_{50} en μM)

QUINASA	Butirolactona I	K252 a	Estaurosporina
CDK1/ciclina B	0.68	1.8	0.0069
CDK2/ciclina A	1.5		
CDK4/ciclina D	Inactiva		
CDK5/p ³⁵	1.5		
PKC	160	1.2	0.0088
AK	260	1.3	1.1
MAPK	94	0.20	0.0069
CKII	240	9.0	15
CKI	>590	59	50
Tyr K	>590	21	0.43

Proteinquinasa C de ratón (PKC), unidad catalítica de quinasa dependiente de AMPc bovina (AK), quinasa 42kDa-MAP humana (MAPK), caseinquinasa I y II porcina (CK I, CKII) y tirosinquinasa del receptor EGF humano (TyrK).

CDKs, sobre todo si se tiene en cuenta que tampoco se han identificado sistemas similares en *screenings* generales de quinasas (13).

Debido a que por el momento ningún grupo de investigación ha llevado a cabo la síntesis total del compuesto natural y a la dificultad que conlleva la obtención de un complejo estable ligando-proteína para su posterior caracterización mediante técnicas cristalográficas o de RMN, se carece de datos referentes al complejo que forma la butirolactona I con CDK1 y CDK2, quinasas por las que ha mostrado una elevada selectividad y constituye por lo tanto un candidato ideal para llevar a cabo estudios teóricos sobre su modo de unión con la CDK2 y un prototipo muy interesante para el diseño de compuestos de estructura más sencilla.

CDK2

La CDK2 (quinasa dependiente de ciclina 2) actúa en el control de los procesos que tienen lugar en las fases G₁ y S del ciclo celular. Para garantizar una adecuada coordinación entre todos los procesos que tienen lugar durante el ciclo celular, es necesario que las CDKs se encuentren ampliamente reguladas por diferentes mecanismos catalíticos.

Además se han resuelto las estructuras de los complejo CDK2-ciclinaA-ATP (14) y CDK2-ATP (14) (figura 1). Este último complejo constituyen la base del presente trabajo, por lo que a continuación se describe brevemente su estructura.

La estructura de la CDK2 se divide en dos lóbulos. El más pequeño, lóbulo N-terminal, consiste en una hoja de 5 láminas β ($\beta 1 - \beta 5$) y una gran hélice α ($\alpha 1$); y el más grande, lóbulo C-terminal, contiene un haz de 4 hélices α ($\alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 6$), una pequeña lámina β y dos hélices adicionales. El sitio de unión del ATP se encuentra en una cavidad entre los dos lóbulos. La adenina se localiza en un bolsillo hidrofóbico entre la lámina β del lóbulo pequeño y el Loop7 (L7) existente entre $\beta 5$ y $\alpha 2$. Los fosfatos del ATP están retenidos por interacciones iónicas y enlaces de hidrógeno con varios residuos (Lys33 y Asp145) y con el esqueleto de amidas del loop rico en glicinas que está situado entre $\beta 1$ y $\beta 2$. Un oxígeno de cada uno de los tres fosfatos del ATP contribuye a una coordinación octaédrica del ión Mg^{2+} . Los otros tres ligandos implicados en la coordinación son Asp145, Asn132 y una molécula de agua (W558) (esquema 1).

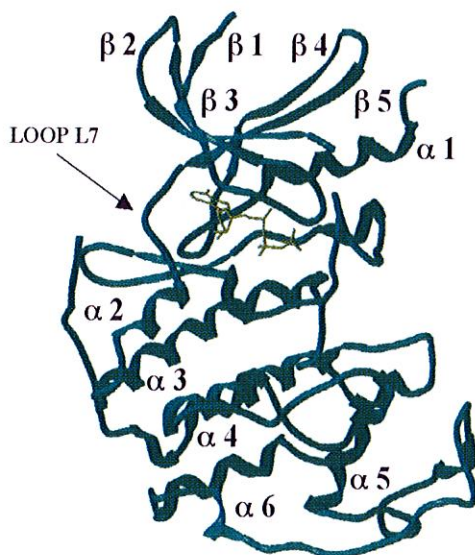
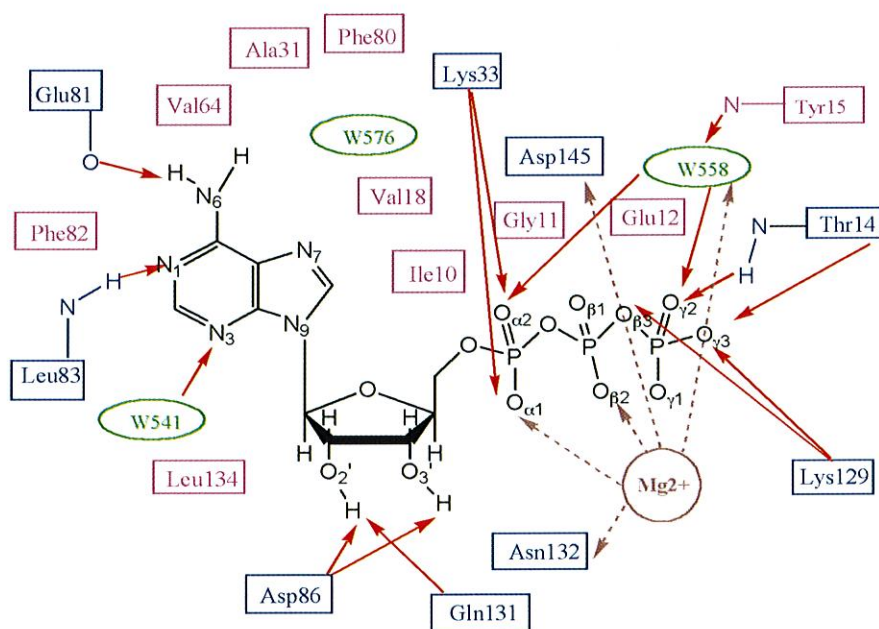


FIGURA 1. Estructura del complejo cristalino CDK2:ATP (Código pdb: 1hck).

Actualmente, se dispone de las coordenadas de las estructuras cristalinas del complejo formado por la CDK2 humana con isopenitiladenina, olomoucina, (15) roscovitina, (16) flavona L868276, (17) estaurosporina (18) y purvalanol (19). Así se ha podido demostrar que todos estos inhibidores actúan de una forma competitiva con el ATP, (20) e interaccionan al igual que el ATP, en la cavidad delimitada por los dos lóbulos de la proteína. El análisis de las estructuras de los complejos CDK-inhibidor ha permitido identificar en la CDK2 varios residuos de aminoácidos, Ile10, Leu83 y Leu134, que son los responsables del 40% de las interacciones entre la qui-



ESQUEMA 1. Representación esquemática del modo de unión de la molécula de ATP en el sitio activo de la CDK2 (Código pdb: 1hck)

Código de colores para los esquemas de este trabajo: Residuos con enlaces de hidrógeno. Residuos con interacciones de van der Waals. Moléculas de agua.

Interacciones con el átomo de magnesio.

Los enlaces de hidrógeno con las cadenas laterales de los aminoácidos se indican con flechas que salen directamente del recuadro en el que se representa el residuo correspondiente, mientras que las interacciones en las que participan átomos de la cadena principal se muestran representando dicho átomo en el exterior del recuadro y haciendo salir de él las flechas que representan los enlaces de hidrógeno.

nasa y los inhibidores. Estos aminoácidos no se conservan en otros tipos de quinasas, por lo que pueden ser los responsables de la especificidad de estos inhibidores frente a las CDKs, y de ahí su gran interés como posibles reguladores del ciclo celular (15). Dos o tres enlaces de hidrógeno están constantemente presentes en la relación entre los inhibidores mencionados y los residuos Glu81 y Leu83 de la CDK2 (21).

Si señalamos los residuos de aminoácidos que están implicados en la unión con la CDK2 podremos observar cuáles son las posiciones de esta quinasa que pueden estar involucradas en la interacción con los diversos inhibidores y proporcionarnos información acerca de su mecanismo de acción y selectividad.

En el presente trabajo de investigación hemos llevado a cabo un estudio teórico de la interacción de la CDK2 y el inhibidor químico butirolactona I. Se ha realizado un análisis detallado de los resultados obtenidos hasta el momento y teniendo en cuenta que el modelo de interacción propuesto se ha realizado manteniendo la proteína rígida (tratamiento habitual para todos los programas de docking). La siguiente aproximación para poder corroborar la calidad del método propuesto, ha sido someter los complejos a una minimización previa utilizando el programa Amber 5.0. Con el fin de evaluar los efectos de la flexibilidad de la proteína y del disolvente en torno al centro activo, se ha llevado a cabo la simulación de dinámica molecular utilizando el campo de fuerzas de Amber.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de los estudios de *docking* hemos tomado como receptor la estructura cristalina de la CDK2 en su complejo con la molécula de ATP (código pdb = *1hck*), que obtuvimos directamente del Banco de Datos de Proteínas de Brookhaven, (22) y de la que extrajimos manualmente la molécula de ATP, dejando libre el centro activo de la proteína para poder introducir en dicho sitio los diferentes ligandos.

Preparación del ligando

La butirolactona I, fue construida mediante el programa de modelización molecular Macromodel (23) y posteriormente fue sometida a un refinamiento de la energía utilizando mecánica molecular y el campo de fuerzas de Amber (24). La butirolactona I fue construida en sus dos posibles configuraciones (*R* y *S*).

Después del refinamiento inicial, las estructuras se sometieron a una búsqueda conformacional utilizando el programa Batchmin y el método Monte Carlo (25), en el que los ángulos de la geometría inicial son relacionados y modificados al azar. Una vez generada la nueva estructura, el propio método la minimiza utilizando el campo de fuerzas seleccionado (en este caso Amber) y analiza el valor de su energía, de forma que si este valor es superior a la energía del conformero anterior en más de 50 KJ (valor elegido) la estructura es rechazada, si la energía es inferior a este margen, la nueva geometría es aceptada y almacenada.

El programa continúa buscando hasta un máximo de 100 conformaciones (valor seleccionado); las coloca en orden de menor a mayor energía y finaliza. El resultado de la búsqueda puede ser entonces analizado.

El cálculo de las cargas puntuales para todos los ligandos se llevó a cabo, utilizando el programa Gaussian94 (26), mediante una optimización de la geometría a nivel RHF/3-21G y un cálculo puntual RHF/6-31G*. Las cargas se derivaron por ajuste al potencial electrostático molecular según el método descrito por Merz-Kollman (24, 27).

El *docking* fue realizado con el programa *autodock*, versión 3.1 (28) y el protocolo llevado a cabo se describe a continuación.

Preparación de la macromolécula

La estructura de la macromolécula, se obtuvo directamente a partir del Banco de Datos de Proteínas de Brookhaven (22). Las moléculas de agua de cristalización, el átomo de magnesio y la molécula de ATP, fueron eliminados utilizando el programa *Sybyl* (29). Los hidrógenos polares se añadieron haciendo uso de una de las aplicacio-

nes de dicho programa. Las cargas puntuales se asignaron utilizando el programa *Sybyl* y cargas tipo «KOLUA» (Kollman United Atom).

Docking

Para el análisis del modo de unión entre el ligando y la CDK2 hemos utilizado el programa *autodock* versión 3.1 (6). De este modo, partiendo de la especificación de la estructura proteica, de la información acerca de la libertad de rotación de los enlaces del sustrato y de una conformación de mínima energía como conformación de partida, llevamos a cabo un docking flexible.

TABLA 2. *Parámetros de autodock*

<i>Parámetros Algoritmo Genético (GA) y Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA)</i>		<i>Valores</i>
ga_pop_size	N.º de individuos en la población	50
ga_num_evals	N.º máximo de evaluaciones de energía	250000
ga_num_generations	N.º del máximo de generaciones	27000
ga_elitism	N.º indiv. máx que sobrevive a la siguiente generación	1
ga_mutation_rate	Porcentaje de mutación	0.02
ga_crossover_rate	Porcentaje de entrecruzamiento	0.80
ga_window_size	N.º de generaciones por escoger al peor individuo	10
ga_cauchy_alpha	Distribución de Cauchy	0
ga_cauchy_beta	Varianza de distribución de Cauchy	1
<i>Parámetros Búsqueda local</i>		
sw_max_its	N.º de iteraciones búsqueda local	300
sw_max_succ	N.º de éxitos consecutivos antes del rho cambiante	4
sw_max_fail	N.º de fracasos consecutivos antes del rho cambiante	4
sw_rho	Tamaño de espacio de la búsqueda local para probar	1.0
sw_lb_rho	Límite más bajo en rho	0.01
ls_search_freq	Probabilidad de realizar búsqueda local en un individuo	0.06

La tabla 2 resume los parámetros utilizados para la realización de docking de los ligandos, para los que se buscaron en cada caso 100 posibles soluciones. Este procedimiento consumió aproximadamente 3 horas en una SGI Octane R12000 para cada una de las moléculas objeto de estudio.

El programa busca hasta un máximo de 100 conformaciones (valor seleccionado); las coloca en orden de menor a mayor energía y finaliza. El resultado de la búsqueda puede ser entonces analizado. Para cada caso se analizaron las cinco orientaciones que proporcionaban una mejor energía de interacción mediante la utilización del programa *Sybyl* (29).

Dinámica molecular

La dinámica molecular (MD), es uno de los métodos empleados para recorrer el espacio conformacional molecular, por lo tanto es una herramienta muy útil en el estudio del movimiento e interacción de estructuras macromoleculares.

El análisis de la trayectoria de la dinámica molecular incluye el seguimiento de los principales cambios estructurales que ocurren en una molécula en función del tiempo, y el promedio de las variaciones de las propiedades físicas durante el tiempo de simulación. Las estructuras obtenidas por dinámica molecular en realidad son una representación estadística del sistema. Las representaciones frente al tiempo de las desviaciones cuadráticas medias (RMDS) de las estructuras con respecto a la inicial, nos dan información sobre la estabilidad del complejo dinámico y de la localización de los estados térmicamente favorecidos en el espacio conformacional.

Los complejos más estables obtenidos mediante el experimento de docking, fueron inicialmente adaptados al campo de fuerzas de amber y sometidos a una minimización progresiva de la energía para lo cual el proceso se dividió en varias etapas: minimización de los hidrógenos, minimización del ligando, minimización del ligando y átomos de las cadenas laterales de la proteína, minimización del ligando y del esqueleto carbonado de la proteína con restricciones posicionales y una constante de fuerza inicial de 32 Kcal/mol y final de 2 Kcal/mol.

Posteriormente se inició el proceso de dinámica molecular, cuyo primer paso consistió en un breve periodo de calentamiento en el cual las velocidades de las partículas se incrementaron a la temperatura deseada de 298 K. Después la simulación busca un punto de equilibrio y se procedió a la relajación de todas las constricciones posicionales y las restricciones que se habían establecido en la fase de calentamiento, así obtuvimos las características dinámicas del complejo en el periodo de tiempo establecido. Con el fin de reducir el número total de átomos y ahorrar tiempo de computación solamente se ha añadido disolvente en una esfera de un radio de 20.0 Å alrededor del centro geométrico del sitio activo de la macromolécula.

El análisis de una trayectoria de dinámica molecular implica el seguimiento de todos los tipos de cambios estructurales que ocurren en la molécula en función del tiempo, así como el comportamiento medio en las propiedades físicas a lo largo del periodo de tiempo de estudio. Para las simulaciones en presencia explícita de disolvente, el tiempo de simulación ha sido de 800 ps. Se obtienen así una serie de estructuras que son una representación estadística de los diferentes estados del sistema. Este tipo de análisis se lleva a cabo utilizando el modulo CARNAL de AMBER (30). CARNAL es un programa de análisis de coordenadas que permite la comparación entre múltiples conjuntos de coordenadas utilizando un lenguaje de comandos relativamente sencillo. Permite realizar mediciones de distancias, análisis de los enlaces de hidrógeno, seleccionar grupos de coordenadas dentro de un conjunto, etc.

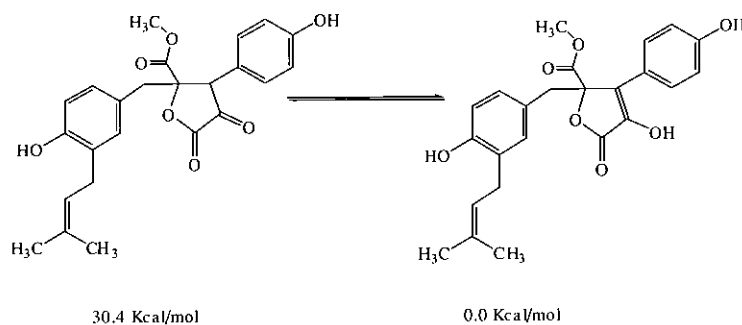
El módulo ANAL de AMBER (30) permite realizar análisis energéticos y estructurales de geometrías estáticas. Una de sus principales y más útiles características es la descomposición de la energía en diferentes grupos de átomos para analizar las energías de interacción entre las diferentes partes de un sistema.

Las gráficas de la desviación estándar cuadrática media (RMSD) en función del tiempo, para las simulaciones de los diferentes complejos, comparadas con la estructura inicial, aportan información adicional acerca de la estabilidad de la estructura dinámica y la localización del equilibrio en una conformación espacial. La estructura inicial sobre la cual se comparan el resto de las conformaciones a lo largo de la dinámica es la resultante del proceso de minimiza-

ción del complejo que a su vez sirve de punto de partida para la dinámica molecular (31).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La butirolactona I contiene en su estructura un centro quiral y según los datos disponibles en la bibliografía, el producto natural presenta actividad óptica ($[\alpha]_D^{15} = +100$) (8). Sin embargo, en el momento en que comenzamos este estudio se desconocía la configuración absoluta de dicho compuesto y por lo tanto no se disponía de datos sobre la actividad biológica de los enantiómeros por separado. Por todo ello iniciamos este trabajo construyendo los dos enantiómeros de butirolactona I. Además, presenta en su estructura un sistema enólico susceptible de encontrarse en equilibrio con su forma cetónica, sin embargo todos los datos de RMN indican un predominio de la primera. Por otro lado, una optimización de la geometría para ambas estructuras a nivel RHF/3-21G, proporciona una diferencia de energía de 30.4 Kcal/mol, por lo que en todos los cálculos posteriores sólo se ha tenido en cuenta la forma enólica.



Como se ha indicado en el apartado de Materiales y Métodos, las estructuras de la *R* y *S* butirolactona I fueron construidas con el programa Macromodel y sometidas a un refinamiento inicial utilizando el campo de fuerzas de amber. A continuación ambas estructuras fueron sometidas a una búsqueda conformacional utilizando el método de Monte Carlo. Las conformaciones de más baja energía así obtenidas fueron utilizadas, tras la asignación de los parámetros

correspondientes (cargas puntuales y número de enlaces rotables), como conformaciones de partida para la generación de 100 posibles modos de interacción utilizando el programa *autodock*. Estas 100 posibles soluciones, una vez filtradas y comparadas para eliminar duplicados, fueron ordenadas conforme a su energía de unión.

Debido a la elevada flexibilidad de la butirolactona I (14 ángulos torsionales), prácticamente todas las orientaciones obtenidas fueron diferentes y sólo se descartaron, utilizando un valor de rmsd = 1.0 Å, cuatro en el caso de la *R* butirolactona I y solamente una para la *S* butirolactona I. Se obtuvieron de este modo 93 orientaciones posibles para la *R* butirolactona I y 99 para la *S* butirolactona I.

En ambos casos, el complejo que predice *autodock* es al menos 1Kcal/mol más estable que la siguiente orientación de mínima energía que predice dicho programa. Además un estudio visual de las cinco primeras orientaciones de más baja energía para ambos enantiómeros, puso de manifiesto que los dos complejos propuestos eran aquellos que presentaban una orientación más adecuada y un mayor número de interacciones. Por lo tanto continuamos evaluando solamente las estructuras de los complejos que tanto para la *R* butirolactona I, como para la *S* butirolactona I, proporcionaron una menor energía de interacción.

De acuerdo con estos datos, calculados con el campo de fuerzas que incorpora *autodock* en su última versión para la evaluación de la energía libre de unión, la *S* Butirolactona I (-5.85 Kcal/mol) es capaz de formar un complejo 1.13 Kcal/mol más estable que la *R* butirolactona I (-4.72 Kcal/mol). Sin embargo, tal y como se muestra a continuación, la butirolactona I en configuración *R* es capaz de establecer un mayor número de interacciones por enlace de hidrógeno y de van der Waals.

A continuación se resumen los resultados obtenidos tras la realización del docking. Con el fin de presentar estos resultados de una forma lo más esquemática posible se han utilizado dos tipos de representaciones: por un lado unas figuras realizadas mediante el programa de gráficos moleculares *Sybyl* (29), en los que se ha enfocado en la zona de unión del ligando al receptor y en la que sólo se representan las cadenas laterales de los aminoácidos involucrados en interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, mientras que el resto

de la proteína se representa en cintas. Hemos tratado de colocar todas las figuras de este trabajo en la misma orientación para facilitar su visualización y comparación. Por otro lado, hemos utilizado unos esquemas, que nos muestran de forma simplificada las interacciones de los ligandos con los residuos implicados en la proteína. El código de colores es el mismo que se ha utilizado en el esquema 1.

En las tablas 3 y 4 se indican las interacciones por enlaces de hidrógeno y van der Waals que establecen tanto la molécula de ATP (en su complejo cristalino) como la butirolactona I en sus dos posibles configuraciones en los complejos con la CDK2 obtenidos por docking flexible. En ambas tablas se han incluido todos los residuos con los que interacciona la molécula de ATP en su complejo con la CDK2 y ha sido necesario adicionar otro residuo en la tabla 3 y otros seis residuos en la tabla 4, por dar lugar a interacciones adicionales con el ligando objeto de estudio.

Los datos referentes al complejo CDK2-ATP proceden de la literatura (32). Con el fin de utilizar un criterio homogéneo, hemos utilizado el mismo criterio que utiliza *Sybyl* (29) para considerar una interacción como enlace de hidrógeno. El criterio que por defecto utiliza *Sybyl* corresponde a distancias entre el hidrógeno unido al átomo dador y el átomo aceptor entre 0.8 y 2.8 Å y un ángulo dador-hidrógeno-aceptor con un valor mínimo de 120°. Estos valores están comprendidos entre los más frecuentes para macromoléculas biológicas (33).

R butirolactona I

De las 93 soluciones obtenidas en el presente estudio para la interacción entre la butirolactona I en configuración *R* con la CDK2, aquella que presentó una mejor energía de interacción se representa en la figura 2. Como se puede observar en dicho complejo el ligando ocupa el centro activo de la enzima y es capaz de establecer una serie de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas con el receptor.

Los enlaces de hidrógeno e interacciones de van der Waals que establece la butirolactona I en configuración *R* con la CDK2 se recogen en las tablas 3 y 4, y se representan de una forma más clara

en el esquema 2. Podemos observar que la *R* butirolactona I, establece dos enlaces de hidrógeno con la Thr14, uno ellos a través del NH de la cadena principal con el O37 del ligando y el otro a través del grupo OH y el H38 de la *R* butirolactona I.

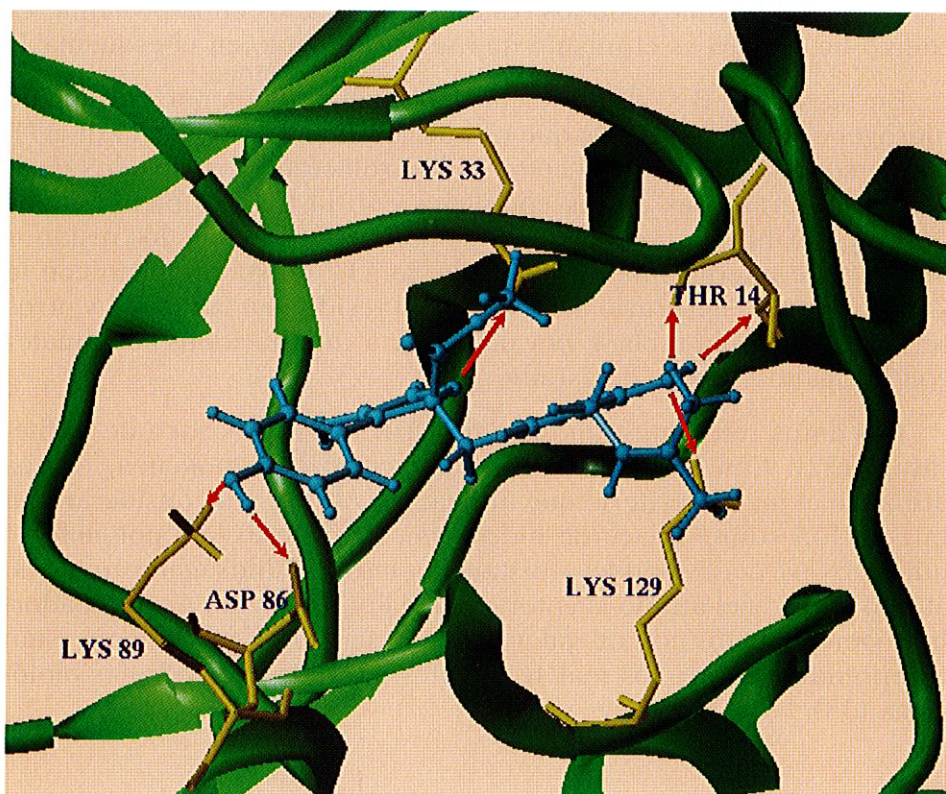


FIGURA 2. Modo de unión propuesto para la *R* butirolactona I dentro del sitio activo de la CDK2.

También forma dos enlaces de hidrógeno con el grupo amino de la Lys33, a través de los oxígenos O1 y O23. Esta interacción fija la conformación que adopta el grupo éster. Los átomos O14 y H15 del ligando establecen dos enlaces de hidrógeno con el grupo amino lateral de la Lys89 y con el carboxilato del Asp86, respectivamente. Además establece interacciones tipo van der Waals con los restos Asp86, Gln131, Lys33, Asn132, Asp145, Lys129, Gly13, Thr14, Leu134, Ile10, Lys89, Thr158 y Thr165. Es importante destacar la

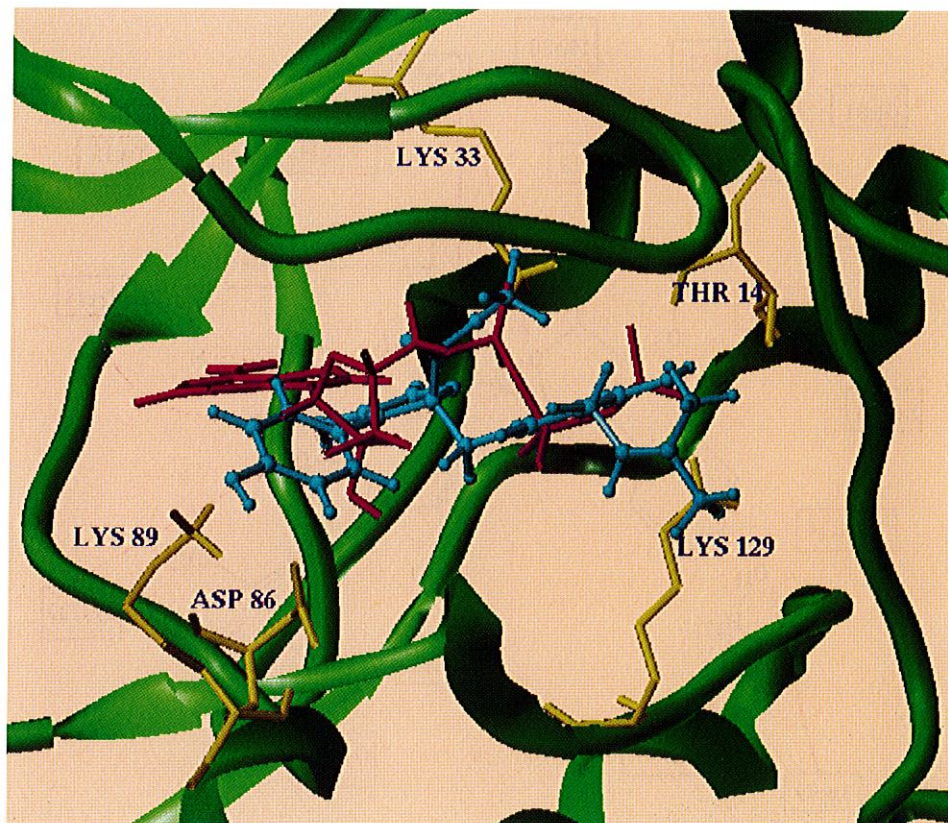


FIGURA 3. Superposición de ATP (magenta) con *R* butirolactona I (azul) en el sitio activo de CDK2.

residuos con los que también lo hace la molécula de ATP (Asp86, Lys33, Lys129 y Thr14). Como se observa en la figura 3, en la que la molécula de ATP (magenta) y la *R* butirolactona I (azul), aparecen superpuestas, ambas moléculas están situadas en la misma zona del centro activo, ocupando zonas similares del receptor, lo que explica que se establezcan interacciones electrostáticas e hidrofóbicas con los mismos residuos, a excepción del grupo dimetilvinilo.

S butirolactona I

Para la *S* butirolactona I se obtuvieron 99 posibles orientaciones. Aquella que presentó una mejor energía de interacción se representa

en la figura 4. La *S* butirolactona I, establece un menor número de interacciones con los residuos de la CDK2 que los que establece este mismo compuesto en configuración *R*.

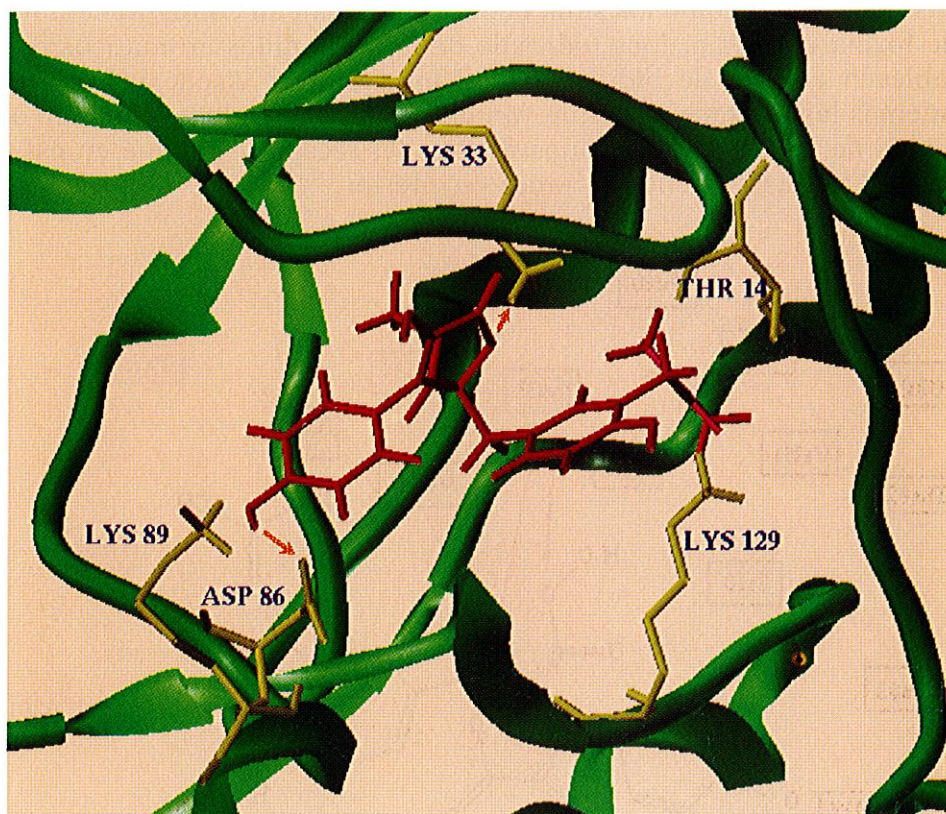
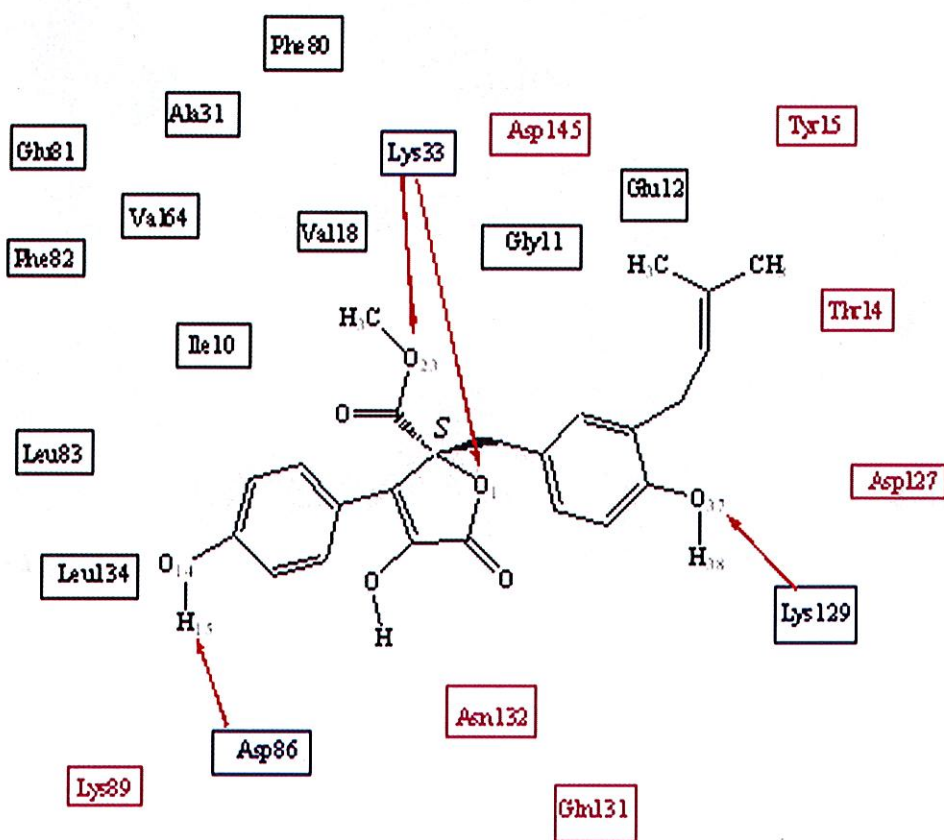


FIGURA 4. *Modo de unión propuesto para la S butirolactona I dentro del sitio activo de la CDK2.*

Como se resume en el esquema 3, la *S* butirolactona I en el complejo que predice el programa *autodock*, establece un enlace de hidrógeno centrado en tres puntos en el que participa el grupo amino lateral de la Lys33 como dador y los oxígenos O1 y O23 del anillo de lactona como aceptores (33).

Curiosamente, la *R* butirolactona I establece este mismo tipo de interacción, a pesar de que el cambio de configuración del centro quiral, obliga a un cambio importante en la conformación del grupo

éster para poder establecer este tipo de interacción en ambos enantiómeros. Por otro lado, la molécula también adopta la conformación adecuada para localizar los anillos aromáticos en posiciones casi idénticas a como los sitúa la butirolactona I en configuración *R*, de forma que los grupos hidroxilo de ambos anillos aromáticos establecen enlaces de hidrógeno con los residuos: Asp86 y Lys129. Además las interacciones tipo van der Waals tienen lugar también a través de los mismos residuos dentro del receptor, aunque en este caso el número de interacciones es inferior.



ESQUEMA 3. Representación del modo de unión de la *S* butirolactona I en el sitio activo de la CDK2.

Así la *S* butirolactona I establece interacciones tipo van der Waals con los residuos Asp86, Gln131, Lys33, Asn132, Asp145, Lys129, Thr14, Val18, Tyr15 y Asp127. En este caso no existe interacción con ninguno de los tres aminoácidos que parecen ser responsables de la selectividad de los inhibidores químicos de CDK2 (Ile10, Leu83 y Leu134).

En la figura 5 se representan las dos soluciones obtenidas para butirolactona I en configuración *R* y *S* en colores azul y rojo, respectivamente. En ambos casos el ligando ocupa la misma zona del receptor, la que originalmente estaba ocupada por la molécula de ATP, por lo que en principio ambos enantiómeros podrían actuar como inhibidores de la CDK2. A pesar de poseer distinta configuración y por lo tanto una distribución espacial diferente para los sustituyentes, la solución de más baja energía que predice el programa *auto*-

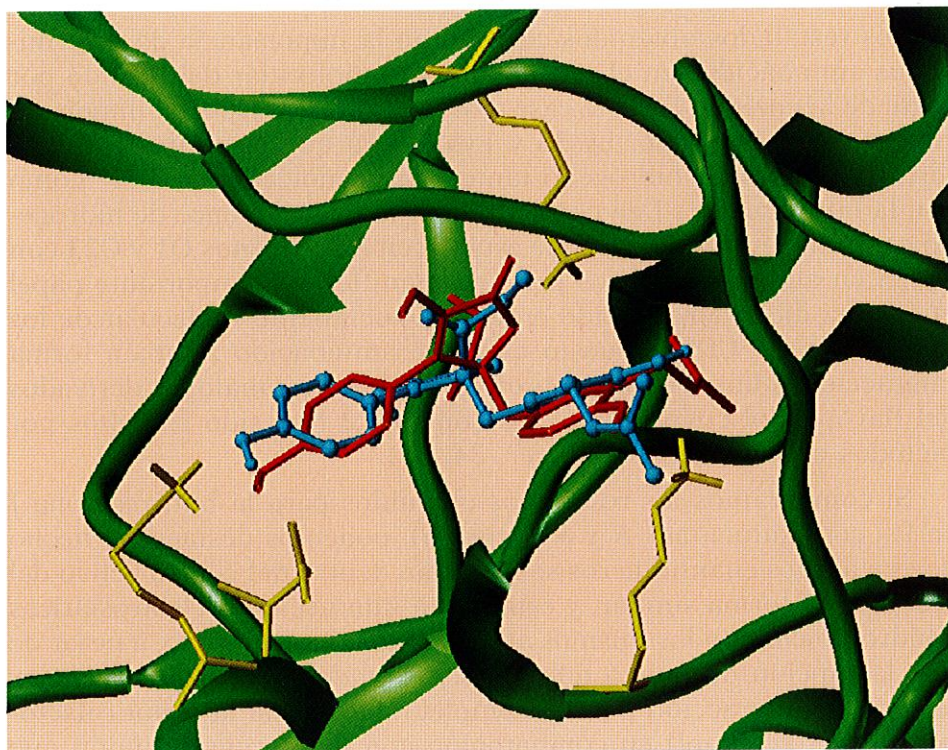


FIGURA 5. Superposición de *R* butirolactona I (azul) con *S* butirolactona I (rojo) en el sitio activo de CDK2.

dock sitúa a ambos enantiómeros en zonas casi equivalentes, de forma que los dos sistemas aromáticos (fenilo y bencilo) se sitúan en orientaciones prácticamente superponibles, estableciendo interacciones a través de los OH fenólicos por enlace de hidrógeno con los mismos aminoácidos dentro del centro activo de la CDK2.

Sin embargo, el grupo dimetilvinilo no se sitúa exactamente en la misma zona, a pesar de que un giro a través del enlace bencílico podría permitir una localización idéntica en ambos compuestos. En este caso, parece indicar que la interacción más relevante es la que establece el grupo hidroxilo en posición 4 del anillo bencílico con el resto Lys129. El sistema dimetilvinilo en el complejo que forma la *R* butirolactona I con la CDK2, está alojado en un entorno hidrofóbico constituido por los residuos Thr158 y Thr165, mientras que en el complejo formado por la *S* butirolactona I, dicho radical no puede alojarse en dicho entorno hidrofóbico.

Los resultados obtenidos corroboran la importancia de determinados aminoácidos en el reconocimiento molecular del ligando por parte de la enzima. En este caso, parecen revestir especial importancia los residuos Asp86, Lys33 y Lys129, ya que estos tres residuos forman enlaces de hidrógeno tanto con la molécula de ATP, como con la butirolactona I en configuración *R* y *S*. El enlace de hidrógeno centrado en tres puntos que establecen los oxígenos O1 y O23 con Lys33 en ambos complejos pone de manifiesto el importante papel que juega dicho aminoácido en el reconocimiento molecular de los inhibidores de CDK2, puesto que este aminoácido también forma interacciones importantes con otros inhibidores análogos derivados del flavopiridol cuyos complejos con CDK2 han sido resueltos por métodos cristalográficos (10, 17, 34, 35).

Si comparamos los resultados obtenidos para la butirolactona I en las configuraciones *R* y *S* (figura 5), podemos destacar el hecho de que ambos enantiómeros se localizan dentro del centro activo del receptor de forma similar, y establecen interacciones electrostáticas e hidrofóbicas con los mismos aminoácidos. Sin embargo, a pesar de que la función de tanteo que emplea *autodock* predice una mejor energía de interacción para el complejo que forma la *S* butirolactona I (-5.85 kcal/mol) en comparación con la energía de unión que predice para el complejo que forma el otro enantiómero (-4.72 Kcal/mol), los resultados del análisis nos indican que en este último com-

plejo el número total de interacciones es superior. Además, entre estas interacciones hay que resaltar las que se establecen con Ile10 y Leu134, que no tienen lugar en el complejo formado con el enantiómero *S*. Estos dos aminoácidos, junto con Leu83, son los responsables del 40% de las interacciones entre la CDK2 y los inhibidores químicos descritos en la bibliografía y el hecho de que estos residuos no se conserven en otro tipo de quinasas hace pensar que sean los responsables de la selectividad que presentan todos estos compuestos (15). Un reciente estudio sobre metabolitos de la butirolactona I en la que se asigna la configuración absoluta de uno de estos metabolitos, ha permitido deducir que la configuración del compuesto natural es la *R* (36).

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en nuestro estudio, pero no descartan la posibilidad de que ambos enantiómeros sean activos.

TABLA 3. Enlaces de hidrógeno que establecen los residuos de la CDK2 con los átomos de los diferentes ligandos: ATP (estructura cristalina) y *R* y *S* butirolactona I. Distancias en Å

Residuo	ATP			<i>R</i> butirolactona I			<i>S</i> butirolactona I		
	A. R	A. L	D	A. R	A. L	D	A. R	A. L	D
Glu81	O=C	H-N ₆	2.88						
Leu83	H-N	N ₁	3.44						
Asp86	O=C	H-O ₂	3.19	COO ⁻	H ₁₅	1.91	COO ⁻	H ₁₅	1.84
	O=C	H-O ₃	3.02						
Gln131	O=C	H-O ₂	2.53						
Lys33	H-N	O _{α1}	2.92	H ₃ N ⁺	O ₂₃	1.81	H ₃ N ⁺	O ₁	1.71
	H-N	O _{α2}	3.02	H ₃ N ⁺	O ₁	2.55	H ₃ N ⁺	O ₂₃	2.23
Asn132	H-N	O _{β2}	2.64						
	H-N	O _{γ1}	2.89						
Asp145	H-N	O _{γ1}	2.84						
Lys129	H-N	O _{γ3}	3.27	H ₃ N ⁺	O ₃₇	2.15	H ₃ N ⁺	O ₃₇	2.32
	H-N	O _{β3}	2.91						
Thr14	H-N	O _{γ3}	2.78	H-O	H ₃₈	2.42			
	H-O	O _{γ2}	2.83				H-N	O ₃₇	1.96
Lys89				H ₃ N ⁺	O ₁₄	2.57			

A. R: Átomo residuo; A. L: Átomo ligando; D: Distancia.

Por otro lado, es bien sabido que uno de los principales problemas que presentan los diferentes métodos de docking que se encuentran actualmente disponibles, es la incorporación de un método de tanteo que permita evaluar y ordenar las orientaciones obtenidas. Existen una serie de métodos bien establecidos para el cálculo de energías libres de unión como son AMBER, CHARM, DISCOVER y GROMOS (28). Sin embargo, este tipo de métodos requiere generalmente un elevado coste computacional y además no suelen ser muy apropiados para ordenar energías libres de unión de compuestos que se diferencian en más de unos pocos átomos. Por ello, la mayoría de métodos de docking incorporan relaciones empíricas para poder relacionar la energía libre de unión y la estructura molecular.

TABLA 4. *Interacciones por enlace de hidrógeno y van der Waals presentes en los complejos formados entre la CDK2 y: el ATP (estructura cristalina), R y S butirolactona I (docking flexible). +, - interacción presente o ausente, respectivamente.*

CDK2*	ATP		R butirolactona I		S butirolactona I	
	E. H	V. W	E. H	V. W	E. H	V. W
Glu81	+	+	-	-	-	-
Leu83	+	+	-	-	-	-
Asp86	+	+	+	+	+	+
Gln131	+	+	-	+	-	+
Lys33	+	+	+	+	+	+
Asn132	+	+	-	+	-	+
Asp145	+	+	-	+	-	+
Lys129	+	+	+	+	+	+
Thr14	+	+	+	+	-	+
Val18	-	+	-	-	-	+
Glu12	-	+	-	-	-	-
Gly11	-	+	-	-	-	-
Leu134	-	+	-	+	-	-
Phe80	-	+	-	-	-	-
Val64	-	+	-	-	-	-
Ala31	-	+	-	-	-	-
Phe82	-	+	-	-	-	-
Ile10	-	+	-	+	-	-
Lys89	-	-	+	+	-	-
Gly13	-	-	-	+	-	-
Thr158	-	-	-	+	-	-
Thr165	-	-	-	+	-	-
Tyr15	-	-	-	-	-	+
Asp127	-	-	-	-	-	+

*CDK2: Residuo en CDK2; E. H: Enlace de hidrógeno; V. W: Van der Waals.

La última versión de *autodock* incorpora este tipo de función de tanteo que ha sido calibrada con 30 complejos proteína-ligando de estructura conocida. Sin embargo, parece evidente que este tipo de función continúa siendo un factor limitante a la hora de valorar la estabilidad relativa de los complejos, especialmente si la diferencia en energía es de tan sólo 1.13 Kcal/mol.

Además como se ha indicado en la introducción todos estos métodos hacen un tratamiento rígido del receptor.

Por todo esto, y como continuación de este trabajo, hemos iniciado la realización de simulaciones de dinámica molecular para ambos complejos, que junto con la incorporación explícita del disolvente en la zona del centro activo, nos permitirán aportar más información referente a la estructura y a la estabilidad relativa de ambos complejos.

Hasta el momento la información obtenida nos ha permitido estudiar una serie de estructuras más sencillas, que han sido sintetizadas en nuestro laboratorio. En estas síntesis hemos obtenido los compuestos en su forma racémica, pues de acuerdo con los resultados expuestos en este trabajo, en principio ambos enantiómeros son capaces de formar complejos estables con la CDK2 y por lo tanto actuar como inhibidores reversibles.

Tras los resultados obtenidos al realizar el docking, pasamos a la realización de las simulaciones de dinámica molecular de la *R* y *S* butirolactona I. Se sometieron los complejos CDK2-*R* butirolactona I y CDK2-*S* butirolactona I a minimizaciones en vacío tal y como se ha descrito de forma general en el apartado de Materiales y Métodos, y seguidamente se sometieron a 800 ps de dinámica molecular en presencia explícita del disolvente alrededor del centro activo.

A continuación se recogen los resultados de las simulaciones para estos dos complejos, CDK2-*R* butirolactona I y CDK2-*S* butirolactona I:

El análisis de la desviación cuadrática estándar (RMSD) a lo largo del tiempo de simulación con respecto a la estructura inicial del complejo una vez refinada, se representa en la figura 6.

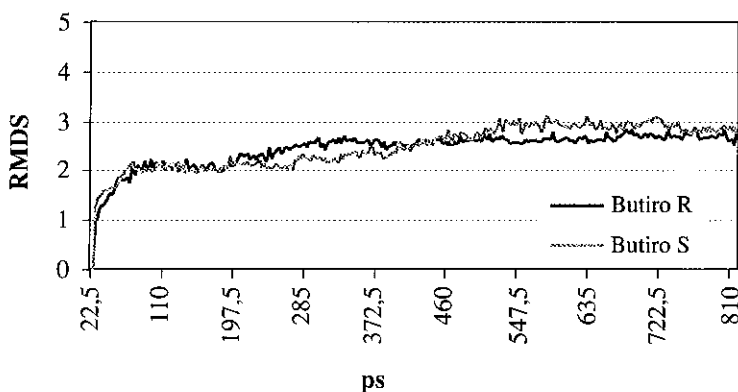


FIGURA 6. Evolución del RMSD a lo largo de la dinámica molecular para el complejo CDK2- R butirolactona I y CDK2- S butirolactona I.

En dicho gráfico, se puede apreciar que dicho parámetro se mantiene estable para ambos complejos a lo largo del tiempo de simulación, lo que indica que no se producen cambios conformacionales importantes y que por tanto los complejos se encuentran en un estado de equilibrio.

La monitorización de varias distancias a lo largo del tiempo de muestreo de las simulaciones de dinámica molecular, puso de manifiesto la formación de varios enlaces de hidrógeno en ambos complejos.

En la figura 7 y 8 se representan los valores de las distancias en Å a lo largo del tiempo de simulación. Estos datos demuestran la importancia de determinados aminoácidos en el reconocimiento molecular del ligando por parte de la CDK2. Además, se establecen una serie de enlaces de hidrógeno que se mantienen a lo largo del tiempo de simulación con la Thr14 y Asp86 para el complejo CDK2- R butirolactona I y con Asp86 para el complejo CDK2- S butirolactona I, mientras que otros solamente son estables en algunos puntos de la dinámica como Lys33, Lys89 y Lys129 para el complejo CDK2- R butirolactona I y Lys33 y Lys129 para el complejo CDK2- S butirolactona I.

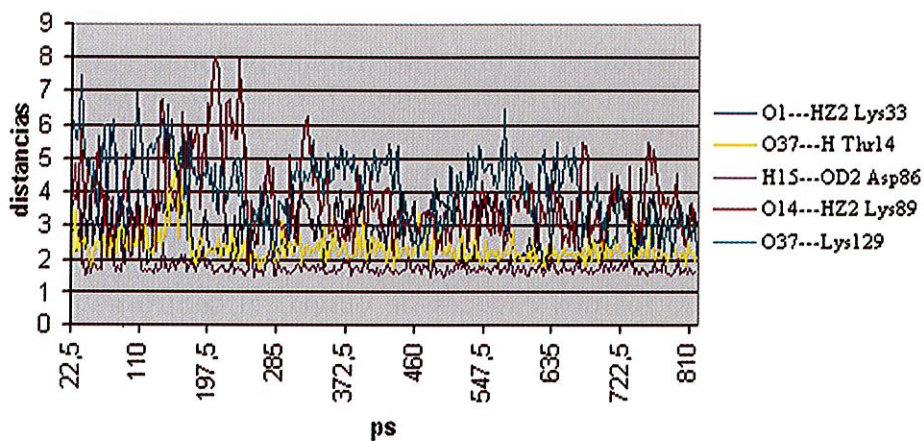


FIGURA 7. Evolución de las distancias (Å) a lo largo del tiempo de simulación del complejo CDK2-R butirolactona I.

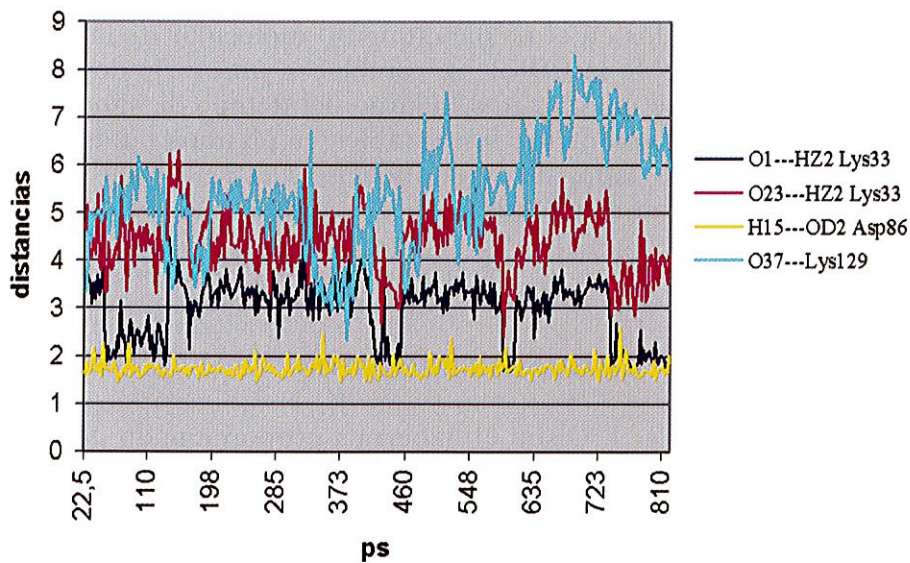


FIGURA 8. Evolución de las distancias (Å) a lo largo del tiempo de simulación del complejo CDK2-S butirolactona I.

CONCLUSIONES

Del estudio realizado en el presente trabajo podemos extraer las siguientes conclusiones: La butirolactona I, es capaz de formar un complejo estable con la CDK2, y de establecer una serie de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas con dicho receptor, lo que explica su actividad biológica. Los resultados de las simulaciones llevadas a cabo para la butirolactona I tanto en configuración *R*, como *S*, nos permiten predecir que ambos isómeros interactúan de forma similar, siendo los dos capaces de ocupar el centro activo del ATP y por tanto actuar como inhibidores competitivos. Sin embargo, en el complejo formado entre la *R* butirolactona I y la CDK2 se establecen un mayor número de interacciones en las que están involucrados aminoácidos que no se encuentran conservados en otras quinasas, y en los que parece estar el origen de la selectividad de este tipo de compuestos. Con el fin de evaluar los efectos tanto de la flexibilidad de la enzima, como del disolvente en torno al centro activo, se han llevado a cabo simulaciones de dinámica molecular utilizando el campo de fuerzas de amber. Los resultados de estas simulaciones ponen de nuevo de manifiesto la importancia de determinados aminoácidos en el reconocimiento molecular de la butirolactona I por parte de la CDK2. Se establecen una serie de enlaces de hidrógeno que se mantienen a lo largo del tiempo de simulación, mientras que otros solamente son estables en algunos puntos de la dinámica. Por otro lado, otros aminoácidos están implicados en interacciones de Van der Waals.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a A. J. Olson el habernos proporcionado de forma gratuita el programa AUTODOCK. Esta investigación recibió apoyo financiero de la Universidad San Pablo-CEU (ref de Concesión: USP-4/01 U.S.P.) y de la Dirección General de Estudios Superiores (Grant. No. PB98-0055). Agradecemos al CIEMAT la concesión de tiempo de cálculo en sus ordenadores.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) GAGO, F. (1994) In *Diseño de Medicamentos*; Farmaindustria, Ed.: España.
- (2) CRAM, D. J. (1988) *Science*, *240*, 760-767.
- (3) KUNTZ, I. D.; BLANEY, J. M.; OATLEY, S. I.; LANGIDGE, R.; FERRIN, T. E. (1982) *J. Mol. Biol.* *161*, 269-288.
- (4) DEAN, P. M.; JOLLES, G.; NEWTON, C. G. (1995) In *New Perspectives in Drug Design*; Kuntz, I. D., Meng, E. C., Shoichet, B. K., Eds.; Academic Press.: London.
- (5) LEACH, A. R.; KUNTZ, I. D. (1992) *J. Comp. Chem.* *13*, 730-748.
- (6) MORRIS, G. M.; GOODSSELL, D. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; HALLIDAY, S.; BELEW, R.; OLSON, A. J. (1999) *AUTODOCK: Automated docking of flexible ligands to receptors, version 3.0.3*.
- (7) KITAGAWA, M.; OKABE, T.; OGINO, H.; MATSUMOTO, H.; SUZUKI-TAKAHASHI, I.; KOKUBO, T.; HIGASHI, H.; SAITOH, S.; TAYA, Y.; YASUDA, H.; OHBA, Y.; NISHIMURA, S.; TANAKA, N.; OKUYAMA, A. (1993) *Oncogene*, *8*, 2425-2432.
- (8) KIRIYAMA, N.; NITTA, K.; SAKAGUCHI, Y.; TAGUCHI, Y.; YAMAMOTO, Y. (1977) *Chem. Pharm. Bull.*, *25*, 2593-2601.
- (9) KITAGAWA, M.; HIGASHI, H.; SUZUKI TAKAHASHI, I.; OKABE, T.; OGINO, H.; TAYA, Y.; NISHIMURA, S.; OKUYAMA, A. (1994) *Oncogene*, *9*, 2549-2557.
- (10) SIELECKI, T. M.; BOYLAN, J. F.; BENFIELD, P. A.; TRAINOR, G. L. (2000) *J. Med. Chem.*, *43*, 1-18.
- (11) NISHIO, K.; ISHIDA, T.; ARIOKA, H.; KUROKAWA, H.; FUKUOKA, K.; NOMOTO, T.; FUKUMOTO, H.; YOKOTE, H.; SAJIO, N. (1996) *Anticancer Res.*, *16*, 3387-3396.
- (12) HIDA, D.; NAKATA, K.; SHIMA, Y.; MIGITA, K.; NAKAO, K.; KATO, Y.; ISHII, N.; EGUCHI, K. (1998) *Anticancer Res.*, *18*, 4317-4322.
- (13) STAHURA, F. L.; XUE, L.; GODDEN, J. W.; BAJORATH, J. (1999) *J. Mol. Graph. Model.*, *17*, 1-9.
- (14) DE BONDT, H. L.; ROSENBLATT, J.; JANCARIK, J.; JONES, H. D.; MORGAN, D. O.; KIM, S.-H. (1993) *Nature*, *363*, 595-602.
- (15) SCHULZE-GAHMEN, U.; BRANDSEN, J.; JONES, H. D.; MORGAN, D. O.; MEIJER, L.; VESELY, J.; KIM, S. H. (1995) *Proteins*, *22*, 378-391.
- (16) DE AZEVEDO, W. F.; LECLERC, S.; MEIJER, L.; HAVLICEK, L.; STRNAD, M.; KIM, S. H. (1997) *Eur. J. Biochem.*, *243*, 518-526.
- (17) DE AZEVEDO, W. F.; MUELLER-DIECKMANN, H. J.; SCHULZE-GAHMEN, U.; WORLAND, P. J.; SAUSVILLE, E.; KIM, S. H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *93*, 2735-2740.
- (18) LAWRIE, A. M.; NOBLE, M. E. M.; TUNNAH, P.; BROWN, N. R.; JOHNSON, N.; ENDICOTT, J. A. (1997) *Nat. Struct. Biol.*, *4*, 796-801.
- (19) GRAY, N. S.; WODICKA, L.; THUNNISSEN, A.-M. W. H.; NORMAN, T. C.; KWON, S.; ESPINOZA, F. H.; MORGAN, D. O.; BARNES, G.; LECLERC, S.; MEIJER, L.; KIM, S. H.; LOCKHART, D. J.; SCHULTZ, P. G. (1998) *Science*, *281*, 533-538.
- (20) MEIJER, L. (1995) *Prog. Cell. Cycle Res.*, *1*, 351-363.
- (21) MEIJER, L.; LECLERC, S.; LEOST, M. (1999) *Pharmacology & Therapeutics*, *82*, 279-284.

- (22) BERMAN, H. M.; WESTBROOK; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28, 235-242.
- (23) MACROMODEL version 5.5. (1996) *MacroModel Interactive Modeling System*. Department of Chemistry, Columbia University. New York. N.Y.
- (24) SINGH, U. C.; KOLLMAN, P. A. (1984) *J. Comp. Chem.*, 5, 129.
- (25) CHANG, G.; GUIDA, W. C.; STILL, W. C. (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 4379.
- (26) GAUSSIAN 94, REVISION C.3. POPLE, J. A. ET AL. GAUSSIAN INC.; PITTSBURGH, P. A. (1995) Agradecemos al CIEMAT la concesión de tiempo de computación y la utilización de este programa.
- (27) BESLER, B. H.; MERTZ, K. M. J.; KOLLMAN, P. A. (1990) *J. Comp. Chem.*, 11, 431.
- (28) MORRIS, G. M. (1998) *J. Comp. Chem.*, 19, 1639-1662.
- (29) SYBYL version 6.6. Tripos. 1699 South Hanley Road, St. Louis, Missouri 63144. <http://www.tripos.com> 1999.
- (30) AMBER 5. CASE, D. A.; PEARLMAN, D. A.; CALDWELL, J. W.; CHEATHAM III, T. E.; ROSS, W. S.; SIMMERLING, C. L.; DARDEN, T. A.; MERZ, K. M.; STANTON, R. V.; CHENG, A. L.; VICENT, J. J.; CROWLY, M.; FERGUSON, D. M.; RADMER, R. J.; SEIBEL, G. L.; SINGH, U. C.; WEINER, P. K.; KOLLMAN, P. A.
- (31) JEFFREY, G. A. (1997) *An Introduction to Hydrogen Bonding*; Oxford University Press: New York.
- (32) KIM, S.; SCHULZE-GAHMEN, U.; BRANDSEN, J.; DE AZEVEDO JUNIOR, W. (1996) *Prog. Cell. Cycle. Res.*, 2, 137-145.
- (33) JEFFREY, G. A. (1997) *An Introduction to Hydrogen Bonding*; Oxford University Press: New York.
- (34) PARKER, B. W.; SENDEROWICZ, A. M.; NIEVES-NEIRA, W.; POMMIER, Y.; SAUSVILLE, E. A. (1996) *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 37, 398.
- (35) BIBLE, K. C.; KAUFMANN, S. H. (1996) *Cancer Res.*, 56, 4856-4861.
- (36) RAO, K. V.; SADIUKHAN, A. K.; VEERENDER, M.; RAVIKUMAR, V.; MOHAN, E. V. S.; DHANVANTRI, S. D.; SITARAMKUMAR, M.; BABU, J. M.; VYAS, K.; REDDY, G. O. (2000) *Chem. Pharm. Bull.*, 48, 559-562.

————— *Artículo original* —————

Acción de la procalcitonina sobre la temperatura corporal *

MARÍA LUISA OJEDA MURILLO

*Área de Farmacología, Laboratorio Experimental, Unidad de
Investigación, Hospital Universitario de Valme Sevilla*

RESUMEN

La procalcitonina (PCT), una proteína de 116 aminoácidos precursora de la hormona calcitonina, es un nuevo marcador diagnóstico de infección bacteriana e inflamación sistémica que presenta alta sensibilidad y especificidad, sin que se alteren los valores de calcitonina. En infecciones bacterianas severas se encuentran valores altos de PCT en plasma, sin embargo en personas sanas los niveles de PCT son indetectables. Al contrario que la interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral (TNF) u otros pirógenos endógenos (marcadores de la respuesta inflamatoria), los niveles sanguíneos de PCT no se incrementan frente a infección viral, traumas, enfermedades autoinmunes o reacciones alérgicas. Por ello la PCT se usa para el diagnóstico diferencial entre infección bacteriana y viral. A pesar de desconocerse el papel biológico de este péptido, se ha demostrado que sus concentraciones plasmáticas se correlacionan con el inicio, curso y severidad de la inflamación. Así se ha demostrado que la PCT se libera tras la inyección de endotoxina bacteriana, este incremento está relacionado con los niveles séricos de IL-1, IL-6 y TNF. Estas características indican que la PCT puede ser algo más que un simple marcador y que puede estar implicada en la respuesta febril. La región termorreguladora de las ratas se localiza en el área preóptica del hipotálamo anterior (AH/POA). En este trabajo se estudió el papel de la PCT en la termorregulación y en la fiebre inducida por endotoxina bacteriana a nivel central. En ratas Wistar se hizo un estudio dosis-respuesta de PCT frente a la temperatura corporal microinyectando diferentes dosis de PCT: 2, 4, 10, 100, 1.000 y 5.000 ng en el ventrículo lateral (icv) y registrando los cambios de temperatura corporal. También se inyectó una dosis de PCT: 100 ng icv media hora antes de la endotoxi-

* Premio Cinfa 2002 de la Real Academia Nacional de Farmacia.

na [lipopolisacárido (LPS) 50µg/kg ip]. Asimismo se realizó un estudio inmunohistoquímico de la presencia y localización de PCT en el AH/POA. Los resultados demostraron que la administración de PCT icv provoca una ligera disminución de la temperatura corporal pero no de un modo dosis-respuesta. El pretratamiento con PCT disminuye levemente la respuesta febril inducida por LPS. Se demostró la presencia del péptido PCT en la Pars Tuberal del hipotálamo.

Este trabajo se ha realizado gracias a la Fundación Valme y la Junta de Andalucía.

Palabras claves: Procalcitonin.— Fiebre.— Temperatura corporal.— Endotoxina.— Pirógeno endógeno.— Lipopolisacárido y sistema nervioso central.

ABSTRACT

Procalcitonin action on body temperature

Procalcitonin (PCT), a 116 amino acid protein with identical sequence to the precursor protein of calcitonin hormone, is a new high sensitive and specific diagnostic parameter of bacterial infection and systemic inflammation in the absence of its precursor protein. High plasma concentrations of PCT are induced during severe bacterial infection but not in controls. Unlike interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF) or other endogenous pyrogens (parameters of the inflammatory response), PCT is generally not induced by viral infection, operation trauma, autoimmune or allergic disorders. Hence, PCT can be used for differential diagnosis of bacterial and non bacterial inflammation. Although the biological role of this peptide is still largely unknown, it has been shown that PCT plasma concentrations correlate closely with the onset, course and severity of the inflammatory reaction. Moreover, it has been demonstrated that PCT is released following endotoxin injection and that the increase of plasma PCT levels, are positively correlated with IL-1, IL-6 and TNF. These characteristics of PCT might well give it not only a role as a marker in clinical infections but also a potential role in fever of bacterial origin. The thermosensitive region of the rat is the anterior hypothalamic pre-optic area (AH/POA). Therefore, the rationale for this study was to study the role of PCT in the thermoregulation and in the febrile response induced by a bacterial endotoxin on the CNS. In Wistar rats we carried out a dose-response study with PCT and body temperature microinjecting different doses of PCT: 2, 4, 10, 100, 1000 and 5000 ng in the rat lateral ventricle (icv) and we measured their body temperature. We also microinjected one dose of PCT 100ng icv half an hour before endotoxin [lipopolysaccharide (LPS) 50µg/kg]. We also designed an immunohistochemical study in the AH/POA to find the peptide PCT and its localization. The results demonstrated that the administration of PCT icv produced a low diminution in the body temperature but not in a dose-response manner. The pre-treatment with PCT lightly reduce the fever induced by endotoxin. We have found the peptide PCT in the endothelial cells of the hypothalamic Pars Tuberal.

This research was in part supported by Fundacion Valme and Junta de Andalucía.

Key words: Procalcitonin.— Fever.— Body temperature.— Endotoxin.— Pyrogenous endogens— Lipopolysaccharide.— CNS.

INTRODUCCIÓN

El control y mantenimiento de la temperatura corporal se realiza mediante una serie de mecanismos relacionados entre sí y controlados por el SNC, que consiguen mantenerla estable por medio de un equilibrio de ganancia y pérdidas de calor. El centro termorregulador del organismo reside en el área preóptica del hipotálamo anterior (PO/HA) (14, 10) que actúa como un «termostato» que armoniza la producción y eliminación de calor mediante un sistema de retroalimentación (feed-back) negativa, manteniendo una temperatura central próxima a los 37° C. Varias son las sustancias neuroquímicas implicadas en la termorregulación: dopamina, noradrenalina, serotonina, el ácido gamma-aminobutírico, péptidos, segundos mensajeros y las concentraciones iónicas del sodio/calcio. La fiebre, se define como la elevación de la temperatura corporal por encima de los límites normales con conservación de los mecanismos reguladores. Este incremento genera simultáneamente un aumento en la producción de calor y una disminución de las pérdidas caloríficas. A diferencia de la hipertermia es una de las principales manifestaciones de la enfermedad. Las causas que pueden determinarla son múltiples: bacterias, sus endotoxinas, virus, hongos, protozoos, reacciones inmunológicas, tumores y fármacos entre otros, de todos, el mejor estudiado es un lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gram negativas, la endotoxina; de cuyos tres componentes se ha identificado el lípido A como responsable del efecto pirogénico. Este grupo de sustancias son los llamados pirógenos exógenos. Actualmente se supone que en la génesis de la fiebre participan una serie de acontecimientos interdependientes, posiblemente sujetos a mecanismos de retrocontrol negativo (4), en el que se incluyen los siguientes pasos: 1) Entrada de pirógenos exógenos al organismo. 2) Activación de los monocitos, neutrófilos, linfocitos y otras células por estímulos infecciosos, tóxicos, inflamatorios y/o inmunológicos. 3) Formación y li-

beración a la circulación de sustancias pirogénicas como interleucina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral (TNF), interferón (IFN), interleucina-6 (IL-6), etc. Son los llamados pirógenos endógenos (PE).

4) Interacción de estas sustancias con lugares específicos localizados alrededor de los ventrículos cerebrales (zonas periventriculares).

5) Estímulo de la síntesis y liberación de prostaglandinas (PGs), fundamentalmente PGE₂, en la pared anterior del tercer ventrículo (3V) y en el PO/HA.

6) Activación de las neuronas termorreguladoras hipotalámicas que desencadenan en última instancia un incremento de la temperatura corporal. Sin embargo, y a pesar de todo ello, aún no se han establecido de forma precisa los últimos pasos que desencadenan la fiebre. Se sabe que el transporte humoral no es el único que siguen las citocinas para llegar al cerebro, pues las aferencias vagales participan en dicho transporte (16). Actualmente se piensa que las citocinas encontradas en hipotálamo no derivan de la sangre, sino que se sintetizan en el cerebro y son reflejo de lo que acontece con éstas en la periferia, ante situaciones adversas, tales como las infecciones (13). Aunque la fiebre no constituye el único signo presente en los procesos infecciosos, es probablemente el signo más manifiesto y mejor conocido de la infección. Origina un considerable costo metabólico para el individuo, asociado a un incremento de las demandas de oxígeno y posteriormente conlleva a un riesgo potencial de producir daños neurológicos. Además como reacción del hospedador frente a la infección aumenta la respuesta inflamatoria y la función del sistema inmunológico, reduciendo al mismo tiempo la replicación de los microorganismos. Por eso no es de extrañar que los pocos marcadores de la inflamación que existen hagan referencia al nivel de ciertas citocinas, que actúan como pirógenos endógenos, como la IL-6 y el TNF, y otros marcadores inflamatorios como la procalcitonina (PCT), la proteína C reactiva (PCR), la neopterinina, la elastasa y la fosfolipasa A₂ (CPLA₂). Cada uno de estos parámetros tienen un perfil de inducción específico y características propias frente a las distintas enfermedades. De entre todos ellos destaca la PCT por incrementar sus valores rápida, selectiva y proporcionalmente frente a bacteriemias Gram- negativas, producidas por endotoxinas (LPS, pirógeno exógeno por ontomiasia), por ello, posiblemente juegue un papel biológico más relevante que un simple marcador, actuando así en los procesos de inflamación y fiebre; hasta ahora ligeramente intuido, pero desconocido.

La PCT es la prohormona inmediata de la calcitonina. La PCT es una prohormona glico-peptídica de 116 aminoácidos. Está codificada por el gen Calc-1 y tiene un peso molecular de 12793Da (17). En individuos sanos la PCT es producida y segregada por las Células-C del tiroides, donde por un proceso proteolítico se transforma en la hormona calcitonina. Por tanto los niveles de PCT en plasma de individuos sanos son del orden de picogramos. En 1993 se demostró que los valores de PCT en sangre aumentaban en pacientes afectados por bacteriemias gram negativas, no así los de CT (9, 17). Actualmente se sabe que existen valores de PCT altos en pacientes que sufren distintos tipos de procesos inflamatorios, llegando incluso en casos de infección severa a alcanzar niveles en plasma de hasta 1.000 ng/ml. El principal estímulo para la síntesis de PCT en sangre es por tanto la administración sistémica de LPS (5). En pacientes tiroidectomizados con bacteriemia gram negativa también se han encontrado niveles altos de PCT, lo que obviamente nos lleva a buscar nuevos sitios de síntesis de PCT. Varias han sido las nuevas zonas adjudicadas a dicho fin: hígado, pulmón, intestino, monocitos... Pero inesperadamente Müller y cols. (12) han demostrado, mediante la técnica de hibridación *in situ* usando hamsters, que el ARNm PCT está, ubicua y uniformemente expresado en múltiples tejidos del cuerpo humano en respuesta a un proceso de **sepsis**; el cuerpo entero aparece como una glándula endocrina productora de PCT.

Ya hemos comentado que en personas **sanas** la PCT es la hormona de la calcitonina, dicha hormona se encarga de reducir los niveles de calcio en sangre e inhibe la reabsorción ósea, también se ha estudiado su acción como anestésico. Aunque se sabe que la PCT también se une a los receptores de calcitonina, no se ha probado su acción como hipocalcemiante (5). Un estudio del grupo de Becker (15) sugiere, que la PCT puede agravar el transcurso de la **sepsis**, basándose en el hecho de que la inyección de anticuerpos Anti-PCT en hamsters les proporcionó prevención frente a la infección por *E.coli*. Así como, que los animales en estado de sepsis provocado por LPS, sobrevivían durante más tiempo si no estaban tratados con sobredosis de PCT, que cuando sí lo estaban. Durante la sepsis aparece una fuerte hipocalcemia como respuesta a varios mecanismos, pero a día de hoy parece estar totalmente desconectado con la acción de la PCT, así como también se sabe que los niveles

de calcitonina no se encuentran elevados (3, 5). Otros estudios defienden que en el lugar oportuno, y en las concentraciones adecuadas, la PCT debe contribuir a la defensa del organismo, de hecho, Monneret y cols (11) describen por primera vez un efecto antiinflamatorio en humanos. El estudio se basa en la inhibición parcial (27%) de TNF- α en sangre humana, debido a la acción de la PCT, que sin embargo no inhibe ni a IL-1, ni a IL-6, ni a IL-8. Frente a esto surge otra teoría que defiende la unión de la PCT a los receptores de calcitonina de linfocitos T y B, provocando un aumento de la proteína-G y de los niveles intracelulares de AMPc que estimulan a la fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-PLC), que es una encima clave en la activación del proceso inflamatorio (17).

La PCT es una molécula muy estable tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que presenta una vida media de 24-30, mucho mayor que la mayoría de las citocinas. En personas sanas los valores plasmáticos de PCT son menores de 0.5 ng/ml (9, 17). En personas voluntarias inyectadas con *E.coli* (4 ng/kg) se detectan valores de PCT a las 2 horas de la inyección. Los valores sufren un incremento rápido y elevado de 4-8 horas y a las 12 horas alcanza unos valores constantes que se mantienen durante cerca de 24 horas. Cuando se repiten dichas inyecciones a las 24 y 48 horas, los valores de la PCT se elevan ligeramente y se mantienen hasta las 72 horas, por ello, los valores de PCT nos dan una idea del estado de la infección (si los valores de PCT aumentan o persisten durante mucho tiempo, nos augura un mal pronóstico). Sin embargo los valores máximos de TNF- α e IL-6 tras la administración iv de LPS (4 mg/kg) se alcanzan a las 2 y 3 horas, desapareciendo completamente de sangre a las 6 y 8 horas, respectivamente (2). Lo que nos invita a pensar que el TNF- α y la IL-6 pueden ser inductores de la PCT (Fig. 1). De hecho, se ha demostrado que al inyectar TNF- α o IL-6 iv se produce un incremento en los valores de PCT, directa o indirectamente (1). Esto indicaría que la PCT esta implicada en el complejo proceso de la inflamación, y que no sería uno de los factores iniciadores de la cascada. La rápida inducción de los valores de PCT tras la inyección *in vivo* de endotoxina, y la detección *in vitro* de ARNm de PCT, mediante PCR en cultivos celulares, que aumenta notablemente y por orden decreciente, tras la administración de LPS, TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-2 (no ocurre así con la IL-10), sugiere, que la estimulación

de PCT está muy relacionada con la inducción de los procesos inflamatorios (concretamente con la fase aguda) (1).

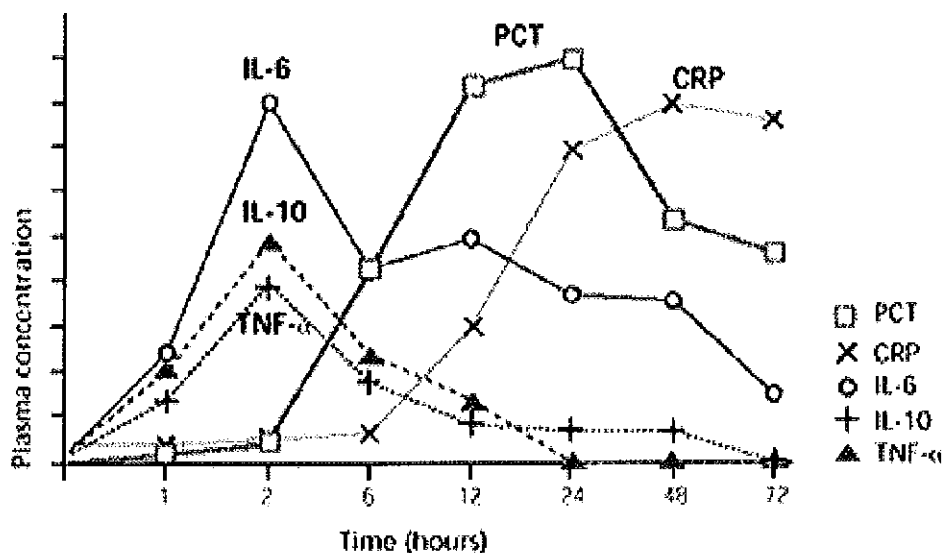


FIGURA 1. Vida media, valores máximos y tiempo de latencia de distintas citocinas y PCT, en infecciones agudas.

Así como existen numerosos estudios de los valores sanguíneos de PCT en personas sanas y en pacientes que sufren un proceso inflamatorio, poca bibliografía podemos encontrar sobre los valores de PCT en líquido cefalorraquídeo (LCR) de personas sanas o enfermas. De los trabajos existentes la mayoría se refieren a pacientes con meningitis o con traumatismos craneoencefálicos y se limitan a medir niveles plasmáticos. Referente a pacientes con meningitis, se ha visto que los valores de PCT plasmática tienen una gran importancia diagnóstica para diferenciar si el origen de la infección es viral o bacteriano. En cuanto a los valores de PCT en LCR, parece ser que un valor > 0.5 ng/ml tiene carácter diagnóstico para decir que nos encontramos frente a una meningitis bacteriana. Referente a los pacientes con traumatismo craneoencefálico, los valores de PCT en LCR de individuos accidentados se triplicaron (PCT = 0.41 ng/ml) frente a los controles (PCT = 0.15 ng/ml) (6, 7). La vida media de PCT en LCR se desconoce así como cuando alcanza su

concentración máxima, su meseta y cuando desaparece del LCR. La correlación entre los valores de PCT en LCR y los de IL-6, parecen ser paralelos, lo que implicaría a la PCT en la respuesta de fase aguda. Comparándolo con los estudios clínicos, ambos marcadores están relacionados con la gravedad de la enfermedad. Presumiblemente están implicados en la respuesta inflamatoria a nivel central. De hecho se especula que la PCT puede ser uno de los miembros de la familia de los neuropéptidos vasoactivos, que actúan como respuesta adaptativa frente a una hipoperfusión local (6, 7).

Como vimos anteriormente, el mecanismo de génesis de la fiebre actualmente aceptado, se basa en la síntesis y liberación de PGE₂ a nivel central, concretamente en la pared anterior del 3V y en el PO/HA. Si la PCT actúa como eslabón de la cadena de citocinas debe estar implicada en los mecanismos de control de la fiebre (como estimulador o como inhibidor). De cualquier modo la PCT ha demostrado tener alto valor diagnóstico para diferenciar el origen de ciertas fiebres de origen desconocido (FUO), fundamentalmente, para diferenciar si son de origen infeccioso bacteriano o de supresión inmunológica, lo cual es altamente útil porque nos da una idea del tratamiento a seguir con dichos pacientes. De hecho otros marcadores inflamatorios como la PCR y la IL-6 no tiene valor diagnóstico en este tipo de pacientes. La presencia de niveles elevados de PCT se han correlacionado con la presencia de episodios febriles en pacientes neutropénicos, sobre todo aquellos episodios debidos a infecciones por gérmenes gram negativos. Dado que la eficacia de este parámetro como marcador de episodios febriles en pacientes neutropénicos ha demostrado ser claramente superior a la de otros parámetros como la PCR, la IL-6, la IL-8 o el TNF- α , la PCT se coloca como el marcador más eficaz y de valor diagnóstico mas alto en pacientes con fiebre neutropénica. Así como un gran indicador del régimen terapéutico utilizado en dichos pacientes. Por su papel como marcador febril y los estudios citados anteriormente, podríamos pensar que la PCT está implicada en los mecanismo de la producción de fiebre, de hecho, cuando pretratamos a animales con PCT periféricamente (2, 3 y 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p.) vemos que se produce un efecto dosis-respuesta de inhibición de la fiebre inducida por *E.coli* (8). Estos resultados otorgan un valor potencial a la PCT como mediador antipirético en el control de la fiebre de origen bacteriano gram nega-

tivo. Sabemos que en última instancia, el control de la temperatura corporal, y por ende de la fiebre, se localiza en el SNC, concretamente en el PO/HA. Por tanto si la PCT verdaderamente tiene alguna acción antipirética, es conveniente estudiar su acción frente a la temperatura corporal a nivel central, así como su acción frente a la fiebre inducida por lipopolisacáridos. Por tanto, los **objetivos** de este trabajo son: 1) Estudiar el efecto de la PCT administrada en el Ventrículo Lateral (icv) sobre la temperatura corporal. 2) Analizar el efecto de la PCT administrada icv en la fiebre inducida por endotoxina bacterina (lipopolisacárido, LPS). 3) Estudiar la presencia y localización de la PCT en el SNC, especialmente en el PO/HA, tanto en condiciones normales como tras estímulos pirogénicos (LPS).

METODOLOGÍA

Animales: ratas Wistar machos (200-250 g) mantenidas en jaulas individuales a temperatura $26 \pm 1^\circ \text{C}$ (zona termoneutral para ratas), con ciclos naturales de luz y oscuridad (07:00-19:00). Agua y comida *ad libitum*. Los experimentos se iniciaron entre las 8:00 y 10:00 a.m.

Cánulas Guías: las cánulas guías de implantación crónica para microinyecciones, se fabricaron con tubos de acero inoxidable de diámetro externo 23 ga. El extremo de localización intracerebral fue biselado y redondeado, con el fin de minimizar al máximo la lesión tisular durante su implantación.

Registro de la temperatura corporal (Tc): mediante técnicas de registro biotelemétricas (Mini-Mitter, Sunriver USA). Durante la cirugía para la implantación de cánulas guía, se procedió a la implantación intraperitoneal (i.p.) de transmisores de frecuencia VH-FH calibrados previamente. Las señales emitidas por estos transmisores (Hz) fueron recogidas a través de un procesador periférico (Dataquest IV, system, Mini-Mitter) situado bajo la jaula de cada animal, y conectado a su vez a un ordenador personal. Tanto la temperatura como la actividad de cada animal fueron registradas y guardadas a intervalos de 5 minutos, para su posterior análisis.

Procedimiento quirúrgico: los animales se implantaron crónicamente en el ventrículo lateral (icv) con cánulas guías, siguiendo pro-

cedimientos asépticos de uso rutinario en nuestro laboratorio. Para ello se anestesiaron (i.p.) con una mezcla de ketamina (100 mg/kg) y xilazina (5mg/Kg) y se colocaron en una mesa estereotáxica, con el cráneo perfectamente fijado en los planos verticales y horizontales. A continuación, se realizó con un bisturí una incisión sobre la piel, desde la comisura anterior de los ojos hasta el inicio de la musculatura del cuello. Tras despegar y separar lateralmente el periostio, se expuso la calota, y se localizó bregma como punto de referencia para la obtención de las coordenadas estereotáxicas correspondientes al segundo ventrículo. Según el atlas estereotáxico (*The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. G. Paxinos y Ch. Watson. Second edition, Academic Press Australia, 1996), las coordenadas utilizadas con fijación del maxilar superior 3 mm por debajo del plano horizontal cero, fueron: Antero-posterior: -0.3 a -0.9 mm desde Bregma, Lateral: 1.4 mm desde la línea media y Vertical: 3.2 a 4 mm desde la calota. Una vez fijadas las coordenadas, y mediante una fresa de corona esférica, se procedió a la craneotomía perforando la calota hasta dejar expuesta la duramadre. A continuación se procedió a la apertura de puntos, para el emplazamiento de sendos tornillos, necesarios para la sujeción y permanencia de la cánula guía. La cánula guía se fijó al cráneo mediante el empleo de cemento dental acrílico, englobando tanto a los tornillos de fijación como a la cánula guía. Una vez endurecido éste, se introdujo a la cánula guía un estilete estéril y biselado (26 ga) de la misma longitud que ésta, con el fin de mantenerla permeable y evitar contaminación. Finalizado el proceso quirúrgico, los animales se colocaron en jaulas individuales, hasta su completa recuperación postquirúrgica (6 días al menos).

Técnica de microinyección: todas las inyecciones se realizaron en animales despiertos y habituados a los procedimientos experimentales. Para ello se utilizó una cánula inyectora de acero inoxidable (26 ga) con 1mm de longitud superior a la cánula guía, para evitar la retrodifusión del fármaco, acoplada mediante un tubo de polietileno (PE 50) lleno de la sustancia a inyectar que fue impulsada por una jeringa de Hamilton de 50 ml. La microinyección se realizó, inyectando un volumen de 5 ml en cada animal; la perfusión duró 5 minutos. Antes de proceder a la inyección de las sustancias se realizó una esterilización de los materiales, se extrajo el estilete de la cánula guía y se introdujo la cánula inyectora, infundiéndose así

la sustancia elegida. Tras la perfusión se dejó la cánula inyectora 1 minutos en el lugar de la inyección para evitar el reflujo del líquido inyectado, a continuación se extrajo y se introdujo un nuevo estilete estéril.

Fármacos: Se ha empleado Calcitonin N-Terminal Flanking Peptide (BACHEM AG) reconstituida en buffer fosfato salino (PBS) con 0.1% de albúmina sérica bovina pasado a través de un filtro 0.22 micras, llevándola a una concentración stock de 1 mg/ml, a partir de la cual se prepararon con LCR distintas alícuotas, almacenadas a -20° C durante un máximo de tres meses, evitando múltiples procesos de congelación y descongelación. Así pues, las distintas dosis: 2, 4, 10, 100, 1.000 y 5.000 ng/5 μ l se prepararon con LCR estéril en el momento de su uso. Se han empleado lipopolisacáridos *Escherichia coli* (lote 110K4060, serotipo 0111:B4, Sigma), disueltos en suero salino y administrados a una dosis de 50 μ g/Kg/ml i.p. En el caso de la inmunohistoquímica, se usaron dosis de 50, 100 y 500 μ g/Kg/ml i.p.

Análisis histológico: Tras concluir los experimentos, y de forma rutinaria, todos los cerebros fueron analizados histológicamente, procediéndose a la localización anatómica de los lugares de microinyección. Para ello, cada rata fue anestesiada i.p. con una mezcla de ketamina y xilazina. A continuación se procedió a la perfusión intracardiaca con suero salino isotónico hasta la total eliminación de la sangre, seguido sin interrupción, para la fijación del cerebro, de 500 ml paraformaldehído al 4%. Finalizado este paso, se extrajo de forma cuidadosa el cerebro y se sumergió en tampón fosfato/sacarosa al 30% a 4° C, donde permaneció de 12 a 48 horas, en ese momento ya está listo para ser almacenado a -80° C para su posterior uso. Los cortes seriados en secciones coronales de 20 μ m se realizaron con un microtomo de congelación a una temperatura de -16° C. Una vez secos los cortes a temperatura ambiente procedimos a su fijación, montaje y tinción, mediante varias etapas consecutivas: inmersión de los portas en una solución etanol 95% (2 s), lavado en agua destilada (5 s), tinción con acetato de violeta de cresilo a 40° C (15 s), inmersión en tres soluciones sucesivas de etanol 95% (5 s), deshidratación con etanol 100% en dos sesiones (5 s), citrosol (10-60 min.), secado a temperatura ambiente, montaje de portas con cubres en medio de montaje permanente,

localización de los sitios de inyección con la ayuda de un microscopio óptico y de un atlas estereotáxico de cerebro de rata Wistar (Paxinos y Watson, 1996). Los lugares de microinyección se caracterizan por la producción de un discreto daño tisular en la zona. De cualquier forma fueron descartados del presente estudio aquellos casos en los cuales la localización de las cánulas guía o lugares de microinyección se ubicaban fuera de las coordenadas establecidas.

Análisis estadístico: Los datos de todos los experimentos fueron analizados mediante el programa Sigma Plot. Todos los resultados se representan como media \pm error estándar de la media. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test Newman-Keuls. Un valor de P menor de 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

Inmunohistoquímica: en este estudio se usaron dos técnicas inmunohistoquímicas para detectar el *daño cerebral* inducido por la introducción crónica de cánulas guías en las ratas implantadas (asegurándonos que las variaciones de Tc se deben sólo a la administración icv de PCT) y para *localizar la PCT* en el cerebro de los animales no implantados crónicamente con cánulas guías, viendo si la PCT tiene acción *per se* en el cerebro de los animales tratados.

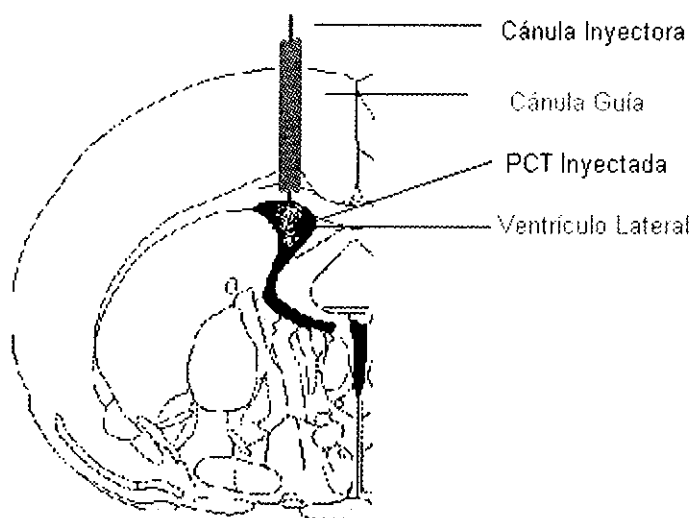


FIGURA 2. Esquema: Localización de la cánula guía e inyectora de un implante icv.

Localización del *daño cerebral* inducido el implante de cánulas guías: Para ver el daño cerebral sufrido, se utilizó un estudio IHC de marcaje de astrocitos. Los niveles de astrocitos y su localización nos proporcionan una idea del daño tisular cerebral. Para ello se utilizó un anticuerpo primario (Ac1°) antiglial (GFAP). Los cerebros se fijaron con paraformaldehído al 4%, los cortes seriados se hicieron a 8 μm y antes de congelarlos a -70°C , se dejaron 1 hora a temperatura ambiente para evitar que los cortes se despeguen durante la incubación. Antes de proceder a la incubación del anticuerpo (Ac), los portas están 30 minutos a temperatura ambiente. Todos los lavados se hicieron con tampón buffer salino (PBS) 0.01M a pH 7.4 y saponina al 0.1% durante 10 minutos. Antes de añadir el Ac1° se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3%, 40 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, se bloquearon las proteínas endógenas con bloqueante de proteínas (Bloqueante de proteínas endógenas, Bio-Genex), 15 minutos a temperatura ambiente y por último se bloquearon las actividades endógenas de avidina y biotina con bloqueante de avidina 15 minutos y bloqueante de biotina 30 minutos (las diluciones de biotina y avidina se suplementaron con un 2% de suero no inmunizado del mismo tipo que el anticuerpo secundario, para bloquear uniones inespecíficas). Todo el proceso se realizó en cámaras de humedad. A continuación se procedió a la incubación a temperatura ambiente durante toda la noche, con 50-100 μl del Ac 1° [Rabbit Anti-cow Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), DAKO] de concentración 1 mg/ml y diluido al 1/4000 en PBS/saponina 0.1%, unido a un 2% de suero no inmunizado del mismo tipo del anticuerpo secundario; o control negativo del Ac en una cámara húmeda. A continuación se procedió a la incubación a temperatura ambiente durante 30min con 25-50 μl del Anticuerpo secundario (Ac 2°) biotinizado, con una concentración de 1 mg/ml diluido al 1/2000 en PBS/saponina al 0.1%. Se le añadió el sistema de detección avidina/biotina/peroxidasa 15 minutos y se procedió a añadir el sistema de visualización tetracloruro de diaminobencidina (DAB) 8 min. Los tejidos se contratiñeron con hematoxilina 20s y se deshidrataron con una batería seriada de alcoholes: etanol 95% 5s, etanol 100% 5s, etanol 100% 5s y citrosol 20 min. Los tejidos se montaron en medio permanente y se observan al microscopio. Se hicieron controles positivos en tejidos con daño cerebral para ver el buen funcionamiento de la reacción. También se

hizo un control negativo con ausencia de Ac 1° para asegurar que no se produjeron reacciones inespecíficas.

Localización de la *molécula PCT* en el cerebro: en este caso los animales fueron perfundidos intracardiovascularmente por gravedad con 300 ml de suero salino fisiológico (SSF) a temperatura ambiente, y posteriormente con 200 ml de SSF frío. A continuación se procedió a la extracción cuidadosa del cerebro del animal, el cual se introdujo en medio de inmersión rodeado por isopentano líquido en nieve carbónica a -60° C. Las muestras se almacenaron a -80° C. Los cortes seriados se hicieron a $8\ \mu\text{m}$ y a -16° C. Se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguidos de otros 30 a 37° C (para asegurar la adhesión de los cortes al porta). Se volvieron a almacenar a -80° C. Antes de iniciar la incubación, los portas se dejaron 30 minutos a temperatura ambiente, y a continuación se fijaron con acetona pura fría durante 10 minutos. A continuación se procedió a bloquear la peroxidasa, proteínas endógenas, avidina y biotina endógenas. Todos los lavados se hicieron con PBS 0.01M a pH 7.4 y saponina al 0.1% durante 10 minutos. La incubación se hizo a temperatura ambiente y en cámaras de humedad durante toda la noche, con 100 μl del Ac 1° (anti-Human Procalcitonin Mouse Monoclonal Antibody PCT-N1, Protein G Purified, Bio Vendor) de concentración 1 mg/ml y diluido al 1/2000 en PBS/saponina 0.1%, unido a un 2% de suero no inmunizado del mismo tipo del Ac 2°; o control negativo del Ac en una cámara húmeda. A continuación se procedió a la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos con 25-50 μl del Ac 2° biotinizado (Ac 2° biotinizado Multilink, Super sensitive Biotinylated Anti-Ig for mouse, Rabbit and Guinea Pig antibodies, Bio_Genex) de uso inmediato. El proceso se realizó en cámaras de humedad. Se le añadió el sistema de detección avidina/biotina/peroxidasa 15 minutos y se procedió a añadir el sistema de visualización DAB 8 minutos. Los tejidos se contratiñeron con hematoxilina 20s y se deshidrataron con una batería seriada de alcoholes: etanol 95% 5s, etanol 100% 5s, etanol 100% 5s y citrosol (Panreac) 20 minutos. Los tejidos se montaron con EUKITT y se observan al microscopio. Se hicieron controles negativos de cada dilución prueba del Ac 1°. Los controles positivos no se pudieron hacer, debido a que no se conoce a ciencia cierta el lugar de síntesis de la PCT, con lo cual no dispusimos de tejidos que la expresaran.

Protocolo experimental: en todos los grupos experimentales se estudiaron los cambios temporales de temperatura durante el tiempo que duró el experimento. Se dividió el trabajo en tres fases: 1) Estudio Dosis/respuesta para ver la relación a nivel central existente entre temperatura corporal y PCT en animales sanos haciendo un estudio de la curva Dosis/Respuesta de la PCT frente a los cambios de temperatura registrado en animales sanos. Se microinyectaron diferentes dosis de PCT: 2, 4, 10, 100, 1.000 y 5.000 ng en icv y se midieron los cambios de temperatura en animales sanos. Se administró un control (LCR) y dos dosis de PCT por cada grupo de animales ($n = 6$). 2) Efecto de la PCT sobre la fiebre inducida por LPS, para ver la relación a nivel central existente entre fiebre y PCT en animales tratados con endotoxinas bacterianas (gram negativas). Se administró PCT 100 ng icv media hora antes de la inyección de LPS 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{ml}$ i.p. (para ver su efecto profiláctico) y se midieron los cambios de temperatura producidos en el animal. Se administró una sola dosis de LPS en cada experimento, pues su administración repetida produce tolerancia frente a la fiebre (16). Por tanto se hicieron dos grupos, uno control (LCR icv + LPS i.p.) ($n = 6$) y otro con PCT (PCT icv + LPS i.p.) ($n = 6$). La dosis elegida (PCT 100 ng) fue en base a los estudios obtenidos en la fase primera. 3) Estudio Inmunohistoquímico para detectar la presencia y localización de la PCT en el SNC. Se administró LPS a dosis únicas: 50, 100 y 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p. a ratas para provocarles fiebre, y se perfundieron a las 1, 4 y 8 horas, que son las horas correspondientes al tiempo de latencia, de inducción y de valor máximo de los niveles plasmáticos de PCT en individuos con infección por bacterias gram negativas. Se les extrajo el cerebro y se les aplicó la técnica cualitativa de inmunocitoquímica. En total son doce grupos ($n = 2$).

RESULTADOS

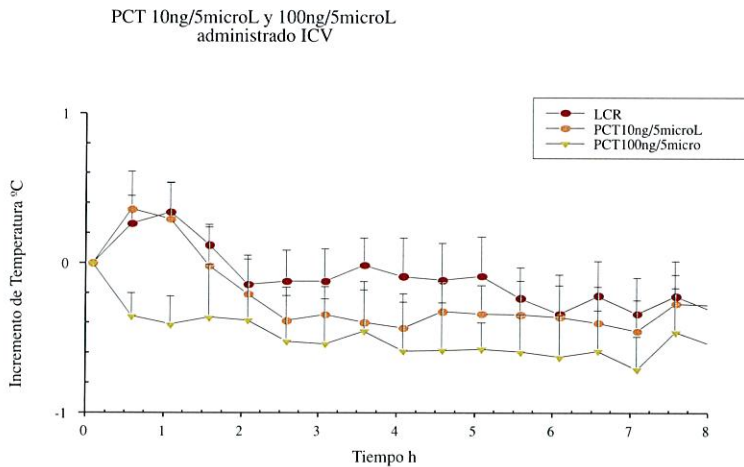
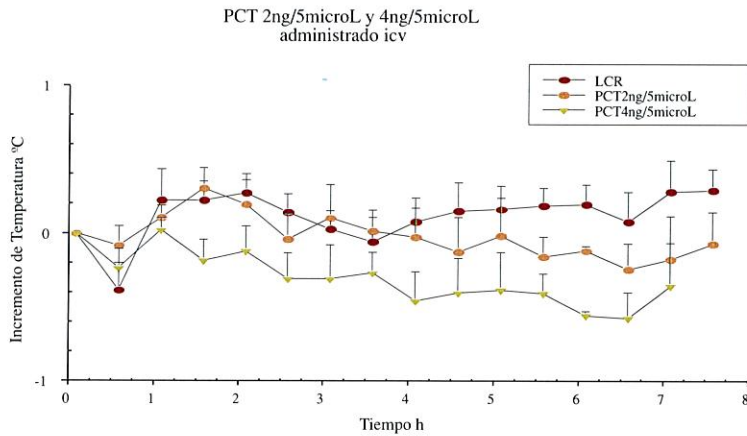
La administración icv de PCT a dosis 2 ng (Fig. 3), modifica significativamente la temperatura corporal (T_c) ($P < 0.05$). Se observa una ligera disminución de la T_c desde las 4-8 horas, alcanzando su valor mínimo a las 4 horas (-0.28 ± 0.21), presentando un tiempo de latencia de aproximadamente 60 minutos. Las ratas tratadas con PCT 2 ng, presentaron unos valores medios de la T_c , a lo largo de

las 8 horas que duró el experimento, de (0.01 ± 0.01) , alcanzando su incremento máximo de Tc a las 2 horas (0.32 ± 0.13) . El análisis comparativo del control (LCR) respecto a la dosis 2 ng reveló la existencia de diferencias significativas ($P < 0.05$). La inyección icv de PCT a dosis 4 ng (Fig. 3), es capaz de producir una variación significativa en la Tc ($P < 0.05$). Se observa una ligera disminución de la Tc desde la 1-8 horas. Alcanza su valor mínimo a las 6 horas (-0.57 ± 0.17) , valor que es significativamente menor que el del LCR (-0.43 ± 0.15) , ($P < 0.05$). Al administrar esta dosis observamos un tiempo de latencia aproximado a 60 minutos. Los animales tratados con PCT a dosis de 4 ng/5 μ l presentaron, durante las 8 horas que duró el experimento, unos valores medios de Tc de $-0.29 \pm 0.02^\circ$ C, y alcanzaron su incremento máximo a la hora (0.04 ± 0.09) . Los análisis comparativos del LCR respecto a la dosis 4 ng revelaron la existencia de diferencias significativas ($P < 0.05$), como también revelaron que la diferencia era significativa con respecto a la dosis anterior ($P < 0.05$). La administración de PCT a dosis 10 ng icv (Fig. 4) es capaz de producir un cambio significativo en la Tc ($P < 0.05$). Se observa una ligera disminución de la Tc desde las 2-8 horas, prácticamente actúa sobre la Tc durante casi toso el experimento a excepción de las 2 horas primeras. Su valor mínimo lo alcanza a las 4 horas (-0.28 ± 0.21) , el cual es significativamente menor que el del control (-0.02 ± 0.2) , ($P < 0.05$). A esta dosis, la PCT presenta un tiempo de latencia de aproximadamente 60 minutos. Los animales tratados con PCT 10 ng presentaron unos valores medios de la Tc, a lo largo de las 8 horas que duró el experimento, de $-0.22 \pm 0.03^\circ$ C, alcanzando su incremento máximo de Tc a la hora (0.41 ± 0.23) . El análisis comparativo del control respecto a la dosis 10 ng reveló la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$). La inyección icv de PCT a dosis 100 ng/5 μ l (Fig. 4) es capaz de producir un cambio significativo en la Tc ($P < 0.05$). Se observa una ligera disminución de la Tc desde los 30 minutos hasta las 8 horas, es decir, durante casi completamente todo el experimento. Alcanza su valor mínimo a las 4 horas (-0.59 ± 0.32) , el cual es significativamente menor que el del LCR (-0.02 ± 0.2) , ($P < 0.05$). Al administrar esta dosis observamos un tiempo de latencia de aproximadamente 30 minutos. Los animales tratados con PCT a dosis de 100 ng, presentaron, durante las 8 horas que duró el experimento, unos valores medios de Tc de $-0.47 \pm 0.02^\circ$ C, y alcanzaron su incre-

mento máximo a la hora (0.24 ± 0.17). El análisis comparativo del control respecto a la dosis 100 ng reveló la existencia de diferencias significativas ($P < 0.05$), así como también las hubo con respecto a la dosis 10 ng ($P < 0.05$). En la figura 5 se observa como la administración de PCT a dosis 1.000 ng icv, modifica significativamente la Tc ($P < 0.05$). Se observa una leve disminución de la Tc desde los 30 minutos hasta las 2 horas, alcanzando su valor mínimo en torno a la hora (-0.01 ± 0.10). A esta dosis, la PCT presenta un tiempo de latencia de aproximadamente 30 minutos. Las ratas tratadas con esta dosis presentaron unos valores medios de la Tc, a lo largo de las 8 horas que duró el experimento, de $0.09 \pm 0.01^\circ \text{C}$, alcanzando su incremento máximo de Tc a las 5 horas (0.28 ± 0.29). El análisis comparativo del control respecto a esta dosis reveló la existencia de diferencias significativas ($P < 0.05$). La inyección icv de PCT a dosis 5.000 ng, representada en la figura 5, es capaz de producir una variación significativo en la Tc ($P < 0.05$). Se observa una ligera disminución de la temperatura de los animales desde los 30 minutos hasta las 8 horas, es decir, durante casi todo el tiempo que dura el experimento. Es a las 4 horas cuando alcanza su valor mínimo (-0.47 ± 0.15) significativamente menor que el del LCR (-0.13 ± 0.14), ($P < 0.05$). Al administrar esta dosis observamos un tiempo de latencia de alrededor de 30 minutos. Los animales tratados con dosis de PCT 5.000 ng, presentaron, durante las 8 horas que duró el experimento, unos valores medios de Tc de $-0.24 \pm 0.01^\circ \text{C}$, y alcanzaron su incremento máximo a los 30 minutos (0.07 ± 0.06). El análisis comparativo del control respecto a dicha dosis reveló la existencia de diferencias significativas ($P < 0.05$). Así como también se encontraron diferencias significativas con respecto a la dosis 1.000 ng ($P < 0.05$).

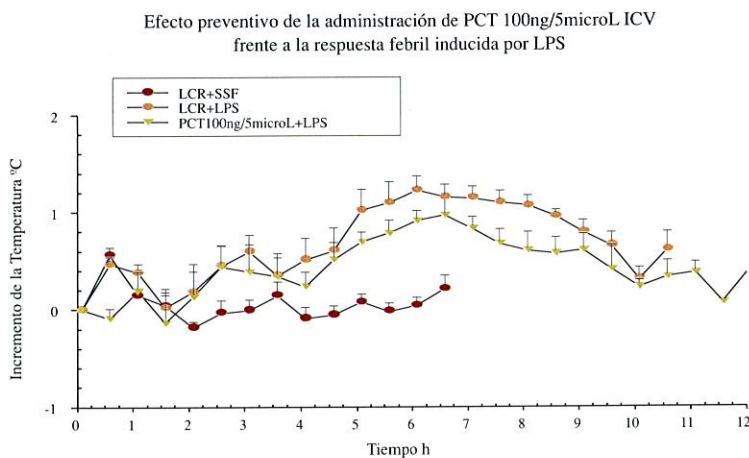
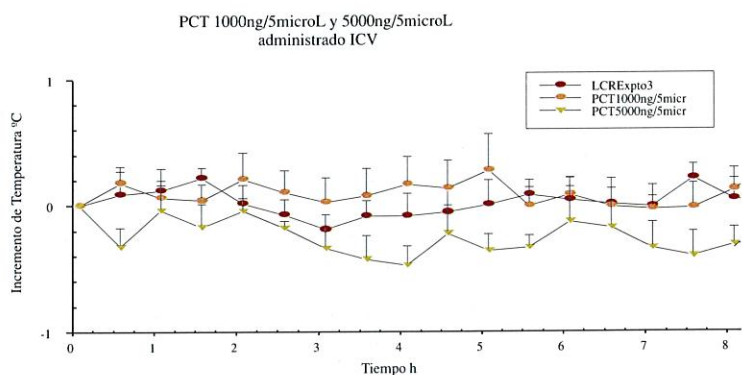
Anteriormente hemos comprobado que la dosis de 100 ng de PCT administrada icv, es la más apropiada para ejercer alguna acción sobre la Tc en animales sanos. Pues, por su corto periodo de latencia (30 min.) igual al de dosis superiores, su valor medio durante las 8 horas que duró el experimento (-0.47 ± 0.02) menor incluso que el de dosis 5.000 ng (-0.24 ± 0.01), su valor mínimo (-0.59 ± 0.32) menor que el de dosis 5.000 ng (-0.4 ± 0.15) y el largo tiempo que dura su acción (de 30 min. a 8 h.), se erige como la dosis más apropiada. El pretratamiento icv con PCT (100 ng) 30 minutos pre-

via a la administración periférica de LPS (50 µg/kg i.p.), produjo cambios significativos en la respuesta febril inducida por éste ($P < 0.05$). En la figura 6 se observa como el pretratamiento con PCT disminuye ligeramente los valores de la Tc desde las 5-9 horas. Alcanza su valor mínimo (-0.13 ± 0.28) a la hora y media, al igual que el control (LCR + LPSi.p.) que en dicho momento alcanza un



FIGURAS 3 y 4. Efecto sobre la Tc de la microinyección icv de LCR ($n=6$), PCT 2 ng ($n=6$) y PCT 4 ng ($n=6$), efecto sobre la Tc de la microinyección icv de LCR ($n=6$), PCT 10 ng ($n=6$) y PCT 100 ng ($n=6$).

valor mínimo (-0.02 ± 0.22) significativamente mayor ($P < 0.05$). El periodo de latencia y la evolución de la temperatura corporal fueron muy parecidos al control. No así sus valores medios de Tc durante las 12 horas que duró el experimento (0.48 ± 0.02), ni su incremento máximo (1.01 ± 0.16), que fueron significativamente menores que el control ($P < 0.05$). La localización anatómica de los sitios de microinyección correspondientes a todos los grupos de ratas tratadas se situaron entre -0.3 mm y -0.9 mm desde bregma (Paxinos & Watson, 1996).



FIGURAS 5 y 6. Efecto sobre la Tc de la microinyección icv de LCR (n=6), PCT 1.000 ng (n=6) y 5.000 ng (n=6), efecto de la administración icv de PCT 100 ng sobre la respuesta febril inducida por LPS (n=6).

La inmunohistoquímica del *daño cerebral* demostró, que la zona dañada se limitaba a la zona cercana a la cánula guía, y la inyectora pero sin extenderse demasiado (Fig. 7). Esto indica que el efecto producido por la administración de PCT icv, se debe a su acción básicamente sobre el ventrículo. Este hecho ocurrió tanto en los animales de la fase primera, como en los animales de la fase segunda.

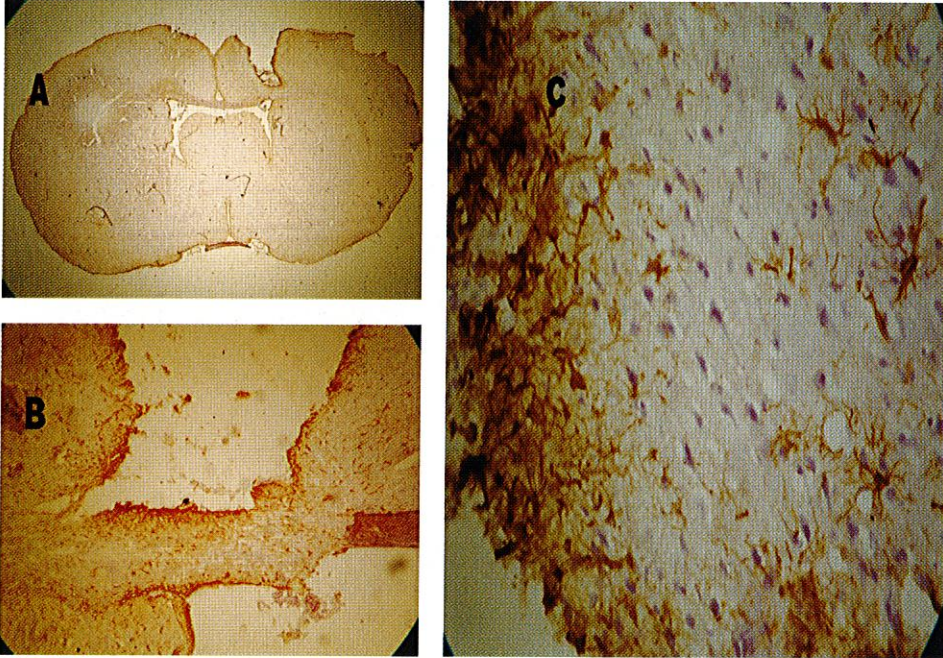


FIGURA 7. A) mapa anatómico histológico representativo del daño tisular inducido por implante de cánula guía. B) marcaje astrocitario del daño tisular. C) astrocitos marcados en zona pericanalar.

El estudio inmunohistoquímico de la *presencia de PCT* en el cerebro: marcó la presencia de esta molécula en las células endoteliales de la Pars Tuberal del hipotálamo. Esta zona se localiza cerca del tercer ventrículo y del Núcleo Arcuato, se caracteriza por poseer una barrera hematoencefálica muy permeable, lo cual explicaría la presencia de la PCT en dicha zona. En los grupos perfundidos a 1 hora se marcó la presencia de PCT en las células endoteliales anteriormente citadas, pero no se encontraron diferencias significativas a las distintas dosis de LPS administradas: 50, 100 y 500 mg. En los grupos per-

fundidos a las 4 horas la PCT se localizó en las células de la Pars Tuberal del hipotálamo, y tampoco se encontraron diferencias en función de la dosis de LPS administrada. Los grupos perfundidos a las 8 horas marcaron la presencia de PCT en la misma zona (la Pars Tuberal), y no mostraron diferencias en función de las dosis de LPS que se administraron. Los controles no presentaron marcaje en las células endoteliales de la Pars Tuberal del Hipotálamo (Figs. 8 y 9).

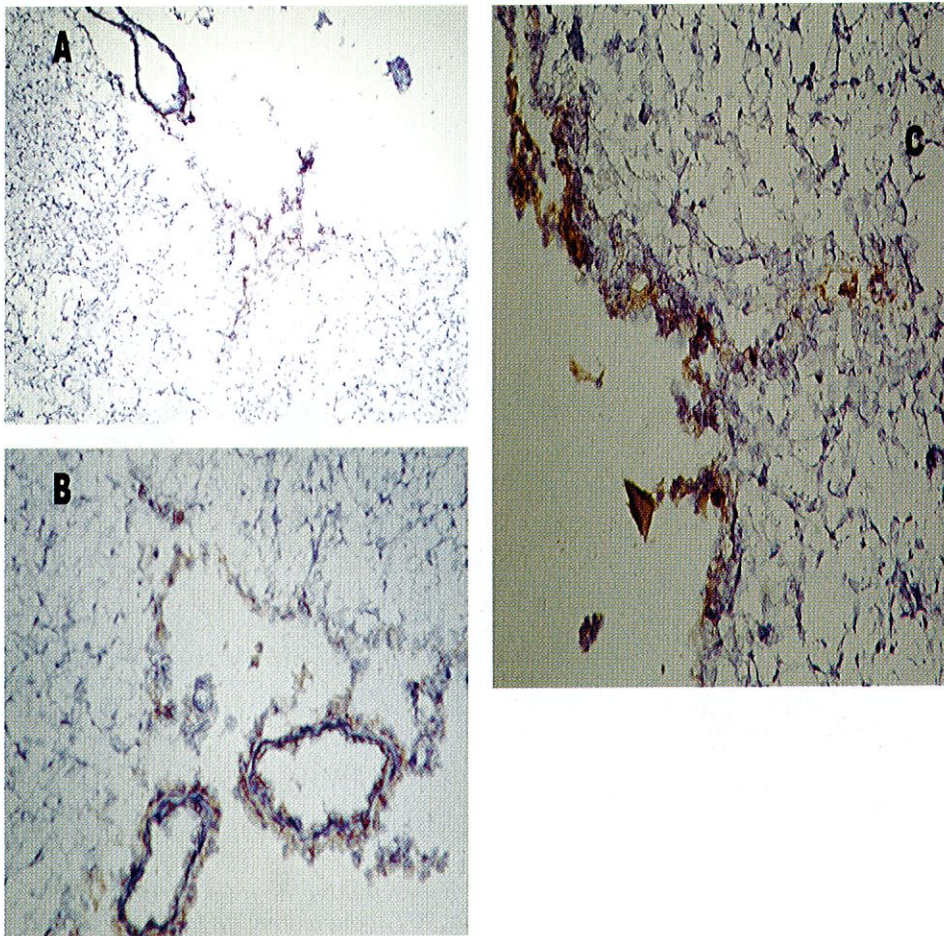


FIGURA 8. Estudio IHQ de la presencia de PCT en la Pars Tuberal del hipotálamo: A) marcaje representativo de ratas perfundidas a 1 hora tas LPS i.p. B) a las 4 horas y C) a las 8 horas.

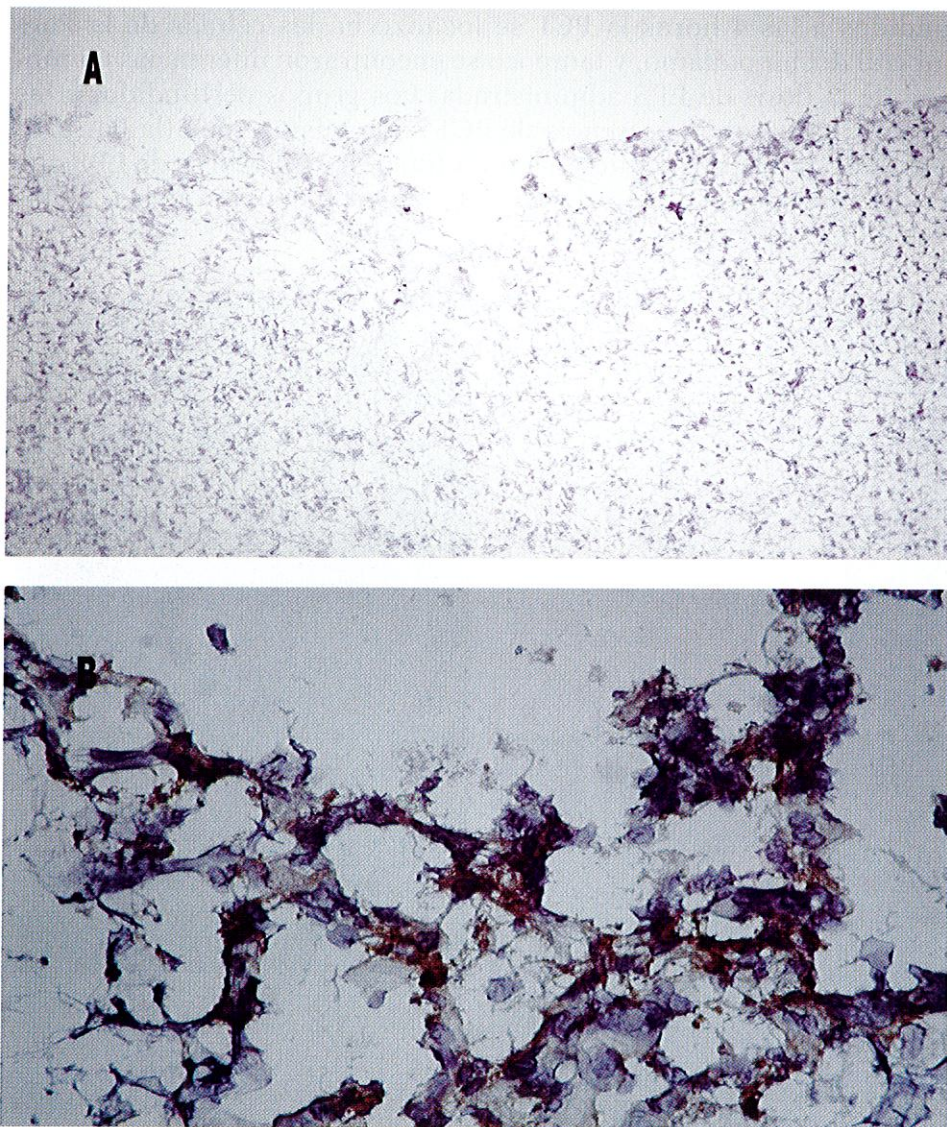


FIGURA 9. A) marcaje inexistente de PCT representativo de ratas control (SSF). B) ampliación de zona inmunoreactiva a la PCT, concretamente la Pars Tuberal.

CONCLUSIONES

1. La administración central (icv) de PCT produce una ligera disminución de la Tc, fundamentalmente de 3-8 horas.
2. La administración central (icv) de PCT a diferentes dosis no produce un efecto Dosis/Respuesta frente a la Tc.
3. El pretratamiento con PCT 100 ng/5 µl (icv), disminuye ligeramente la respuesta febril inducida periféricamente por LPS 50 µg/kg (i.p.), fundamentalmente de 4-9 horas.
4. La presencia de PCT en el cerebro de ratas con fiebre producida por la administración de LPS, se localiza en las células endoteliales de la Pars Tuberal del Hipotálamo.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BRAITHWAITE S. (2000) Procalcitonin: New insights on regulation and origin. *Crit Care Med*, 28(2): 586-588.
- (2) BRUNKHORST F.M., HEINZ U., FORYCKI Z.F.(1998) Kinetics of procalcitonin in iatrogenic sepsis. *Intensive Care Med*, 24: 888-892.
- (3) DANDONA P., NIX D., WILSON M.F. y cols.(1994) Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 1605-1608.
- (4) DINARELLO C.A., CANNON J.G., WOLFF S.M. (1988) New concepts on the pathogenesis of fever. *Rev Infect Dis*, 10(1): 168-189.
- (5) GENDREL D., BOHUON C. (2000) Procalcitonin as a marker of bacterial infection. *Pediatr Infect Dis J*, 19(8): 679-688.
- (6) HAN Y., CARCILLO J., RUPPEL R. y cols. (1999) Cerebrospinal fluid procalcitonin is increased after traumatic brain injury in children. *Crit Care Med*, 27(12): A75.
- (7) HAN Y., CARCILLO J., RUPPEL R. y cols. (2002) Cerebrospinal fluid procalcitonin and severe traumatic brain injury in children. *Crit Care Med*, 3(1): 39-44.
- (8) LÓPEZ-VALPUESTA F.J., TAVARES E., FERNÁNDEZ-ALONSO A., SANCIBRIÁN M., MIÑANO F.J. (1999) Procalcitonin: A new molecule involved in endotoxin-induced fever. Abst. XI Int Congress of Pharmacology of Thermoregulation. Sevilla.
- (9) MEISNER M. (1996) PCT: A new innovative infection parameter, biochemical and clinical aspects. Brahm's Diagnostica GMBH.
- (10) MIÑANO F.J., FERNÁNDEZ-ALONSO A., MYERS R.D., SANCIBRIÁN M. (1996) Hypothalamic interaction between macrophage inflammatory protein-1α (MIP-1α) and MIP-1β in rats: a new level for fever control? *J Physiol*, 491(1): 209-217.

- (11) MONNERET G., PACHOT A., LAROCHE B., PICOLLET J., BIENVENU J. (2000) Procalcitonin and calcitonin gene-related peptide decrease LPS-induced TNF production by human circulating blood cells. *Cytokine*, 12(6): 762-764.
- (12) MÜLLER B., WHITE J., NYLEN E., SNIDER R., BECKER K., HABENER J. (2001) Ubiquitous expression of the calcitonin-1 gene in multiple tissues in response to sepsis. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(1): 396-404.
- (13) NETEA M.G., KULLBERG B.J., VAN DER MEER J. (1999) Do only circulating pyrogenic cytokines act as mediators in the febrile response? A hypothesis. *Eur J Clin Invest*, 29(4): 351-356.
- (14) NOOR A., MALLIK B. (1991) Differential influence of medial and lateral preoptic areas on body temperature in conscious and unconscious rats. *Brain Res*, 566: 307-315.
- (15) NYLEN E.S., WHANG K.T., SNIDER JR. y cols. (1998) Mortality is increased by procalcitonin and decreased by an antiserum reactive to procalcitonin in experimental sepsis. *Crit Care Med*, 26: 1001-1006.
- (16) ZEISBERGER E. (1999) From humoral fever to neuroimmunological control of fever. *J Therm Biol* 24 (5-6): 287-326.
- (17) <http://www.procalcitonin.com>

El suelo en la biosfera y su repercusión en la Salud Ambiental *

ANTONIO LÓPEZ LAFUENTE Y
CONCEPCIÓN GONZÁLEZ HUECAS

*Departamento de Edafología. Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense de Madrid.*

RESUMEN

Se analiza en este trabajo el papel que juega el suelo en el desarrollo de los ecosistemas terrestres y su influencia en la salud ambiental. No siempre que se han estudiado los factores que intervienen en la evolución del medioambiente se ha tenido en cuenta la edafosfera como el sistema donde agua, aire, materia orgánica y materia mineral se entremezclan para formar la epidermis del planeta. Tratamos, a partir de entender el suelo como un sistema sin el cual la vida no existiría, de encontrar algunas respuestas que ayuden a los indicadores ambientales a detectar los procesos que tienen lugar en la naturaleza. El crecimiento de la población y la aceleración del desarrollo están llevando a una situación en la que no se podrá aplicar el concepto de «sostenibilidad». Estudiar el suelo para entender su funcionamiento y su relación con la salud de los habitantes es un reto que debe ser asumido con urgencia por los científicos que estudian el suelo.

Palabras clave: Suelo.— Contaminación.— Salud ambiental.

ABSTRACT

Soil in the biosphere and its impact on Environmental Health

In this work, we examine the role of soil in the development of terrestrial ecosystems and its influence on environmental health. Not all studies on the fac-

* Trabajo de investigación del que se ha extraído el discurso que pronunció Antonio López Lafuente con motivo de la toma de posesión como Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia, el 13 de marzo de 2003.

tors involved in environmental evolution have considered the edaphosphere as the system where water, air, organic matter and minerals blend to form our planet's skin. By dealing with soil as a system without which no life could ever exist, we aim to find some answers that may help environmental indicators identify natural processes. Population growth and the increasingly accelerated development are leading to a situation where the «sustainability» concept may no longer be applicable. Studying soil with a view to understanding the way it acts and how it relates to human health is a challenge to be urgently met by all soil scientists.

Key words: Soil.— Contamination.— Environmental health.

Extensive abstract

In this work, we examine the role of soil in environmental studies. Traditionally, soil has been overlooked in analysing the parameters involved in the development of nature; one could easily wonder why, if soil is an indispensable element of ecosystems, it has been so rarely addressed in these studies. The answer may lie in the concept that has developed around it. Its exceedingly utilitarian management, with studies focusing on its properties as a substrate for plant development, has led to the fact that it is in itself a complex, multistructural, multifunctional system with its own organizational laws being ignored. Such concepts as «*quality*» and «*uses*» have led to the widespread adoption of an excessively anthropomorphic approach that has precluded the emergence of a broader conception of this system.

Based on these premises, the pedology of the next millennium should undertake the challenge of managing the *resource* soil in every aspect (technical, legal, social, health-related and economic) if problems such as the climatic change, the destruction of the ozone layer, the increasing atmospheric emissions, waste management, eutrophication or desertization are to be solved with a global approach where soil is assigned a prominent role.

Let us comment now on two of the major topics in relation to pedological development, namely: soil as an element of the ecosystem that must be known and identified, and the impact of its contamination on environmental health.

So far, studies on soil have relied on traditional definitions such as «*a surface portion of the earth's crust that constitutes a complex organo-mineral system which cannot be renewed in the short run and is capable of supporting life and the existence of all terrestrial ecosystems and their associated activities*».

Based on the previous definition, soil, as a natural resource, evolves in space and time. In this context, the concept of edaphosphere emerges as the portion of the earth's surface that constitutes the interface between the lower atmosphere, the plant and the underlying geological layer. From this standpoint, the edaphosphere can be characterized in terms of spread, volume, and physical, chemical and biological properties, all of which are influenced by formation or degradation processes. Also, whether through natural evolution or by effect of human activities, the edaphosphere can expand, contract, increase or decrease in size, and undergo qualitative and/or quantitative changes in its properties.

Let us examine some of these characteristics by focusing on a specific type of site of a high environmental interest, *viz.* the diapir. Diapirs are saline geofoms rarely encountered in the Mediterranean basin that were exploited by successive civilizations. Salt, as an indispensable substance for human health, turned diapirs into natural factories for their production. Pedologically, these formations give rise to ecosystems with specific characteristics as the wide variety of original materials in them fold completely randomly to produce mineralogically complex soils.

One other aspect to be considered in studying soil is its impact on environmental health and, especially, the effects of its contamination. Because it is an open system that exchanges mass and energy with the atmosphere, lithosphere and biosphere, soil is a key medium in the control of the biogeochemical cycles that occur on the earth's surface, where it acts as an intricate receptor capable of filtering, destroying, neutralizing, storing or controlling some substances. As such, soil can be both a source of hazardous substances and a protective barrier for other, more sensitive systems such as water or vegetation.

When a contaminant reaches soil, it can be neutralized, biodegraded, adsorbed, bound or precipitated. Soil is unselective, so it can act simultaneously on organic and inorganic compounds, anions and cations, acids and bases, oxidants and reductants, metals, salts, colloids, microbes, etc. The contaminant can leave the system by volatilization, leaching, adsorption or exchange, or be extracted by vegetation and microorganisms. The end result is the retention of the contaminant or its mobilization, either within the soil or, via leaching, to the water table.

Unlike other media, contaminated soil rarely exhibits immediately appreciable effects; rather, the effects tend to go unnoticed over long periods owing to the ability of soil to accommodate them. This poses a serious problem since, when the damage becomes apparent, recovery is much costlier in terms of time and money—or may even be impossible. In response to this challenge, the scientific community, and environmental and health officials, should cooperate with a view to developing specific approaches to abating soil contamination and lessening or avoiding its impact on our quality of life.

INTRODUCCIÓN

«La Ciencia evoluciona y al tiempo se diversifica. Los conocimientos en que se basa la Ciencia son cada vez mayores y permiten afrontar nuevos campos de investigación que a su vez son origen de nuevos conocimientos. El engranaje funciona de tal manera que ejerce un efecto multiplicador, y al mismo tiempo específico» (1).

Es indudable, que hoy no se puede entender la ciencia sin ese carácter autorregenerador que le hace multidisciplinar y al mismo tiempo le imprime la condición de globalizadora. El desarrollo científico está relacionado directamente con la capacidad de integrar

todos los elementos que intervienen en los procesos, y con la posibilidad de que los resultados obtenidos afecten al conjunto del planeta. No podemos entender la ciencia desde una óptica compartimentalizada y sin conexión entre disciplinas, porque los límites son cada vez más difusos, Murray Gell Mann, Premio Nobel de Física en 1969, afirma: «*En la actualidad, la red de interrelaciones que conecta el género humano consigo mismo y con el resto de la biosfera es tan complejo que todos los aspectos se influyen mutuamente en grado extremo*» (2).

Cuando aplicamos estas premisas al estudio de los recursos naturales nos encontramos que son la base del conocimiento. No se puede afrontar el problema que supone la falta de agua, o la utilización de combustibles fósiles, desde una ciencia particular. Tampoco se pueden analizar hoy los temas medioambientales desde aspectos puramente tecnológicos sin tener en cuenta que el primer involucrado es el hombre, por ello, el estudio de indicadores sociales, económicos y sanitarios, son imprescindibles para tener una visión más próxima a la realidad. Hemos pasado de una percepción del medio a escala local, a considerar la biosfera como un sistema global, debiendo armonizar desarrollo y bienestar con protección, conservación y salud.

Esta globalización de los planteamientos alcanza también a todos los habitantes del planeta, los países en los últimos años, han tomado medidas para amortiguar los efectos negativos de una mala utilización del desarrollo. Aparecen conceptos como «*Desarrollo sostenible*», o «*Indicadores ambientales*» para definir los problemas y buscar soluciones. Es preciso profundizar en el estudio de los mecanismos y las causas de tales problemas, pero todavía se está lejos de poder cuantificar todos los parámetros que intervienen y mucho más de aportar todas las soluciones.

Un ejemplo de la dificultad que entraña el concepto de «*Desarrollo sostenible*» lo encontramos si analizamos el informe de la Agencia Europea de Medio Ambiente basado en indicadores, que se publicó en abril de 2001 (3). En él se puede leer: *el crecimiento económico sigue demandando un consumo adicional de energía y los países desarrollados continúan dependiendo de la energía producida por combustibles fósiles y de energía nuclear*. Cuando en la Cumbre de Johan-

nesburgo del pasado año 2002 se propone aumentar los recursos para potenciar la utilización de energías renovables, aparecen discrepancias, y no todos los países están de acuerdo en los planes para llevarlo a cabo.

Pero el ecosistema terrestre no es ilimitado y solo es capaz de suministrar una determinada cantidad de energía. El crecimiento de la población y la aceleración del desarrollo están llevando a una situación «no sostenible». Se están agotando las fuentes que son la base del bienestar humano, y si en el futuro no llegamos a cuadrar una ecuación que diga: Aumento energético producido por la mayor población y desarrollo tecnológico, igual a generar un efecto cero en los recursos no renovables, y un efecto equivalente en los renovables, el hombre, en los países desarrollados, no podrá seguir manteniendo su nivel de comodidad.

Ahora bien, los problemas medioambientales no afectan solo al desarrollo económico de los países, también afectan, y de forma perentoria a la estabilidad de los ecosistemas y a la forma de vida de sus especies. El cambio climático, el agotamiento de la capa de ozono, o la contaminación de aguas, suelos y plantas, tienen una repercusión directa en la supervivencia animal y vegetal, además de una incidencia notable en la salud de la población. Aparecen aquí dos términos, salud y medioambiente que están íntimamente relacionados y desde hace unos años su conexión ha dado lugar al concepto de salud ambiental.

1. MEDIOAMBIENTE Y SALUD AMBIENTAL

«La salud ambiental comprende aquellos aspectos de la salud humana, incluyendo la calidad de vida, que son determinados por factores físicos, químicos, biológicos, sociales y psicológicos en el medio ambiente. También se refiere a la teoría y práctica de valorar, corregir, controlar y evitar aquellos factores en el medio ambiente que potencialmente puedan perjudicar la salud de generaciones actuales y futuras» (4).

Definición elaborada por la Organización Mundial de la Salud en el año 1991, que incluye el efecto del impacto ambiental en la salud humana. Para determinar las relaciones de mayor importancia entre la Salud Pública y el entorno se eligen los llamados «indicadores

ambientales», parámetros que dan información clara y nítida sobre los fenómenos de mayor trascendencia, o bien parámetros, que hacen perceptible la tendencia de un proceso no detectable en el momento actual.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) definió en este mismo año, como indicador de Salud ambiental: *aquel factor que brinda datos en el área de la calidad del medioambiente, tanto en el agua como en el aire o el suelo y su impacto en relación con la salud pública* (4).

El análisis de estos factores se hace imprescindible para afrontar el estudio de la calidad ambiental. El agua es la base de la supervivencia y según las Naciones Unidas, actualmente 1.100 millones de personas viven sin agua potable y 2.400 millones sin red de saneamiento. Las emisiones de dióxido de carbono, por su efecto invernadero o de los óxidos de nitrógeno como precursores del ozono, junto a la deposición de azufre y nitrógeno que contribuyen a la acidificación de suelo y agua son algunos de los indicadores que tienen una repercusión directa en la salud.

En el VI Programa Marco Europeo de Medioambiente, publicado en noviembre de 2002, se puede leer: *«en las últimas décadas ha habido una concienciación cada vez mayor de que la calidad del aire, del agua, del suelo y de los alimentos influye en la calidad de nuestra salud y de nuestras vidas. Se pasa de un aumento de las alergias, las enfermedades respiratorias y los casos de cáncer, a la alteración de los sistemas hormonales y reproductivos de nuestro cuerpo y a la muerte prematura»* (5).

El objetivo general de este programa en relación con el medioambiente y la salud es obtener una calidad del medioambiente tal que los niveles de contaminación antropogénicos, incluidos los diversos tipos de radiación, no representen riesgos para la salud. En la estrategia política para los próximos años, está el ver por que vías los contaminantes alcanzan el cuerpo humano y determinar el camino más eficaz para reducir al mínimo aceptable los niveles de exposición referidos al aire, al agua y al suelo.

Son por tanto, aire, agua y suelo, los vehículos que transportan la vida, aunque también son los elementos que la naturaleza utiliza para transportar su alteración. Todos son imprescindibles, pero quizá

sea el suelo quien mejor representa la conjunción de un espacio vital, por lo que constituye un elemento decisivo en la valoración de los riesgos ambientales, tanto por ser un sistema en el que se desarrolla vida, como por ser almacén de nutrientes, y también un depósito de contaminantes.

No ha sido tradicionalmente el suelo, el elemento más estudiado, seguramente porque se tiene la sensación que hay mucho, y por tanto no se puede agotar, lo cual es, un gran, un imperdonable error, porque como todo bien no renovable a corto plazo, y el suelo lo es, su destrucción o contaminación significa una pérdida que tardaría miles, incluso millones de años en recuperarse.

2. EVOLUCIÓN HISTÓRICA DEL SUELO

Han tenido que pasar varias décadas, desde el comienzo del desarrollo industrial, mediados del siglo xx, para que la comunidad internacional empiece a entender su importancia, y no fue hasta 1986 cuando se emitió la primera disposición en forma de Normativa Europea específica para suelos (6).

En reuniones posteriores, promovidas por el Comité Científico Europeo de Suelos, se reconoce explícitamente que los suelos en Europa es uno de los recursos naturales más amenazados, y donde las políticas medioambientales han conseguido poco éxito.

Cabría preguntarse a que es debido, por qué el suelo, elemento imprescindible de los ecosistemas, ha tenido tan escaso tratamiento. Quizá la respuesta esté en el concepto que sobre él se ha desarrollado. Su tratamiento excesivamente utilitarista, donde su estudio se ha centrado en su condición de sustrato para el desarrollo de las plantas, ha hecho no entenderlo como un sistema, en sí mismo, complejo, multiestructural y multifuncional con sus propias leyes de organización. Conceptos como «*calidad*» o «*funciones*» del suelo imprimen una perspectiva excesivamente antropomórfica, que impide desarrollar una concepción más amplia del sistema.

Pero si atendemos al concepto holístico no podemos pararnos en el análisis de estas propiedades que definirían, el «*cuerpo edáfico*» (7). La edafología en el próximo milenio deberá ocuparse de

gestionar el *recurso suelo* en todos los aspectos: técnicos, jurídicos, sociales, sanitarios, e incluso económicos, de forma que problemas como el cambio climático, la capa de ozono, las emisiones atmosféricas, la gestión de residuos, la eutrofización, la erosión o la desertización, respondan a planteamientos generales donde el suelo no pueda ser obviado.

Un rápido análisis de la utilización del «*suelo*» en la Comunidad Europea durante los últimos años nos enseña que la agricultura se ha ido especializando y concentrando en las zonas con menores costes de explotación, de forma que el 80% de la producción intensiva en la Comunidad Europea se ubica en zonas costeras del mar del Norte y del canal de la Mancha, en detrimento del sur donde muchas hectáreas se desforestan, se marginan e incluso se abandonan por completo, la emigración o el cambio del sector productivo es la respuesta. La contaminación es otro hecho que afecta al suelo y tiene implicaciones en elementos del ecosistema, un ejemplo de ello lo encontramos en la absorción y acumulación de metales por las plantas que crecen en suelos con elevadas concentraciones de estos. Otros efectos son: el de la eutrofización que se producen en las aguas como consecuencia de la utilización de abonos nitrogenados y fosfatados, o los procesos de salinización y posteriores pérdidas de productividad.

Nos referiremos a continuación a dos de los grandes bloques temáticos que constituyen parte fundamental en el desarrollo de la edafología, de un lado, el suelo como integrante del ecosistema que debemos conocer e identificar, y de otro, las implicaciones que su contaminación tiene para la salud ambiental.

3. EL SUELO EN LA BIOSFERA

Hasta ahora, cuando se estudia el suelo partimos de definiciones clásicas, «*el suelo es la parte superficial de la corteza terrestre que constituye un sistema complejo órgano-mineral, no renovable a corto plazo, capaz de permitir la vida y la existencia de todos los ecosistemas terrestres y de las actividades asociadas*».

Según esta definición el suelo, como todo recurso natural, se despliega en el espacio y evoluciona con el tiempo. Aparece el con-

cepto de edafosfera, entendiendo como tal la superficie terrestre que forma la interfase entre la baja atmósfera, la planta y la capa geológica subyacente. Desde esta perspectiva, la edafosfera puede caracterizarse por atributos tales como extensión, volumen, propiedades físicas, químicas y biológicas, sometidos a los procesos de formación o degradación. Así mismo, ya sea mediante su evolución natural, ya como resultado de las actividades humanas, la edafosfera puede dilatarse, contraerse, aumentar o disminuir de volumen, mutar cuantitativa y/o cualitativamente sus propiedades.

Un ejemplo donde la evolución natural está relacionada con las actividades humanas lo encontramos en las formaciones diapíricas, en las que sustrato y tipo de suelo hacen de estas zonas enclaves de interés medioambiental. Los Diapiros son geoformas salinas poco frecuentes en la cuenca Mediterránea que fueron utilizadas por las diferentes civilizaciones para su explotación. La sal como sustancia imprescindible para la salud humana hizo de los diapiros fábricas naturales para su producción, cientos de familias vivieron de sus entrañas, su cuidado y conservación era imprescindible para la supervivencia.

Estudiadas, en algunos casos, como formaciones asociadas a bolsadas de petróleo (8), las formaciones diapíricas son pliegues del terreno en forma anticlinal que tienen un núcleo salino. Estas capas de sal enterradas a gran profundidad, debido a su menor densidad ascienden en columnas como troncos, van penetrando lentamente en los estratos suprayacentes y finalmente afloran en la superficie. Las columnas o cúpulas de sal pueden tener una extensión vertical de varios kilómetros y sólo uno o dos kilómetros de diámetro. Por tanto, las formaciones diapíricas representan un caso extremo de pliegues disarmónicos desarrollados en series sedimentarias que intercalan material evaporítico con una estratificación caótica.

Unidas a estas formaciones diapíricas pueden encontrarse afloramientos de rocas ígneas básicas, denominadas ofitas. Su origen es volcánico o subvolcánico y proceden de antiguas actividades sísmicas ocurridas en el Trías, que dejó en su erupción materiales sueltos, posteriormente arrastrados por el domo en su ascenso (9).

Estas formaciones dan origen a unos ecosistemas de características específicas, ya que la gran diversidad de materiales originales

se pliegan sin orden alguno, originando suelos de mineralogía compleja, condicionando una gran edafodiversidad. Los afloramientos principales se localizan en el Norte y Noreste de la Península Ibérica, Levante, Cordilleras Bética y Subbética.

Analizamos las condiciones geológicas, climáticas, botánicas y edáficas de distintos diapiros encontrados en el Norte de España, como ejemplo de ecosistemas autóctonos cuya conservación determina la evolución de los recursos naturales y participa en el desarrollo sociocultural de una región.

El área diapírica seleccionada, Norte de la provincia Burgos (Poza de la Sal), presenta una elevación máxima de 1.024 metros, y está encuadrada en el centro de un gran valle constituido por calizas y margas del Cretácico que rodean concéntricamente al domo salino. En la parte central aparece un gran dique con perfil elíptico de ofitas.

Geológicamente la zona central está formada por rocas ígneas oscuras, básicas, duras y compactas que se presentan como manifestaciones volcánicas y subvolcánicas, asociadas a su alrededor con formaciones sedimentarias. Estos materiales circundantes tienen una gran diversidad litológica, predominan arcillas abigarradas y yesos del Keuper que están en contacto con calizas arcillosas y margas jurásicas recubiertas por sedimentos terrígenos del Cretácico superior (10). Tienen un carácter claramente extrusivo que, gracias al comportamiento plástico del Keuper, representan un nivel de despegue respecto a la cobertera cretácica y terciaria.

Los afloramientos ígneos de los diapiros presentan textura ofítica heterogranular cuyos constituyentes esenciales desde el punto de vista mineralógico, son: clinopiroxeno, plagioclasas y, olivino en menor proporción. Como minerales accesorios, hornblenda y óxidos metálicos. La biotita con alto grado de cristalinidad es el filosilicato más abundante, acompañado por vermiculita en baja proporción, y trazas de clorita. En general presentan una alteración media tipo deutérico que afecta principalmente al olivino que se altera hacia minerales serpentínicos y a las plagioclasas que se alteran hacia moscovitas.

Geoquímicamente las ofitas se caracterizan por presentar una composición básica, con porcentajes de SiO_2 entorno al 50%, y don-

de el Al_2O_3 representa 1/3 del total de los otros óxidos (Figura 1). Es de destacar el alto contenido en óxido de calcio, el enriquecimiento en óxidos ferromagnesianos y la escasez en óxidos de sodio y potasio, cuyos contenidos no sobrepasan el 3% (11).

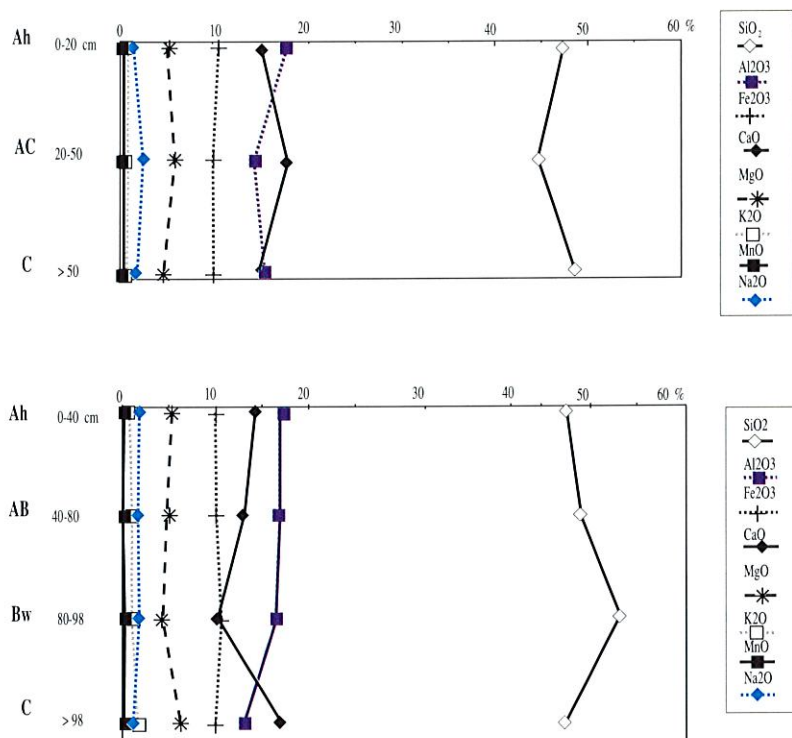


FIGURA 1. Composición química porcentual de muestras de rocas ofíticas incluidas en los suelos.

Presenta la zona un clima marcadamente mediterráneo, con una estación seca (3-4 meses) que coincide con la estación cálida lo que conduce a un intenso déficit de humedad. Las precipitaciones son escasas y torrenciales, especialmente en otoño. Elevadas temperaturas en verano, y fuertes contrastes climáticos interanuales. Según los datos de las estaciones meteorológicas más próximas, el tipo climático de la zona es Mediterráneo templado con una precipitación media anual de 650 mm y una temperatura media anual de 11,5 1C.

Desde el punto de vista bioclimático la zona se encuadra en el piso Supramediterráneo inferior, con un ombroclima seco a subhúmedo. Se distinguen dos series de vegetación: Serie supra-mediterránea castellano-cantábrica y riojano-estellesa basófila del quejigo (*Quercus faginea*) *Daphno latifoliae*-*Acereto granatensis sigmetum* y serie supra-mediterránea castellano-cantábrica y riojano-estellesa basófila de la encina (*Quercus rotundifolia*) *Spiraeo hispanicae-Querceto rotundifoliae sigmetum* (12).

En la actualidad la vegetación es poco densa y está constituida principalmente por pastos y matorrales. Los pastizales son de gramíneas del tipo *Lolium perenne*, *Phleum phleoides*, *Dactylis hispanica*, *Festuca indigesta* y *Bromus hordaceus* y de leguminosas del tipo *Medicago minima*, *Lotus corniculatos* y *Trifolium repens*, que corresponden, tanto a antiguas parcelas de labor abandonadas como, a laderas húmedas y sin arbolado. Estas formaciones a menudo se encuentran asociadas a matorrales rastreros de aulagas (*Genista scorpius*), tomillos (*Thymus mastichina*) y espliegos (*Lavandula latifolia*). Al Oeste del área diapírica se presentan cultivos de hierba, que sirven de pasto para los numerosos rebaños de oveja existentes en esta parte del país.

Debido a la gran actividad minera desarrollada en el siglo XIX en la zona, el relieve se encuentra en la actualidad fuertemente alterado, predominando terrazas artificiales construidas para la explotación de la sal.

Sobre este tipo de materiales geológicos y estas condiciones ambientales se desarrollan, dos secuencias evolutivas de suelos: la procedente de la alteración de materiales sedimentarios y la procedente de la alteración de las rocas ígneas, que a pesar de constituir catenas, tienen unas características edáficas muy diferentes.

3.1. Propiedades físicas y químicas de los suelos

Los suelos desarrollados sobre ofitas presentan una textura gruesa, con proporciones de arcilla entorno al 14%, que disminuyen en los horizontes profundos. Los mayores porcentajes de las fracciones finas en horizontes superficiales indican una alteración más intensa a este

nivel, como resultado de la marcada transformación bioquímica provocada por la descomposición de la materia orgánica (Tabla 1).

La densidad aparente varía entre 0.42 y 1.62 Mg m⁻³, lo que pone de manifiesto la pequeña proporción de constituyentes amorfos en estos suelos. Sin embargo, y a pesar de sus gruesas texturas, se trata de suelos con un alto porcentaje en la capacidad de retención de agua, que supera el 14%, este hecho es debido al alto contenido en C orgánico que estabiliza los agregados y evita las pérdidas de humedad (13).

Las texturas más finas, con altos contenidos de limo, están asociados a los suelos del tramo yesífero-arcilloso y son consecuencia de la naturaleza del material original y no a procesos de ilmerización.

No existen diferencias apreciables respecto a los valores de densidad aparente con los suelos ofíticos, si bien la capacidad de retención de agua tiende a ser superior en todos los casos, propio de clases texturales medias.

TABLA 1. *Propiedades físicas seleccionadas de suelos representativos de formaciones diapíricas*

Horz.	Análisis Granulométrico				Densidad	Densidad	Retención
	Arena Gruesa	Arena Fina	Limo	Arcilla	Aparente	Real	de Agua -33kPa
	%				Mg m ⁻³		g kg ⁻¹
Suelo derivado de ofitas							
A1	57.48	25.10	7.56	9.86	1.55	2.75	142.6
AB	47.14	29.54	9.28	14.03	1.62	2.73	138.9
Bw	46.85	37.53	9.01	14.81	nd	nd	nd
C	59.71	30.83	6.25	3.25	nd	nd	nd
Suelo derivado de materiales sedimentarios							
A1	36.52	38.44	15.19	9.85	1.01	2.55	293.2
ABca	5.29	18.39	49.58	26.74	1.51	2.68	201.1
C1	4.29	17.95	34.31	45.54	1.63	2.70	186.7
C2	35.07	21.92	18.53	24.48	1.52	2.74	209.4

Los suelos derivados de materiales ígneos presentan unos pH comprendidos entre valores moderadamente ácidos a neutros (Tabla 2). Están influenciados por la fuerte incorporación de los ácidos orgánicos. La reacción con fluoruro sódico fue ligeramente alcalina en todos los horizontes, lo que descarta la presencia de materiales ándicos (14).

Los perfiles desarrollados a partir de materiales sedimentarios alcanzan valores de pH superiores a la neutralidad. Esto se debe, por un lado a la naturaleza de los materiales litológicos y por otro, a la escasez de precipitaciones que impide la pérdida de bases por lavado, induciendo la formación de carbonato cálcico secundario.

Todos los suelos presentan, así mismo, elevados contenidos en C orgánico, como consecuencia del fuerte enraizamiento que origina el tipo de vegetación. Por el marcado contraste estacional, se trata de materia orgánica bien humificada, y estabilizada por el carbonato cálcico, en el caso de los suelos carbonatos o por los constituyentes amorfos en el caso de los suelos ofíticos (15). La evolución del nitrógeno total es similar a la evolución del carbono orgánico, lo que sugiere que las formas orgánicas de N son mayoritarias en estos suelos.

La naturaleza química de estos suelos es esencialmente igual a la del material de partida. Presentan respecto a las rocas un relativo incremento en sílice y potasio, decrecen los óxidos de aluminio y hay una ligera disminución en las proporciones de hierro, sodio y alcalinotérreos.

En las condiciones actuales las rocas de textura ofítica presentan una composición química homogénea. Las mayores proporciones corresponden a los iones Si y Ca, el resto de los cationes presentan contenidos variables aunque su concentración sigue el mismo orden $Al > Fe > Mg > Na > K > Mn$. En las rocas de facies Keuper encontramos una gran heterogeneidad química en función de su contenido en arcilla, manteniéndose constante el predominio de silicio y los altos contenidos de potasio.

El contenido en cationes alcalinos y alcalinotérreos de la roca fresca de textura ofítica y de los suelos derivados de ellas es análogo. La secuencia de movilidad es: $Ca > Mg > K > Na$. Por el contrario,

TABLA 2. Propiedades químicas seleccionadas de suelos representativos de formaciones diapiíticas

Horz.	pH	Carbónico	Nitrógeno	C/N	CIC*	Bases Cambiables			Saturación	CaCO ₃	Retención		
H ₂ O	INNaF	Orgánico	Total		Ca	Mg	Na	K	Bases Equiv.	Fosfatos			
		g kg ⁻¹				cmol kg ⁻¹			%				
Suelo derivado de ofitas													
A1	7.41	8.52	33.22	2.08	16	31.84	21.50	3.92	0.15	0.42	81.62	0.00	18.57
AB	7.61	8.72	16.42	1.60	10	32.15	23.60	3.58	0.14	0.37	86.13	0.00	19.59
B _w	7.80	8.75	14.35	1.35	10	27.05	21.32	3.61	0.14	0.29	93.75	0.00	17.52
C	8.01	8.84	2.10	0.70	-	21.94	17.55	3.08	0.11	0.23	95.58	0.00	9.76
Suelo derivado de materiales sedimentarios													
A1	7.87	nd	28.13	2.43	12	26.12	21.07	4.77	0.78	0.64	Sat.	5.10	nd
AB _{ca}	8.14	nd	10.00	0.80	11	15.46	31.07	3.52	8.87	0.47	Sat.	33.72	nd
C1	9.01	nd	2.45	0.55	-	10.94	14.39	1.28	12.90	0.39	Sat.	11.23	nd
C2	9.29	nd	0.50	0.20	-	9.19	6.91	1.01	9.76	0.24	Sat.	4.33	nd

CIC* = Capacidad de Intercambio Catiónico.

hay una gran diversidad en el contenido de los cationes básicos correspondientes a rocas y suelos del Keuper, debido a su variada naturaleza litológica y a su distribución caótica (Figura 2).

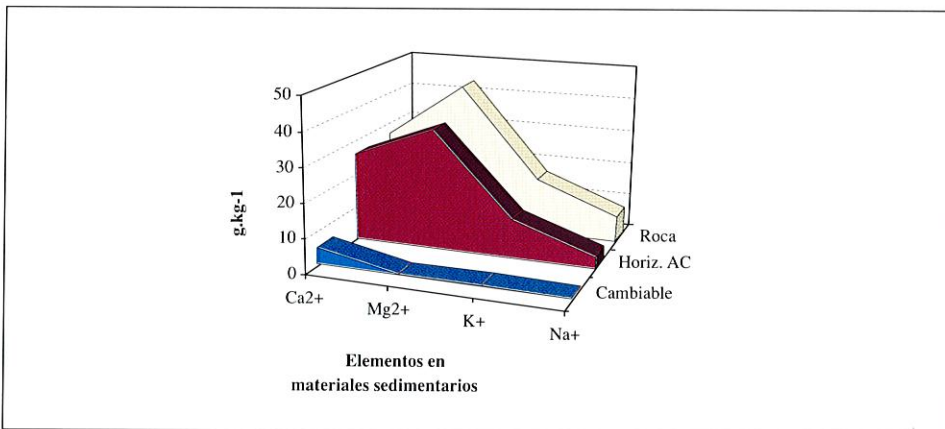
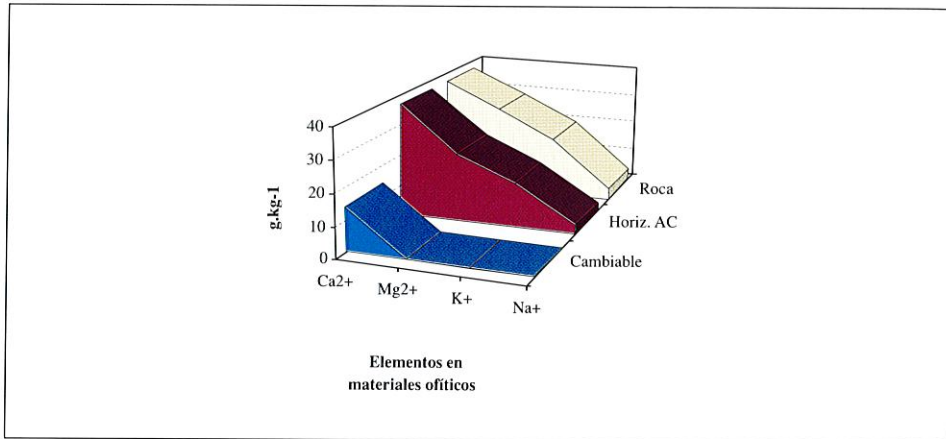


FIGURA 2. Evolución del contenido cationes alcalinos y alcalinotérreos en ambientes diapíricos.

El Ca es el catión con mayor proporción en el Complejo de Cambio Catiónico (entre un 47% y 97% del total de bases), incluso en los suelos con menor cantidad de calcio total, lo que indica que, en toda la formación diapírica, existe una preferencia relativa y/o una intensa retención de este elemento por el complejo de cambio.

A pesar de que el Na cambiante queda fijado muy débilmente en todos los suelos estudiados, su alto contenido en algunos perfiles se atribuye a la presencia de sales solubles asociadas a él, representando un peligro potencial de toxicidad, así como, un antagonismo significativo para el magnesio.

El Mg total en la unidad facies Keuper, es muy superior al Ca total, tanto en roca como en suelo. No obstante, se puede originar un estado carencial de magnesio, debido a que en el complejo de cambio las proporciones de este elemento son muy bajas, dando relaciones $Ca_{\text{cambiable}}/Mg_{\text{cambiable}} > 10$ (16). Sin embargo este hecho no supone una carencia de calcio para la vegetación, ya que las relaciones Mg/Ca en el complejo de cambio son menores de 0.13. El catión K que presenta elevadas proporciones, sobre todo en roca y suelo de materiales del Keuper, disminuye notablemente en el complejo de cambio, lo que se debe, tanto al efecto antagonista que ejerce el calcio (17), como a su facilidad para ocupar posiciones reticulares en los silicatos.

3.2. Génesis y Clasificación

Debido a la textura y al carácter heterogranular, la alteración que tiene lugar en los materiales ofíticos solo se produce superficialmente. Este hecho junto a la peculiaridad del clima mediterráneo, con escasez de precipitación < 650 mm, conduce a que estos materiales se alteren muy lentamente dando lugar a perfiles de suelos poco diferenciados, tipo AC o AR. Están constituidos por horizontes organominerales bien desarrollados que satisfacen los requisitos de epipedón móllico. Son suelos con escasa proporción de arcilla, en todos los casos heredada del material original. No obstante el buen drenaje y los fuertes contrastes climáticos interanuales han favorecido la alteración de biotita primaria hacia vermiculita, clorita, esmectita y sus interstratificados.

Cuando el material de partida corresponde a la deposición del Keuper arcillo-evaporítico, los procesos de alteración son igualmente incipientes. El escaso lavado que se produce en estos medios como consecuencia de la sequedad ambiental, junto a la impermeabilidad de los sustratos, impide la pérdida de las bases liberadas en la

alteración, por lo que los suelos permanecen saturados en cationes, permitiendo la formación de CaCO_3 secundario (18) (19).

La influencia en los suelos de los materiales salinos asociados al diapiroismo, se pone de manifiesto por los altos valores de Na^+ cambiante, conductividad eléctrica y pH. A causa de estas características se originan suelos poco evolucionados. Son las alternancias estacionales las que desempeñan un importante papel en la dinámica de los suelos, ya que provocan la precipitación de los iones menos solubles (Ca^{2+} y Mg^{2+}) y la saturación del complejo absorbente en el ión que se mantiene soluble durante más tiempo (Na^+).

En función de estos parámetros y aplicando el sistema de clasificación de suelos Soil Taxonomy propuesta por la Soil Survey Staff (20), se distinguen en el diapiro tres Grandes grupos de suelos:

Haploxerolls, los formados a partir de material subvolcánico.

Torriorthent y Xerorthent, los formados a partir de arcillas y yesos del Keuper (21).

Los clasificados dentro del orden Mollisols como Haploxerolls corresponden a los suelos desarrollados sobre materiales ofíticos y presentan un epipedón móllico y un régimen de humedad xérico. Se caracterizan por tener un horizonte orgánico en superficie, desarrollado sobre un horizonte de alteración fisicoquímica con diferentes grados de evolución. Se distinguen tres subgrupos: Typic haploxeroll, por presentar un horizonte cámbico y alta saturación en bases. Entic haploxeroll, por presentar un alto contenido en fragmentos rocosos y escaso desarrollo de los horizontes. Lithic haploxeroll, por tener contacto lítico.

Los suelos desarrollados sobre materiales arcillosos del Keuper se clasificaron dentro del orden Entisols como Torriorthent y Xerorthent. Son suelos con escaso desarrollo genético caracterizados por tener un epipedón órico. Se distinguen dos subgrupos: Tipyc Torriorthent aquellos que tienen una conductividad eléctrica en extracto de saturación mayor de 2 dSm^{-1} a 25°C , y Tipyc Xerorthent los que presentan una moderada profundidad y un régimen de humedad xérico. Como consecuencia, la unidad de paisaje seleccionada presenta una gran variabilidad edáfica, con suelos de composición química y mineralógica heterogénea.

Encontramos, por tanto, en estas formaciones un ecosistema que responde a una arquitectura heterogénea, donde son muchos los parámetros que intervienen y cada uno de ellos influye en el equilibrio del sistema.

4. ELEMENTOS CONTAMINANTES DEL SUELO. SALUD AMBIENTAL

Surge en este punto un nuevo planteamiento que el edafólogo debe hacerse. La Edafología tiene su base científica en el estudio del suelo, como hemos visto, pero como cualquier otra ciencia, sobre el fundamento y el método científico, se desarrollan, además, unas aplicaciones que ayudan a su evolución. Es en este contexto donde debemos encuadrar el análisis de la calidad de los suelos y sus efectos sobre la salud de la población. Ahora bien, no podemos olvidar que disciplinas como la edafología tiene una serie de dificultades que hacen difícil la posibilidad de hallar la necesaria «*causa-efecto*», pues en muchos casos se valora lo que podemos definir como «*efectos débiles o no apreciables*», es decir, valoramos elementos que son nocivos, muchas veces, en cantidades trazas, y con secuelas no apreciables a corto plazo.

Analizamos a continuación las consecuencias que suponen para la salud ambiental la existencia de suelos contaminados, que según el último informe de la Agencia Europea de Medioambiente, se estima que en la Comunidad Europea hay alrededor de 1,5 millones de áreas contaminadas de diversa naturaleza.

Las constantes agresiones que sufre el medioambiente, fundamentalmente en los países industrializados, desde comienzos del siglo xx, por el aumento de la población, y por el desarrollo de la ciencia y la técnica, ponen de manifiesto la necesidad de estudiar su comportamiento frente a la llegada de elementos extraños.

El suelo por ser un sistema abierto que intercambia materia y energía con la atmósfera, hidrosfera, litosfera y biosfera, hace de él un medio clave en el control de los ciclos biogeoquímicos que tienen lugar en la superficie del planeta, donde el suelo actúa como un receptor complejo, capaz de realizar funciones de filtración, descom-

posición, neutralización, almacenamiento y regulación de determinadas sustancias. Por lo que este puede ser barrera protectora de otros sistemas más sensibles, agua, plantas, animales, o por el contrario puede ser fuente de sustancias peligrosas.

Cuando una sustancia entra en el suelo puede ser neutralizada, degradada de forma biótica o abiótica, adsorbida por procesos de adsorción específica o cambio iónico, complejada o precipitada. El suelo no es selectivo y puede actuar simultáneamente sobre compuestos orgánicos e inorgánicos, aniones y cationes, ácidos y bases, oxidantes y reductores, metales, sales, partículas coloidales, microorganismos, etc. La salida del sistema puede ser por volatilización, por lavado, por adsorción, por intercambio, o extraído por la vegetación y microorganismos. Como resultado final se produce la retención de las sustancias o su movilización, bien en el interior del suelo, bien a través de sus lixiviados a las capas freáticas.

La legislación española en la Ley básica de Residuos Tóxicos de 1998 define suelo contaminado como *«todo aquel cuyas características físicas, químicas o biológicas han sido alteradas negativamente por la presencia de componentes de carácter peligroso de origen humano, en concentración tal que comporte un riesgo para la salud humana o el medio ambiente»* (22). Entendiendo por contaminante no solo a la sustancia química de origen humano, sino también aquella que siendo de origen natural se acumula en el suelo y produce cambios en su equilibrio.

La ley recoge veintinueve productos tóxicos que se agrupan en: Compuestos tóxicos de naturaleza orgánica y compuestos tóxicos de naturaleza inorgánica, todos ellos representan un elevado nivel de riesgo para la vida, ya que a través de vertidos accidentales o planificados, estos compuestos llegan al suelo, a las plantas, a las aguas y por último a nuestro propio organismo.

4.1. Compuestos orgánicos

El desarrollo tecnológico ha dado origen a la existencia de miles de compuestos orgánicos que son contaminantes potenciales de los suelos, bien por si mismos, bien como resultado de transformacio-

nes químicas o biológicas, que conducen a la formación de nuevos productos, en ocasiones más móviles, persistentes y peligrosos que los compuestos de partida.

Algunos de estos compuestos orgánicos son relativamente inertes, sin embargo, otros son muy activos aún en concentraciones muy bajas. Las propiedades moleculares, en particular la estructura electrónica, la solubilidad en agua y su disponibilidad para volatilizarse, son los factores que controlan su comportamiento en el suelo.

Dos son los tipos de moléculas que afectan de forma directa a los suelos, unas de elevado Peso Molecular o macromoléculas y otras de bajo Peso Molecular.

Constituyen las primeras, polímeros que se incorporan en los suelos de manera natural o de forma antrópica. El origen natural se debe a la proliferación de microorganismos y a las transformaciones químicas de compuestos orgánicos naturales existentes en el suelo, como son ácidos fúlvicos y ácidos húmicos, así como polisacáridos cargados positiva o negativamente. Estas macromoléculas, por sí mismas no son consideradas como contaminantes del suelo, pero al constituirse en ligandos de compuestos tóxicos orgánicos e inorgánicos, desarrollan un importante papel en los procesos de contaminación.

Los polímeros sintéticos aparecen en el suelo como productos de actividades humanas. Están formados por alcoholes vinílicos, acrilamidas, etilenglicoles, entre otros. Todos ellos, son sustancias no iónicas, solubles en agua, capaces de formar complejos órgano-minerales con la fracción arcilla de los suelos. En general no son tóxicos pero pueden ser muy peligrosos cuando aumenta su concentración como consecuencia de vertidos incontrolados, llegándose a detectar cantidades por encima de 1.100 microgramos por L⁻¹ en lixiviados procedentes de residuos hospitalarios.

El segundo grupo, sustancias de bajo Peso Molecular, se encuentran en la superficie del suelo como resultado de las distintas prácticas de protección de cultivos, o por deposición de vertidos industriales. Se incluyen sustancias como fitosanitarios y productos derivados del petróleo.

De ellos, debido a su uso, son los fitosanitarios los compuestos orgánicos que más afectan a las propiedades del suelo. El enorme

crecimiento demográfico de los países subdesarrollados y, el aumento de la calidad de vida de los desarrollados, ha traído como consecuencia la necesidad de obtener más y mejor cosechas, lo que lleva implícito la necesidad de combatir plagas y enfermedades.

Según la actual denominación de la EPA (Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos), los fitosanitarios son sustancias utilizadas para prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga producida por insectos, hongos, mohos, bacterias o virus. Por lo que bajo el nombre genérico de fitosanitarios se engloban diferentes compuestos designados como: herbicidas, insecticidas, fungicidas, nematocidas y raticidas.

El comportamiento en el suelo de estos compuestos no es igual, la estructura molecular determina su actuación. Un ejemplo de ello lo encontramos en las moléculas orgánicas no iónicas, todas tienen en común el ser adsorbidas en el suelo a través de coloides orgánicos, sin embargo la escasa biodegradabilidad de los compuestos Órganoclorados (compuestos clorados de benceno), frente a la rápida biodegradación de Carbamatos (derivados de la urea) condiciona su persistencia en el suelo y por tanto su toxicidad.

Los compuestos organoclorados constituyen un ejemplo de persistencia ambiental, ya que perduran en los suelos sin degradación significativa hasta 30 años después de ser aplicados. Esa permanencia favorece su incorporación a las cadenas tróficas y la acumulación en los tejidos grasos, tanto en humanos, como en animales. Aunque su uso es limitado desde los años ochenta, en nuestro país aún se detectan en tejidos vivos.

Es igualmente importante, la contaminación producida por los lixiviados de suelos contaminados, hacia las aguas subterráneas. De esta forma, se produce la desaparición de la flora y fauna acuática, la pérdida de agua como recurso utilizable y como consecuencia, el deterioro de nuestra calidad de vida.

En la actualidad mas de 600 compuestos orgánicos, con aproximadamente 50.000 formulaciones son usados en todo el mundo, para el control de diferentes plagas. Europa utiliza anualmente cantidades que están entorno a 350 millones de kilogramos, cantidad similar a las empleadas en Estados Unidos y Asia. Ante esta situa-

ción numerosos países han establecido niveles máximos de fitosanitarios en agua potable, así la legislación española (23) establece para el agua de bebida, niveles entorno a $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para un compuesto individual y de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para el contenido total, estos valores son muy inferiores a los que se detectan en los lixiviados procedentes de muchos suelos. Lo que pone de manifiesto la importancia del control de estos compuestos en la actividad agraria.

Cualquier compuesto tóxico de naturaleza orgánica una vez liberado en los suelos puede experimentar una o más procesos de transformación en función de la estructura química que presenten. Su mayor afinidad por los ácidos húmicos del suelo determina que es la naturaleza de la materia orgánica quien condiciona su disponibilidad y fito-toxicidad.

Sin duda la toma de decisiones en la gestión de residuos orgánicos es complicada. Por una parte es necesario un mayor rigor en la acción preventiva sobre la utilización de nuevos productos de síntesis, con la aplicación de mejores controles y evaluaciones de las consecuencias de su uso. Por otra parte, parece imprescindible aumentar el conocimiento de las interacciones de estos productos con los constituyentes y organismos del suelo, y su relación con otros medios (agua, atmósfera), con objeto de estudiar los procesos biológicos que incrementan la velocidad de su degradación o inmovilización. También parece lógico evitar la entrada en los suelos de aquellas sustancias estables y de mayores riesgos para los sistemas biológicos. A pesar de ello, en ocasiones, es necesario su utilización por lo que hemos de analizar las distintas consecuencias que pueden provocar. Sin duda la peor es su llegada al agua subterránea o al aire, sus consecuencias no son previsibles, por el contrario su retención en el suelo abre la posibilidad de estudiar las medidas que lleven a encontrar los mecanismos para su degradación.

4.2. Compuestos inorgánicos

Actualmente se piensa que en los países industrializados el grado de toxicidad producido por contaminantes inorgánicos, es superior al producido por la combinación de sustancias orgánicas y las emisiones radioactivas. Dentro de este grupo se incluyen nitratos,

fosfatos, carbonatos-bicarbonatos, cloruros, sulfatos, calcio, magnesio, sodio, potasio y elementos traza, fundamentalmente metales pesados.

Determinar su procedencia no es fácil en todos los casos, la presencia de una amplia red de elementos contaminantes, hace que se vean implicados muchos de los sectores que constituyen el entramado productivo. La evolución de los mismos, tanto en su forma como en su tamaño, pone de manifiesto una situación dispar. El aumento del transporte por carreteras ha tenido una influencia decisiva en la prevalencia del Plomo, Cobre o Zinc en la atmósfera. Las emisiones de óxidos de nitrógeno, dióxido de carbono y dióxido de azufre se deben fundamentalmente, con porcentajes que superan al 60% del total en el caso de los compuestos de azufre, al sector energético. La producción de fertilizantes inorgánicos, la presencia de metales pesados en la industria automovilística, o la incineración de residuos industriales, son algunos de los sectores implicados en la contaminación atmosférica.

Este tipo de contaminación, asociada a las emisiones tiene una incidencia notable en la acidificación y eutrofización de aguas y suelo, acelerando la degradación de los ecosistemas naturales y atentando directamente a la salud. Presenta además una característica específica, sus efectos suelen ser transfronterizos, ya que pueden ser transportados por el aire a distancias considerables de su fuente productora. Para paliar en lo posible esto, el pasado Septiembre el Parlamento y Consejo Europeo aprobaron un proyecto que pretende establecer una Directiva donde se fijen los límites nacionales de las emisiones.

Su deposición, tanto por vía seca como húmeda, junto a los vertidos directos, son las principales vías de contaminación inorgánica de los suelos. La solución a estos problemas no es fácil, de acuerdo con el informe emitido por la FAO «Agricultura mundial: hacia los años 2015-2030», la persistencia de elementos potencialmente tóxicos en tierras de cultivo en los próximos treinta años seguirá siendo grave (24).

Según dicho informe, los problemas planteados tienen una doble vía, de un lado los producidos como consecuencia de la utilización de fertilizantes minerales en los suelos de cultivo, y de otro, la acu-

mulación de metales procedentes de las actividades industriales y de desarrollo.

Aparece nuevamente el concepto utilitarista del suelo, no podemos negarnos a utilizar los medios que nos ofrece la naturaleza para alcanzar un mayor y mejor desarrollo, pero al mismo tiempo, hemos de arbitrar las medidas que armonicen esa utilización con la conservación.

Es indudable que el aporte de fertilizantes es de crucial importancia para la nutrición vegetal, pero las elevadas tasas de Nitrógeno y Fósforo incorporadas en los suelos, tienen sus consecuencias, pues no son totalmente absorbidos por la vegetación y pueden movilizarse hacia las aguas superficiales y freáticas, provocando problemas de eutrofización y pérdida de potabilidad.

La contribución exacta de las prácticas agrícolas a la eutrofización es difícil de cuantificar, no obstante son numerosos los ejemplos estudiados, la concentración de nitratos en aguas subterráneas de zonas de cultivo, en la Unión Europea, excede el nivel de referencia (10 mg/L) en más del 85%, a pesar de las reducciones en el uso de fertilizantes minerales en estos últimos años. Pero esto no solo pasa en el ámbito rural, los hábitats seminaturales también están amenazados, hasta el punto que más de 370 zonas protegidas se encuentran en peligro de ser afectadas por la utilización de monocultivos exóticos, gasto excesivo de agua o abuso de prácticas agresivas en la preparación del suelo, hechos, todos ellos, que favorecen los procesos de lixiviación y por tanto tienen una incidencia directa en la eutrofización.

Pero los efectos negativos no recaen solo en las aguas, también tienen una repercusión en el suelo y en los seres vivos. Por ejemplo suelos con proporciones elevadas de materia orgánica como son los Histosoles, o suelos saturados en agua con drenaje lento como Fluvisoles y Gleysoles, pueden perder hasta un 70% de los fertilizantes nitrogenados, por procesos de desnitrificación y posterior volatilización en forma de compuestos gaseosos. Su oxidación contribuye a la formación de ácido nítrico, uno de los principales componentes de la lluvia ácida. El aporte posterior de esta lluvia puede provocar, en los suelos, pérdida de nutrientes por lavado y movilización de constituyentes, lo que incide en la menor productividad.

Si el Nitrógeno es un elemento imprescindible para la planta, también lo es el Fósforo, y también tiene una incidencia directa en todos los procesos antes señalados. El Fósforo constituye un macroelemento esencial para la nutrición vegetal, sin embargo, la baja solubilidad de los compuestos fosfatados y su importante capacidad de fijación en los suelos, ha justificado tradicionalmente unas aplicaciones excesivas, que han provocado un incremento de la reserva de Fósforo asimilable en los suelos, con frecuencia muy por encima de los niveles considerados críticos. Esta situación ha hecho aumentar el riesgo ambiental, puesto que, además de contribuir a la eutrofización de las aguas, el exceso de este nutriente ha dado lugar a problemas de toxicidad, causados por la aparición de antagonismos nutritivos, fundamentalmente con Hierro y Cinc.

Otro de los problemas planteados, como indicamos anteriormente, lo constituyen la presencia de metales pesados en los suelos. Para la Organización Mundial de la Salud constituye uno de los principales problemas sanitarios, ya que su existencia, no solo incide en la calidad de los cultivos, si no que afecta a los alimentos, provocando un efecto de bioacumulación en los organismos de la cadena trófica.

El suelo juega un papel esencial en el control de esta contaminación, su acumulación o eliminación determina su toxicidad. La legislación española recoge los contenidos máximos admitidos de estos elementos, tanto en alimentos como en agua, sin embargo aún no está establecida una normativa para los suelos, y únicamente aparecen límites recomendables en suelos a los que se les van a aplicar lodos con finalidad agrícola. Esta norma no hace referencia al tipo de suelo receptor ni a sus características, lo cual supone partir de la hipótesis que cualquier volumen de suelo es adecuado para poder recibir un residuo, lo que evidentemente está muy lejos de ser cierto.

La capacidad de los suelos para incorporar elementos extraños a su composición depende de múltiples factores, unos condicionados por el elemento y otros por las propiedades edáficas.

Contenido en materia orgánica, pH, conductividad o capacidad de intercambio iónico, son parámetros decisivos para controlar la concentración y movilidad de los elementos, y por tanto cuantificar su bio-disponibilidad. Por otra parte, hay que tener en cuenta que no todos los metales presentan el mismo comportamiento. En numero-

sas ocasiones los márgenes entre toxicidad y deficiencia son muy pequeños, por lo que no siempre es posible delimitar claramente que metales son esenciales y cuales son tóxicos. También es difícil considerar la toxicidad de un metal aislado puesto que en el suelo se producen interacciones entre ellos y con los organismos.

Ahora bien, la toxicidad de estos compuestos, no depende sólo de su contenido total, en ocasiones es mucho más importante estudiar su distribución, forma o especie en que se presenta en el suelo. Todos los metales pueden aparecer en formas de baja actividad o formas inmóviles que se relaciona con el predominio de compuestos escasamente solubles, o por el contrario pueden aparecer en especies más solubles. Este hecho se debe a las distintas formas de oxidación que un mismo elemento presenta en la naturaleza. Es el caso de los compuestos de Cromo, que puede estar en el suelo como Cr III o como Cr VI, la primera es mucho más estable, ya que se coordina con ligandos que contienen Oxígeno y Nitrógeno, mientras que las formas de mayor estado de oxidación (Cr VI) son mucho más tóxicas debido a su solubilidad. Esto mismo sucede con el Arsénico en el que las formas reducidas son de cuatro a diez veces más solubles en agua que los estados oxidados.

Un caso que se recoge tradicionalmente en la bibliografía es el descrito por Iimura (25), referente al envenenamiento que se produjo en Japón, por el consumo de arroz que había sido cultivado en suelos con alto contenido en Cadmio. Mientras que con las técnicas tradicionales de cultivo no se producían daños, al mantenerse el suelo en condiciones reductoras durante todo el ciclo productivo, el drenaje temporal realizado para facilitar el laboreo causó un cambio en las condiciones redox y por ello un incremento en la concentración de Cadmio en la disolución. La ingesta del arroz cultivado en estas condiciones provocó en la población una disentería en muchos casos mortal.

Estos ejemplos ponen de manifiesto la gran complejidad de los procesos que tienen lugar en el suelo ante la incorporación de metales pesados, por lo que no cabe duda, que debe seguir profundizándose en el estudio de su comportamiento químico, si queremos evaluar los riesgos potenciales y reales que su presencia supone para el medio ambiente. Es imprescindible ahondar en la relación causa/efecto, para

poder establecer las medidas necesarias que permitan la reducción de riesgos ambientales y su incidencia en la salud humana.

Por ello, la recuperación de suelos contaminados, es uno de los cometidos más importante que se esta llevando acabo en muchos países. La puesta en marcha de una tecnología apropiada entraña una gran dificultad desde el punto de vista medioambiental, debido al elevado número de variables que intervienen y a la complejidad que presenta la movilidad de los contaminantes.

La evaluación de las tecnologías existentes se efectúa por medio de una serie de criterios como son: La adecuación a una situación particular de contaminación, la facilidad de construcción y de operación, el comportamiento del contaminante, los aspectos medioambientales y de salud, la facilidad de obtener los permisos institucionales y por último los costes. Las razones por la que se rechazan las tecnologías se deben a: Las dificultades de implementación, la falta de garantía o de efectividad en los resultados y a los costes excesivos. La gran cantidad de variables que presentan las situaciones reales hace que la tarea de selección sea compleja y, en muchos casos, difícil, por la ausencia de información para decidir si una tecnología puede o no ser rechazada.

Diversas técnicas se están desarrollando en este sentido, desde lavados por métodos físico-químicos, a bioremediación y fitoremediación realizados *in situ*.

Las técnicas *in situ*, implican transformaciones biológicas que afectan a un gran número de contaminantes inorgánicos, fundamentalmente a nitratos, fosfatos y metales pesados. La bioremediación utiliza, entre otros, microorganismos, en general bacterias del suelo con capacidad para eliminar hidrocarburos y otros elementos tóxicos, y la fitoremediación, se basa en el uso de plantas con capacidad para absorber metales pesados. Estos procesos son, generalmente, inocuos para el ser humano y todos los ecosistemas.

Sin embargo, en muchas ocasiones los procesos de biodegradación natural necesitan ser intensificados, ya sea mediante el aporte de dadores de electrones (Grupos metilo, Gupos hidroxilos, Cloruros, Ioduros, entre otros), ya sea por la colocación de pantallas biológicas que prevengan la propagación del contaminante. En estas

ocasiones la intervención de elementos extraños puede tener como consecuencia la aparición de riesgos no previstos.

Los métodos de lavado *ex situ* utilizan ácidos y agentes quelantes, como es el caso del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) debido a la intensa capacidad que presenta para formar complejos con los metales, especialmente con Plomo, Cinc, Cobre y Cadmio.

Dentro de estos métodos de desplazamiento, estamos trabajando actualmente en el Departamento en el desarrollo de un sistema experimental de columnas, que ya fue descrito por Adams en 1980 (26) y modificado por Wolt (27). Esta técnica no somete a las muestras a ninguna fuerza física o mecánica, por tanto, los percolados obtenidos están próximos a la solución del suelo inalterada (Figura 3). Cada columna es uniformemente empaquetada con muestras de

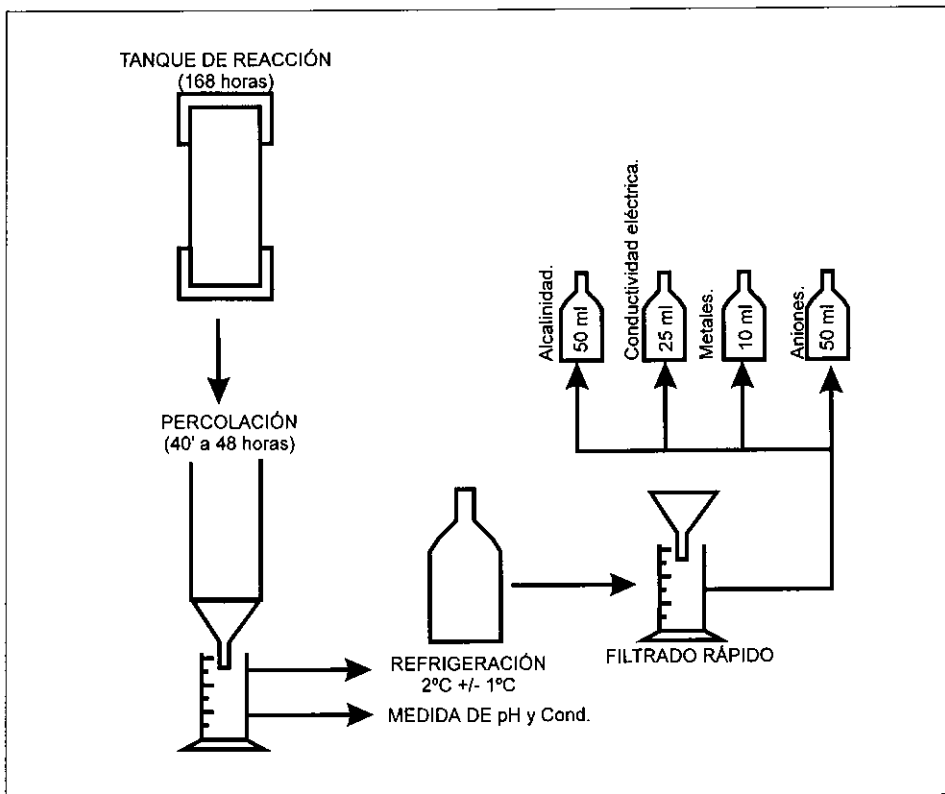


FIGURA 3. Esquema del sistema experimental de columnas y secuencia de trabajo.

suelos, a densidad aparente, y se le añade agua desionizada hasta alcanzar el contenido en humedad, equivalente a la capacidad de campo. Posteriormente, las columnas experimentales son almacenadas en condiciones controladas de temperatura durante, un tiempo de reacción establecido según consideraciones cinéticas como: «*el tiempo necesario para que la solución se equilibre con los minerales mayoritarios del suelo*» (28). La determinación de la composición química de los percolados resultantes, es una fase de vital importancia ante cualquier análisis de recuperación de suelos, ya que el estudio de la solución del suelo, debido a su carácter dinámico, puede proporcionar importante información respecto a la distribución espacial y temporal de contaminantes, así como su movilidad y disponibilidad.

Caracterizada la solución natural hemos procedido a los ensayos de contaminación. Para lo cual añadimos a las columnas una solución de metales pesados con igual concentración de cada metal (350 mg/kg^{-1}) con un tiempo de contacto de 48 horas. De los resultados obtenidos, se desprende que los porcentajes de absorción por el suelo fueron superiores al 90% en todos los casos, siendo el Cr y el Cu los cationes más retenidos y el Cd el catión más móvil (Figura 4). A continuación, sometimos a los suelos a diferentes procesos

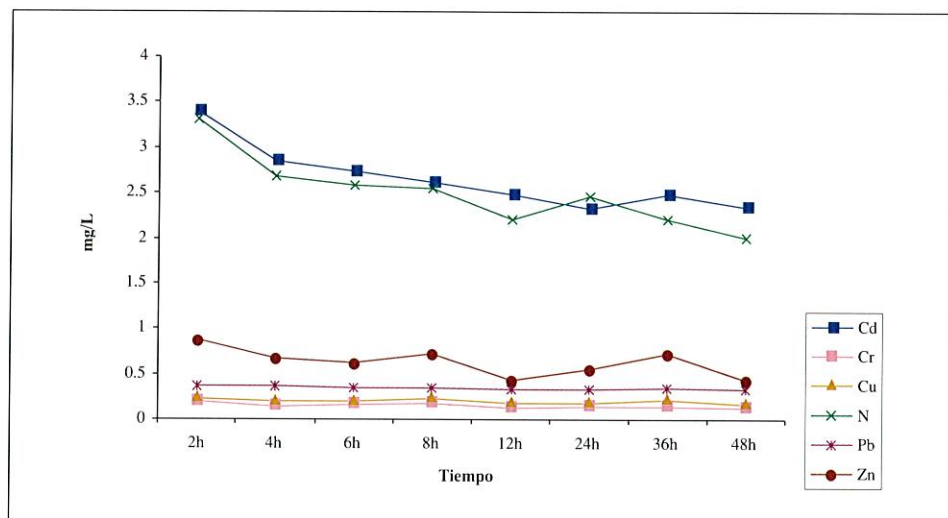


FIGURA 4. Lixiviados de metales.

de lavado sucesivos, a flujo discontinuo, con agua desionizada, simulando procesos de lluvia en climas áridos. Obteniéndose que la secuencia de retención es: Cr > Cu > Pb >> Zn >> Ni > Cd. Esta secuencia permite reconocer que Cr, Cu y Pb son los cationes de metales pesados más fuertemente adsorbidos por todos los suelos, mientras que Zn, Ni y Cd fueron los metales menos retenidos en situación de competencia. Es el Cd el catión que presenta mayor índice de toxicidad, tanto por su naturaleza como por su movilidad.

Actualmente, estamos realizando estudios de recuperación de los suelos previamente contaminados, mediante la aplicación de diferentes extractantes a flujo continuo.

Paralelamente estamos desarrollando técnicas de recuperación mediante la deposición en superficie de matrices poliméricas. Son hidrogeles sintéticos de naturaleza orgánica formados por redes procedentes del entrecruzamiento, tanto químico como físico, de cadenas poliméricas de alto peso molecular, lo que permite que se mantengan en estado sólido a pesar de contener un porcentaje elevado de agua en su estructura. Como propiedad más significativa es su grado de hinchamiento en equilibrio, o cantidad de agua absorbida por gel, de forma que, las sustancias disueltas en el medio pueden incorporarse a la matriz polimérica. Debido a esta propiedad utilizamos los hidrogeles como absorbentes de especies químicas existentes en el suelo, con el fin de que eliminen y retengan contaminantes.

Se realizaron estudios previos de absorción mediante experimentos por inmersión de los hidrogeles seleccionados en un cocktail de metales pesados a igual concentración de 350 mg/L, durante 48 horas. La desorción se realizó mediante inmersión de los geles contaminados en agua destilada (Tabla 3).

TABLA 3. *Comportamiento de los hidrogeles al ser sometidos a procesos de inmersión.*

GEL	COMPORTAMIENTO	PORCENTAJE
1	Absorción	Pb >>> Cr >> Ni > Cu > Cd > Zn 16,4 9,7 5,3 5,0 3,5 3,2
	Desorción	Zn > Cu > Ni > Cd >> Pb > Cr 21,9 16,5 13,1 10,6 4,8 3,2
2	Absorción	Pb >>>> Cr > Zn > Ni > Cu 54,9 19,7 8,5 5,3 4,1
	Desorción	Cu > Ni > Zn > Pb > Cr 3,3 1,9 1,4 1,0 0,2

5. HACIA DÓNDE VA EL FUTURO

Es otra de las preguntas que deberíamos contestarnos para no caer en los mismos errores. Que el suelo es un elemento esencial para el desarrollo de la vida como hoy la entendemos, queda fuera de toda duda, que su destrucción o contaminación es un hecho que debemos impedir, también. Que los países deben tomar conciencia de ello, debería ser objetivo a realizar sin demoras, para lo cual, deberemos planificar mejor su estudio, y dirigir las investigaciones a conseguir un mejor conocimiento del suelo, que nos permita establecer estrategias de control y evaluación de los impactos.

Para el cumplimiento de estos objetivos, es necesario el desarrollo de una tecnología que garantice analíticas adecuadas, el empleo de técnicas de modelización, y el establecimiento de una base de datos georeferenciada a escala apropiada que proporcione información de suelos de forma precisa, armonizada y útil. En consecuencia deberán recibir especial atención, todas aquellas medidas destinadas a mantener y/o mejorar la calidad ambiental.

A diferencia de otros medios, los procesos de contaminación de un suelo no suelen causar efectos perceptibles y explosivos, sino que, durante mucho tiempo, pueden pasar inadvertidos debido a su propia resistencia. Este hecho constituye un grave problema ya que,

cuando se hacen patentes los daños, la recuperación es mucho más costosa, en tiempo y dinero e incluso puede llegar a ser irreversible. Como consecuencia de esta situación, la comunidad científica y los poderes públicos medioambientales y sanitarios, deben trabajar conjuntamente para establecer estrategias específicas que luchen contra la contaminación de los suelos y su repercusión en nuestra calidad de vida.

Así, la Organización Mundial de la Salud en la década de los noventa, propuso como lema de trabajo «Salud para todos en el año 2000» (4). Para lograr esta meta, la OMS seleccionó 12 indicadores globales de salud. La región europea (OMS-EURO) fue una de las pioneras en seguir esta propuesta, al formular 38 objetivos de Salud, de los que 8 se relacionaban con la obtención de un medio ambiente saludable. El objetivo 23 correspondía al Control de Residuos Peligrosos y a La Contaminación de Suelo. Estrategia ambiciosa cuyo objetivo esencial era alcanzar a finales del año 2000 un nivel de salud para todos los habitantes del planeta que les permitiera desarrollar una vida digna. Logro que, evidentemente, no se consiguió.

En nuestro país, es a partir de 1996, cuando aparecen publicadas las primeras monografías sobre Indicadores Ambientales. De todos los indicadores propuestos, destacan, por sus potenciales impactos en salud, la eliminación de residuos peligrosos, en particular los aceites usados y los PBC, sin embargo los objetivos concernientes a Suelos Contaminados son todavía bastante limitados. Esta situación ha sido mejorada por el vigente Plan Nacional de Recuperación de Suelos Contaminados 1995-2005 (29). En él se pone de manifiesto la gravedad de la situación existente en materia de contaminación de suelos, detectando 4.532 emplazamientos identificados como potencialmente contaminados, por razón del tipo, concentración de contaminantes, y potencial de dispersión de los mismos. Sin embargo, sigue sin fijarse normas específicas que contemplen, entre otros: Estándares de calidad de los suelos en función de su uso. Valores, cualitativos y cuantitativos de riesgo sobre la salud humana e Impactos que producen.

La Sanidad Ambiental del siglo XXI deberá prestar especial atención a las emergencias ambientales, aún asumiendo que el «Ries-

go 0» en esta área es inalcanzable, por ello lo más importante es la estrategia que se debe emplear para conseguir un medio ambiente que favorezca la salud y el bienestar allí donde la gente vive y trabaja. Así, OMS plantea como objetivo para el año 2015 que la población de la Región Europea debe vivir en un ambiente físico más seguro, donde los niveles de contaminantes peligrosos para la salud no excedan los patrones acordados internacionalmente.

Se están realizando en la actualidad programas pilotos que abarcan zonas concretas y aunque existan problemas irresolubles a escala temporal corta, como es el caso de contaminaciones por radionucleidos radiactivos, sólo desde la prevención se podrá realizar una política eficaz de aprovechamiento del recurso «Suelo», por lo que todos los análisis ambientales y sanitarios, todos los Programas específicos de lucha contra la contaminación, así como los Programas de Salud Pública, tanto a nivel local como a nivel mundial, deberán tener en cuenta la edafodiversidad, el estado actual de los suelos, y su vulnerabilidad ante cualquier intervención. De esta manera se podrá integrar lo que es ecológicamente adecuado, con lo que es sanitariamente necesario, para que se obtenga un ambiente físico saludable y seguro, en el que la población mundial alcance y mantenga el nivel más alto de salud a lo largo de su vida.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) HOYOS DE CASTRO, A. (1980) La Edafología como ciencia. El problema de las clasificaciones de suelos. *Monografía Real Academia Nacional de Farmacia*. Madrid. 39 pp.
- (2) GELL-MANN, M. (1995) The Quark and the Jaguar. Aventures in the Simple and the Complex. METATEMA. Tusquets (Ed). Barcelona. 413 pp.
- (3) Agencia Europea de Medio Ambiente. (2001) Señales ambientales 2000. Informe de la Agencia Europea de Medio Ambiente basado en indicadores. Ed. Secretaría General Técnica. Ministerio de Medioambiente. 109 pp.
- (4) World Health Organisation Regional Office for Europe. (1991) Targets for Health for All. Summary of the updated edition. Copenhagen. WHO.
- (5) European Commission. (2002) The Sixth Framework Programme. Bruselas
- (6) European Economic Community. 1986. *Directiva relativa a la protección del medio ambiente* y, en particular, de los suelos, en la utilización de lodos de depuradora en agricultura, 86/278/EEC, EEC, Bruselas.

- (7) European Communities (1999) Una base de datos de suelos georeferenciada para Europa. EUR 18092. Comité Científico del Buró Europeo de Suelos (Ed). 208 pp. Italia.
- (8) STRHALER, A.N. AND STRHALER, A.H. (1989) Modern Physical Geography. Jhon Wiley & Son (Eds.) 689 pp.
- (9) JACKSON, J. (1986) Salt-Tectonics. Ed Elsevier
- (10) IGME. (1980) Mapa Geológico de España. E.1:50.000. Hoja N1 136, Oña. 10 Ed. IGME, Madrid.
- (11) GONZÁLEZ HUECAS, C.; VALVERDE ASENJO, V.; LÓPEZ LAFUENTE, A. (1999) Chemical and mineralogical characterization of soils derived from ophites in Mediterranean climate (North of Spain). *Commun. Soil Sci. Plant Anal* 30 (13-14), 2007-2021.
- (12) RIVAS MARTÍNEZ, S. (1987) Memoria del mapa de vegetación potencial de España. ICONA, Madrid.
- (13) RASMUSSEN, P.E. y H.P. COLLINS. (1991) Long-term impacts of tillage fertilizer, and crop residue on soil organic matter in temperate semiarid regions. *Adv. Agron.* 45, 93-134.
- (14) SHOJI, S., NANZYU, M. AND DAHLGREN, R. (1993) Volcanic ash soils- Genesis, properties, and utilization. *Dev. Soil Sci.* 21. Elsevier, Amsterdam.
- (15) TISDALE, S.L.; NELSON, W.L.; BEATON, J.D.; HAVLIN, J.L. (1993) Soil Fertility and Fertilizers, 5th Ed.; Macmillan Company Ed., New York.
- (16) POUDEL, D.D.; WEST, L.T. (1999). Soil Development and Fertility Characteristics of Volcanic Slope in Mindanao, the Philippines. *Soil Sci. Soc. Am.* 63, 1258-1273.
- (17) URBANO TERRÓN, P. (1992) Tratado de fitotecnia general. Ed. Mundi-Prensa. 21 Ed Madrid. 895 pp.
- (18) YAALON, D. H. y E. GANOR. (1973) The influence of dust on soils during the Quaternar. *Soil Sci.*, 116, 146-155.
- (19) GRAHAM, R.C. y FRANCO-VIZCAÍNO, E. (1992) Soils on igneous and metavolcanic rocks in the Sonoran Desert of Baja California, Mexico. *Geoderma*, 54, 1-21.
- (20) Soil Survey Staff (1994). Keys to soil taxonomy. 6 th Ed. US. Govt. Printing Office, Washington, DC.
- (21) LÓPEZ LAFUENTE, A.; VALVERDE ASENJO, A.; GONZÁLEZ HUECAS, C. (1999). Soils developed in diapiric environment in Mediterranean area: sector North of the Iberian Peninsula. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 30 (78), 1183-1199.
- (22) Ley 10/1998 de 21 de abril. Ley Básica de Residuos Tóxicos. BOE 22 de abril de 1998.
- (23) Real Decreto 1138/1990. Reglamentación Técnico-Sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público. BOE del 20 de Septiembre de 1990.
- (24) www.fao.org. (2003) Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030.
- (25) IMURA, I. CH. (1977) Behavior of contaminants heavy metals in soil plant system. International Seminar on soil Environment and Fertility managements in intensive Agriculture. Tokio. Japan.
- (26) ADAMS, F; BURMESTER, C.; HUE, N. AND LONG, F. (1980) *Soil Sci. Am. J.* 44: 733-735.

- (27) WOLT, D.J. (1994) Soil Solution Chemistry. Applications to Environmental Science and Agriculture; John Wiley & Sons, Eds.; Inc.: New York, 1994; 415 pp.
- (28) APPELLO, C.A.J. AND D. POSTMA. (1994) Geochemistry, Groundwater and Pollution, A.A.N. Balkema, Ed. Rotterdam. 536.
- (29) Plan Nacional de Recuperación de Suelos Contaminados (1995-2005). RCL 1995/1437 y 2155. BOE 23 de marzo de 1996.

Manejo farmacológico de las dislipidemias en la prevención de las enfermedades cardiovasculares *

CARLOS CALVO MONFIL, PHD

*Académico Correspondiente en Chile de la Real Academia Nacional
de Farmacia. Laboratorio de Lipoproteínas y Arteroesclerosis.
Universidad de Concepción, Chile*

RESUMEN

Diversos estudios clínicos han demostrado que las estatinas reducen significativamente la morbilidad y mortalidad cardiovascular en pacientes con y sin enfermedad coronaria. Las estatinas son las drogas de primera elección para el tratamiento de la hipercolesterolemia. Estas drogas inhiben la enzima limitante de la síntesis de colesterol en el hígado (3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa) aumentando así la expresión del receptor de LDL en el hígado y disminuyendo las concentraciones de LDL circulante.

Los estudios clínicos publicados recientemente muestran que la terapia con fibratos en pacientes con enfermedad coronaria reduce el riesgo de un nuevo evento coronario.

Los fibratos son los fármacos de primera elección en el manejo de la hipertrigliceridemia y son también capaces de aumentar sustancialmente los niveles de HDL.

Se ha evidenciado que los fibratos actúan modulando la transcripción de diferentes genes involucrados en el metabolismo de lipoproteínas. Los fibratos activan factores de transcripción, conocidos como receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs). El efecto hipotrigliceridemiante de los fibratos puede deberse a aumento en la expresión de lipoprotein lipasa y disminución en la expresi-

* Discurso pronunciado en su toma de posesión como Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia el 10 de junio de 2003.

sión de apolipoproteína (apo) CIII en el hígado. Además, la capacidad de elevar los niveles de HDL parece ser mediada al menos en parte por inducción de la transcripción de los genes de la apoA-I y apoA-II.

Palabras claves: Dislipidemia.— Agentes hipolipemiantes.— Factores de transcripción.

ABSTRACT

Pharmacological management of the dyslipidemia regarding the prevention of the cardiovascular illnesses

Clinical trials have demonstrated that statins greatly reduce cardiovascular-related morbidity and mortality in patients with and without coronary heart disease. Statins are the drugs of first choice in the management of hypercholesterolaemia. These drugs inhibit the rate-limiting enzyme of cholesterol synthesis in the liver (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase) thereby upregulating expression of hepatic LDL receptors, thus lowering concentrations of circulating LDL.

The recently published trials showed that fibrate treatment in patients with coronary heart disease reduces the risk of a recurrent coronary event.

Fibrates are the drugs of first choice in the management of hypertriglyceridemia and are also able to substantially raise HDL.

It has been known that fibrates act by altering the transcription of several different genes involved in lipoprotein metabolism. Fibrates activate specific transcription factors, known as peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). The triglyceride-lowering effects of fibrates may be due to increased expression of lipoprotein lipase and decreased apolipoprotein (apo) CIII expression by the liver. In addition, the HDL raising actions of fibrates appear to be mediated at least in part by PPARs-mediated induction of transcription of the genes for apoA-I and apoA-II.

Keywords: Dyslipidemia.— Hypolipidemic agents.— Transcription factors.

DISLIPIDEMIAS

El término dislipidemia se ha definido originalmente como un conjunto de síndromes caracterizados por alteraciones en las concentraciones de lípidos a niveles que significan riesgo para la salud. Recientemente, el conocimiento de la bioquímica de las lipoproteínas ha permitido definir las dislipidemias como alteraciones en la

estructura y el metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas o vehículos encargados del transporte de los lípidos en la circulación. Actualmente el avance vertiginoso de la biología molecular como del conocimiento de la naturaleza de los defectos genéticos implicados en las dislipidemias permite definir las como una expresión anormal de los genes que codifican para proteínas responsables del metabolismo de los lípidos en la circulación.

MANEJO FARMACÓLOGICO DE LAS DISLIPIDEMIAS

La prescripción de fármacos en el tratamiento de las dislipidemias se plantea cuando la respuesta terapéutica a la dieta resulta insuficiente y cuando se ha evaluado y tratado las causas secundarias como diabetes mellitus, hipotiroidismo, obesidad, etc. Solo en caso de dislipidemias severas es aconsejable el uso de fármacos desde su diagnóstico (1).

La selección del fármaco a utilizar, depende de una serie de factores como el tipo de dislipidemia a tratar, su efectividad para lograr la meta, sus efectos laterales, tolerancia y toxicidad y su costo-efectividad. La evaluación global de los factores de riesgo es fundamental en todo caso para determinar medidas de prevención y necesidad de tratamiento específico.

La indicación de estos fármacos es, a largo plazo, muchas veces de por vida y se justifica la mantención de un fármaco si con ello se logra al menos una respuesta significativa (más del 20%) aunque no logre la normalización de la dislipidemia.

El presente trabajo reporta el mecanismo molecular de acción de los dos fármacos más empleados en el tratamiento de las dislipidemias como son las estatinas y los fibratos.

BASES MOLECULARES DE LA ACCIÓN DE ESTATINAS

Las estatinas son las drogas más usadas como hipolipemiantes en el momento actual y constituyen los fármacos de elección para el tratamiento de la hipercolesterolemia aislada. Su efectividad clínica ha sido demostrada, a raíz de los resultados observados en

varios estudios de prevención primaria y secundaria de cardiopatía coronaria (2).

Actualmente se dispone de cinco estatinas (lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina y atorvastatina), todas efectivas para reducir el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad o LDL, presentando una respuesta que es dosis dependiente.

La etapa limitante de la biosíntesis de colesterol la constituye el paso de 3-hidroxi-3metil-glutaril-coenzima A a mevalonato catalizado por la enzima 3-hidroxi-3metil-glutaril-Coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa). Esta enzima ha llegado a ser el blanco para la manipulación farmacológica con drogas específicas como las estatinas que inhiben selectivamente y competitivamente su acción, provocando una disminución del colesterol intracelular. La disminución del contenido de colesterol intracelular provoca la activación de un factor de transcripción denominado Proteína de Unión a Elementos de Respuesta a Esterol (SREBP) que induce la expresión del gen del receptor de la LDL principalmente a nivel hepático (Figura 1). Esto conlleva a una mayor captación de LDL circulante por los hepatocitos, lo que se traduce en una disminución significativa de los niveles de colesterol en la circulación (3, 4).

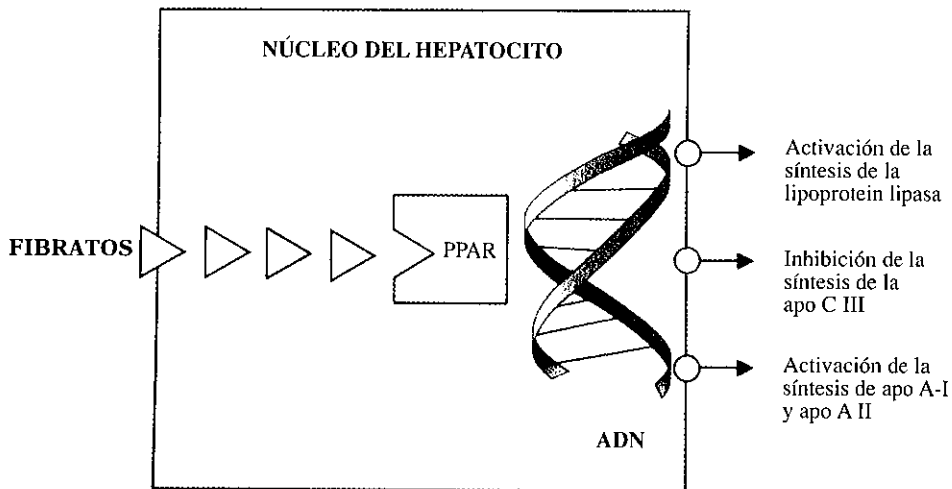


FIGURA 1

Aparte de su efecto de disminuir el colesterol plasmático, las estatinas al parecer, influyen también en cambios de la pared vascular (5), como: mejorar la disfunción endotelial, suprimir la respuesta inflamatoria, inhibir la proliferación de células musculares lisas y suprimir la expresión de factores tisulares importantes en la iniciación de la formación del trombo. Esto demuestra claramente que las estatinas más allá de ser drogas hipolipemiantes, son drogas antiaterogénicas.

Recientemente, se ha reportado en animales de experimentación, que las estatinas reducirían también los niveles de triglicéridos por un mecanismo de estimulación del catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos mediado por una inducción del gen de la lipoprotein lipasa (4).

Aunque las estatinas no deberían constituir la primera indicación en hipertrigliceridemias aisladas, ellas constituyen una buena alternativa frente a hiperlipidemias mixtas o combinadas con predominio de triglicéridos.

BASES MOLECULARES DE LA ACCIÓN DE FIBRATOS

Los fibratos (clofibrato, bezafibrato, ciprofibrato, fenofibrato, etofibrato y gemfibrozilo) han sido usados en la práctica clínica por unas tres décadas. Sin embargo, solo recientemente se ha logrado conocer el mecanismo molecular de su efecto hipolipemiante (6), principalmente en su acción de disminuir los niveles de triglicéridos, además de elevar los niveles de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad o HDL.

Su indicación principal es en pacientes con triglicéridos elevados y en prevención primaria de cardiopatía coronaria en hiperlipidemias mixtas con colesterol de HDL bajo. Son los fármacos de elección en pacientes diabéticos con dislipidemia ya que no deterioran el control metabólico de la diabetes.

Los efectos farmacológicos de los fibratos son en parte mediados a través de la modulación de la transcripción de genes que codifican para proteínas que controlan el metabolismo de lipoproteínas. Los fibratos activan factores de transcripción pertenecientes a la super

familia de receptores nucleares denominados Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas (PPARs). Los PPARs activados por fibratos forman un heterodímero con otro receptor nuclear, el receptor al ácido retinoico (RXR), uniéndose a una secuencia nucleotídica específica que se localiza en el promotor de los genes blancos denominada Elemento de Respuesta a Proliferadores de Peroxisomas (PPRE), alterando la velocidad de transcripción de estos genes (Figura 2).

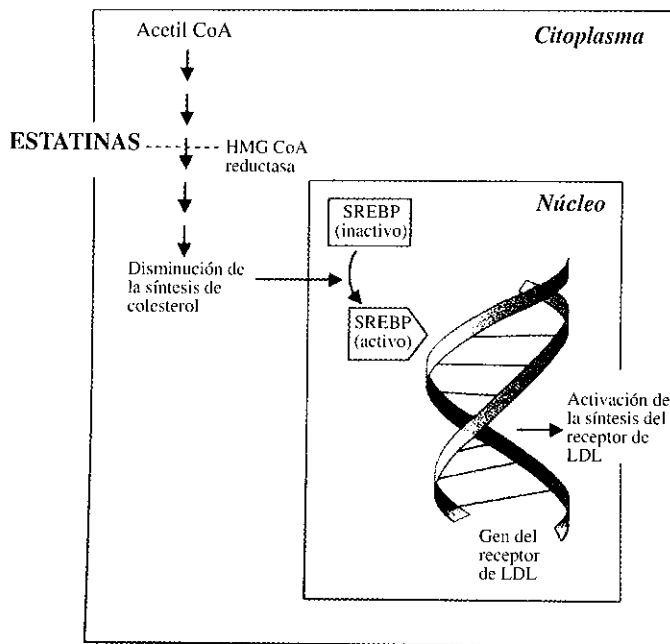


FIGURA 2

Este mecanismo de regulación transcripcional explica la mayor parte de las acciones de los PPARs sobre el metabolismo de lípidos.

Efecto de los fibratos sobre el metabolismo de los triglicéridos

La enzima lipoprotein lipasa es la principal responsable del catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos y la encargada de la degradación de los triglicéridos en la circulación.

Las hipertrigliceridemias aisladas, se deben principalmente a una deficiencia genética de lipoprotein lipasa. Los fibratos ejercen la acción de disminuir los niveles de triglicéridos por su capacidad de activar el factor de transcripción PPAR provocando así la inducción de la expresión del gen de la lipoprotein lipasa, aumentando la degradación de los triglicéridos (7).

El otro elemento responsable de la hipertrigliceridemia lo constituye la presencia de partículas lipoproteicas que contienen apolipoproteína CIII (apoCIII). El apoCIII es un inhibidor de la lipoprotein lipasa que provoca un retardo del catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos.

Concentraciones elevadas de apoCIII se han observados en hipertrigliceridemias. Al contrario, sujetos deficientes en apoCIII exhiben un acelerado catabolismo de lipoproteínas ricas en triglicéridos.

Los fibratos en una acción mediada por PPAR, inhiben la expresión del gen del apoCIII (8,9,10) disminuyendo así los niveles de esta apolipoproteína y favoreciendo la actividad de la lipoprotein lipasa. La inhibición del gen del apoCIII por activadores de PPAR del tipo fibratos se debería a la inducción del factor de transcripción negativo $Reverb\alpha$ que provoca una represión del gen del apoCIII.

Efecto de los fibratos sobre los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL)

La terapia con fibratos aumenta los niveles de colesterol de HDL, al menos mediante dos mecanismos: como una consecuencia metabólica de la disminución de los triglicéridos plasmáticos y mediante inducción de la expresión del gen del apoA-1 (11) y apoA-II (12) proteínas constituyente principal de las HDL.

La transcripción del gen de la apoA-I es inducida por PPAR activado por fibrato que interactúa con un PPRE localizado en el promotor del gen de la apoA-I. Del mismo modo, el aumento de la concentración de apoA-II por fibratos es consecuencia de la inducción de la síntesis hepática de la apoA-II mediada vía PPAR, el cual se une a un PPRE localizado en el promotor del gen de la apoA-II.

Actualmente se reconoce que las HDL están constituidas por al menos dos tipos principales de partículas: una fracción que contiene tanto apoA-I como apoA-II denominada LpA-I:A-II y otra que contiene solo apoA-I denominada LpA-I (13). Estudios clínicos y epidemiológicos sugieren fuertemente que la LpA-I pero no la LpA-I:A-II constituye la fracción antiaterogénica de las HDL.

El aumento de la expresión del gen de la apoA-II por acción de fibratos conduce a una elevación en los niveles de partículas LpA-I:A-II y a una disminución en los niveles de LpA-I, debido a un desplazamiento de la apoA-I desde partículas LpA-I a partículas LpA-I:A-II.

Nosotros hemos logrado producir y caracterizar anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes apolipoproteínas. El uso de estos anticuerpos en sistemas tipo ELISA ha permitido la medición específica de estas partículas lipoproteicas en plasma (14, 15, 16), lo que podrá proveer un aporte importante para la evaluación de los efectos de fármacos hipolipemiantes en la práctica clínica.

Todas estas evidencias junto a los nuevos conocimientos respecto a la génesis de la aterosclerosis, hacen razonable afirmar que nos encontramos en los umbrales de lograr un efectivo tratamiento farmacológico preventivo y curativo de la enfermedad coronaria.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) O'CONNOR P., FEELY I., SHEPHERD I. (1990) Lipid lowering drugs. *Br. Med. J.* 300:667-672.
- (2) BUCHER H., GRIFFICH L. (1999) Systematic review on the risk and benefit of different cholesterol lowering interventions. *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.* 19:187-195.
- (3) LESTAVEL S., FRUCHART JC. (1994) Lipoprotein receptors. *Cell. Mol. Biol.* 40:461-481.

- (4) SCHOONJANS K., PEINADO-ONSURBE J., FRUCHART J.C., TAILLEUX A., FIEVET C., AUWERX J., (1999) 3-hidroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors reduce serum triglyceride levels through modulation of apolipoprotein C-III and lipoprotein lipase. *FEBS Lett.* 452:160-164.
- (5) ROSENSON R.S., TANGNEY C.C. (1998). Antiatherothrombotic properties of statins: implication for cardiovascular event reduction. *JAMA* 279:1643-1650.
- (6) FRUCHART J.C, DURIEZ PRACTICA, STAELS B. (1999) Peroxisome proliferator activated receptor alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism: vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipodol*; 10: 245-257.
- (7) SCHOONJANS K., STAELS B., DEEB S., AUWERX J. (1995) Fibrates and fatty acids induce lipoprotein lipase gene expression via the peroxisome proliferator activated receptors. *Circulation* 92: Suppl. 1, 495.
- (8) HERTZ R., BISHARA-SHIEBAN J., BAR-TANA J. (1995) Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipemic drugs. Suppression of apolipoprotein CIII. *J. Biol. Chem.* 270:13470-13475.
- (9) MCCONATHY W.J., GESQUIERE J.C, BASS H., TARTARR A., FRUCHART J.C., WANG C.S. (1992) Inhibition of lipoprotein lipase activity by synthetic peptides of apolipoprotein CIII. *J. Lipid. Res.* 33:995-1003.
- (10) CLAVEY V., LESTAVEL S., COPIN C., BARD J.M., FRUCHART J.C. (1995) Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins CI, CII, CIII and E. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15:963-971.
- (11) STAELS B., AUWERX J. (1998) Regulation of apo A-I gene expression by fibrates. *Atherosclerosis* 137: Suppl. S19-S23.
- (12) VU-DAC N., SCHOONJANS K., KOSYKY V., DALLONGEVILLE J., FRUCHART J.C., STAELS B., AUWERX J. (1995) Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J. Clin. Invest.* 96:741-750.
- (13) TAILLEUX A., FRUCHART J.C. (1996) HDL heterogeneity and atherosclerosis. *Clin. Rev. Clin. Lab. Sc.* 33:1-30.
- (14) CALVO C., BUSTOS P., SEPULVEDA J., ULLOA N., SEPULVEDA V. (1995) Development of monoclonal antibodies for the selective isolation of plasma apolipoprotein A-containing particles. *Hybridoma* 14:603-608.
- (15) ULLOA N., BUSTOS P., CASTRO G., FRUCHART J., VERA M., FRUCHART J.C., CALVO C. (1999) Characterization of monoclonal antibodies against apolipoproteins A-I and A-II. Epitope expression in LpA-I and LpA-I:A-II particles. *Hybridoma* 18: 513-520.
- (16) BUSTOS P., ULLOA N., CALVO C., MULLER D., DURAN MARTINEZ J., SALAZAR L., QUIROGA A. (2000). Monoclonal antibodies to human apolipoproteins: application to the study of high density lipoprotein subpopulations. *Clin. Chim. Acta* 299:151-167.

INFORMACIÓN ACADÉMICA

Sesiones Científicas

1 de abril

Conferencia pronunciada por el Excmo. Sr. D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo, titulada: «Glicopatología y Glicoterapéutica: nuevos datos (Sobre virus de las gripes aviaria y humana. Agentes antigripales)».

15 de abril

Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Prof. Dr. D. Antonio Rodríguez Artalejo, Catedrático de Farmacología en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, quien pronunció su discurso titulado: «La maquinaria molecular de la exocitosis en las células cromafines de la médula adrenal». Fue presentado por la Académico de Número Excmo. Sra. D.^a María Teresa Miras Portugal.

20 de abril

Presentación de la Monografía «Citocromo P-450». Intervinieron la Prof. Dra. M.^a José Gómez-Lechón Moliner y la Excmo. Sra. Dña. María Cascales Angosto.

22 de abril

Conferencia por el Excmo. Sr. D. Albino García Sacristán, titulada: «Bienestar animal y estrés».

29 de abril

Presentación de la nueva Página Web de esta Corporación. Intervino el Excmo. Sr. D. Antonio Luis Doadrio Villarejo.

6 de mayo

Conferencia por el Dr. D. José Luis Pedráz Muñoz, Catedrático del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la

Universidad del País Vasco, titulada: «La microencapsulación de células, ¿una nueva alternativa terapéutica?».

13 de mayo

Conferencia por la Excm. Sra. D.^a Ana María Pascual-Leone Pascual, titulada: «El eje cerebro-intestinal: orexinas».

20 de mayo

Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Prof. D. Manfred Anke, Profesor de Toxicología de la Nutrición en la Universidad de Jena (Alemania), quien pronunció su discurso titulado: «Essentiality of arsenic, bromine, fluorine and titanium for animal and man». Fue presentado por el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas.

27 de mayo

Conferencia por el Excmo. Sr. D. Manuel Domínguez Carmona, titulada: «La toxina botulínica como medicamento».

3 de junio

Tertulia Científica de la Real Academia Nacional de Farmacia sobre el tema: «Brote de *Trichinellosis*». Intervinieron los Excmos. Sres. D. Manuel Domínguez Carmona, D. Bernabé Sanz Pérez y D. Antonio Martínez Fernández, Académicos de Número de esta Corporación.

Conferencia por la Dra. Dña. Begoña Elorza Barroeta, Profesora Titular del Departamento de Química Física II en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, titulada: «Aplicaciones farmacológicas de los liposomas».

10 de junio

Conferencia por el Dr. D. Carlos Roquero de Laburu, Académico Correspondiente, titulada: «Elementos del medio natural de Irak

favorables para el desarrollo de la Agricultura y la Sanidad: Una visión realista y optimista».

17 de junio

Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Dr. D. Agustín García Asuero, Catedrático del Departamento de Química Analítica en la Universidad de Sevilla, quien pronunció su discurso titulado: «Calibración, comparación de métodos y estimación de parámetros en el análisis Químico y Farmacéutico». Fue presentado por el Excmo. Sr. D. Benito del Castillo García, Académico de Número de esta Corporación.

24 de junio

Conferencia por el Excmo. Sr. D. Antonio Martínez Fernández, titulada «Adyuvantes vacunales: ADAD un nuevo sistema adyuvante».

Noticias

Acto de Inauguración del Curso Académico 2004

El acto de inauguración del Curso Académico celebrado el 22 de enero de 2004, revistió especial interés.

Presidió el Dr. Reol Tejada, nuestro Presidente, y asistieron el Presidente del Consejo de Estado D. José Manuel Romay, el Presidente del Instituto de España, D. Salustiano del Campo Urbano, que por primera vez en su mandato, estaba recién nombrado, acudía a un acto académico, el Secretario de Estado de Educación y Universidades, D. Julio Iglesias de Ussel. Además nos acompañaron el Secretario de la Real Academia de Medicina Dr. Juan Jiménez Collado junto a nuestro Presidente de Honor Prof. Ángel Santos Ruiz con la casi totalidad de los Académicos y compañeros de otras Academias, autoridades sanitarias nacionales y regionales y el Presidente del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos D. Pedro Capilla.

El acto tuvo especial relevancia puesto que por primera vez en el transcurso del mismo se procedió al nombramiento del Prof. Suñé, Ex-Presidente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña, del Dr. José Esteve, actual Presidente de la misma y de los Dres Miguel Ylla y Francisco Taxonera, Secretario y Vicepresidente de la misma, como Académicos Correspondientes de esta Real Academia Nacional de Farmacia.

El Dr. Reol señaló el simbolismo del acto, la extraordinaria trayectoria científica del Prof. Suñé como galénico e historiador, el empuje empresarial del Dr. Esteve siempre desde la vanguardia de la I+D y la más alta calidad en la producción, así como las extraordinarias trayectorias profesionales, en los Departamentos Técnicos y de I+D de la Industria Farmacéutica, de los Dres. Ylla y Taxonera. La Real Academia Nacional de Farmacia considera un honor contar entre sus miembros con tan extraordinarias figuras de la ciencia farmacéutica y el mundo del medicamento de esa tierra emprendedora y querida que es Cataluña, dijo el Dr. Reol.

Contestó, en nombre de todos, el Dr. Esteve quien agradeció a nuestra Academia el alto honor recibido y la circunstancia de que el nombramiento fuera en el acto más solemne de la Real Academia Nacional de Farmacia, lo que muestra la más firme voluntad de “hacer cosas juntos en bien de las Ciencias Farmacéuticas, el mundo del medicamento y para estrechar los lazos de amistad y sintonía entre la Real Academia Nacional de Farmacia y la Real Academia de Farmacia de Cataluña”.

En el acto también se impuso la Medalla Carracido, en su categoría de Bronce, al farmacéutico D. Ricardo García Gil, quien desde su condición de Farmacéutico Titular de Épila (Zaragoza) fue quien primero dio pistas microbiológicas rigurosas sobre la presencia del vibrión colérico en las aguas del río Jalón. La Autoridad Sanitaria Nacional lo puso al frente de la Campaña Anti-cólera en aquella región y le distinguió públicamente después con la Encomienda de la Orden Civil de Sanidad.

El Dr. García Gil fue un pionero en temas ecológicos en nuestro país y siempre un sanitario y un farmacéutico ejemplar. Al Dr. García Gil le acompañaban numerosos sanitarios de Zaragoza, el Presidente del Colegio Oficial de Farmacéuticos de esa Provincia, Ilmo. Sr. D. Ramón Blasco Nogués; el Vicepresidente, D. Juan Carlos Gimeno Barranco, así como otros miembros de esta Corporación profesional, entre los que se encontraba D. Jesús Maorad Bello, ex-Presidente.

Con la Memoria de la Académica Secretaria, que recoge el número anterior, y la entrega de premios de la Academia finalizó tan brillantísimo acto.

* * *

El Excmo. Sr. D. Josep Esteve, Académico Correspondiente y Presidente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña, ha sido galardonado con el Premio Extraordinario a la Trayectoria Profesional en el Sector Farmacéutico; patrocinado por el Grupo Expansis.

* * *

El Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza, que ha presidido la Fundación OTIME (Oficina Técnica Internacional del Medicamento) desde su creación en el año 2000, ocupará, por decisión unánime del Patronato de esa institución, durante otros cuatro años más, la Presidencia de esta Fundación.

* * *

El Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero ha sido nombrado el 20 de mayo de 2004 Vocal del Comité Asesor de Expertos sobre Cuestiones Éticas, Económicas, Medio-Ambientales, Jurídicas y Sociales del Banco Nacional de ADN.

* * *

El Excmo. Sr. D. José Elguero Bertolini, Académico Correspondiente en Madrid, ha tomado posesión como Académico de Número en la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, el día 26 de mayo de 2004. En su acto de recepción leyó el discurso titulado "Metodología de la Investigación: Los ejemplos de Freud y Cajal". Le contestó, en nombre de la Corporación, el Excmo. Sr. D. Miguel Ángel Alario Franco.

* * *

El Excmo. Sr. D. Román de Vicente Jordana ha representado a la Real Academia Nacional de Farmacia el día 3 de Junio de 2004 en el Ramsay Memorial Fellowships Trust en Londres, con ocasión de la celebración del centenario de la concesión del Premio Nobel a Sir William Ramsay.

* * *

El Excmo. Sr. D. Benito del Castillo García ha tomado posesión del cargo de Decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid en un solemne acto celebrado el día 23 de junio de 2004 por la mañana en la Sala de Juntas del Rectorado de dicha Universidad. El Dr. Benito del Castillo ha sido renovado por quinta vez en este cargo bajo el mandato del Excmo y Magco Sr. Rector Dr. D. Carlos Berzosa.

* * *

Necrológica

El Dr. D. Antonio de Fuente Castells, nacido en Madrid en 1916, ha fallecido en marzo de 2004. Hijo de Farmacéutico palentino, con arraigada tradición, y de madre leridana. Estudió Farmacia y posteriormente Medicina en la Universidad Complutense, licenciándose en 1943.

Fue interno de la Beneficencia Provincial y Profesor Auxiliar de la Universidad. Médico del Hospital Central de la Cruz Roja y del Servicio de Aparato Respiratorio. Jefe del Servicio de Cardiología de la Asamblea Central. Inspector Médico de Servicios Sanitarios del S.O.E (Barcelona). Director de Balnearios. Médico del Registro Civil y de la Beneficencia Municipal de Madrid. En Medicina interna se especializó en Cardiología, Reumatología y Aparato Respiratorio.

Dentro de su extenso *curriculum vitae* académico, hay que mencionar que efectuó casi una decena de oposiciones y concursos públicos.

No podemos dejar de mencionar el aspecto humano y, sobre todo, la gran proyección hacia el paciente con la que el Dr. Antonio de Fuente proyectó toda su trayectoria profesional. Recuerda su hijo sus interminables consultas, que continuaban durante toda la tarde hasta bien prolongada la noche, olvidando la hora de la cena, con la sala de espera llena de clientes para ser atendidos, tanto su mujer como sus hijos pequeños lo toleraban pacientemente. Al enviudar, y en su nuevo matrimonio, continuó con la misma actividad profesional y circunstancias.

Insigne cardiólogo, afamado en el barrio de Chamberí, no pasó inadvertido para jóvenes médicos, que trabajaban en dicha zona, y con ellos practicaba un magisterio constante, de una manera especial con la Dra. M^a Luz Ruiz, principal colaboradora, y hasta su propio médico de cabecera, al que atendió continuamente con todo cariño en su larga y penosa enfermedad.

La sola mención de su nombre iba acompañada de comentarios de los pacientes y familiares que decían que D. Antonio había salvado la vida de su padre, hijos, etc.

Ocupó la dirección de diversos balnearios como Tona (Barcelona), Incio (Lugo), Fitero (Navarra), Caldas de Cuntis (Pontevedra) y San Juan de la Font Santa (Mallorca).

Colaboró en una serie de publicaciones en la revista de la Real Academia Nacional de Farmacia como miembro de la Comisión de Aguas, alcanzando la Medalla Carracido de Bronce en 1987 por sus méritos. Fue miembro de la Junta Directiva de la Sociedad Española de Hidrología e hizo aportaciones personales en su Boletín.

En la medicina social intervino en las plazas del S.O.E y de empresas como Telefónica, Ingenieros Industriales, etc... Colaborador en la Cátedra de Hidrología y en la Escuela de la UCM con los Profesores Armijo Valenzuela y San Martín Bacaicoa.

De personalidad extraordinaria y variada. Asistió a frecuentes conciertos, viajero infatigable hasta las islas Galápagos, con estudios termolúdicos, etc... Gran conocedor de arte e historia; patrón de yate en sus excursiones a Mallorca. Todo hace resaltar su figura humana, dedicada al buen hacer de la medicina, cuyas enseñanzas contribuyeron a diseñar importantes aspectos de la problemática de la Salud, con callada labor y humildad extrema. Su recuerdo permanecerá siempre entre nosotros que le conocimos y admiramos.

Disfrutamos con él los placeres de la buena mesa, ya en su casa o en restaurantes como "Currito" o "Casa Lucio", siempre acompañado de familiares, amigos o colegas que tanto lo recuerdan por su cercanía y trabajo incansable. Compañero ejemplar dispuesto a hacer favores y orientarnos en problemas profesionales.

Padeció una larga y grave enfermedad con la sonrisa en los labios hasta su fallecimiento. Dios lo habrá acogido y nosotros le seguiremos pidiendo ayuda en nuestros problemas.

AGUSTÍN VALERO CASTEJÓN

* * *

Don Ricardo García Gil, Medalla Carracido en su categoría de Bronce en 2004 de nuestra Real Academia Nacional de Farmacia,

nacido el 10 de agosto de 1920 en Mandayona (Guadalajara) ha fallecido en Zaragoza el 1 de junio de 2004.

Don Ricardo era Licenciado en Farmacia por la Universidad Central de Madrid habiéndosele expedido el título en 3 de mayo de 1994. Trabajó en Bioquímica y Análisis Clínicos con el profesor Ángel Santos Ruiz, Farmacéutico Titular de Épila (Zaragoza), muy preparado en Microbiología, como dice el Dr. Juan Manuel Reol en Correo Farmacéutico de la semana 14 al 20 de junio de 2004, “puso de manifiesto el destacado papel que los farmacéuticos españoles del medio rural” han desempeñado en el control de las aguas, el medio ambiente y la salubridad en general. Su intervención fue decisiva para detectar el brote epidémico de cólera en la Cuenca del Jalón en el verano de 1971 y a él se debe el haber formado en los años setenta un equipo de farmacéuticos jóvenes con los cuales realizó un Estudio higiénico-sanitario del río Jalón, ampliándolo a continuación con los del Ebro, Gállego y Huerva a su paso por la provincia de Zaragoza.

Su labor sanitaria fue reconocida en el año 1971 con la Encomienda al Mérito de la Orden Civil de Sanidad.

Fue Presidente del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza durante los años 1972 a 1975. A él se debe el libro publicado en 1985 titulado “Estudio Hidrológico de los Ríos Jalón, Huerva, Gállego y Ebro y Evaluación del efecto contaminante de los vertidos residuales de la ciudad de Zaragoza. Peligro de una contaminación”.

* * *

El Excmo. Sr. D. Pablo Sanz Pedrero, que ostentaba como Académico de Número la medalla nº 22, ha fallecido el 10 de junio de 2004 en Valladolid.

Don Pablo había nacido el 30 de junio de 1921 en Piñel de Abajo (Valladolid) y cursó estudios en la Universidad de Madrid obteniendo la Licenciatura en Farmacia en 1948 y el título de Doctor en Farmacia en 1950, además era Licenciado y Doctor en Ciencias Químicas (1953). El Dr. Pablo Sanz dedicó su vida a la enseñanza desempeñando diversos cargos docentes en el campo de la Física, Técnica Física, Físico-química y Técnicas instrumentales principal-

mente tanto en las Facultades de Farmacia y Ciencias de Madrid como en la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela, así fue Profesor Ayudante de Clases Prácticas, Profesor Adjunto, Profesor Encargado y Catedrático.

Asimismo tuvo responsabilidades de gestión en la Universidad de Santiago de Compostela donde desempeñó los cargos de Jefe del Departamento de "Química Inorgánica y Físico Química" (1967-1978), Decano de la Facultad de Farmacia (1971-19974) y Rector Magnífico (1974-1978). Fue Consejero del Consejo Nacional de Educación (1974-1978).

Estaba en posesión de la Medalla de Oro del Consejo General de Colegios de Farmacéuticos (1977) y de la Gran Cruz de la Orden de Alfonso X el Sabio (1979).

Había ingresado como Académico Correspondiente en nuestra Corporación en 1962 y como Académico de Número el 16 de junio de 1983.

* * *

Vaya para todos ellos nuestro deseo de Paz Eterna y para sus familiares nuestro pesar por la pérdida de estos seres queridos.

Bibliografía

Cultivos transgénicos, hechos y desafíos.—Sasson, Albert.—2001.—La Habana.—Elfos Scientiae.—ISBN: 959-235-019-1.—377 págs.

La monografía comprende seis **apartados** que se concretan en más o menos minuciosas y extensas divisiones y subdivisiones, según la importancia de la materia.

En la **Introducción** se hace especial referencia al aporte de las biotecnologías a lo que llama «sistema agricutico» como respuesta al desafío de la alimentación de la población actual y futura en los países en vías de desarrollo y a la salvaguarda de la biodiversidad, sobre todo en los países africanos, en los que se debe orientar la investigación hacia tecnologías más eficaces en la producción de alimentos. A este respecto cita como muy relevantes la contribución del CGIAR (*Consultive Group on International Agricultural Research*) y su colaboración con instituciones privadas: *Emergen Genetics Inc*, *Montsanto* y *Novartis* (EE.UU.), *Axis Genetics* (R.U.) y *Plantec* (Japón) y las transferencias de biotecnologías para la mejora de diversos cultivos en Filipinas, África y China.

En **especies de cultivo transformadas** se extiende en los aspectos afectados de las veinte comestibles mejoradas por la genética clásica y la ingeniería genética. Destaca la necesidad de captar y correlacionar la mucha información procedente de investigaciones sobre genomas, patrones de expresión, bioinformática y fisiología de plantas enteras.

De las **iniciativas sobre el genoma de las plantas** resaltan las de la *National Science Foundation*, el *Departamento de Agricultura de los EE.UU. (USDA)*, la francesa *Genoplante* y otras varias agencias; así como los principales institutos de investigación y asociaciones productoras de substancias químicas para la agricultura.

Sigue con: **las superficies cultivadas y los valores de mercado**, dando datos relevantes sobre los incrementos de la extensión y rendimientos de estos cultivos estos últimos años y el subsiguiente aumento en la producción de alimentos.

Como **casos de estudio particular** cita, por ejemplo, la posibilidad de incrementar la lisina en los cereales; los rendimientos del arroz, que puede llegar a las 15 t/ha. Se ocupa de los maíces de *Montsanto*, resistentes al barreno y al herbicida glifosato, y de la controversia con el grupo francés *Rhône-Poulenc* sobre la utilización en el maíz de un gen resistente al referido herbicida. Se detiene en las investigaciones sobre el trigo para hacer más eficiente la producción y procesamiento mediante la modificación de las proteínas del gluten. Cita las investigaciones del *Institute of Arable Crop Res.*, recuperando líneas transformadas de diversos trigos, de *Triticum durum* y de *tritordeum* (cereal hexaploide que combina los genomas del trigo tetraploide *Durum* y la cebada silvestre (*Hordeum chilense*) que se adapta bien a los climas mediterráneos; y, asimismo, los éxitos en la transferencia de un segmento de cromosoma de *H. bulbosum* resistente al mildiu y al virus del mosaico amarillo; las investigaciones de Guelph (Canadá) sobre transgénesis para mejorar la supervivencia de la cebada, reducir la proporción de ácidos grasos responsables del enranciamiento de las semillas; así como las que se realizan en la Carlsberg para la obtención de cebadas que secreten hacia el endospermo una (1,3-1,4) *B glucosana* termoestable.

Se detiene en los beneficios potenciales de la *apomixis*, y los intentos de aplicar la genética molecular y la ingeniería genética para introducirla en los cultivos de propagación sexual; describe los efectos probables (negativos o beneficiosos) sobre la diversidad biológica agrícola y la distribución de los beneficios, e insiste en la necesidad de que la *apomixis* esté disponible especialmente en los países subdesarrollados.

Las **especies oleaginosas** se abordan teniendo en cuenta el creciente consumo y producción mundial de aceites y grasas para la elaboración de alimentos, deteniéndose en los estudios para obtener variedades transgénicas más productivas, con una determinada composición de ácidos grasos y otras características agronómicas beneficiosas. En la producción de grasas y aceites especiales, como la manteca y la margarina, se incluyen, además investigaciones de ingeniería genética sobre el aceite de semillas, la jojoba, lunaria, ricino, etc. Se pormenorizan *las perspectivas para el incremento de la producción de los cultivos tropicales oleaginosos* (palma y cocotero),

para el mejoramiento de sus aceites y la obtención de variedades transgénicas resistentes a virus e insectos.

En **otros cultivos alimenticios** se incluyen investigaciones biotecnológicas sobre *los plátanos* (aumento de la fertilidad, resistencia a plagas y enfermedades y a la maduración y almacenamiento de los frutos), *el tomate* (resistencia a los virus, mejora del sabor), *el melón* (resistencias virales) *la patata* (resistencia a los virus, reducción del uso de insecticidas); en la *uvid* da cuenta de las técnicas de ingeniería genética desarrolladas por el CSIRO de Australia, para mejorar el rendimiento y la calidad de las especies vinateras, y para modificar las levaduras por ingeniería genética; aplicables también a *Otras especies* como la berenjena, la remolacha, la remolacha azucarera y frutales del hueso.

En **las no destinadas a la alimentación** menciona las plantas transgénicas de tabaco con mayor masa de hoja; berenjenas sin semillas amargas; frutales de hueso sin o con escaso oscurecimiento enzimático de las frutas frescas y procesadas, etc.

En **los cultivos forrajeros** se citan particularmente los estudios sobre la alfalfa; y los programas de premejoramiento del dactilo (*Dactylis glomerata*) y *Agrostis stolonífera*.

El **algodón de Monsanto Co.**, y los **cultivos resistentes** (también) a **insectos (cultivos Bt)** se tratan especialmente, confrontando las ventajas del bioplaguicida Bt y los insecticidas químicos.

La Floricultura fija el interés en las dicotiledóneas más susceptibles a la transformación mediada por *Agrobacterium*, para mejorar la coloración o la resistencia a enfermedades, y en la obtención de transgénicas de *lisianthus*, Irio, gladiolo y petunia. Asimismo, se citan los principales institutos y organismos implicados en la mejora.

En la **agricultura molecular** se conceden grandes expectativas a las empresas dedicadas a aplicar la ingeniería genética a cultivos para obtener productos de alto valor, como fármacos y vacunas contra diversos agentes patógenos; así como a la producción de anticuerpos en las plantas e hirudina mediante la tecnología de la oleosina. Se expone la obtención de proteínas autoantígenos y la elaboración de productos codificados por virus.

A continuación, se cita ampliamente **la experiencia canadiense** en experimentos con cultivos transgénicos de numerosas especies, la evolución de la extensión de los mismos, y los organismos oficiales y empresas implicadas, haciendo referencia a las condiciones legales para la evaluación y comercialización de las semillas y productos. **La experiencia japonesa** se centra en la aplicación de las biotecnologías a los alimentos fermentados, su evolución, situación en relación con EE.UU. y la U.E., y en las transferencias de tecnología.

Bajo el epígrafe **Problemas de salud y seguridad** se abordan las preocupaciones de los consumidores por la seguridad, la evaluación de los riesgos y las pruebas de seguridad realizadas con algunos alimentos transgénicos.

Los problemas que plantea LA ACEPTACIÓN POR EL PÚBLICO se van desgranando bajo numerosos epígrafes como **Problemas de seguridad ambiental**. Los peligros ambientales, refiriendo la dificultad de determinar y cuantificar los riesgos de la transferencia de un gen desde un cultivo hacia el ambiente natural y de su efecto en la estabilidad del ecosistema y en la biodiversidad. Se tratan por separado *El impacto de la movilidad de los transgenes sobre la biodiversidad* y *Otros efectos sobre el medioambiente*, como la posibilidad de que las malezas puedan desarrollar resistencia a los herbicidas y la influencia de las plantas transgénicas en la flora edáfica.

En **Conducta y ética** se abordan *Aspectos relacionados con la conducta* de aceptación o rechazo por los consumidores de los productos modificados, resaltando la necesidad de una mayor investigación e información sobre la seguridad de los mismos; se abordan también, *Cuestiones sociales y morales* como la influencia de los tabúes religiosos a la manipulación de la vida implicados en la ingeniería genética. Asimismo se da cuenta pormenorizada de *los comités de ética* instaurados en muchos países.

En **las implicaciones económicas y las cuestiones relacionadas con los derechos de propiedad** se destaca la sinergia entre los sectores público y privado en los EE.UU., con las consiguientes transferencias de tecnología entre ambos, se cuantifican las ayudas y se tratan nuevos aspectos como la prevención de la transferencia de tecnología entre ambos, se cuantifican las ayudas y se tratan nuevos aspectos como la prevención de la transferencia de genes y el impor-

tante papel que desempeña a este respecto el TPS (Technology Protection System) y la oposición al mismo del CGIAR (Consultive Group on International Agricultural Research) la *tendencia hacia el monopolio y el oligopolio* se aborda por separado, con numerosos ejemplos sobre los peligros que entrañan. Cita el valor económico de las operaciones de las más importantes empresas mundiales de biotecnología. En *la gestión del riesgo* llama la atención hacia el bajo nivel de los estudios sobre evaluación.

Da cuenta de los **Muestreos de opinión y encuestas**, citando la Encuesta Internacional sobre Bioética de 1993. En *los beneficios y los riesgos*, se resalta la diferente aceptación de las transferencias génicas entre plantas y de estas a animales o a humanos.

A continuación, da cuenta de *La aceptación por el público en EE.UU.* En la U.E. el Eurobarómetro da resultados variables. En España cita los obtenidos por Atienza y Lujan (C.S.I.C.) en 1995, sobre la percepción pública de la ciencia y tecnología, en particular de la biotecnología y la Ingeniería genética, y de la necesidad de más información y estudio. En Japón en general, existe una buena aceptación, aunque con algunas recientes incertidumbres e incluso oposición; Australia y Nueva Zelanda apoyan la Ingeniería genética, aunque con reticencias sobre los alimentos insistiéndose en la necesidad del etiquetado.

Las posiciones del gobierno y de las entidades no gubernamentales en los EE.UU. se tratan extensamente dando cuenta de los numerosos experimentos con cultivos transgénicos en múltiples direcciones; y el importante papel que desempeñan a este respecto el USDA y la *Food Drug Administration* (FDA) así como la intervención de otras instituciones oficiales y privadas en todos aquellos aspectos y en el del etiquetado.

La **situación en Europa** se pormenoriza haciendo referencia al debate en la U.E., y a las dificultades de la introducción de las biotecnologías de vanguardia, y de la comercialización de OMG (Organismos Genéticamente Modificados). Se ocupa también de las posiciones de los organismos e instituciones oficiales y de la actividad de las principales empresas biotecnológicas en el Reino Unido, en Francia, en España y en Suiza; deteniéndose de nuevo, en las actitudes de las organizaciones de consumidores y de las empresas

mayoristas y minoristas del negocio de los alimentos. Concluye con la necesidad de aplicar la moderna biotecnología agraria para luchar de modo inmediato contra el hambre.

El texto termina con cuatro divisiones: **Iniciativas de la bioindustria para el diálogo; La reglamentación y etiquetado** en la Unión Europea; destacando *Las dificultades de un etiquetado significativo* y el caso particular de *Los productos de la agricultura biológica*, y *La segregación de los cultivos transgénicos y no transgénicos y de los productos derivados*; **Las reglamentaciones de bioseguridad y la percepción del público acerca de los alimentos transgénicos en los países de desarrollo**, en Asia, África, América Latina y particularmente en Argentina, y de las actividades cooperativas en los mismos. Y finalmente, con las **reglamentaciones internacionales** sobre muy diversos aspectos. El plan de acción adoptado en Río de Janeiro en 1993 por la UNCED (United Nations Conference on Environment and Development). Y la Conferencia de los Partidos (CoP), previa a la Convención sobre Diversidad Biológica.

La monografía, con 186 citas bibliográficas, contiene una exhaustiva —a veces reiterativa— información que alcanza hasta 1999, sobre obtención, distribución y uso de las plantas transgénicas y sus productos; entidades tanto públicas como privadas implicadas, y sobre la problemática que plantean en el mundo. Esta extensa temática es abordada por el Dr. Sassón —Académico Correspondiente de esta Real Academia Nacional de Farmacia— con la autoridad que le dan, sus profundos conocimientos y experiencia y los cargos ostentados en la UNESCO.

GASPAR GONZÁLEZ GONZÁLEZ

* * *

Historia de la Ciencia y de la Técnica en la Corona de Castilla, Vols. I, II, III y IV.—Junta de Castilla y León. Consejería de Educación y Cultura.—2002.—Salamanca.—Gráficas VARONA.—Obra completa.—ISBN: 84-9718-063-1.

Vol. I. *EDAD MEDIA I*.—Luis García Ballester Dir. —ISBN: 84-9718-064-X.—936 págs.

Vol. II. *EDAD MEDIA 2.*—Luis García Ballester Dir.—ISBN: 84-9718-065-8.—790 págs.

Vol. III. *SIGLOS XVI y XVII.*—José M.^a López Piñero Dir.—ISBN: 84-9718-066-6.—719 págs.

Vol. IV. *SIGLO XVIII.*—José M.^a López Piñero Dir.—ISBN: 84-9718-067-4.—861 págs.

En cuatro gruesos volúmenes, que suman en total más de 3.300 páginas, esta obra monumental y de edición exquisita que mereció en el año 2002 el Primer Premio Nacional de «Libros Mejor Editados» en la modalidad de «Libros Científicos y Técnicos», recoge de forma prácticamente exhaustiva el devenir del pensamiento, las artes, las técnicas, las profesiones, la cultura erudita y la popular de la hoy Autonomía Castellano-Leonesa, desde la Alta y la Baja Edad Media hasta la Ilustración, pasando por el Renacimiento.

En la imposibilidad de comentar todos los temas, que han sido desarrollados por los 71 autores que han intervenido, vale la pena el recordar que abarcan, entre otros muchos, desde: *El Conocimiento del Macrocósmo*, *La técnica de Construcción*, *La Arquitectura Gótica*, *La Enfermedad y la Asistencia Hospitalaria*, *La Actividad Intelectual Médica de las minorías Mudéjar y Judía*, *La Farmacia...* hasta *El cuidado de los Animales y sus Enfermedades* (Vol. I); así como, en el Vol. II: *La Alimentación*, *Técnicas Pre-industriales*, *El Tiempo y la Medida del Tiempo*, *La Guerra*, *El Ocio y la Ornamentación...*, en el Vol. III: *Las Instituciones*, *Ocupaciones y Profesiones*, *La Difusión de la Información Científica y Técnica...* y los capítulos dedicados a las distintas ciencias como: *Matemáticas*, *Astronomía*, *Navegación*, *Historia Natural*, tanto relativa a *Plantas* como a *Animales*, *Medicina*, *Agricultura...*; finalmente, el Vol. IV recoge temas como: *La Ciencia y la Técnica en la Ilustración Castellana*, *El Estudio de la Historia Natural (El Jardín, El Gabinete, Las Expediciones)*, *La Enfermedad y los Médicos*, *La Física Moderna*, *La Química y sus Aplicaciones*, *Nueva Tecnología y Nuevas Industrias...*

Es de hacer constar que todo ello se encuentra embellecido con más de 160 ilustraciones de gran calidad, en consonancia con los textos a los que llegan a dar una precisa ambientación, que el lector no sólo agradece sino que disfruta.

Se puede asegurar sin la menor exageración, que se trata de una verdadera joya editorial, literaria y de erudición, regalada a esta Corporación por el Excmo. Sr. D. Juan Abelló.

ALBERTO GIRÁLDEZ

Historia del Colegio Oficial de Burgos.—Editado por dicha institución.—Imprenta Amabar, S. L., Burgos.—2003.—ISBN: 84-96230-02-3.—267 págs.

El Colegio Oficial de Farmacéuticos de la provincia de Burgos ha editado su propia Historia, en un libro verdaderamente modélico, pues rezuma Farmacia desde la primera a la última página; en él se incluyen los orígenes históricos y nacimiento de las primeras boticas en lo que actualmente constituye la provincia; así como la relación y comentario de los farmacéuticos burgaleses y sus respectivas oficinas de farmacia anteriores a la creación de los Colegios; por supuesto, la constitución del de Burgos y sus primeros años de andadura, detallando cuantas vicisitudes ha afrontado en su devenir desde el siglo XIX hasta la reciente actualidad.

En él se detallan no sólo lo concerniente al Colegio en sí, como locales y traslados, juntas y nombramientos, medallas conferidas, situaciones afrontadas, adaptación a los cambios legislativos, sino lo relativo a muchos de los colegiados, a sus aportaciones y méritos, la calidad de sus servicios e incluso la prestancia de sus establecimientos.

Aparecen nombre ilustres casi legendarios y sus respectivas biografías, como las de D. Obdulio Fernández y D. T. Mariano Losa, como también de otros muchos farmacéuticos y farmacéuticas, precisamente, se alude a una de las primeras *Inspectora Farmacéutica Municipal*, Doña Hildelisa García Bengoechea y a cuantos han desarrollado la profesión farmacéutica en territorio burgalés.

Existe además una detallada relación y descripción de las farmacias de la provincia desde al año 1950 hasta el 2003, varias de ellas y de otras anteriores aparecen como ilustraciones de los diversos capítulos. Porque hay que resaltar la abundancia de documentos, fotografías y hasta caricaturas de ilustres farmacéuticos, que además

de complementar la rica información de los textos, dan al libro una exquisita presentación.

Para esta Real Academia Nacional de Farmacia es un singular honor las repetidas veces que aparece citado y fotografiado nuestro Presidente D. Juan Manuel Reol Tejada, en diversas ocasiones tales como el de ser nombrado Farmacéutico del Año o de merecer la Medalla de Oro del Colegio y, principalmente, la de alcanzar la máxima distinción de Presidente de Honor del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Burgos. Igualmente, en multitud de ocasiones se cita o aparece en ilustraciones por sus constantes vinculaciones con el Colegio (actualmente sigue siendo Vocal de la Junta del mismo) otro Académico de esta institución, también burgalés, el Prof. Benito del Castillo, de cuyo archivo personal ha cedido varias de las ilustración que enriquecen el libro. No es menos grato el que varias de las fuentes en que se han basado algunos de los capítulos son trabajos publicados por la Académica Secretaria Profesora M.^a Carmen Francés Causapé, que aparecen citados en la bibliografía de la obra.

Enhorabuena, por lo tanto, al Colegio de Farmacéuticos de Burgos por la publicación del libro, pero sobre todo por su ejemplar historia.

ALBERTO GIRÁLDEZ

* * *

De la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias se han recibido tres Informes, los n.^{os} 37, 38 y 39.

N.^o 37. —*Implantes cocleares: actualización y revisión de estudios coste-utilidad.*—2003.—ISBN: 84-95463-20-2.—96 págs.

El tema del informe es analizar la evidencia científica disponible sobre los costes, efectividad, utilidad o beneficio de la tecnología terapéutica de los implantes cocleares, mediante la revisión de los estudios de coste de cada uno de tales parámetros. A tal efecto se localizaron 6.368 artículos, de los que se obtuvieron 842 resúmenes y 43 textos completos.

Los resultados indicaron que la tecnología empleada ha dado unos resultados significativamente favorables, tanto en adultos como en

niños. El mayor riesgo lo han representado las infecciones relacionadas con la inserción de un cuerpo extraño dentro del organismo, pero la tasa de complicaciones mayores no superó el 5% de los casos.

La ejecución de la tecnología de implantes cocleares requiere equipos multidisciplinares altamente especializados. Se recomienda la vacunación de todos los pacientes, para reducir el riesgo de desarrollar meningitis, aunque el número de casos fue del 1 por mil, semejante al que se da en la población general.

De los datos obtenidos se deduce, como conclusión, que la tecnología de implantes cocleares demuestra su coste-utilidad y la sitúa entre las coste-efectivas.

* * *

N.º 38.—*Sistema de detección de tecnologías sanitarias nuevas y emergentes. El proyecto síntesis. Nuevas tecnologías.*—2003.—ISBN: 84-95463-22-9.—66 págs.

Desde el mes de enero del año 2003 ha comenzado en la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias (AETS) el sistema denominado «SÍNTESIS-nuevas tecnologías» destinado a la detección de tecnologías sanitarias (dispositivos y procedimientos médicos o quirúrgicos, usados en atención sanitaria): «emergentes» (que no han sido adoptadas todavía por el sistema de salud pública) o «nuevas» (en fase de adopción, disponibles para uso clínico desde hace poco tiempo).

El funcionamiento de tal sistema se basa en la colaboración de un grupo de expertos voluntarios que informa sobre dichas nuevas tecnologías y su previsible impacto en terapéutica. Los expertos se dividen en tres categorías, según las funciones que realizan: 1. «Vigías»: identifican e informan sobre las tecnologías que aparecen como novedosas; 2. «Pilotos»: personas de autoridad reconocida para la toma de decisiones sobre la selección de las que resultan de interés y de las que se prevé un notable impacto; 3. «Técnicos»: profesionales de la AETS responsables de la creación y publicación de las correspondientes Fichas Técnicas; 4. «Otros Informadores»: público en general, que a través de *internet* puede solicitar la evaluación de una nueva tecnología sanitaria.

El trabajo se realiza en cuatro etapas: 1.^a Identificación de las nuevas tecnologías; 2.^a Selección de las que necesitan evaluación; 3.^a Evaluación, en relación con la eficacia, efectividad e impacto; 4.^a Difusión de los resultados.

N.º 39.—*Revisión de intervenciones en atención primaria para mejorar el control de las enfermedades crónicas.*—2003.—ISBN: 84-95463-23-7.—68 págs.

En este informe se investiga la efectividad de diferentes estrategias destinadas a mejorar la calidad de vida de enfermos crónicos de cuatro patologías: asma, diabetes, hipertensión e insuficiencia cardiaca.

Se efectuó una búsqueda en *Medline* en la que se identificaron 37 estudios, que fueron incluidos en esta revisión. El número más frecuente de estrategias que aparecen en un estudio, es de dos. Los parámetros que se toman provienen del manejo de la enfermedad, de las visitas a atención primaria y de los resultados clínicos. Los indicadores de «control» de dichos parámetros son los que frecuentemente mostraron resultados más positivos, seguidos por los indicadores de «autocontrol».

Todas las estrategias aquí consideradas consiguieron mejoras en el manejo de enfermos crónicos, pero para obtener aún mejores resultados es necesario una combinación de al menos dos estrategias. Se concluye que las intervenciones deben armonizar estrategias organizativas, de diseño asistencial y de autocontrol.

ALBERTO GIRÁLDEZ

* * *

La Leyenda Verde. Naturaleza, Sanidad y Ciencia en la Corte de Felipe II (1527-1598).—Javier Puerto.—2003.—Junta de Castilla y León. Consejería de Educación y Cultura.—Gráficas VARONA.—ISBN: 84-9718-120-4.—442 págs.

Si el discreto lector desea pasear de forma apacible y pormenorizada por la Corte del Rey Don Felipe II, puede acudir a la lectura de este inolvidable libro que le llevará hasta las más detalladas, íntimas y curiosas vivencias de aquella corte renacentista, su entorno

y los usos contemporáneos; y todo ello llevando como mentor al Prof. Javier Puerto, autor del libro, de cuya mano recorrerá los vericuetos no sólo de la psicología, criterios, pensamientos, hechos y dolencias del monarca, sino incluso conocerá su alimentación y gustos culinarios, los entretenimientos preferidos y su práctica, sus aficiones por la naturaleza plasmada en los jardines que ordenó diseñar, el interés por la ciencia alquímica aunque contaminada por la magia, astrología y supersticiones; por supuesto, su espíritu profundamente religioso, que en consonancia con los tiempos estaba salpicado de credulidad en milagros cotidianos, en virtudes emanadas de las reliquias a las que se daban usos terapéuticos y en furor frente a las desviaciones de la ortodoxia.

Como queda dicho, cuanto en él se glosa no se circunscribe a la persona de Felipe II, sino que trasciende a las usanzas y personajes de su corte y de la época en general, consiguiendo una muy lograda ambientación que hace la lectura de esta obra tan atrayente y seductora que al lector le resulta arduo el levantar los ojos de las páginas.

Si éste además de discreto y curioso es de formación sanitaria y en especial si es dado a las ciencias farmacéuticas, se sorprenderá conociendo los modos terapéuticos de aquel periodo, los *simples* (principios activos) y los complejos bálsamos, aceites, destilados, electuarios y otros tantos derivados que de ellos se obtenían, así como la tecnología al uso, que incluía, por ejemplo, el hermoso destilador conocido como *mujer en jarras*, por su forma y silueta, o la curiosa *torre filosofal* cuya imagen aparece ilustrando la portada del libro.

Resulta nostálgica la precisa puntualización de la disposición y contenido de la farmacia del Monasterio de El Escorial, que hacen Fray José de Sigüenza y el médico murciano Juan Alonso de Almela, abarcando varias páginas del libro.

Vale la pena citar esos dos nombres para dar testimonio de la gran riqueza de presentación de los colaboradores reales, con sus características, opiniones y acciones; de forma que se incluyen, por ejemplo, largas listas de todos los médicos y cirujanos de Su Majestad, así como comentarios de otros muchos de sus colaboradores. Pues la información manejada en esta obra resulta extremadamente completa, de la cual se notifican todas sus fuentes, que alcanzan

incluso manuscritos existentes en la Biblioteca Real, la del Monasterio de El Escorial y la Nacional de París.

Y es que además de las conocidas Leyenda Negra y su oponente —tema en el que no se entra— existe esta Leyenda Verde, que trata de la Naturaleza, la Sanidad y la Ciencia, de aquellos tiempos, como reza en el título de la obra.

ALBERTO GIRÁLDEZ

* * *

Futuro del Laboratorio Clínico en la década 2001-2010.—Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.—2003.—Publicaciones Acción Médica.—Barcelona-Sevilla.—130 págs.

El informe que se presenta analiza las tendencias de la especialidad de Analistas Clínicos en los próximos diez años y el futuro previsible para los Laboratorios Clínicos en nuestro país.

Para el estudio se ha seguido el cuestionario DELPHI consistente en 30 bloques de preguntas dicotómicas (contestaciones: SÍ/NO), las cuales a su vez se responden según las perspectivas «Predicción» (si se prevé que el argumento planteado va a ser llevado a la práctica, o no) y «Deseo» (expresa lo que al encuestado le gustaría que sucediese), que han sido elaboradas y posteriormente tabuladas por la consultoría Pricewaterhouse-Coopers.

Los cuestionarios fueron enviados a 61 expertos seleccionados entre especialistas en Análisis Clínico, miembros de asociaciones y sociedades científicas, cargos de la Administración, directivos de entidades aseguradoras, expertos en gestión y calidad, cuadros de Industria y personalidades de la Universidad.

Como conclusiones se recogen aquellas cuestiones y argumentos en los que más del 90% de los encuestados han expresado idéntico parecer («Consenso») y se muestran en cuatro bloques: Resultados de Predicción y Resultados de Deseo; ambos divididos en Afirmativos (se prevé que sí se van a realizar) y Negativos (no parece que vayan a tener lugar). Todo ello relativo a un horizonte temporal que no excede a los 10 años.

La presentación resulta, a mi juicio, excesiva en cuanto a espacios vacíos (sin texto) y más de 60 gráficas que solamente expresan

porcentajes de respuestas SÍ/NO, lo cual podría resumirse en una tabla general.

ALBERTO GIRÁLDEZ

Comité de Expertos de la OMS en Farmacodependencia.—2002.—OMS, Serie de Informes Técnicos, 915.—Ginebra, Suiza.—ISBN: 92-4 320915-9.—28 págs.

Un nuevo fascículo editado por la OMS, lo que le confiere una indudable importancia y la consuetudinaria utilidad, como el resto de sus publicaciones. En este caso ha sido confeccionado por el mismo Comité de Expertos de la OMS en Farmacodependencia, siendo su 33.º informe y sigue en la línea de sus anteriores, cuyo propósito es examinar las sustancias psicoactivas que producen dependencia.

Primeramente se exponen los criterios que se siguen para incluir en los distintos tipos de listas acordadas en el Convenio de 1971 los psicofármacos cuyo consumo puede ser abusivo y significar riesgos graves para la salud pública.

Seguidamente, se pasa a realizar el examen crítico de cinco sustancias ya estudiadas pero que se había recomendado tener en cuenta datos más recientes sobre su potencial de dependencia y probabilidad de abuso, para establecer un balance con su utilidad terapéutica, formulando como consecuencia las oportunas recomendaciones. Las sustancias examinadas fueron: Amfepramona, Amineptina, Buprenorfina, Δ^9 -tetrahidrocannabinol y Tramadol.

Por otra parte, se hizo un examen preliminar de seis sustancias, lo que viene a ser el estudio para determinar si es necesario proceder al examen documentado y cabal (examen crítico). Las sustancias que figuran son: Ketamina, Zaleplón, Zopiclona, Butorfanol, Oripavina y Té de Arabia. De todas ellas se recomendó el efectuar un examen crítico.

ALBERTO GIRÁLDEZ

* * *

Fuchsio, Leonharto.—*De historia stirpivem commentarii Insignes.* Basilea, Officina Isingriana, 1542.—Edición Facsímil a cargo de

Duilio Contin y Alessandro Menghini.—2003.—Centro Studi Aboca Museum.

Con la edición de esta obra de Leonardo Fuchs, el Museo Aboca, establecido en Sansepolcro (Italia), continua con su labor de revalorizar el gran patrimonio literario del pasado que alberga y en particular del que tiene unas características médico-farmacéuticas ya que se trata del uso racional de las plantas medicinales a través del tiempo.

En la presentación del facsímil se señala que con esta obra, cuyo original se conserva en la Biblioteca antigua del Museo Aboca, se pone a disposición de los estudiosos un herbario de la primera mitad del siglo XVI cuyo autor tuvo una gran importancia en la historia de la medicina y de la botánica renacentista debido a las innovaciones científicas e iconográficas que presenta este libro que se halla bien conservado, y cuenta con 517 xilografías coloreadas en acuarela.

La reproducción facsimilar mantiene el tamaño original en folio e incluso las cubiertas son similares a la obra original ya que en el facsímil están realizadas en color rojo burdeos y presentan en la cara anterior el retrato del autor y en la posterior el retrato de sus tres colaboradores: Albrecht Mayer, Heinrich Fullmaurer y Veyt Rudolf Speckle responsables de las ilustraciones, grabados en madera e impresión de las mismas.

Seguidamente se ilustra a los lectores sobre los diferentes aspectos que ayudan a encuadrar esta obra en el momento histórico, científico y literario de la época en que se publicó, profundizando en los padres de la botánica alemana, la biografía de Leonardo Fuchs, las especies vegetales contenidas de las que el autor describe el nombre, las sinonimias conocidas, la sistemática empleada para definir los caracteres fitográficos, los hábitat, el tiempo en que deben recolectarse, los temperamentos que se les asigna, propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. Asimismo, se hace mención de las diversas ediciones conocidas de la obra que salieron de imprentas localizadas en diferentes ciudades europeas.

Agradecemos la donación de este magnífico Facsímil que ha realizado el Dr. Leonardo Colapinto para los fondos de la Biblioteca de esta Real Academia.

M.^a CARMEN FRANCÉS

The Merck Index. MERCK & Co., Inc.—13.^a edición.—2001.—ISBN 0911910-13-1.—Whitethouse Station, NJ.—2.579 págs.

Ésta es la más reciente edición de un antiguo y excelente amigo de cuantos químicos, biólogos o afines han tenido que trabajar con productos de aplicación en múltiples actividades de importancia social como elaboración de medicamentos, uso de aditivos de alimentos, manejo de plaguicidas... y de un sinnúmero de materias primas, pues en él se encuentran nada menos que 10.250 monografías que de modo muy sucinto, pero completo, informan de la fórmula química —tanto empírica, como descriptiva y desarrollada—, de las referencias de las patentes originales, con las citas de los principales trabajos iniciales, los datos básicos de su caracterización y las aplicaciones de cada una de las sustancias monografiadas.

La obra es de tal amplitud que ha tenido que cambiar el papel convencional de las primeras ediciones por un papel *Biblia* pues de otra manera las 2.579 páginas que lo componen alcanzarían un volumen que sería difícilmente manejable o se convertiría en varios libros, con la incomodidad y ocupación de espacio correspondiente.

Para los que no conozcan esta monumental obra hay que hacer mención que además de la división de Monografías, antes comentada, consta de otras muchas secciones como las de: Tablas (de muy diversos contenidos, desde Sistema Internacional de Unidades, Equivalentes termométricos, Soluciones isotónicas, Isótopos radiactivos usados en Diagnóstico y Terapéutica... hasta Factores de Conversión Universal); la de Nombre de Reacciones Orgánicas en la que se describen de forma muy breve pero altamente didáctica 446 de las principales reacciones usuales en el laboratorio químico; la que contiene el Registro del Número con el que figuran en el *Chemical Abstracts* todos los productos químicos que figuran en el libro; otras dos son los Índices de los productos elencados por sus Fórmulas y por sus Nombres. Todo eso aparte de un Introducción inicial y de que en el interior de su tapa aparece la Tabla Periódica de los elementos, y en la de la contratapa la lista del Pesos Atómicos de los mismos, ordenados de forma alfabética.

Resta decir que la presente edición, del año 2001, ha recogido la descripción de 150 nuevos productos más que en la anterior de 1996.

Sin olvidar, pues es de justicia, el dato de que la 1.^a edición de esta obra data de 1889.

ALBERTO GIRÁLDEZ

* * *

Anuario 2003.—Fundación Dr. Antonio Esteve.—Paul Morales Vidal.—2004.—Barcelona

Se ha recibido de la Fundación Dr. Antonio Esteve, establecida en memoria del fundador de los Laboratorios Dr. Esteve, el Anuario de Actividades 2003, entre las que destacan los actos de conmemoración del centenario del nacimiento del Dr. Antonio Esteve Subirana.

Entre otras actividades figura la edición y presentación de una serie de monografías, siendo de especial interés el libro «La dama oscura del ADN», biografía de la investigadora Rosalind Franklin, verdadera descubridora de la estructura en doble hélice del DNA, pero que por motivos acientíficos sus hallazgos han sido sistemáticamente ignorados. Viene a ser un merecido homenaje a tan destacada científica que puso las bases de uno de las conquistas biológicas más importantes del pasado siglo.

El Anuario se completa con la descripción de los Seminarios, Premios y otras actividades de la Fundación.

Acompañando a dicha publicación, se ha recibido el catálogo de Presentación y Principales actividades de la Fundación previstas para el año 2004.

ALBERTO GIRÁLDEZ

NORMAS PARA LA PRESENTACIÓN DE ORIGINALES

A. Características

1. *ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA* es una revista trimestral en la que se considerarán para publicación aquellos trabajos relacionados con los diversos campos de las ciencias farmacéuticas y afines, orientadas a la investigación básica o aplicada.

2. Fundamentalmente, la revista constará de las siguientes secciones:

REVISIONES: Se dedicará a estudios de actualización y puesta a punto de distintos temas, siendo realizados por personas expertas en cada tema y a petición de la Comisión de Publicaciones. Podrán aceptarse revisiones y artículos doctrinales no solicitados, después de una consideración particular por parte del Consejo de Redacción.

ARTÍCULOS ORIGINALES: Se publicarán aquellos trabajos de investigación con interés en el campo de las ciencias farmacéuticas y afines, que no hayan sido publicados previamente. Su exposición se ajustará a un estilo conciso y la extensión dependerá del volumen de resultados, que deberán ser rigurosos y originales en su aportación.

COMUNICACIONES BREVES: Incluirán la descripción de observaciones y resultados de investigaciones en curso, cuyo interés justifique el que los autores quieran dar una rápida noticia. Su texto no excederá de cinco hojas A4 (a doble espacio), con 2-3 figuras/tablas como máximo y sin sobrepasar 10-12 referencias abreviadas en su bibliografía..

INFORMACIÓN ACADÉMICA: Dará cuenta de las sesiones científicas, cursos, reseñas de libros y otras visicitudes académicas, así como otras informaciones o novedades editoriales que la revista juzgue puedan ser de interés para los lectores.

B. Instrucciones para la preparación de manuscritos

1. **PRESENTACIÓN.** De cada trabajo se enviarán a la Secretaría de la Real Academia Nacional de Farmacia un original y dos duplicados. Asimismo, se remitirán los originales escritos y grabados en Word.

En la primera página se hará constar: Título del trabajo (en español y en inglés), autores y centro donde se ha realizado el trabajo, incluyendo su dirección, teléfono y correo electrónico si lo tiene. También se incluirá un título abreviado en 3 ó 4 palabras.

En la segunda página se repetirá el título del trabajo y se incluirá un resumen (máximo 200 palabras) en español y en inglés. A continuación de los resúmenes se incluirá hasta un máximo de 5 palabras claves.

Los trabajos de revisión, en español o inglés, deberán aportar un amplio resumen (1-2 hojas A4) en el otro idioma distinto al que se ha redactado el trabajo «in extenso», que, además, irá acompañado de su resumen normal (máximo 200 palabras).

2. **REDACCIÓN DEL TEXTO.** Los originales se presentarán en A4 a un espacio, con el siguiente formato: tipo de letra «Times New Roman»; tamaño: 12. Márgenes: superior, 6 cm.; inferior: 6 cm.; izquierda: 4,2 cm.; derecha: 4,2 cm. Encabezado y pie de página: 5,2 cm. Número de palabras: 10.000. Máximo de páginas: 30. Ilustraciones: 8 máximo.

En los trabajos experimentales se recomienda la presentación de una parte crítica o introducción, una parte experimental y una discusión de los resultados. También, cuando se considere necesario, podrá incluirse un apartado de agradecimientos.

La introducción, en la cual se expondrán los fines y objetivos, deberá ser lo más breve posible. Se hará referencia explícita a todo trabajo anteriormente pu-

blicado por el mismo autor o por otro autor si el conocimiento de esos trabajos es esencial para situar, en el desarrollo científico, el texto presentado. La parte experimental no deberá contener más que los datos necesarios para la reproducción de los experimentos.

En las Comunicaciones breves, la justificación, planteamiento del problema, método y resultados, junto con sus comentarios, irán redactados siguiendo un proceso argumental lógico y sin distinción de apartados. Irán acompañados de un breve resumen en español y en inglés.

3. SÍMBOLOS. En la redacción el autor se atenderá a las normas S.I. (Sistema Internacional) en lo que respecta a unidades, símbolos y abreviaturas.

4. BIBLIOGRAFÍA. Las citas bibliográficas irán al final del original, correlativamente numeradas, por orden de aparición en el texto. Tamaño letra: 10.

Para la denominación de las revistas, se utilizarán las abreviaturas publicadas por Chemical Abstracts, Bibliographic Guide for Editor & Authors. C.A. 1974.

Los siguientes ejemplos pueden servir de modelo:

a) Para artículos publicados en revistas:

Autor en versales; título de la revista en cursivas:

DUNNE, A. (1986) *J. Pharm. Pharmacol.* 38: 97-101.

b) Para libros:

Autor en versales; título del libro en letra normal:

BARTOS, J. Y PESEZ, M. (1984) *Practique de l'analyse organique colorimétrique et fluorimétrique*. 2^a édition. Masson. París.

5. TABLAS Y FIGURAS. Salvo casos muy excepcionales, no se emplearán simultáneamente ambas formas de expresión. El número de figuras se limitará al mínimo, procurando yuxtaponer aquellas gráficas que, sin perjuicio de la claridad, pueden referirse al mismo sistema de coordenadas.

Las figuras podrán enviarse sobre papel, en fotografía, en diapositiva o en

disco en formato TIFF, JPG... Los autores indicarán la reducción de las figuras que estimen conveniente.

La rotulación será del tamaño adecuado para que, una vez reducida la figura, resulte de 1,5 mm de altura.

Los pies de las figuras, suficientemente explicativos, deberán enviarse en una página al final del trabajo.

La situación aproximada de las figuras en el texto deben señalarse mediante un recuadro: debajo de este recuadro se indicará el número de la figura.

6. CARACTERES DE IMPRENTA. Se ruega a los autores que expresen, en sus originales, los estilos de caracteres de letra que deban emplearse de acuerdo con las indicaciones siguientes:

— Subrayar con una línea — las palabras en *cursiva*.

— Subrayar con dos líneas == las palabras en *VERSALITAS*.

— Subrayar con tres líneas === las palabras en *VERSALES*.

— Subrayar con una línea las palabras en **NEGRITAS**.

7. EXAMEN DE MANUSCRITOS. La comisión de publicaciones, que examinará los manuscritos, devolverá a los autores aquellos cuyo contenido no se adapte al habitual de la Revista o no se ajuste a las presentes normas, solicitando, en todo caso, las modificaciones que estime oportunas.

8. PRUEBAS. Deberán devolverse debidamente corregidas, en un plazo máximo de ocho días a partir de la fecha de envío, pasado el cual perderá el trabajo su turno de publicación. En la corrección de pruebas, que deberá realizarse con gran atención, no se admitirán modificaciones del texto original.

9. CUOTAS DE PUBLICACIÓN. La publicación del trabajo implica el pago por los autores o Centros de trabajo, de una cuota que corresponde sólo al coste parcial de los gastos de composición, exceptuándose aquellos artículos que fueran requeridos por los editores.

RULES FOR ORIGINALS PUBLICATION

A. Characteristics

1. *NATIONAL PHARMACY ROYAL ACADEMY ANNALS* is a quarterly magazine. In order to be published, the mentioned magazine will take into account the works done in connection with the pharmaceutical science and related areas, linked to basic and applied research.

2. The magazine will mainly include the following sections:

REVIEWS: performed by specialists and by request of Publication Commission, will be dedicated to updating and final preparation surveys. After due consideration of the Board of Editing could be accepted reviews and not requested doctrinal articles.

ORIGINAL ARTICLES: not previously published surveys in connection with pharmaceutical science and related areas, will be edited. The wording has to be concise and the extent will depend on the results. The mentioned results are to be rigorous and original.

BRIEF COMMUNICATIONS: have to include a description of the remarks and the status of the research in course. The text will not exceed from five pages (paper size A4), (doubled-spaced), with a maximum of two-three graphs/tables, and including 10-12 bibliographic abbreviated references at maximum.

ACADEMIC INFORMATION: will inform about the different courses, scientific sessions and others, which the magazine deem necessary.

B. Operating instructions

1. **PRESENTATION.** One original and two copies have to be delivered to the NATIONAL PHARMACY ROYAL ACADEMY SECRETARY. In addition to this, the original electronic format (WORD) has to be provided.

First page: will include the following: Title of the survey (in English and in Spanish), authors, and the complete ad-

dress (e-mail and telephone included) of the working center where the survey has been developed. Moreover, it has to be included an abbreviated title, three or four words.

Second page: include a repetition of the title and a summary (maximum 200 words), both in English and Spanish. Summaries will be followed by a maximum of five key words.

The review surveys, in Spanish or in English, have to include an extensive summary (1-2 sheets, size A4) in the language different from the original one. In addition to this, the standard summary has to be included (maximum 200 words).

2. **WRITING.** Original documents have to be typewritten single-spaced using A4 paper, with the following format: Letter type: Times New Roman; size: 12 points; margin superior: 6 cm, inferior: 6 cm; left: 4,2 cm, right: 4,2 cm; headed: 5,2 cm and foot of page: 5,2 cm. Number of words: 10.000. Maximum of pages: 30. Illustrations: 8 as maximum.

It is recommended to include a critical section, an experimental section and a discussion of the results. Additionally, when deemed necessary, may be included a thanks giving appendix.

The introduction must include the aims and the objectives and be as brief as possible.

A reference to prior surveys, from the author or from third parties, has to be made in connection with the current survey, if it is deemed necessary to a better comprehension of the work.

The experimental part has only to include the needed data to re-perform the experiments.

Regarding short communications, the justification, the approach, the methodology, the results, and related comments, have to be written following a logical process (it is required not to include separations on the mentioned process). A brief summary in English and Spanish language is required.

3. SYMBOLS. When writing the author is subjected to International System of Symbols regarding units, symbols and abbreviations.

4. BIBLIOGRAPHY. The bibliographic references have to be illustrated at the end of the original documents, consecutively numbered. Letter size: 10.

The names of the magazine will be taken from the published abbreviations of Chemical Abstracts, Bibliographic Guide for Editor & Authors. C.A. 1974.

Set out below are some model-examples:

a) *Articles published at magazines. Author name in Small capital letter and title of the magazine in Italics: Dunne, A. (1986) J. Pharm. Pharmacol. 38:97-101.*

b) *Books. Author name in Small capital letter and title of the book in standard format: BARTOS, J. y PESEZ, M. (1984) Practique de l'analyse organique colorimétrique et fluorimétrique. 2^a édition. Masson - Paris.*

5. TABLES AND GRAPHS. A joint use is not allowed except for exceptional reasons. A minimum use of graphs is required. The graphs, when possible, must be based on the same axis structure.

The graphs can be delivered by paper, photography, slide or in a disc (format TIFF, JPG, ...). The authors must indicate the appropriate size of the graphs.

The required size of the graph is 1.5 millimetre high.

The footnotes are required to be shown on a separate page at the end of the survey.

The location of the graphs must be indicated through a frame.

A footnote showing the number of the graph is required.

6. TYPE. The authors must provide in their original works the different type of letters used in accordance with:

— Single underline - *Italics*.

— Double underline - SMALL CAPITAL LETTERS.

— Triple underline - CAPITAL LETTERS.

— Single underline - **black**.

7. Review of surveys. The Magazine Committee will review the surveys. The works which do not comply with the mentioned rules will be sent back with a list of modifications required.

8. TESTS. As a result of the abovementioned review, the amended document must be delivered within eight days beginning at the date of the return. Apart from the required modifications, amendments will not be accepted.

9. PUBLICATION RATE. As a result of the publication, and taking into account the different costs involved in the mentioned publication, a publication rate is required. The publication rate is not applicable to surveys requested by the editors.

