

INSTITUTO DE ESPAÑA

ANALES
de la
REAL ACADEMIA
NACIONAL
DE
FARMACIA



2004

VOLUMEN LXX

Núm. 3

Publicación trimestral

Domicilio de la Academia

FARMACIA, 11

28004 MADRID

————— *Artículo original* —————

Pharmacokinetics and individualized Drug Therapy*

LENNART K. PAALZOW

Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia en Suecia

ABSTRACT

This paper describes different aspects concerning the application of pharmacokinetics for individualized drug therapy. Pharmacokinetic sciences have developed rapidly during the last three decades, but its use in clinical practice is still lagging behind. The clinical use is often called therapeutic drug monitoring (TDM). By measuring one single drug plasma concentration and by applying prior knowledge of the population pharmacokinetic characteristics of a specific drug we can perform a Bayesian estimates of the pharmacokinetic parameters in the individual patient. Hereby, we can calculate the optimal dose and dosing interval for individual patient. Examples of Bayesian dose predictions and its therapeutic outcomes are given.

Key words: Pharmacokinetics.— Therapeutic drug monitoring (TDM).

RESUMEN

Farmacocinética y Terapéutica individualizada de Drogas

El presente artículo constituye una disertación sobre los diferentes aspectos relativos a los estudios farmacocinéticos. La farmacocinética abarca el estudio de la evolución de los niveles de fármacos presentes en los distintos fluidos biológicos, lo que explica los efectos terapéuticos y tóxicos de los mismos. Existen dife-

* Discurso pronunciado en su toma de posesión como Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia, en fecha 7 de febrero de 2002.

rentes modelos matemáticos que describen el comportamiento y las concentraciones de estos medicamentos. Así cuando los medicamentos son administrados, su concentración en los fluidos biológicos cambia con el tiempo, dando una curva de perfil característico. La práctica clínica de la farmacocinética recibe la denominación de monitorización terapéutica de fármacos (TDM). La monitorización de fármacos se realiza determinando las concentraciones de un fármaco en plasma así como su intervalo de dosificación, mediante cuantificación de los niveles del mismo en plasma de pacientes individualizados. También se consideran los fármacos para los que es más adecuada su monitorización clínica y se describen los métodos estadísticos disponibles y adecuados para la descripción del comportamiento de un fármaco según los niveles de concentración medidos.

Palabras clave: Farmacocinética.— Monitorización terapéutica de fármacos (TDM).

INTRODUCTION

Pharmacokinetics is usually described as a science that describes what happens to a drug in the body. It is a study of the time course of drug and metabolite levels in different fluids, tissues and excreta of the body and the mathematical relationships required to interpret such data (1). The international development of pharmacokinetics as a separate science has been very rapid during the last three decades, but of course even before this period there were published a number of seminal research that laid the foundation to this discipline.

Personally, I am very pleased to know that professor Torsten Teorell, who was professor of physiology at our University, is considered as the father of pharmacokinetics. Already in the summer 1937, he wrote two famous articles (2, 3), which from the beginning nobody really understood and most experts in Sweden considered almost as rubbish and these papers were consequently forgotten. It took almost 30 years before researcher, especially in U.S.A., realized the importance of these two articles and from around 1965 and onwards pharmacokinetics started to develop rapidly. These papers of Teorell are today considered as two of the most important articles in this area and they are considered as the origins of pharmacokinetics. We also have to remember that the development in pharmacokinetics was due to the rapid development of new analytical techniques like gas chromatography, liquid chromatography, high-pressure liquid chromato-

graphy and mass-spectrometry. These techniques have given us sensitive and specific methods that are able to measure drug and metabolite concentrations in extremely low concentrations.

When plasma concentrations obtained after given dose of a drug are measured, plasma is used as a reference tissue to describe what happens to a drug in the body and since its concentrations change over time it gives every drug its own characteristic time profile (Figure 1). You can say that the characteristic shape of each plasma concentration-time curve is an identity of the drug. It is also well established that a drug produces its therapeutic effect within a certain range of plasma concentration, its therapeutic window or target therapeutic drug concentration (Figure 1). To describe the plasma concentration-time curve mathematically we use certain pharmacokinetic parameters and the most important ones are clearance, volume of distribution, absorption rate constant and bioavailability (4). Once these parameters are known we can calculate the plasma concentration time profile after single or repeated doses.

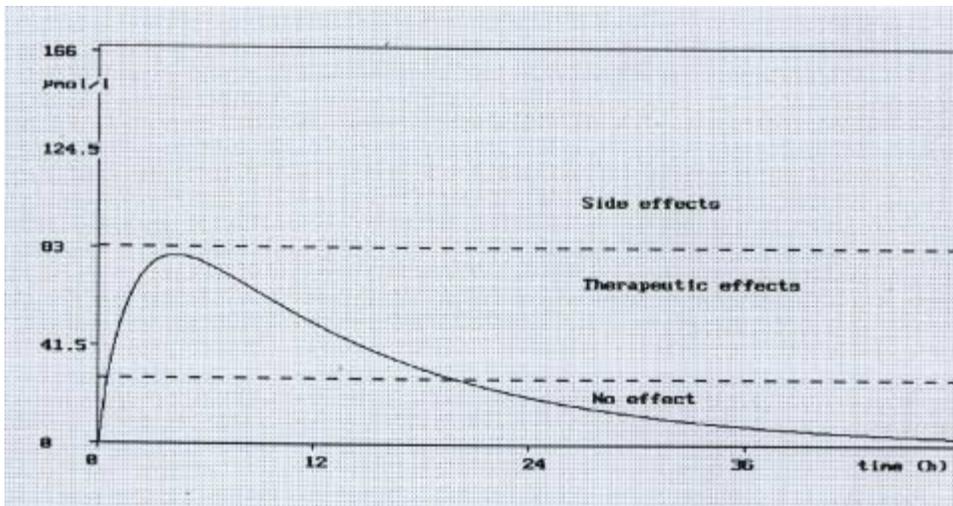


FIGURE 1. Plasma concentration-time profile of a drug with its therapeutic window.

DRUG DOSING TODAY

When the physician has decided to prescribe a specific drug she or he has to recommend a certain dose and dosing interval. Usually the doctor chooses the average dose found in the physician desk reference. Then she or he changes the dose by trial and error. In certain cases, although not very common, the prescribed dose is based on the gender, bodyweight and age. For certain drug excreted by the renal route, the kidney function is taken into consideration when chosen the dose.

The most common way of adjusting or prescribing the dose is based on how the patient reacts on the given drug and accordingly changed next time the patient meets the physician. In some few instances the dose is selected based on laboratory finding and finally for some drugs it is based on the measurements of drug concentration in the blood or plasma.

There are estimations reported that for certain drugs only about half of the patients get the correct dose and the 50% of the patients doses (5). However, by measuring the blood concentration and the use of the knowledge we have in pharmacokinetics we have today the possibility to decide about the dose and individual patient should take in order to get an optimal therapeutic effect. So the question is: Should we give the same dose to all individuals or after the specific need of the individual patient?

During recent years it has been an ongoing discussion that in the future the dose of a drug should be selected based on the genetic constitution of the patient. Examples of inherited variability in pharmacokinetics have so far been almost exclusively restricted to drug metabolism. By performing phenotyping or genotyping we have been able to characterize rare phenotypes. Despite its appeal, metabolite phenotyping is not widely employed in clinical practice while genotyping holds the promise of providing a more direct approach toward predicting metabolic phenotypes. However, we have to remember that pharmacokinetics parameters like volume of distribution, renal excretion and absorption most probably are not under genetic control and additionally, the behavior of a drug in the body are influenced by a number of physiological factors like drug binding, blood

flow, distribution characteristics etc. and not to forget environmental and patho physiological factors.

THERAPEUTIC DRUG MONITORING (TDM)

As mentioned above the pharmacokinetic science has developed tremendously but its use in clinical practice has been limited, although it is used widely during drug development by the drug industry. The usage of pharmacokinetics in clinical practice can be called TDM, therapeutic drug monitoring, which means: To monitor drug dose and dosing interval by measuring the plasma concentration of the drug in the individual patient. But in order to use plasma concentration for selecting the dose and dosing interval there has to be a relationship between concentration and therapeutic effects like for instance the sigmoidal relationships shown in Figure 2 (6). It may also be inferred that if a substance should become a drug, it has to be a relationship between dose and effect and if such relationship exists there is also certainly a relationship between drug concentration and effect, even if it in some circumstances can become somewhat more complex than the relationship shown in Figure 2.

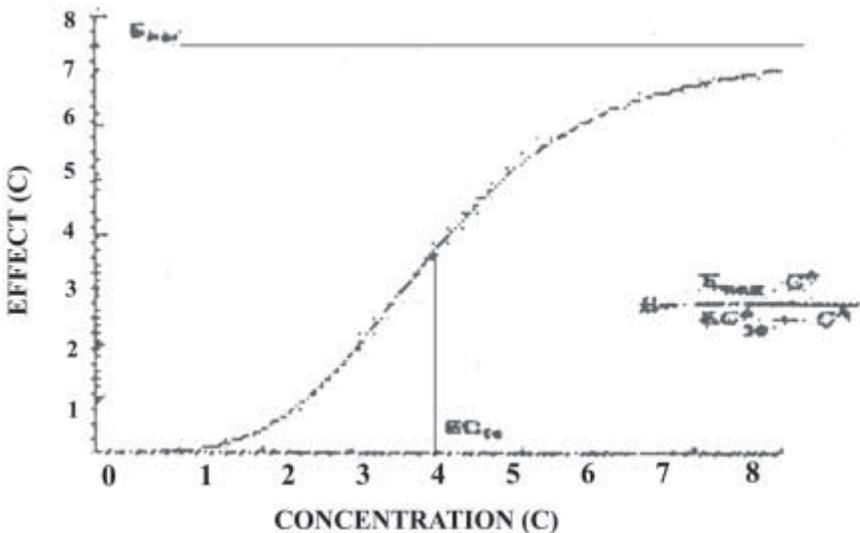


FIGURE 2. The sigmoidal relationship between drug concentration and therapeutic effects according to a sigmoidal Emax equation.

CLINICAL INDICATIONS FOR THERAPEUTIC DRUG MONITORING

When should we monitor drug doses by TDM? In the following I will give you some examples when TDM are indicated:

- Sometimes it is difficult to judge if lack of therapeutic effect is due to wrong choice of drug or that other factors could be the reason to e.g. absence of effects.
- For many drugs it takes time before we can see any effects. For drugs against e.g. psychosis or cancer it may take weeks before we can say anything about the outcome of the prescribed drug.
- By measuring the plasma concentration we can figure out if the patient has taken the drug or not.
- For many drugs there is a large variability between patients in the uptake, distribution and elimination of the drug in the body, and by measuring plasma concentration we could individualize the dose.
- TDM should be used for drugs where it is a narrow concentration range between too low concentration giving no effect and concentration that are too high and consequently gives side effects.
- Liver and kidney functions are important for the elimination of drugs and we have to take their functions in consideration if they did not function normally.
- Sometimes it is difficult to judge if the patient does not respond to therapy, if this depends on the drug or the illness.
- Quite often we give several drugs simultaneously and in certain cases could they interact with each other.
- Genetic factors as mentioned above.

DRUGS SUITABLE FOR TDM

From what I have said you may get the impression that all drugs should be monitored by plasma concentration measurements. That

is not true. Many drugs have such a wide margin between good effects and side effects so if you do not observe an effect; it is just to increase the dose until you observe an effect. If you then do not get a therapeutic effect you may have to change drug.

Suitable drugs for TDM are of course drugs that are going to be used by the patients for a long time and where it is important that you find the correct dose and dosing interval in order to get the best therapeutic effect with a minimum of side effects. I will give you some examples of classes of drugs we have been working with in Uppsala.

Immunosuppressant drugs have to be taken in order to avoid organ rejections after transplantation, psychoactive drugs used to treat e.g. psychosis, antiepileptics, cardioactive glycosides and blood factors for hemophilia are examples of drugs used for long times, in certain cases for the whole life. Other examples are antibiotics and tuberculostatic drugs, where it is critical for the treatment that the correct concentration in the body is achieved otherwise the bacteria may become resistant. Anticancer drugs are a group of drugs that are used under the philosophy that it should be given in as large doses as possible, with the limitation that the patient can manage the serious side effects. There are still much to do with these drugs in order to improve the cancer therapy and I think that TDM is one way to optimize cancer treatment.

THERAPEUTIC DRUG MONITORING TODAY

There are performed a lot of drug chemical analyses at the hospitals all over the world. In Sweden there is analysed about 600.000 blood samples per year in a population of about 8 million. The question is of course how these measurements is interpreted. In Sweden, I may say, most medical doctors look upon the values just to find out if they fall within by the manufacturer recommended concentration range, without any, I may say, deeper consideration. If the value falls within the range, the prescribed dose is correct (Figure 3).

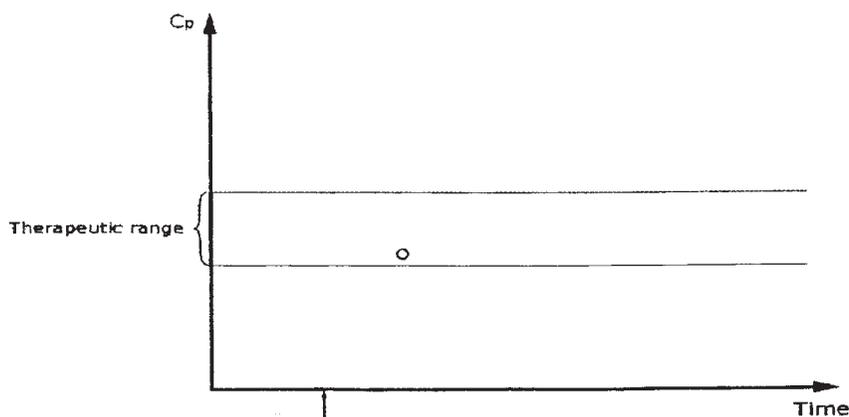


FIGURE 3. Plasma concentration measurement indicating a value within the therapeutic concentration range.

I will give you one example of how one concentration value could give limited or as in this case wrong information. As shown in Fig. 4 the obtained plasma concentration value could indicate that the selected dose and dosing interval are correctly chosen. However, without taking into account the dosing interval and the number of doses taken by the patient measured plasma concentration value can indicate that the prescribed dose is going to produce serious side effect and a much lower dose should be prescribed.

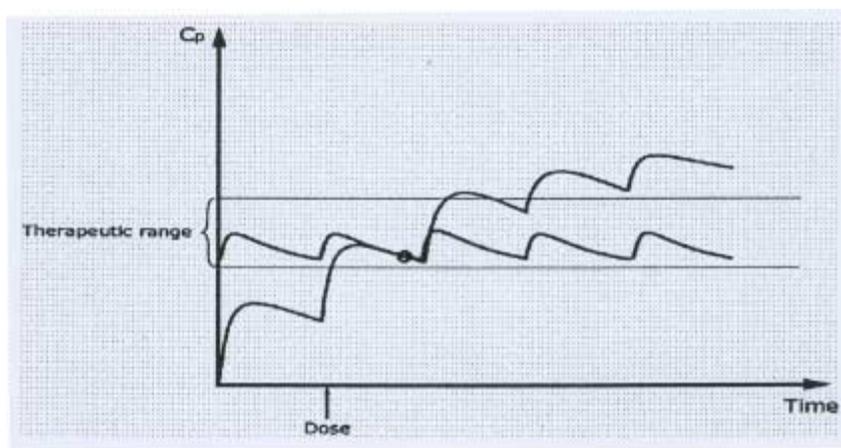


FIGURE 4. The plasma concentration measurement in Fig. 3 may indicate that the selected dose and dosing interval are correct or indicating that the dose is too high leading to side effects if continued.

EXAMPLES OF BAYESIAN DOSE PREDICTIONS

Today, there are computerized statistical techniques available to help us to perform the correct interpretations of measured plasma concentration values, although they are not used very much. The most reliable one is based on the statistical theory called Bayesian techniques after the English statistician Bayes. As shown in equation 1 the Bayesian analysis (Maximum likelihood estimates) takes into consideration, apart from the measured plasma concentration, what is known about the pharmacokinetic parameters in the population under investigation and its statistical variability.

$$\text{Bayes} = \text{Sum} [(C_{\text{obs}} - C_{\text{pred}})^2 / \text{S.D. ana}^2 + (P_{\text{pop}} - P_{\text{pred}})^2 / \text{S.D. pop}^2 + \ln (\text{S.D. pred})^2]$$

| | |
|-----------|---|
| Cobs= | Measured plasma concentration for a specific individual |
| Cpred= | Predicted plasma concentration for a specific individual |
| Ppop= | Pharmacokinetics population parameter value |
| Ppred= | Predicted pharmacokinetics parameter value for the individual |
| S.D. pop= | Standard deviation of the population value |
| S.D ana= | Standard deviation of the chemical analysis |

By this technique, first introduced by Sheiner et al. (7), you can calculate the pharmacokinetic parameters in the individual patient with only one plasma concentration value available. Once you have calculated the pharmacokinetic parameter of the individual patient you can easily calculate the dose and dosing interval the patient should use in order to get desired plasma concentrations. I will give you some examples and the first one is shown in Fig. 5.

If this patient behaved as the normal average patient the recommended dosing should give a plasma concentration-time profile as the upper curve. A Bayesian estimate gave however the lower curve with trough values lower than the 250 ng/mL needed for the drug to have an effect in this individual. Obviously this patient needs a higher dose in order to get an effect of the drug.

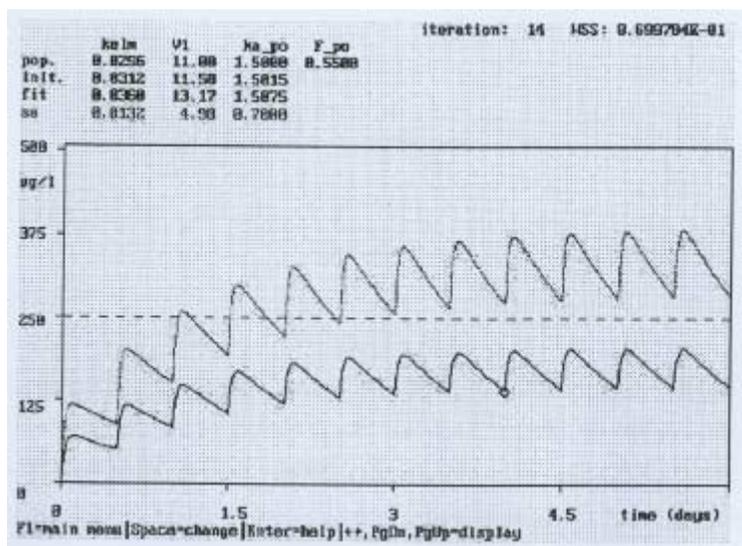


FIGURE 5. A Bayesian prediction of drug dosing in a patient based on one plasma concentration value and knowledge of population pharmacokinetics values (lower curve) compared to plasma concentration-time profile for the actual population.

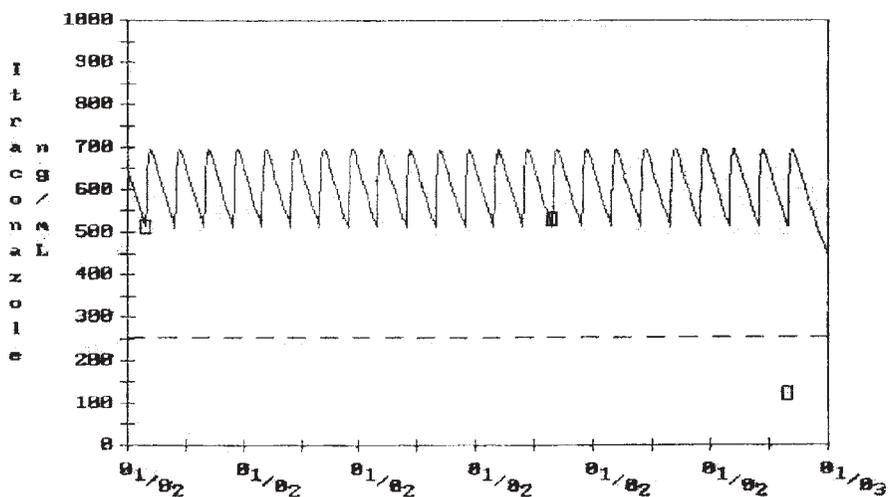


FIGURE 6. Suspected non-compliance to prescribed drug dosing. The first two plasma concentration measurements show trough values above the minimum 500 ng/mL, while the third one was only 120 ng/mL.

Figure 6 shows a seven year old boy treated against a fungus infection by the drug itraconazol and as you can see everything

looks fine when two blood samples were taken and the concentrations were measured; the trough level should exceed 500 ng/mL for this infection.

Suddenly, however, the last blood sample was very low and you start to wonder what has happened. The first question is of course to ask the patient if he really has been taken the drug. During the interviews with the parents it was evident that the mother usually had been supervising the medication, but during the last weeks the boy had been trusted to manage his own medication. He assured that he had been taken the drug, but the measured low concentration got him to confess that he has not been taken the drug for two weeks and an Bayesian estimate fitted very well to this kind of non compliance as shown in Fig. 7.

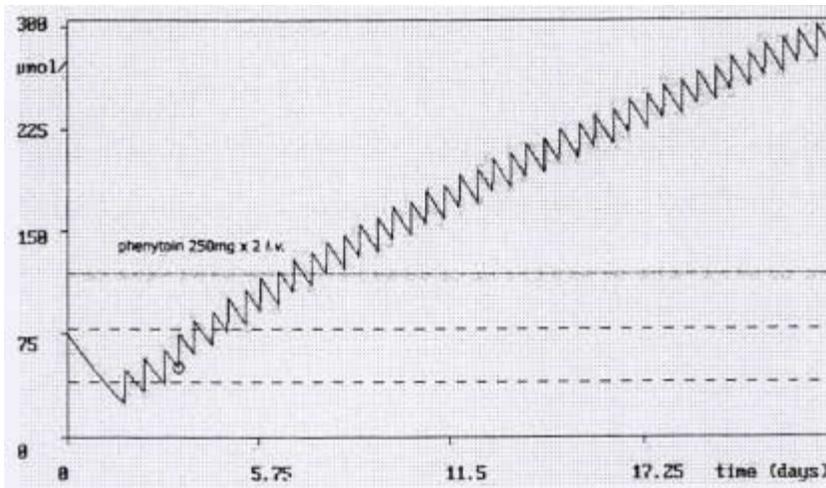


FIGURE 7. A Bayesian estimate of drug dosing taking into consideration that the last 8 doses in Fig. 6 have not been taken by the patient.

Phenytoin, as you know, is widely used as an antiepileptic drug, but it is difficult to find the correct dose, because it is very easy to saturate the enzymes for its elimination. Just a small increase in dose can lead to serious side effects and a too small dose does not protect against seizures. In Fig. 8 is shown a patient where the measured plasma concentration looks fine, but in reality, if the patient continues with the prescribed dose 250 mg two times daily it will lead to serious side effects.

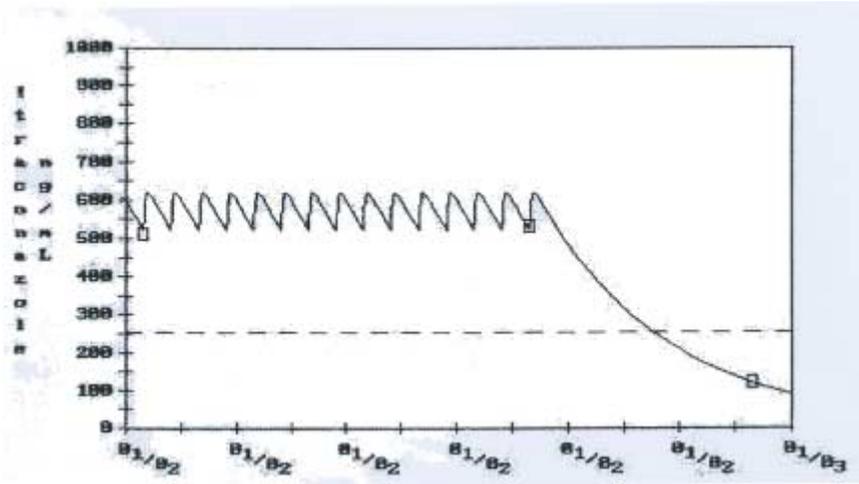


FIGURE 8. Patient treated with standard dose of phenytoin against epilepsy (250 mgx2). Because of saturation of the metabolism, this drug dosing will lead to toxic levels if continued.

A Bayesian estimate showed that this patient instead should have a dose of 150 mg. two times daily in order to keep the concentration within the therapeutic concentrations (Fig. 9).

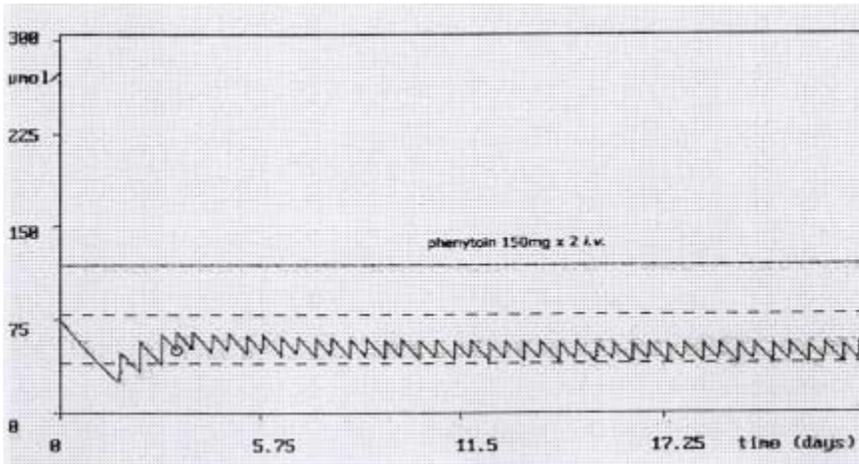


FIGURE 9. The patient in Fig. 8 given the individually calculated dosing of 150 mgx2 yields a plasma concentration-time profile within the therapeutic window.

In a study we recently have performed in Uppsala it was shown that in 39 new patients treated with phenytoin only about 5% got a prescribed dose that gave therapeutic plasma concentrations, while about 47% either got too high or too low plasma concentrations. With a Bayesian individualization program for phenytoin dosing it was furthermore shown that it was possible to predict the correct dose in 95% of patients treated with phenytoin. These examples demonstrate the difficulties of individualization drug dosing without performing correct interpretations of measured plasma concentration values.

As mentioned before, for immunosuppressant drugs it is very important to keep the drug concentrations within certain limits. If you get too high concentrations you can have toxic effect of the drug and the transplanted organ will be affected and if you get too low concentration the body may reject the organ. In order to avoid this, a number of blood samples are usually taken repeatedly in each patient, almost every day, during the first weeks after the surgery. In figure 10 is shown a patient that had much lower plasma concentrations than expected in his population and if he had behaved as expected, this patient should have had a plasma concentration-time curve like the upper one, but instead he had low plasma concentration values as shown in the figure.

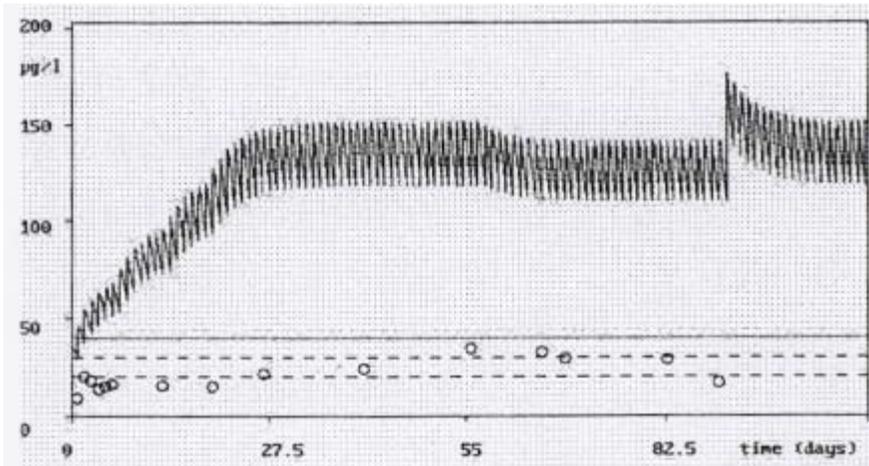


FIGURE 10. *Kidney-transplanted patient treated with the immunosuppressant drug sirolimus. Several drug analyses and dose adjustments performed. The upper curve shows the blood concentration-time profile if this patient had behaved kinetically as expected in his population.*

However, as shown in Fig. 11, a Bayesian estimates using only two or three samples in the beginning could predict the dosing for the following three months without blood sampling. All the subsequent blood samples could have been avoid if Bayesian technique had been utilized and by that saved hospital money and distress for the patient. It has to be inferred, however, that it may also be other factors than drug blood concentration values that have to be taken into consideration at the same time when performing blood sampling.

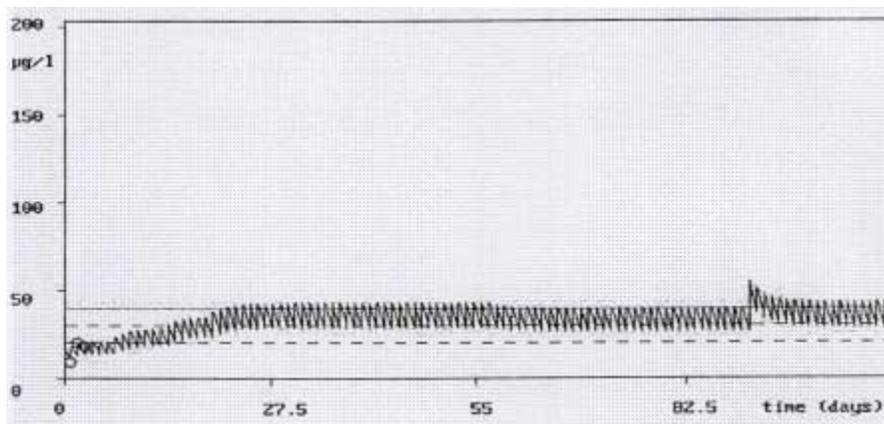


FIGURE 11. *The patient in Fig. 10 with individualized drug dose predictions based only on a Bayesian estimate using the first three blood concentration measurements.*

Neuroleptic drugs used to treat psychosis are used during long time periods. It is an interesting class of drugs since there is a distinct concentration range within which you have a therapeutic effect. The concentration effect-relationship is however complex for several of these drugs (8). With increasing concentration the effect against psychosis increases reaching a maximum and than the effect start to decline with further increase in concentration, a type of curve that we can call Bell-shaped. In order to get maximum therapeutic effects you have to keep the concentration within a certain limited range and therapeutic drug monitoring using Bayesian dose adaptation can facilitate this.

An example of these drugs, perphenazin is administered as an intramuscular depot injection with the aim of delivering the drug for a whole month. The problem with these depot preparations is that

it will take almost half a year before you know if the prescribed dose will end with a plasma concentration within the desired concentration range. In Fig. 12 is shown a woman who got 2 ml injected every second week and the first sample taken during the first dose was within the therapeutic range, but a Bayesian estimate showed that if the patient continues with this dosing scheme it will lead too high plasma concentrations that will be evident three months later.

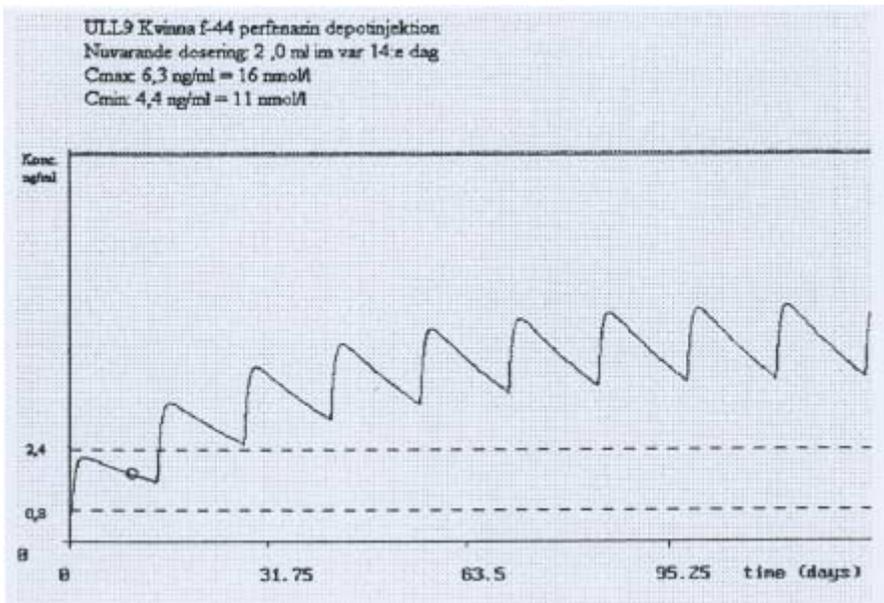


FIGURE 12. A patient treated with perphenazin depot injections (2mL every second week) and a plasma concentration value taken during the first dose being within the therapeutic drug concentrations. However, this drug dosing will lead to drug levels above the therapeutically recommended.

As illustrated in Fig. 13, this patient should only be given 0,5 mL every second week in order to keep the plasma concentrations within the therapeutic range.

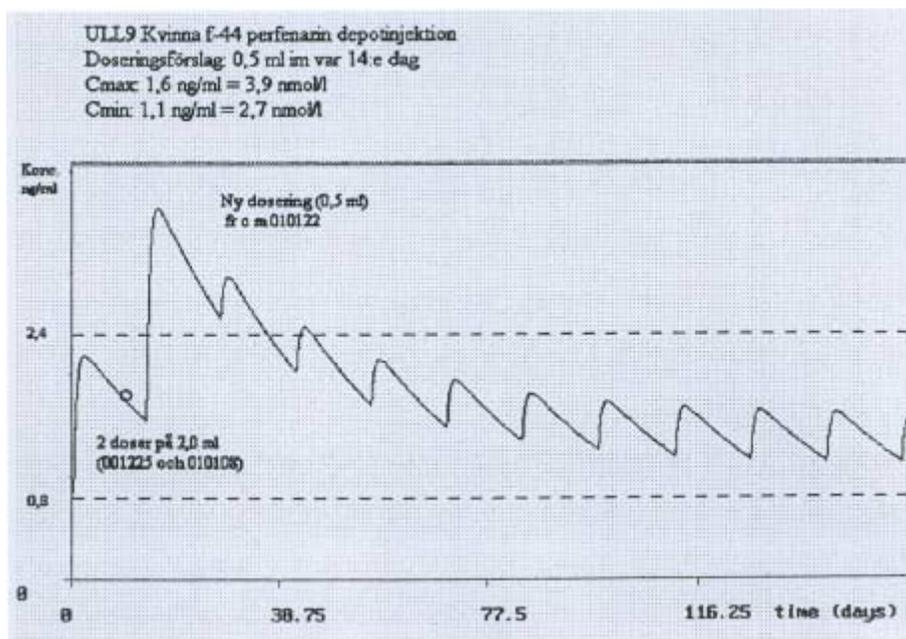


FIGURE 13. A Bayesian estimate of the patient in Fig. 12 predicts that the patient should be given a dose of 0.5 mL perphenazin every second week.

CONCLUSION

In my presentation I have given you some examples on how pharmacokinetics could be applied in clinical practice in order to optimize drug therapy. Bayesian estimates based on previous knowledge of the pharmacokinetics in a specific patient population and a single plasma concentration value is a technique that gives the possibility to estimate the desired drug dosing in an individual patient. There is still much research to do before we have reached the goals of individualizing drug dosing and I personally think that pharmacists and especially clinical pharmacists can do a lot in order to reach this goal.

REFERENCES

- (1) GIBALDI, M.; PERRIER, D. (1975) In Pharmacokinetics, Marcel Dekker Inc, New York.
- (2) TEORELL, T. (1937) Kinetics of distribution of substances administered to the body I. The extravascular modes of administration. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 57: 205.
- (3) TEORELL, T. (1937) Kinetics of distribution of substances administered to the body I. The extravascular modes of administration. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 57: 226.
- (4) ROWLAND, M.; TOZER, T.N. (1995) In Clinical Pharmacokinetics, Concepts and applications 3rd ed. Williams & Wilkens, Baltimore.
- (5) EVANS, W.E., SCHENTAG, J.J.; JUSKO, W.J. (1992) In Applied Pharmacokinetics. Principles of Therapeutic Drug Monitoring 3rd ed. Applied Therapeutics, Inc., Vancouver.
- (6) PAALZOW, L. (1990) Pharmacodynamics, pp. 333-358. In: Taylor, J.B. ed. Comprehensive Medical Chemistry, Vol. 5, Biopharmaceutics. Pergamon Press, Oxford.
- (7) SHEINER, L.B.; ROSENBERG, B.; MELMON, K.L. (1972) Modelling of individual pharmacokinetics for computer aided drug dosage. *Comp. Biochem. Res.* 5: 441-459.
- (8) PAALZOW, L.K.; PAALZOW, G.H.M.; Tfelt-HANSEN, P. (1985) Variability in Bioavailability: Concentration versus Effect. In Rowland, M.; Sheiner, L.B.; Steimer, J-L. (eds): Variability in Drug Therapy, Description, Estimation, and Control. Raven Press, New York.

Complejos de inclusión de harmano con hidroxipropil- β -ciclodextrina. Aspectos metodológicos relativos a su caracterización analítica*

ANDRÉS LEÓN LEAL, LAURA MARTÍN CARBAJO,
ANA ISABEL OLIVES BARBA, MARÍA ANTONIA MARTÍN
CARMONA y BENITO DEL CASTILLO GARCÍA

*Laboratorio de Técnicas Instrumentales, S. D. de Química Analítica.
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
28040 Madrid*

RESUMEN

Se han obtenido y caracterizado los complejos de inclusión de hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) con un alcaloide derivado de β -carbolina: el harmano. El harmano presenta una notable fluorescencia nativa y dicha fluorescencia es dependiente del pH del medio. La formación de complejos de inclusión con hidroxipropil- β -ciclodextrina permite observar la emisión de fluorescencia correspondiente a la forma neutra de harmano. Este comportamiento es inusual especialmente en disolución acuosa. La caracterización de los complejos de inclusión de estos compuestos mediante espectrofotometría UV-VIS o espectrofluorimetría presenta dificultades debido a la presencia de las distintas especies absorbentes o emisoras. La separación del harmano incluido, con respecto al harmano no incluido, puede realizarse mediante filtración o diálisis de equilibrio. Ambos procesos conducen a resultados cuantitativos mejores que cuando se evitan estos procedimientos. En el intervalo de concentraciones de hidroxipropil- β -ciclodextrina estudiado (de 1×10^{-3} M a 2×10^{-2} M) se puede apreciar que el proceso de inclusión se ve favorecido al aumentar la concentración de ciclodextrina.

Palabras clave: Complejos de inclusión.— Fluorimetría.— Diálisis de equilibrio.

* Premio Carlos del Castillo Leiva 2002, de la Real Academia Nacional de Farmacia.

ABSTRACT**Harmane/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes.
Methodology for its analytical characterization**

The inclusion complexes between hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) and harmane have been obtained. Harmane is a β -carboline derivative which exhibits notable native fluorescence pH dependant. When the inclusion complexes between hydroxypropyl- β -cyclodextrin and harmane are produced it is possible to observe the fluorescence emission corresponding to the neutral form of harmane. This is a particular behaviour of harmane in aqueous solution. The characterization of the inclusion complexes of this guest molecule by UV-VIS spectrophotometry or spectrofluorimetry is difficult due to the coexistence of different species in ground and excited states. The separation of the inclusion complexes from the free harmane present in the solution can be carried out by filtration or equilibrium dialysis process. Both experimental procedures lead to quantitative results better than when these procedures are avoided. For the concentration range studied for hydroxypropyl- β -cyclodextrin (from 1×10^{-3} M to 2×10^{-2} M) the inclusion process is favoured with increasing concentration of cyclodextrin.

Key-words: Inclusion complexes.— Fluorimetry.— Equilibrium dialysis.

INTRODUCCIÓN

El origen de la presencia de los alcaloides derivados de β -carbolina originados de forma endógena en los mamíferos (1), entre ellos el hombre, por el momento no está claro. Sin embargo, se sabe que su concentración en orina humana (2) así como en los tejidos de rata se incrementa como consecuencia del consumo de alcohol (3). Los alcaloides del harmano, los cuales pueden considerarse derivados de la estructura de β -carbolina, están muy difundidos en la naturaleza, y presentan una amplia variedad de actividades farmacológicas, desde alucinógenos o hipotensivos hasta actividad antimicrobiana, así como inhibidores de la agregación plaquetaria (4), debido a su papel en el metabolismo del ácido araquidónico. Entre otras cabe citarse su actividad mutagénica (5, 6) comportándose como agentes cancerígenos semejantes a la anilina o la *o*-toluidina.

La capacidad de formar complejos de inclusión, ya sea en estado sólido o en disolución, es una de las principales características de las ciclodextrinas (7). La inclusión tiene lugar gracias a que las moléculas

las huésped quedan atrapadas en el interior de la cavidad, siendo estable el aducto formado, gracias a la estructura anular característica de las ciclodextrinas. La formación de complejos con ciclodextrinas (CDs) tiene como finalidad lograr la mejora de la solubilidad y de las características organolépticas de numerosos principios activos, así como la de facilitar la absorción y liberación de los mismos. Se ha demostrado que los complejos con ciclodextrinas en disolución son química y fotoquímicamente más estables que los correspondientes compuestos no incluidos. En este sentido, el complejo vitamina K₃/β-CD es mucho más estable frente a la luz en disolución ácida o neutra que la propia vitamina K₃ (8). Igualmente, tanto el retinol como el retinal y el ácido retinóico son fotolábiles mientras que los complejos de inclusión con diversas CDs los hacen resistentes a la luz (9) y la oxidación. Este incremento en la estabilidad se ha observado asimismo para la aspirina (10), el nitracepan (11), algunos antiinflamatorios (12), el metronidazol (13), ciertos antibióticos (14) y otros fármacos.

Debido a la existencia de diferentes equilibrios ácido-base tanto en estado fundamental como en estado excitado para los alcaloides derivados de β-carbolina, resulta difícil caracterizar los complejos de inclusión con ciclodextrinas. Por ello, en el presente trabajo se describen las ventajas derivadas del empleo de una metodología sencilla para la caracterización analítica de los complejos de inclusión de harmano con hidroxipropil-β-ciclodextrina. Así pues, la diálisis de equilibrio permite diferenciar en un mismo ensayo el harmano libre del complejo de inclusión basándonos en las peculiaridades espectrofluorimétricas de las formas catiónicas y neutras de estas especies, que sólo son detectables mediante espectrofluorimetría.

EXPERIMENTAL

Aparatos y reactivos

Los espectros de excitación y emisión fluorescente se obtuvieron con un espectrofluorímetro Perkin-Elmer modelo MPF-2A (lámpara de xenon de 150 W). En todas las determinaciones se utilizaron cubetas de 1 cm de paso óptico. La formación de los complejos de

inclusión y el posterior proceso de diálisis requirió un multiagitador magnético de la firma comercial SBS.

Todos los reactivos y disolventes empleados fueron de la máxima garantía y calidad para análisis. El agua empleada en los diferentes experimentos fue bidestilada. El harmano fue adquirido a la casa comercial Sigma y la hidroxipropil- β -ciclodextrina fue donada generosamente por los laboratorios Rhône-Poulenc (Francia). Los tensioactivos empleados: SDS (n-dodecilsulfato de sodio), CTAB (bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio), Brij-35 (polioxietileno-23-lauril éter) fueron adquiridos a la casa comercial Merck. En la preparación de los complejos de inclusión se utilizaron las disoluciones acuosas de HP- β -CD en concentración $1,0 \times 10^{-2}$ M. Las soluciones de los tensioactivos utilizados se prepararon en concentraciones cuatro veces superiores a las concentraciones micelares críticas (CMC) de cada uno de los tensioactivos. La concentración de harmano, tanto en las disoluciones micelares como en las disoluciones de ciclodextrina, fue $1,0 \times 10^{-6}$ M.

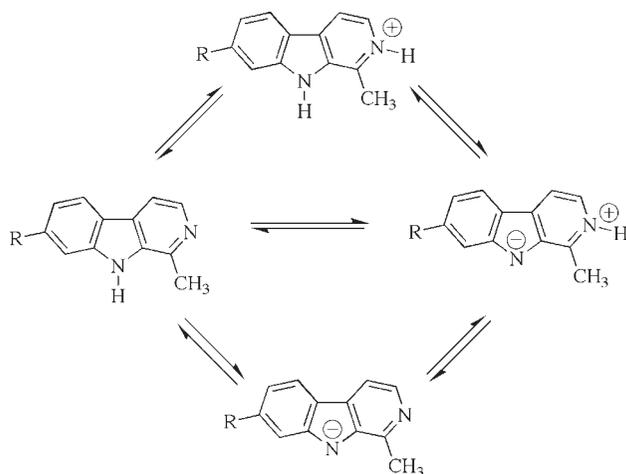
Metodología

Los complejos de inclusión fueron obtenidos mediante la formación de una película (15) del sustrato a incluir. Para ello, se preparó una disolución madre etanólica de harmano y se tomaron alícuotas de la misma de 10 ó 20 μ L y se depositaron en un matraz de fondo redondo. A continuación se evaporó el disolvente por aplicación de vacío a temperatura ambiente quedando formada una fina película sobre las paredes del matraz. A continuación se añadieron 10 mL de la disolución acuosa de ciclodextrina de concentración $1,0 \times 10^{-2}$ M; este sistema se mantuvo en agitación magnética continua durante 24 horas. Se registraron los espectros de excitación y emisión de fluorescencia de las disoluciones de los complejos de inclusión, así obtenidos tras 24 horas en agitación magnética. Asimismo, las disoluciones de estos complejos fueron sometidas a un proceso de diálisis de equilibrio para separar el harmano libre del harmano incluido en la cavidad de la ciclodextrina. Transcurridas 24 horas en diálisis se obtuvieron los espectros de excitación y emisión de fluorescencia tanto de los líquidos del interior de la membrana de diálisis como de los líquidos exteriores que contienen en disolución los solutos dializados.

Las disoluciones de los tensioactivos fueron preparadas y estabilizadas durante 24 horas a temperatura ambiente. A continuación se adicionaron sobre la película de harmano obtenida de forma análoga a lo anteriormente descrito para los complejos de inclusión con ciclodextrinas y posteriormente se mantuvieron dos horas en agitación magnética. Seguidamente se registraron los espectros de excitación y emisión fluorescente de las disoluciones así obtenidas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La existencia de complejos de inclusión puede ponerse de manifiesto de muy diversas maneras, desde un incremento en la solubilidad acuosa de los compuestos incluidos hasta notables cambios en propiedades espectroscópicas y cromatográficas. En el caso de los complejos de inclusión de harmano e hidroxipropil- β -ciclodextrina se pueden apreciar cambios notables en los espectros de emisión fluorescente como consecuencia del proceso de inclusión. Así, en disolución acuosa sólo es posible observar la emisión fluorescente del harmano correspondiente a la forma catiónica (Esquema 1), debido a que la protonación del nitrógeno piridínico del anillo de β -carbolina es mucho más rápida que la desactivación del estado excitado por fluorescencia.



ESQUEMA 1. *Diferentes especies implicadas en los equilibrios de transferencia de protón del harmano. Formas: catiónica, neutra, ion dipolar y aniónica.*

Esta reacción de transferencia de protón transcurre rápidamente en disolución acuosa, en consecuencia, en condiciones de pH superiores al pK_a del harmano (7, 34) (16) la especie existente en estado fundamental será la forma neutra o la correspondiente al ion dipolar dependiendo de la naturaleza del disolvente (alcoholes o agua). Sin embargo, cuando estas disoluciones acuosas se irradian, las moléculas de harmano pasan a estado excitado y se produce la reacción de transferencia de protón durante el tiempo de vida del estado excitado, lo que provoca la emisión correspondiente de las formas catiónicas, aún cuando las especies en estado fundamental (previamente a la irradiación) fueran las formas neutras. En disoluciones acuosas de ciclodextrinas se pueden observar las bandas de emisión correspondientes a la forma neutra junto con la catiónica. Este comportamiento se puede apreciar en la Figura 1, donde se muestra la coincidencia de los máximos de emisión del complejo de inclusión con los obtenidos en disolución etanólica correspondientes a la forma neutra del harmano.

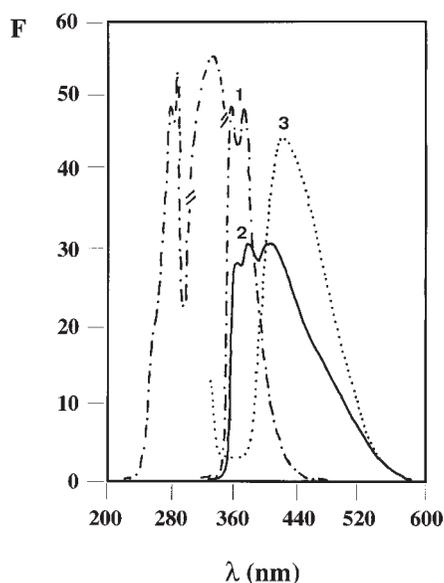


FIGURA 1. Espectros de emisión de fluorescencia ($\lambda_{ex} = 290 \text{ nm}$) de: **1.** Harmano ($c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ M}$) en disolución etanólica. **2.** Disolución acuosa del complejo de inclusión de harmano ($c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ M}$) e hidroxipropil- β -ciclodextrina ($c = 1,0 \times 10^{-2} \text{ M}$) obtenidos en disolución acuosa tamponada a $\text{pH} = 7,8$. **3.** De harmano ($c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ M}$) disolución acuosa tamponada a $\text{pH} = 7,8$. **F:** fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda en nanómetros.

Asimismo, también se aprecia la emisión correspondiente al catión, que está presente en disolución acuosa de ciclodextrina; si bien, comparada con la disolución acuosa tamponada, se produce un ligero desplazamiento en el máximo de emisión fluorescente correspondiente a la forma catiónica, por lo que puede deducirse que el citado

alcaloide debe hallarse incluido o parcialmente incluido. El perfil del espectro de emisión puede explicarse considerando que la cavidad de la ciclodextrina proporciona un microentorno con una polaridad semejante a la que presentan disolventes como los alcoholes (etanol o metanol), tal y como ya se ha descrito para otros complejos de inclusión (17, 18). En la Tabla 1 se resumen las características espectrofluorimétricas del harmano en diferentes entornos y a distintos valores de pH, demostrándose que la inclusión en la cavidad de las ciclodextrinas o la solubilización por diversos agentes tensioactivos afecta notablemente al comportamiento espectroscópico y a los equilibrios de transferencia protónica del harmano.

TABLA 1. Características espectrofluorimétricas de las distintas especies de harmano en diferentes disolventes y microentornos (micelas y ciclodextrinas). El pH al que se detecta cada máximo de fluorescencia aparece entre paréntesis. λ_{em} : longitud de onda del máximo de emisión en nanómetros.

| | CACIÓN | NEUTRO | ION DIPOLAR | ANIÓN |
|--|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| MEDIO | λ_{em} (nm) | λ_{em} (nm) | λ_{em} (nm) | λ_{em} (nm) |
| Acuoso * | 434 (pH=0-9) | 380 (pH=10-14) | 491 (pH=10-14) | 440 (pH>14) |
| Etanol | 430 (pH=1,0) | 366,380 (pH=13,0) | 480 (pH=13,0) | — |
| Dodecilsulfato de sodio (SDS) | 430 (pH=1,0) | 366,380 (pH=13,0) | 480 (pH=13,0) | — |
| Bromuro de cetiltrimetil- amonio (CTAB) | 430 (pH=1,0) | — | — | 426,450 (pH=13,0) |
| Polioxietileno-23-lauril-éter (Brij-35) | 430 (pH=1,0) | 366,380 (pH=13,0) | 480 (pH=13,0) | — |
| β -ciclodextrina (β -CD) | 430 (pH=1,0) | 360,380 (pH=7,8) | 485 (pH=13,1) | — |
| Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) | 430 (pH=1,0) | 362,380 (pH=7,8) | — | 420,450 (pH=13,1) |
| Dimetil- β -ciclodextrina (DM- β -CD) | 430 (pH=1,0) | 362,380 (pH=7,8) | — | 420,450 (pH=13,1) |
| Trimetil- β -ciclodextrina (TM- β -CD) | 430 (pH=1,0) | 362,380 (pH=7,8) | 480 (pH=13,1) | — |

* Datos tomados de referencia 16.

La existencia de diferentes especies en estado excitado (neutra y catiónica) para los complejos de inclusión de harmano e HP- β -CD dificulta la determinación de los parámetros utilizados en la caracterización de los complejos de inclusión con ciclodextrinas; tal es el caso de la determinación de los valores de las constantes de asociación o la estequiometría de los mismos. Dado que no es adecuado desplazar el equilibrio completamente hacia la forma catiónica, ya que ello contribuye a dificultar la inclusión, se hace necesario la búsqueda de otras metodologías alternativas que permitan superar esta dificultad.

Entre las metodologías alternativas, nos decidimos por aquéllas que presenten una menor dificultad, accesibilidad y, a la vez, buenas características en cuanto a la reproducibilidad de los resultados cuantitativos se refiere. En un primer paso se procedió a la filtración de las disoluciones de los complejos de inclusión a través de un sistema de filtración de Millipore con filtros de tamaño de poro de 0,22 μm . Dado que los complejos de inclusión formados deben resultar más hidrosolubles que los sustratos a incluir, este procedimiento constituye una opción para separar el harmano libre y no solubilizado del harmano incluido y, por tanto, solubilizado. Se observó que el harmano libre es lo suficientemente soluble en la disolución tampón acuosa al nivel de concentración de $1,0 \times 10^{-6}$ M empleado para la determinación espectrofluorimétrica, puesto que el harmano libre originaba una intensa banda de emisión fluorescente correspondiente a la forma catiónica que interfería las determinaciones cuantitativas. Este procedimiento, que había dado buenos resultados en el caso de los complejos de inclusión con el carbazol (19) y la elipticina (20), fue descartado para el caso de los complejos de inclusión con harmano. Por ello, se decidió realizar la separación mediante un proceso de diálisis de equilibrio, en el que las formas libres del harmano difundan desde el interior al exterior de la membrana de diálisis debido a su bajo peso molecular. Por el contrario, los complejos de inclusión harmano/HP- β -CD, cuyo peso molecular es de 7 a 8 veces superior al del harmano, no podrán difundir desde el interior al exterior de la membrana. De esta manera, se puede lograr la separación del harmano incluido con respecto al harmano no incluido.

Cuando se comparan los espectros de emisión de fluorescencia de las disoluciones sin dializar (Figuras 2 y 3), se puede apreciar la

emisión mayoritaria de las formas catiónicas, especialmente a bajas concentraciones de ciclodextrina.

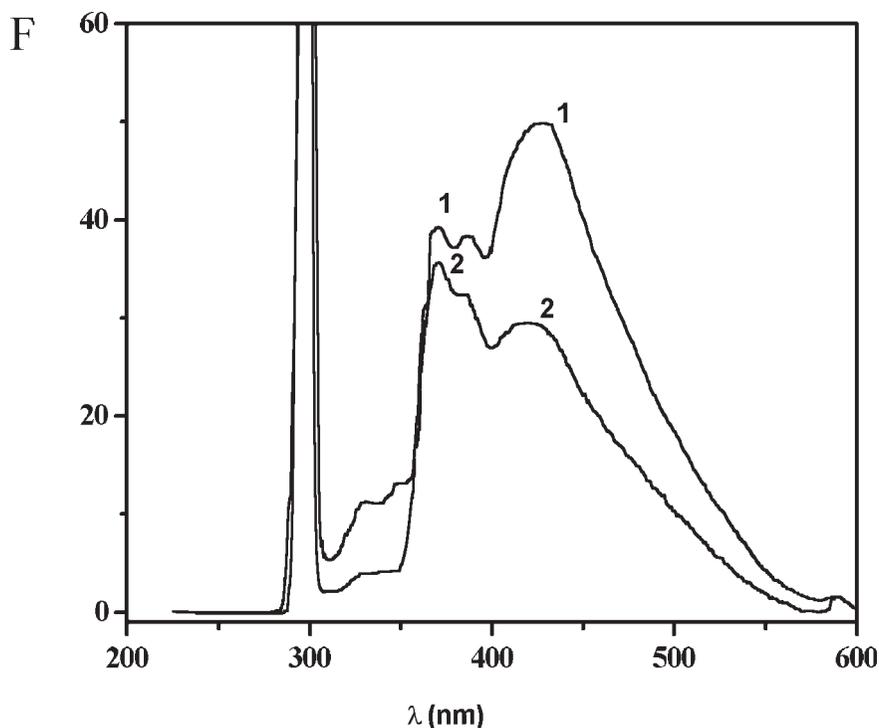


FIGURA 2. Espectros de emisión de fluorescencia ($\lambda_{ex} = 290 \text{ nm}$) de los complejos de inclusión de harmano ($c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ M}$) e hidroxipropil- β -ciclodextrina ($c = 5,0 \times 10^{-3} \text{ M}$) obtenidos en disolución acuosa tamponada a $\text{pH} = 7,8$: **1.** Disolución no dializada. **2.** Disolución medida después de 24 horas de diálisis de equilibrio. **F:** fluorescencia en unidades arbitrarias, **λ :** longitud de onda en nanómetros.

Este comportamiento se explica teniendo en cuenta que en la disolución coexisten las formas libres del harmano (protonadas), que emiten a 430 nm, con las formas neutras incluidas en la HP- β -CD, que son responsables de la banda de emisión, con máximos a 360 y 380 nm. Si se considera que el rendimiento cuántico de emisión de fluorescencia es aproximadamente diez veces superior para las formas catiónicas que para las formas neutras, se explica que, aún cuando las concentraciones relativas de harmano libre y de

harmano incluido sean similares (en el caso de los complejos con una concentración de ciclodextrina de $5,0 \times 10^{-3}$ M, Figura 2), la intensidad de emisión a 430 nm sea superior a la intensidad de emisión a 360-380 nm. Sin embargo, una vez desarrollado el proceso de diálisis, cuando se registran los espectros de emisión de fluorescencia de los líquidos del interior de la membrana de diálisis, donde después de este proceso permanecen los complejos de inclusión pero no el harmano libre, se observa (Figuras 2 y 3) un aumento de la intensidad de emisión de fluorescencia a 360-380 nm con respecto a la banda de 430 nm. Este aumento es tanto más significativo cuanto mayor es la concentración de ciclodextrina en la disolución. En la Tabla 2 se resume este comportamiento.

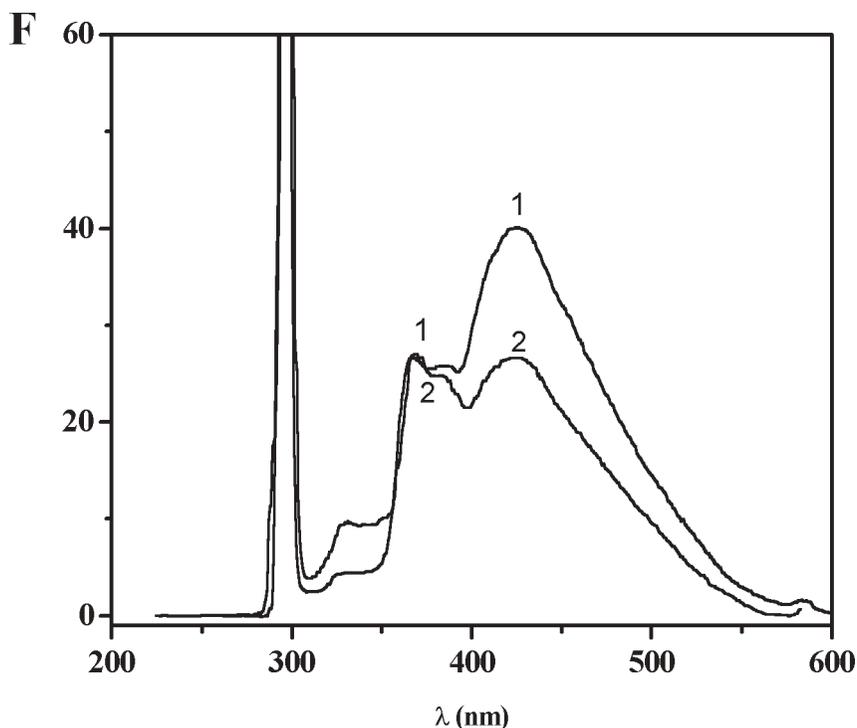


FIGURA 3. Espectros de emisión de fluorescencia ($\lambda_{ex} = 290$ nm) de los complejos de inclusión de harmano ($c = 1,0 \times 10^{-6}$ M) e hidroxipropil- β -ciclodextrina ($c = 9,0 \times 10^{-3}$ M) obtenidos en disolución acuosa tamponada a pH = 7,8: **1.** Disolución no dializada, **2.** Disolución medida después de 24 horas de diálisis de equilibrio. **F:** fluorescencia en unidades arbitrarias, **λ :** longitud de onda en nanómetros.

TABLA 2. *Influencia del proceso de diálisis sobre la fluorescencia de los complejos de inclusión obtenidos para concentraciones crecientes de hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD)*

Comparación de las intensidades de emisión de fluorescencia de los complejos de inclusión obtenidos para concentraciones crecientes de hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) en función del proceso de diálisis

| CONCENTRACIÓN DE HP- β -CD (M) | DISOLUCIONES NO DIALIZADAS | DISOLUCIONES DIALIZADAS |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | SF ₃₇₀ /SF ₄₃₀ | SF ₃₇₀ /SF ₄₃₀ |
| 1,0 \times 10 ⁻³ | 0,421 | 0,551 |
| 2,0 \times 10 ⁻³ | 0,455 | 3,000 |
| 3,0 \times 10 ⁻³ | 0,541 | 0,809 |
| 4,0 \times 10 ⁻³ | 0,594 | 2,083 |
| 5,0 \times 10 ⁻³ | 0,700 | 1,060 |
| 6,0 \times 10 ⁻³ | 0,687 | 2,000 |
| 7,0 \times 10 ⁻³ | 0,750 | 1,101 |
| 8,0 \times 10 ⁻³ | 0,772 | 1,600 |
| 9,0 \times 10 ⁻³ | 0,788 | 1,200 |
| 1,0 \times 10 ⁻² | 0,798 | 1,700 |

SF₃₇₀: Señal de fluorescencia (en unidades arbitrarias) a la longitud de onda de emisión de 370 nm correspondiente a la forma neutra del harmano.

SF₄₃₀: Señal de fluorescencia (en unidades arbitrarias) a la longitud de onda de emisión de 430 nm correspondiente a la forma catiónica del harmano.

Así, cuando se compara la relación de intensidades de emisión de la forma neutra ($\lambda_{em} = 370$ nm) con respecto a la forma catiónica ($\lambda_{em} = 430$ nm), se puede apreciar que tanto en las disoluciones dializadas como en las no dializadas se produce un incremento en la intensidad de fluorescencia a medida que se incrementa la concentración de hidroxipropil- β -ciclodextrina en el medio. Este comportamiento se explica considerando el desplazamiento favorable del equilibrio de inclusión a medida que aumenta la concentración de ciclodextrina en la disolución, favoreciéndose de esta manera la inclusión de las formas neutras. Si se compara la relación de intensidades obtenidas para las disoluciones no dializadas con respecto a las dializadas, se observa que la relación de intensidades es más

elevada en el caso de las disoluciones dializadas. Así, para un valor de concentración de ciclodextrina de $1,0 \times 10^{-3}$ M, la relación de intensidades para las disoluciones no dializadas es de 0,421 mientras que para las disoluciones dializadas es de 0,551, es decir, la intensidad de emisión debida a la forma catiónica es aproximadamente el doble que para la forma neutra. Sin embargo, la intensidad de emisión crece mucho más significativamente para la forma neutra que para la forma catiónica a medida que aumenta la concentración de ciclodextrina. En consecuencia, cuando la concentración de ciclodextrina en el medio es $1,0 \times 10^{-2}$ M, la relación de intensidades es 0,798 para las disoluciones no dializadas y 1,700 para las disoluciones dializadas. Este hecho indica que si bien en el caso de las disoluciones no dializadas se produce un aumento paulatino de la emisión de la forma neutra, sin embargo, continúa siendo mayoritaria la emisión debida al catión, ya que la relación de intensidades se mantiene en un valor inferior a la unidad. En el caso de las disoluciones dializadas, la relación de intensidades supera la unidad, lo cual quiere decir que la emisión de la forma neutra es mayoritaria con respecto a la forma catiónica. Considerando que la aparición de la emisión correspondiente a la forma neutra en disolución acuosa es una demostración de la existencia de los complejos de inclusión, podemos afirmar que el proceso de diálisis es lo suficientemente eficaz como para permitir la determinación cuantitativa de parámetros que sirven para la caracterización de los complejos de inclusión (constantes de asociación o estequiometría) sin la interferencia debida a la emisión de la banda catiónica.

La utilización de esta sencilla pero laboriosa metodología ha resultado ser extraordinariamente valiosa en la determinación de la estequiometría de los complejos de inclusión con diferentes ciclodextrinas (21). Así, para los cálculos estequiométricos se ha empleado el método de Job o de las variaciones continuas; lo cual supone que las concentraciones de harmano y ciclodextrina varían pero se mantiene fija la suma de las concentraciones de ambos en un valor predeterminado, en nuestro caso $1,0 \times 10^{-2}$ M. En estos experimentos las concentraciones de harmano y ciclodextrina son muy semejantes y, por tanto, no hay exceso de hidroxipropil- β -ciclodextrina que favorezca la inclusión.

En conclusión, la introducción del proceso de diálisis resulta imprescindible a fin de separar los complejos de inclusión de las formas libres de harmano y, de esta manera, facilitar su cuantificación.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BROSSI, A.; MAMMALIAN ALKALOIDS II, en CORDEL, G.A. (1993) *The Alkaloids Chemistry and Pharmacology*, vol. 43, Academic Press Inc., San Diego.
- (2) AIRAKSINEN, M.M.; KARI, I. (1981) *Med. Biol.*, 59: 21-34.
- (3) MATSUBARA, K.; FUKUSHIMA, F.; AKANE, A.; HAMA, K.; FIKUI, Y. (1986) *Alcohol Alcohol.*, 21: 339-344.
- (4) SAEED, S.A.; SIMJEE, R.U.; FARNAZ, S.; GILANI, A.H.; SIDDIQUI, S.; SIDDIQUI, B.S.; BEGUM, S.; FAIZI, S.; ZIA, A. (1993) *Biochem. Soc. Trans.*, 21: 461S-462S.
- (5) YAMASHITA, K.; OHGAKI, H.; WAKABAYASHI, K.; NAGAO, M.; SUGIMURA, T. (1988) *Cancer Lett.*, 42: 179-183.
- (6) NAKAYASU, M.; NAKASATO, F.; SAKAMOTO, H.; TERADA, M.; SUGIMURA, T. (1983) *Cancer Lett.*, 42: 249-255.
- (7) SZEJTLI, J. (1982) *Cyclodextrins and their Inclusion Complexes*, Akademiai Kiado, Budapest.
- (8) PITHA, J. (1981) *Life Sci.*, 29: 307-311.
- (9) MUÑOZ-BOTELLA, S.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; LERNER, D.A.; MENÉNDEZ, J.C. (2002) *Anal. Chim. Acta*, 468: 161-170.
- (10) NAKAI, Y.; YAMAMOTO, K.; TERADA, K.; AKIMOTO, K. (1984) *Chem. Pharm. Bull.*, 32: 685-691.
- (11) MØLLGAARD ANDERSEN, F.; BUNDGAARD, M. (1982) *Arch. Pharm. Chem. Sci. Ed.*, 10: 80-87.
- (12) HAMADA, Y.; NAMBU, N.; NAGAI, T. (1975) *Chem. Pharm. Bull.*, 23: 1205-1211.
- (13) MØLLGAARD ANDERSEN, F.; BUNDGAARD, H. (1984) *Int. J. Pharm.*, 19: 189-197.
- (14) RAJAGOPALAN, N.; CHEN, S.C.; CHOW, W.S. (1984) *Int. J. Pharm.*, 29: 161-168.
- (15) MARTÍN, L.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B. (1997) *Analyst*, 122: 45-49.
- (16) BALÓN, M., HIDALGO, J., GUARDADO, P., MUÑOZ, M.A., CARMONA, C. (1993) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 99-104.
- (17) FRANKIEWICH, R.P.; THIMMAIAH, K.N.; HINZE, W.L. (1991) *Anal. Chem.*, 63: 2924-2933.
- (18) SBAI, M.; AIT-LYAZIDI, S.; LERNER, D.A.; DEL CASTILLO, B.; MARTÍN, M.A. (1995) *Anal. Chim. Acta*, 303: 47-55.
- (19) SBAI, M.; AIT-LYAZIDI, S.; LERNER, D.A.; DEL CASTILLO, B.; MARTÍN, M.A. (1997) *J. Fluorescence*, 7: 7S-10S.
- (20) SBAI, M.; AIT-LYAZIDI, S.; LERNER, D.A.; DEL CASTILLO, B.; MARTÍN, M.A. (1996) *Analyst*, 121: 1561-1564.
- (21) MARTÍN, L.; LEÓN, A.; OLIVES, A.I.; DEL CASTILLO, B.; MARTÍN, M.A. (2003) *Talanta*, 60: 493-503.

————— *Artículo original* —————

Hormona de crecimiento, destete y estado nutritivo

M.^a ELVIRA LÓPEZ-OLIVA MUÑOZ, ÁNGEL AGIS TORRES y
EMILIA MUÑOZ MARTÍNEZ

*Sección Departamental de Fisiología. Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense de Madrid*

RESUMEN

El eje GH-IGF-I es el regulador fundamental del crecimiento postnatal y el determinante del tamaño corporal. El tratamiento con GH aumenta la masa muscular y disminuye el depósito de grasa, modificando la redistribución de los depósitos corporales. Por su capacidad de aumentar la síntesis y de disminuir el catabolismo proteico genera un balance nitrogenado positivo, bien actuando directamente a nivel tisular o mediante la acción endocrina, paracrina o autocrina del factor IGF-I. De forma paralela, la hormona somatotropa incrementa la hidrólisis de los triglicéridos y disminuye la lipogénesis. Esta respuesta metabólica a la GH exógena varía con diversos factores, entre los que destacan el nivel nutritivo y la etapa de crecimiento del animal. Se conoce por una parte, que la acción somatotropa requiere de un aporte suficiente de nutrientes en la dieta y por otra, que sus efectos son mínimos entre la segunda y tercera semana de crecimiento postnatal, aumentando su eficacia entre los 31 días de vida y la pubertad. Aunque no se conoce la causa de esta refractoriedad al tratamiento con GH en estas primeras etapas de la vida, podría estar relacionada con la respuesta bifásica a la GH, desarrollada en ratones BALB/c machos rhGH-tratados entre los 21 y 50 días de vida y alimentados con dos concentraciones de proteína en la dieta (12 y 20%). La hipofagia GH-inducida entre los 21 y 30 días de vida es la causa primordial del estado de subnutrición que aparece en estos animales y que da lugar a la detención del crecimiento por falta de sustratos, eliminando la acción anabólica de la hormona. Posteriormente, el incremento autorregulado de la ingesta favorece la recuperación del crecimiento entre los 35 y 50 días de vida, periodo en el que se desarrolla un crecimiento de carácter compensador, caracterizado por un acúmulo excesivo

de la masa grasa, similar al determinado por el crecimiento que sigue a la realimentación después de malnutrición, lo que puede coexistir con un estado de resistencia del tejido adiposo a la GH. Sin embargo el efecto anabólico de la somatotropa parece manifestarse, en los animales bien nutridos, por un mayor depósito de la proteína muscular al incrementar la tasa fraccional de síntesis proteica, que permite la aparición de un fenómeno de hipertrofia compensadora. Por lo tanto, la administración de rhGH en el momento del destete parece interferir con los delicados mecanismos de adaptación a la alimentación sólida característicos de este periodo, e inducir el cese del crecimiento entre los 21 y 30 días, generando más tarde un crecimiento de carácter compensador que se inicia a partir de los 35 días de vida.

Palabras clave: GH.— Destete.— Proteína de la dieta.— Crecimiento compensador.

ABSTRACT

Growth hormone, weaning and nutritional status

The GH-IGF-I system constitutes the major determinant of body size, specially in postnatal growth. It is well established that exogenous GH increases muscle mass and decreases lipid content, leading to the alteration of nutrients repartitioning. The mechanism involves, at least, an increase in the protein synthesis and creates a status of positive nitrogen balance by increasing nitrogen retention and decreasing protein catabolism in animals fed an adequate diet. GH can act directly on tissues inducing these metabolic changes and can also stimulate IGF-I in an endocrine, autocrine or paracrine fashion. Body fat decreases by the increase of triglycerides hydrolysis and the decrease of free fatty acid re-esterification. The magnitude of the response to exogenous GH is variable and at least partly attributable to the nutritional status and to the growth stage of animal. The action of growth hormone is minimal between the 2nd and the 3rd week of age and is manifested at 31 days of age, increasing its efficacy at puberty. The reason for this refractoriness to GH treatment is unknown but it can be related to the biphasic response developed in mice fed two dietary protein levels between 21 to 50 days of age, when administered with rhGH. The GH-induced fall of feed intake in mice between 21 and 30 days old provokes a loss of body and skeletal muscle components due to the lack of nutrients leading to the impairment of growth. Later on (35-50 days) the self-controlled increase of feed intake let the recovery of the body weight, through of a catch-up growth phenomenon, characterized by a higher lipid body accretion, similar to the compensatory growth developed during refeeding after protein-energy malnutrition, and possibly contemporary of a GH-resistance status of the fat mass. However, the GH anabolic action is clearly seen on the muscle mass, specially in the well-nourished mice, with increased fractional protein synthesis rate that allows higher both muscle protein deposit and muscle cellular size. Thus, GH administration throughout weaning seems to interfere with the delicate adaptive mechanisms to the solid diet, impeding normal growth bet-

ween the 3rd and 4th week of age and inducing a compensatory growth from 35 days of age.

Key words: GH.— Weaning.— Diet Protein.— Compensatory growth.

INTRODUCCIÓN

La hormona somatotropa (GH) ejerce una acción fundamental en el control del crecimiento, en especial en la etapa postnatal (1). Presenta efectos reguladores sobre el metabolismo y controla la redistribución de los nutrientes absorbidos durante el crecimiento y la lactación. Así, en niños prepúberes (2), cerdos jóvenes (3) y en ratas hipofisectomizadas (4), se ha demostrado que la administración de GH a dosis máximas, incrementa la velocidad de crecimiento, la eficacia alimentaria y la masa magra y reduce de forma simultánea, el depósito de grasa.

Esta función es primordial, no sólo en situaciones de equilibrio nutritivo, sino también durante períodos de subnutrición o de mala utilización de los nutrientes, como se observa en la rata malnutrida, tanto en la etapa neonatal (5) (6) como en los individuos adultos (7), todos los cuales desarrollan un crecimiento compensador después de realimentación, cuando son tratados con hormona de crecimiento.

El músculo esquelético y el tejido adiposo se configuran como dos de los tejidos blancos esenciales de la actividad hormonal (8) (3). La acción somatotrópica sobre músculo (de carácter anabólico) y sobre tejido adiposo (de carácter catabólico), permite coordinar la reordenación de sustratos, aumentando la eficacia de acreción del depósito proteico. Este efecto está en función de la dosis administrada de la hormona (9), de la etapa de crecimiento (10), del sexo (11), y de la concentración de nutrientes en la dieta (12).

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE GH SOBRE MÚSCULO ESQUELÉTICO

La activación de la proliferación celular y de la acreción de la proteína son los mecanismos fundamentales mediante los cuales

la hormona somatotropa estimula el crecimiento muscular. El tratamiento con GH restaura o incrementa el número de células en ratas hipofisectomizadas (13), en cerdos en la etapa fetal (14), en ratas con tumores que segregan GH (15) y en animales intactos (16). La acción somatotropa puede ejercerse, bien activando la replicación del ADN, o bien mediante la adición de nuevos núcleos a las miofibras, por incremento de la proliferación de células satélite y su fusión con las células musculares (17).

En el músculo esquelético, la hiperplasia va acompañada del aumento del tamaño celular y de la aparición de hipertrofia, como consecuencia del incremento de la capacidad de captación de aminoácidos (18) y de síntesis proteica en el miocito (19) (20), lo que facilita la acreción de la proteína celular y la mejora de la retención nitrogenada y de la masa magra corporal (21), tanto en animales intactos (22) como en individuos GH-deficientes (23).

No obstante, el mecanismo por el que la hormona somatotropa actúa sobre el metabolismo proteico muscular es todavía muy controvertido: Así, mientras Wester y col. (24) encuentran pocos efectos de la GH en cerdos jóvenes bien nutridos y tratados con la hormona sobre la síntesis proteica corporal y muscular, a pesar del incremento en el depósito proteico; también en animales jóvenes GH-tratados se ha descrito que el mantenimiento de la proteína en situaciones de ayuno (25), o el incremento de la acreción de la proteína, en animales intactos (26) (27), se debe más probablemente a la disminución del catabolismo que a un aumento de la síntesis proteica. Parecería que la hormona somatotropa no puede aumentar, más, un potencial de crecimiento que está elevado al máximo en estos animales jóvenes en período de rápido desarrollo, por lo que la acción anabólica de la hormona parece efectuarse mediante una reducción de la degradación de la proteína.

Además, el aumento de la tasa fraccional de síntesis proteica en animales intactos GH-tratados parece ligado en primer término, al incremento de la concentración del ARN muscular (26) (28) y en segundo, al aumento de la tasa de síntesis proteica por unidad de ARN (29).

Mecanismos que median la acción de la GH sobre el músculo esquelético

Se han propuesto varios mecanismos que explican la acción anabólica proteica de la GH (30) (31): 1) según la hipótesis clásica, mediante la síntesis hepática del factor de crecimiento insulínico I (IGF-I) y su posterior acción endocrina sobre los órganos blanco (32); 2) mediante la formación de un factor IGF-I local y su efecto autocrino/paracrino sobre el propio tejido (33); 3) por acción mitogénica directa de la propia somatotropa, también de efecto local (34) y, finalmente, 4) por mediación de otros factores distintos del factor IGF-I (35).

La importancia de la función del factor IGF-I derivado del hígado, de carácter endocrino, respecto de la desarrollada por el factor IGF-I producido localmente, es un problema muy controvertido en la actualidad. El efecto de la delección específica del gen IGF-I hepático en el ratón, que resulta en una disminución de hasta el 75% en la concentración del factor IGF-I circulante mientras se mantienen tasas normales de ARNm del factor IGF-I local en los tejidos extrahepáticos, no parece afectar al crecimiento, lo que sugiere que la acción endocrina del factor IGF-I, podría no ser esencial para el crecimiento postnatal (36) (37). Por otra parte, la necesidad de mediación de un factor IGF-I local con acción paracrina en el crecimiento estimulado por la hormona somatotropa, se ha puesto de manifiesto (38) al encontrar que la supresión conjunta por manipulación genética de la producción endocrina y paracrina del factor IGF-I, induce un retraso en el crecimiento y un estado de resistencia a la GH. Hoy se considera (39), que la regulación del crecimiento somático postnatal, incluye tanto la acción endocrina del factor IGF-I, modulado por complejos de unión inducidos por GH, como una acción paracrina que puede incluir los efectos directos de ambas hormonas, GH e IGF-I, y quizá también del factor IGF-II sobre los tejidos.

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE GH SOBRE TEJIDO ADIPOSO

La capacidad de la hormona somatotropa para disminuir el depósito graso viene determinada por sus efectos sobre la síntesis y/o la movilización lipídica, aunque el predominio de uno u otro efecto parece ser específica de la especie.

De los estudios en la rata (40) (41) y en el hombre (42), se deduce que el tratamiento con GH incrementa la lipólisis a partir de tejido adiposo y disminuye los triglicéridos.

Entre los mecanismos mediadores de la hidrólisis grasa por tratamiento con GH señalados hasta ahora en estas especies, se encuentran los siguientes: a) el incremento de la sensibilidad frente a agonistas β -adrenérgicos, por aumento del número de receptores, como se observa en la lipólisis inducida por catecolaminas (43), b) una mayor expresión de la lipasa sensible a hormona, como se ha demostrado en líneas celulares 3T3 (44), c) un antagonismo frente a los efectos antilipolíticos de la insulina (45), y d) la inhibición de la subunidad α de la proteína G inhibidora, que puede reducir la supresión tónica de la lipólisis mediada por antilipolíticos como adenosina y prostaglandinas (41).

Además, la capacidad de la hormona de crecimiento para reducir la concentración de triglicéridos en el hombre parece asociada a la inhibición de la actividad del enzima lipoproteín-lipasa (46), a consecuencia de una alteración a nivel postraducciona en el procesamiento del enzima (47).

Por el contrario, en la especie porcina en la que la mayor parte de los lípidos corporales (80%) se derivan de la síntesis de novo de ácidos grasos (48), el efecto fundamental de la somatotropa se produce mediante la disminución de la síntesis lipídica, con poco efecto sobre la lipólisis (49).

La hormona somatotropa genera una marcada disminución de la actividad del enzima ácido graso sintasa (FAS) y la desestabilización y reducción de los niveles del ARNm de FAS tanto en hígado de rata y en adipocitos 3T3-F442A en cultivo, como en tejido adiposo de cerdos GH-tratados (50), por disminución de la transcripción génica

del enzima (51). Este efecto está ligado a la disminución de la sensibilidad del adipocito a la insulina, fenómeno que reduce todos los procesos celulares regulados por esta hormona, como el transporte de glucosa, la expresión génica y las actividades enzimáticas de los enzimas lipogénicos (52). Este proceso parece tener carácter tejido-específico y sólo referido al tejido adiposo (53), ya que la sensibilidad a la insulina del tejido muscular está relativamente no afectada.

La consecuencia fundamental del control tejido-específico de la acción insulínica es un cambio patente en la redistribución de sustratos, en la que una gran parte de la glucosa destinada a la síntesis de lípidos es redirigida hacia el músculo. Esta adaptación es importante, puesto que gran parte de esta glucosa se utiliza para cubrir las necesidades energéticas suscitadas por el incremento de la síntesis proteica en músculo esquelético (3) durante el tratamiento con GH.

La acción somatotrópica sobre tejido adiposo parece ser directa y no mediada por los factores de crecimiento insulínicos (IGFs), ya que puede ser reproducida en condiciones *in vitro* (54) y además, la administración de IGF-I no mimetiza estos efectos (55), porque aunque la hormona GH estimula la expresión y secreción en tejido adiposo del ARNm de IGF-I (56), los adipocitos parecen carecer de receptores para IGF-I (57).

FACTORES QUE AFECTAN AL CONTROL Y LA FUNCIÓN DEL EJE GH-IGF-I

Estado nutricional

El estado nutricional es un factor fundamental en la regulación del eje somatotrópico (GH-IGF-I). Tanto el exceso como el déficit nutricional influyen de forma diferencial y con carácter edad-dependiente, la maduración y la función de este eje en distintas especies y órganos alterando, entre otros, la expresión génica del receptor de GH (GHR) y los mecanismos de secreción y de acción de la hormona de crecimiento (58).

Así, en ratas GH-tratadas y sometidas a malnutrición proteica, se ha descrito una disminución de la liberación espontánea, del conteni-

do hipofisario y de la tasa plasmática de GH (59), aunque se mantiene constante el nivel de transcritos del receptor de la hormona en el hígado (60). Por el contrario, la administración de somatotropa incrementa la concentración sérica de GH (61), mientras disminuyen la abundancia del ARNm del GHR hepático en cerdos jóvenes malnutridos (62). No obstante, tanto en ratas (63) como en cerdos (62) (64) desciende la afinidad de la hormona por su receptor.

Por otra parte, también el déficit en proteínas afecta la formación y la función del factor insulínico I. En estas circunstancias, se ha descrito una reducción en la expresión del gen IGF-I en cultivos de hepatocitos (58), el bloqueo del mecanismo de traducción de dicho factor (65) (66), la disminución del tamaño medio de los polisomas con un posible efecto sobre la eficiencia de traducción de este péptido (67) y el descenso de su concentración plasmática (61).

Son más dispares y menos conocidos los efectos de la hormona de crecimiento sobre músculo estriado. En músculo esquelético de cerdos malnutridos se ha demostrado tanto un aumento (62) como una disminución de la afinidad de GH por su receptor (68), mientras se incrementa el nivel del ARNm de éste respecto a los animales control. Estos resultados, que contrastan con los observados en hígado, parecen señalar que la regulación nutritiva del receptor de GH es tejido-específica. También en músculo esquelético de ratas, el nivel de proteína alimentaria regula no sólo la economía del nitrógeno corporal, sino que también controla los niveles del ARNm del factor IGF-I local (69).

Las proteínas transportadoras de la hormona somatotropa (GHPB) y de los factores de crecimiento insulínicos (IGFBPs) están asimismo bajo control dietario, lo que puede modificar la disponibilidad tisular y el grado de acceso a las células diana de estas hormonas (70). Así, el estado nutritivo regula de forma paralela la proteína ligadora de GH y el receptor hepático de la somatotropa (71). En la rata (70) y en pacientes con anorexia nerviosa (72), su concentración plasmática decrece durante el ayuno hasta el 50% de sus niveles basales, aunque se recuperan después de realimentación. Por el contrario, tasas elevadas de GHPB aparecen en pacientes obesos (73) que parecen reflejar también modificaciones en la abundancia de GHR.

Además, aunque la ingesta de alimentos es un potente regulador de la expresión génica y de la tasa plasmática de las proteínas ligadoras IGFBPs, presenta un carácter diferencial entre las seis clases de estas proteínas transportadoras. Mientras la proteína IGFBP-3 es relativamente estable y sólo disminuye después de un periodo prolongado de restricción en la dieta, la proteína IGFBP-2 se modifica rápidamente por la ingesta de alimentos. Así, la tasa plasmática de IGFBP-3 disminuye a largo plazo en ratas con malnutrición proteica y en individuos con anorexia nerviosa (72), mientras que el ayuno incrementa de inmediato la abundancia del ARNm de IGFBP-2 en hígado, como resultado del aumento de la transcripción del gen IGFBP-2 (74).

Por otra parte, la influencia de la dieta sobre el eje GH-IGF-I presenta carácter edad-dependiente. En las primeras etapas de la vida, el eje somatotrópico parece ser muy sensible a las modificaciones dietarias, ya que un buen nivel nutritivo facilita una maduración más rápida de este eje respecto al de los animales peor nutridos. Así, una ingesta alta en calorías incrementa la expresión del GHR hepático, la afinidad de la hormona por su receptor y la expresión del gen de la glicoproteína ácido-lábil (ALS) (75), en las especies ovina y bovina durante la primera semana de vida. Sin embargo más adelante durante el período del destete, cuando el eje GH-IGF-I está ya desarrollado (76), la limitación de energía en la dieta no afecta la abundancia del ARNm del factor IGF-I, ni la de la glicoproteína ALS, ni la de la proteína ligadora IGFBP-3 en hígado, a pesar de la caída de los niveles plasmáticos del factor IGF-I y de la pérdida de la tasa de crecimiento.

Además, aunque el nivel de nutrición requerido para desencadenar un efecto óptimo del eje somatotrópico no se ha definido todavía (77), se conoce que la hormona de crecimiento induce un incremento de la eficiencia de utilización de la proteína de la dieta en el depósito proteico corporal, en función directa a su concentración. El aumento de la velocidad del depósito de proteína corporal puede alcanzar hasta un 90% cuando la concentración de la proteína de la dieta se incrementa del 10 al 18% (78). Es por ello que en animales GH-tratados, la composición corporal y la tasa de acreción proteica depende de una óptima utilización de los nutrientes en el depósito de sustratos (79).

Etapa de crecimiento

En contraste con su bien conocida función promotora del crecimiento postnatal (39), se ha considerado durante mucho tiempo que el crecimiento fetal tenía una baja dependencia respecto de la GH, como consecuencia de la expresión tardía y la maduración progresiva de sus receptores, que parecía reflejar la existencia de un estado de resistencia a la hormona durante esta etapa temprana de la vida. Esta aparente afuncionalidad de la GH se manifestaba en la pequeña disminución del crecimiento linear *in utero* (80) (81), encontrada en estudios clínicos y experimentales con fetos anencefálicos y niños con déficit congénitos en GH o con una mutación en el receptor de la hormona.

Sin embargo más recientemente y gracias a nuevos datos derivados de estudios con pacientes con déficit congénitos del crecimiento, así como del análisis fenotípico de los receptores de GH y prolactina en el ratón knockout (82), hoy comienza a admitirse que la hormona somatotropa podría actuar en todas las etapas del desarrollo desde el periodo de preimplantación del huevo fertilizado hasta las últimas fases de crecimiento del feto y su transición a la vida extrauterina (83). Transcritos de los receptores de GH se han encontrado ya en la etapa de preimplantación embrionaria (84) (85), y su expresión se inicia en los tejidos fetales hacia la mitad de la gestación, se incrementa de forma paulatina a lo largo del proceso y continúa en la etapa postnatal (86) (87).

La hipótesis actual sobre la función de la hormona somatotropa en el crecimiento del feto propone la cooperación funcional entre todas las hormonas del sistema GH/prolactina liberadas en el compartimiento fetal: GH, prolactina y lactógeno placentario y sus receptores por una parte, y el factor IGF-I y su receptor (IGF-I-IR) por otra, estos últimos siendo requeridos necesariamente con carácter unívoco en el desarrollo del feto (88). Ello supone además, que la sensibilidad tisular de la hormona somatotropa podría iniciarse a partir del segundo tercio de la gestación y que el eje somatotrópico sería activo en el crecimiento fetal desde ese momento.

El crecimiento progresivo de la afinidad de la hormona GH por su receptor, que continúa en la etapa postnatal, va acompañada de un incremento de las tasas plasmáticas de IGF-I y de su proteína

transportadora, IGFBP-3, fenómeno que favorece la acción anabólica proteica de la GH, que es máxima, en las últimas etapas de crecimiento en los animales jóvenes (89), como se ha observado en animales prepúberes tratados con la hormona (90).

Su acción parece tener efectos mínimos sin embargo durante las primeras etapas del crecimiento postnatal y por ello las tasas plasmáticas de IGF-I y de sus proteínas transportadoras, así como el depósito proteico corporal son bajos en cerdos GH-tratados de 40 días de vida, en contraste con los valores observados en animales más maduros (91).

El destete parece ser un momento crítico en la respuesta a la GH, puesto que los efectos de la administración de la hormona parecen ser evidentes sólo a partir de los 31 días de edad, mientras su acción es leve o nula antes de esa etapa (92). Esta refractoriedad al tratamiento con GH en esta fase del crecimiento podría depender de la regulación negativa de la función somatotropa ejercida por la GH exógena.

En el ratón, Liu y LeRoith (38) observan dos fases en el crecimiento postnatal: una temprana, entre la segunda y tercera semana de vida (coincidente con el destete), que no puede ser estimulada por la GH, y un crecimiento peripuberal rápido, a partir de la tercera semana, que se manifiesta totalmente a los 56 días de edad.

Esta incapacidad de la GH para estimular el crecimiento durante el destete podría estar asociada a la respuesta bifásica que se desarrolla en ratones rhGH-tratados, dependiente de la acción hipofálica de la hormona, y en la que su acción anabólica se manifiesta a partir de los 35 días de vida, según se ha observado a nuestro entender por vez primera en nuestro laboratorio (93) (94), como se expone a continuación.

RESPUESTA BIFÁSICA A LA ADMINISTRACIÓN DE HORMONA DE CRECIMIENTO RECOMBINANTE HUMANA (rhGH) EN RATONES AL DESTETE

La administración a dosis de 74 ng/g de peso corporal de rhGH, a ratones BALB/c machos al destete (21 días de vida) y sometidos a dos niveles de proteína en la dieta: 12% (grupo 12GH) y 20% (grupo 20GH) induce una respuesta bifásica en el crecimiento corporal y

muscular respecto a los animales control (grupos: 12S y 20S) administrados con solución salina. Durante la primera etapa (21-30 días) se produce un retraso en el crecimiento, a consecuencia de la disminución de la ingesta voluntaria de alimentos, inducida por la hormona, lo que genera un déficit proteico-calórico. A partir de los 35 y hasta los 50 días de vida (segunda etapa), la función de crecimiento se recupera, debido al incremento autorregulado de la ingesta (Figura 1) (93) (94), mediante un crecimiento de tipo compensador, similar al descrito en animales subnutridos por déficit alimenticios y sometidos a realimentación (95). Este efecto parece ligado a la existencia de un buen nivel nutritivo, puesto que sólo los animales sometidos al 20% de proteína recuperan el crecimiento de los animales control.

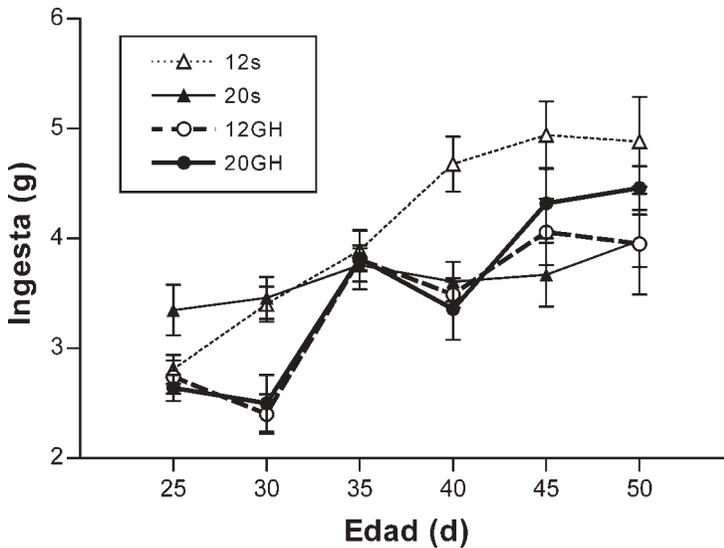


FIGURA 1. Evolución de la ingesta de alimentos de ratones BALB/c machos rhGH-tratados (GH) y controles (s), alimentados con dietas del 12% y 20% de proteína entre los 21 y 50 días de vida. La ingesta disminuye entre los 21 y 30 días de vida y se incrementa entre los 30 y 50 días en los ratones GH-tratados. Sólo presenta hiperfagia el grupo 20GH respecto a su control.

Primera etapa de la respuesta a rhGH

La causa inmediata del retraso en el crecimiento, observado en los animales GH-tratados en esta primera etapa de respuesta a la hormona es, como ya se ha mencionado, la profunda caída de la

ingesta de alimento inducida por la GH. Este efecto se ha descrito también en animales en crecimiento con balance de nitrógeno positivo (54) y en pacientes sanos tratados con la hormona (96), lo que sugiere que la somatotropa podría actuar sobre los centros hipotalámicos del apetito, además de regular el metabolismo tisular.

Por ello, aunque esta pérdida de apetito se ha venido atribuyendo a la mejora de la utilización de los nutrientes por parte de la hormona, lo que resultaría en una menor necesidad de un mayor aporte de sustratos; más recientemente la demostración, por una parte, de que un incremento de leptina induce experimentalmente, en roedores, una disminución de la ingesta (97), dando lugar a un balance energético negativo (gasto de energía > ingesta) (98) y, por otra, la observación de que la somatotropa aumenta la expresión del gen de leptina en tejido adiposo, sugiere que esta última podría actuar como mediador de la reducción de la ingesta en los animales en estudio, como se ha señalado en terneros en crecimiento tratados con GH (99).

Esta disminución en el aporte de nutrientes se hace crítica durante el destete, puesto que altera las profundas modificaciones metabólicas que se producen en este momento, e impide la puesta en marcha de la adaptación normal a la transición alimenticia del pre al postdestete. En este periodo se pasa de un estado de resistencia tisular a la insulina, que conduce a la disminución de la lipogénesis y al aumento de la glicólisis (100), en el que se ingiere una dieta láctea, rica en grasa y baja en carbohidratos, a un estado de mayor sensibilidad a la insulina, que facilita la adaptación a la nueva dieta, baja en grasa y alta en carbohidratos (dieta sólida) (101).

Por lo tanto, al igual que sucede en animales restringidos en alimentos (102), la insuficiencia de la ingesta para alcanzar el incremento en el gasto energético que supone el crecimiento, junto al estado de resistencia tisular a la insulina propio del predestete (101) (103) al que se añade posiblemente el efecto anti-insulínico de la GH (104), impide el depósito de sustratos y provoca un estado de subnutrición, caracterizado por una profunda pérdida de la masa grasa y sólo relativa de la masa proteica.

En consecuencia, a los 30 días de vida se produce una pérdida de peso corporal (12GH: $11,7 \pm 0,4$ g; 12S: $14,6 \pm 0,4$ g; 20GH: $12,0 \pm 0,4$ g; 20S: $13,0 \pm 0,4$ g) y muscular (12GH: 59 ± 2 mg; 12S: $75 \pm$

2 mg; 20GH: 64 ± 2 mg; 20S: 71 ± 2 mg), debido a la caída de la velocidad fraccional de crecimiento (12GH: $4,3 \pm 1,2\%/día$; 12S: $8,4 \pm 1,3 \%/día$; 20GH: $2,9 \pm 1,4\%/día$; 20S: $6,2 \pm 1\%/día$), lo que genera la disminución de los componentes corporales, aunque en diferente medida según el grupo dietario considerado. Así, mientras los animales sometidos a la dieta del 12% de proteína, pierden agua (13%), proteína (14%), cenizas (9%) y grasa (27%), los animales mejor nutridos sólo pierden grasa (30%), al disminuir la tasa de acreción lipídica (20GH: $0,019 \pm 0,004$ g/día; 20S: $0,028 \pm 0,002$ g/día) (93).

Ello da lugar a la modificación de la forma del crecimiento, al reducirse la proporción en la que los distintos sustratos contribuyen al peso corporal. En especial, la masa grasa decrece entre los 10 y los 14 g de peso corporal en el grupo 12GH y entre los 10 y 21 g de peso en el grupo 20GH, en relación con los controles, según se deduce de la relación alométrica entre la masa grasa *versus* el peso corporal (Figura 2).

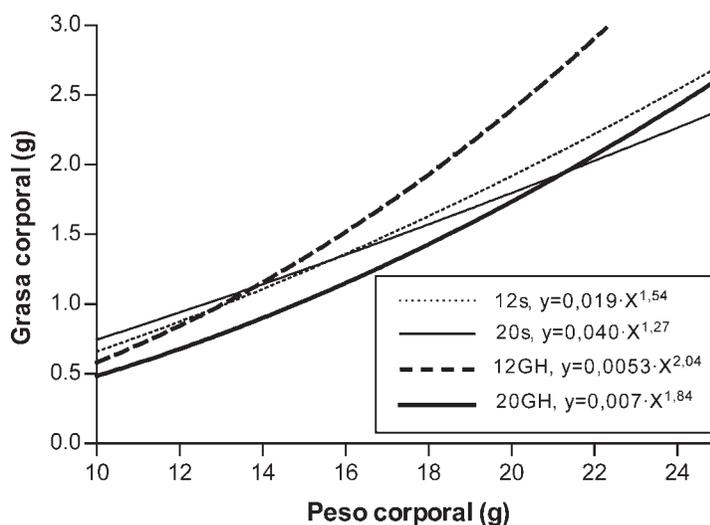


FIGURA 2. Relación alométrica entre la grasa corporal *versus* peso corporal de ratones BALB/c machos rhGH-tratados (GH) y controles (s), alimentados con dietas del 12% y 20% de proteína entre los 21 y 50 días de vida. La contribución de la grasa al peso corporal es menor que en animales controles entre 10 y 14 g de peso (grupo 12GH) y entre 10 y 21 g (grupo 20GH). La contribución se hace positiva en periodos posteriores del crecimiento. La mayor contribución de la grasa al peso corporal se produce en el grupo 12GH.

Por otra parte, mientras la ineficaz utilización de la energía y la proteína en el depósito magro conlleva la pérdida irreparable de la proteína corporal en el grupo GH-tratado y alimentado con un nivel medio de proteína (12GH) (105) (106) (107), la proteína muscular se conserva en estos animales peor nutridos a día 30 de vida, debido al mantenimiento de la capacidad de síntesis proteica (ARN/proteína: 12GH: $11,6 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{mg}$; 12S: $11,1 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{mg}$) (Figura 3) a nivel control y a la disminución de la degradación de la proteína, puesta de manifiesto por el descenso de la actividad del enzima catepsina D (12GH: $43,4 \pm 0,3 \pm \text{mUI}/\text{mg}$ proteína; 12S: $90,1 \pm 2 \text{mUI}/\text{mg}$ proteína) (Figura 4), lo que conduce al aumento de la masa proteica en la fibra muscular (Proteína/ADN: 12GH: $92,3 \pm 3,0 \text{mg}/\text{mg}$; 12S: $103,9 \pm 1,1 \text{mg}/\text{mg}$) (Figura 5), que se acompaña de una hipoplasia irreversible por pérdida del ADN (109) (7), no compensada por la acción proliferativa de la GH (8).

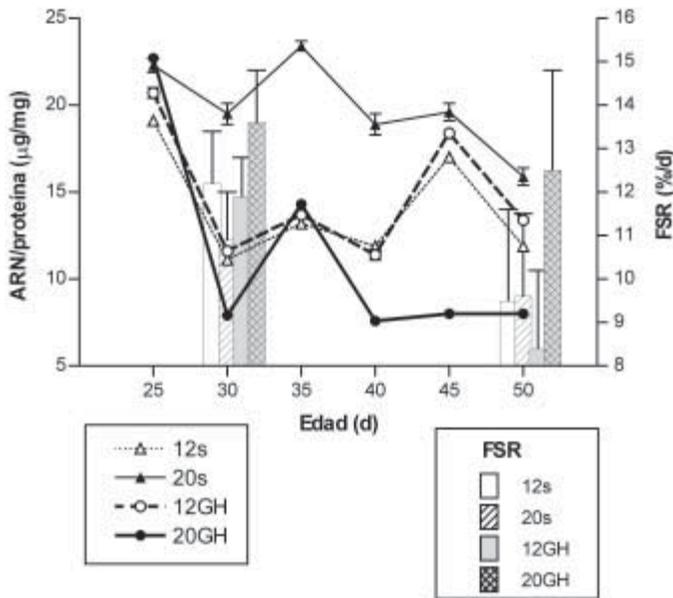


FIGURA 3. Cambios de la capacidad de síntesis proteica (ARN/proteína) y de la tasa fraccional de síntesis proteica (FSR) en músculo gastrocnemio de ratones BALB/c machos rhGH-tratados (GH) y controles (s), alimentados con dietas del 12 y 20% de proteína entre los 21 y 50 días de vida. El grupo 12GH pierde proteína corporal por falta de sustrato, aunque se eleva la capacidad de síntesis proteica muscular (ARN/proteína), mientras que el grupo 20GH incrementa la proteína corporal y muscular por un aumento continuado de la tasa fraccional de síntesis proteica.

Los animales bien nutridos (20GH), por su parte, presentan una mayor protección sobre este sustrato, puesto que la masa magra corporal se conserva (20GH: $2,02 \pm 0,05$ g; 20S: $1,88 \pm 0,06$ g) y la proteína del músculo gastrocnemio aumenta en esta primera etapa de la respuesta debido al incremento del recambio proteico. Así, se produce la mejora de la tasa fraccional de síntesis proteica (FSR) (20GH: $13,6 \pm 1,2\%/día$; 20S: $10,9 \pm 1,1\%/día$) (Figura 3) que, no obstante, el incremento de la capacidad degradativa de la catepsina D (20GH: $75,6 \pm 0,6$ mUI/mg proteína; 20S: $34,0 \pm 0,6$ mUI/mg proteína) (Figura 4), facilita la elevación de la tasa fraccional de acreción proteica (20GH: $2,34 \pm 0,12\%/día$; 20S: $1,98 \pm 0,16\%/día$) y la aparición de un mecanismo de hipertrofia compensadora (108), un 18% superior a la del grupo 12GH, al aumentar el tamaño de los miocitos (Proteína/ADN: 20GH: $80,2 \pm 0,5$ mg/mg; 20S: $61,5 \pm 0,4$ mg/mg) (Figura 5).

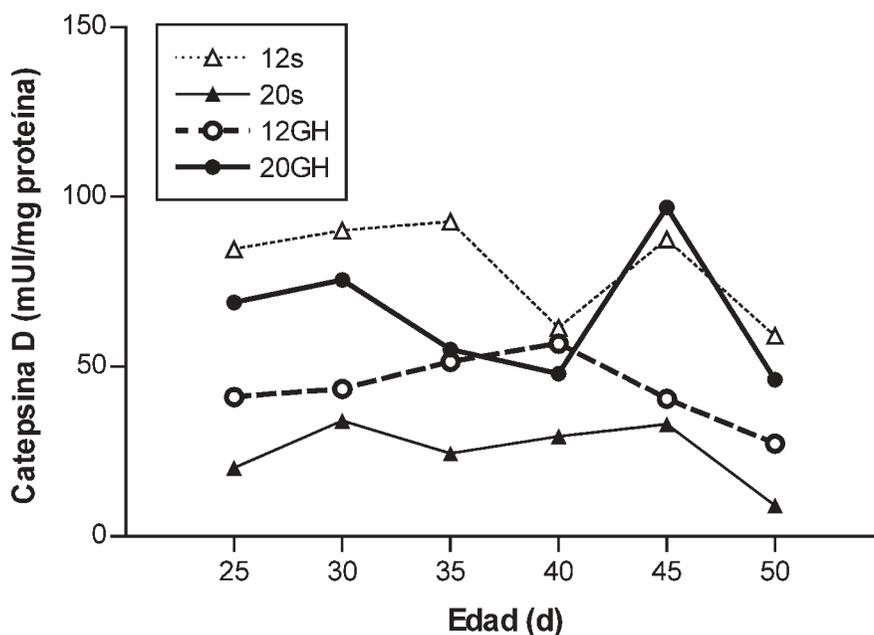


FIGURA 4. Modificación de la actividad proteolítica del enzima catepsina D en músculo gastrocnemio de ratones BALB/c machos rhGH-tratados (GH) y controles (s), alimentados con dietas del 12 y 20% de proteína entre los 21 y 50 días de vida. La administración de GH disminuye la actividad catepsina en el grupo 12GH y la incrementa en el grupo 20GH respecto a los controles.

Por lo tanto, la falta de nutrientes desencadenada en ratones BALB/c entre los 21 y los 30 días de vida, por el tratamiento con rhGH en el momento crítico de adaptación a la alimentación sólida característica del destete, induce un retraso en el crecimiento, cuya gravedad es inversamente proporcional a la concentración proteica de la dieta. Este efecto es similar al fenómeno de «weaning growth check» descrito en cerdos destetados bruscamente (110), en los que la caída de la ingesta de alimentos produce una subnutrición temporal con un efecto deletéreo sobre la función de crecimiento que les obliga a importantes ajustes metabólicos y endocrinos.

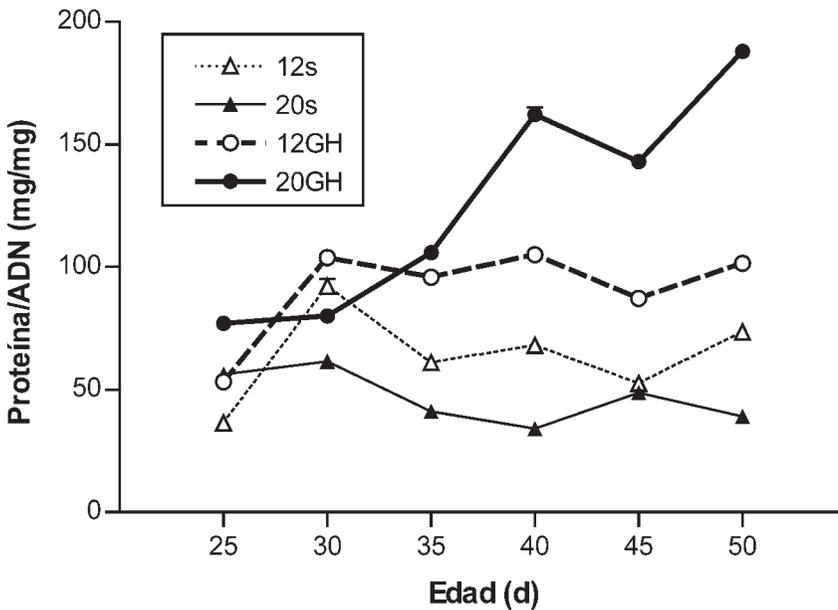


FIGURA 5. Evolución del tamaño celular (Proteína/ADN) del músculo gastrocnemio de ratones BALB/c machos rhGH-tratados (GH) y controles (s) alimentados con dietas del 12 y 20% de proteína entre los 21 y 50 días de vida. Se produce un mecanismo de hipertrofia compensadora a partir del día 30, en especial en el grupo 20GH.

Segunda etapa de la respuesta a rhGH

A partir de los 35 y hasta los 50 días de vida, los animales bien nutridos rhGH-tratados, recuperan la función de crecimiento hasta

alcanzar y superar (9%) los valores control, y lo consiguen a consecuencia de la acción aditiva del aumento autorregulado de la ingesta voluntaria de alimentos (93) (107), por una parte, y de la actividad anabólica proteica de la GH por otro, puesto que el efecto de la realimentación sólo puede explicar el 75% de la recuperación del crecimiento (111).

El incremento de la ingesta es fundamental para la recuperación y podría estar mediado por un descenso en los niveles plasmáticos de leptina. Esta hormona señalaría a nivel hipotalámico la depleción de la masa grasa, coordinando la redistribución de la energía hacia funciones esenciales como el crecimiento (112) (113), al igual que se produce en estados de subnutrición y ayuno tanto en el hombre (114), como en los roedores (115) (116). También este fenómeno podría atribuirse a la acción directa de la propia somatotropa, pues-

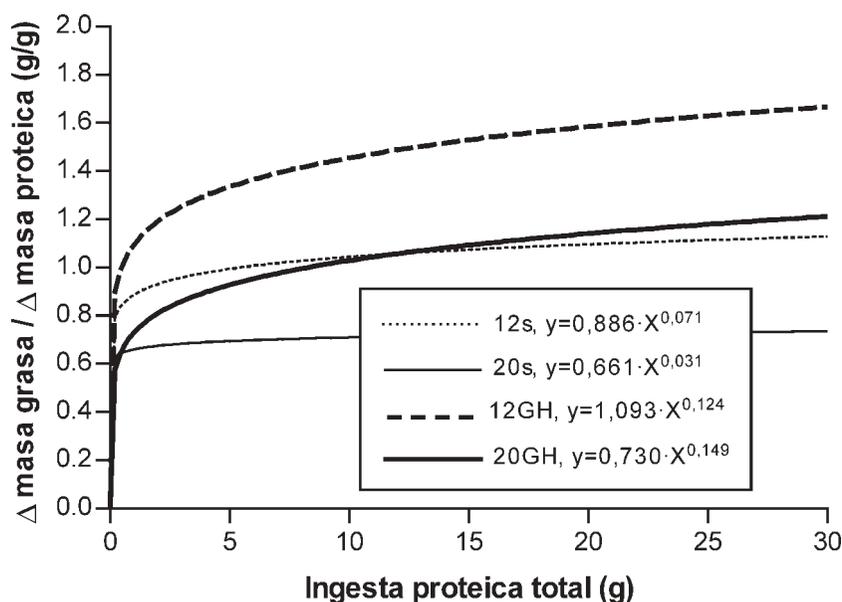


FIGURA 6. Relación potencial entre la razón incremento masa grasa/incremento masa proteica (Δ masa grasa/ Δ masa proteica) versus ingesta proteica total de ratones BALB/c machos rhGH-tratados (GH) y controles (s), alimentados con dietas del 12 y 20% de proteína entre los 21 y 50 días de vida. El tratamiento con rhGH induce, durante la recuperación del crecimiento, una alteración en el reparto de sustratos al dirigir la ingesta proteica a un mayor depósito grasa respecto al proteico, en especial en los animales 12GH.

to que según Etherton y Bauman (52), la administración de GH a animales en balance de nitrógeno negativo incrementa la ingesta de alimentos para soportar el aumento de la demanda metabólica generado por el tratamiento.

La mejora del crecimiento que se manifiesta en el aumento de los depósitos corporales (117) de los animales bien nutridos (20GH), se produce sin embargo de forma anómala, al utilizar con mayor eficacia la energía y la proteína de la dieta en el depósito de ambos depósitos, magro y graso (108) (118), mediante la aceleración de las tasas de acreción proteica y especialmente de la lipídica (119). Esto se contrapone con la acción de la GH exógena, puesto que su administración a animales malnutridos y realimentados mejora la utilización de la energía en la acreción proteica, mientras disminuye el depósito graso (5) (6).

Esta forma de crecimiento, que es típica del crecimiento compensador que sigue a la realimentación después de subnutrición (120) (121), da lugar a una mayor tendencia al acúmulo de la masa grasa frente a la masa proteica, en función del incremento de la ingesta de proteína de la dieta (Figura 6) (122), generando una mayor contribución de la grasa al peso corporal, como se comprueba en la relación alométrica de estos parámetros (Figura 2).

El aumento de la ingesta parece interferir pues, el efecto normal de la hormona sobre el reparto de sustratos, generando un posible mecanismo de resistencia del tejido adiposo a la GH, como se ha observado tanto en ratas subnutridas y realimentadas con una dieta enriquecida y tratadas con GH, las cuales ganan más grasa que las controles (7), como en terneros alimentados con una ingesta alta en energía, en los que se suprime el efecto lipolítico de la hormona (77). Este efecto se ha relacionado con la disminución del número de receptores de GH en los adipocitos, puesto que su expresión disminuye en tejido adiposo y aumenta en hígado y músculo esquelético, en cerdos GH-tratados y alimentados con una dieta alta en proteína (56).

Sin embargo, el estado de resistencia a la GH no parece tener efecto sobre la masa magra, puesto que la acción aditiva —mayor consumo de nutrientes-somatotropa— favorece una mejor utilización de la ingesta hacia el depósito magro y la acreción de la proteína en estos animales bien nutridos (122). Así, el crecimiento celular del músculo

gastrocnemio se acelera y prosigue el aumento, ya iniciado durante la primera fase de la respuesta, del tamaño de las miofibras (380%) por hipertrofia compensadora (Proteína/ADN: 20GH: $188 \pm 1,8$ mg/mg; 20S: $39,0 \pm 0,8$ mg/mg) (Figura 5) (108), al continuar acelerado el recambio proteico (109). Así, se produce un incremento simultáneo de la tasa fraccional de síntesis proteica muscular (20GH: $12,5 \pm 2,3\%$ /día; 20S: $9,60 \pm 1,9$) (Figura 3) y de la actividad del enzima proteolítica catepsina D (20GH: $46,2 \pm 0,4$ mUI/mg proteína; 12GH: $9,1 \pm 0,3$ mUI/mg proteína) (Figura 4), que permite el depósito de la proteína muscular. Ello sugiere la existencia de un elevado potencial de crecimiento celular (26), en estos animales bien nutridos y tratados con rhGH entre los 35 y 50 días de vida, y señala que la capacidad anabólica de la GH permite una recuperación del crecimiento, mayor de la que podría esperarse del crecimiento compensador propiamente dicho, el cual origina una pobre recuperación de la masa magra (123), que se eleva si el aporte nutritivo es el óptimo (95). En este sentido, se ha señalado en ratas subnutridas y tratadas con GH (7), que la combinación GH-dieta control aumenta la tasa del factor IGF-I y el contenido de la proteína muscular, en los primeros 16 días de recuperación del crecimiento.

Por otra parte, el hecho de que los animales peor nutridos (12% proteína) no recuperen la función de crecimiento en esta segunda fase de la respuesta a la GH, se debe, en primer término, a su incapacidad para autorregular su ingesta y desarrollar hiperfagia, en claro contraste con el resto de los grupos, por lo que reciben un menor aporte de energía y proteína (Figura 1) (106). Por ello, en estos animales 12GH sigue disminuyendo la eficacia de utilización de los nutrientes en el depósito de la proteína corporal (107) (122) por falta de sustrato, lo que impide la recuperación del crecimiento (106), aunque se incrementa el tamaño celular del músculo gastrocnemio (40%) al mantenerse la tasa fraccional de síntesis proteica (12GH: $8,4 \pm 2,6\%$ /día; 12S: $9,5 \pm 2,1\%$ /día) (Figura 3), por aumentar la capacidad de síntesis (ARN/proteína: 12GH: $13,4 \pm 0,2$ μ g/mg; 12S: $11,9 \pm 0,1$ μ g/mg) y disminuir la actividad degradativa de la catepsina D (12GH: $27,3 \pm 0,1$ mUI/mg proteína; 12S: $59,1 \pm 0,6$ mUI/mg proteína) (Figura 4). Ello indica un mejor protección de la proteína muscular respecto a la corporal, pero nunca a nivel del grupo 20GH, lo que evidencia que la acción anabólica de la

somatotropa necesita un nivel adecuado de proteína en la dieta para ser efectiva en las condiciones experimentales, puesto que la administración continua o intermitente de GH (124), no revierte la disminución del factor IGF-I y la afinidad de la GH por su receptor hepático, provocada por la deficiencia en proteínas. Este efecto podría estar asociado a un fenómeno de homo-dimerización del receptor de GH, lo que conduciría a una baja producción de IGF-I y por lo tanto a una reducción de su acción mediadora de la hormona (125). No obstante, en ratas malnutridas y tratadas con rhGH, Sánchez Gómez y col. (69) observan que la capacidad del factor IGF-I para poder incrementar el balance de nitrógeno, pero no la de la hormona GH, es dependiente de una alta ingesta proteica, lo que sugiere una regulación diferencial de la proteína de la dieta sobre los componentes del eje GH-IGF-I.

La menor concentración proteica de la dieta intensifica, además, la anomalía en la redirección de los sustratos hacia una mayor ganancia grasa respecto de la proteica (122) (Figuras 2 y 6), alcanzando el mayor índice grasa/proteína de todos los grupos (117), posiblemente a través del incremento del estado de resistencia del tejido adiposo a la GH (126).

Por otra parte, el aumento de adiposidad que caracteriza la recuperación ponderal de los animales GH-tratados, independientemente del nivel de proteína ingerida, podría estar asociado a un efecto de feminización de la composición corporal, provocada por la alteración en la forma de liberación de la GH endógena y generada por la pauta de administración de rhGH (127). En este sentido, ratones BALB/c hembras bien nutridas y tratadas con rhGH, presentan un depósito proteico un 34% superior al obtenido por los machos y éstos, a su vez, acumulan un 91% más grasa que las hembras (128), invirtiendo así la inherente capacidad de los sexos en la distribución de sustratos.

De todo lo expuesto se derivan varias conclusiones: 1) que el momento fisiológico y metabólico del destete condiciona la respuesta a la administración exógena de GH; 2) que el desarrollo de la hiperfagia autorregulada es fundamental para lograr la recuperación del crecimiento en la segunda fase de la respuesta, y 3) que la acción lipolítica de la GH sobre el tejido adiposo se ve comprometida, dando lugar a un crecimiento de carácter compensador.

Por todo ello y a fin de poder comprender los mecanismos por los que se produce esta respuesta, el objeto fundamental de nuestra investigación en la actualidad se centra en de los siguientes puntos: a) estudiar la posible mediación de la leptina en las modificaciones de la ingesta de alimentos; b) comprobar el papel determinado por el eje GH-IGF-I en el desarrollo del crecimiento compensador, que caracteriza la segunda fase de la respuesta a la hormona, y c) investigar los mecanismos moleculares que median la acción de la hormona de crecimiento en cada una de las condiciones experimentales utilizadas.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) OKADA, S. y KOPCHICK, J.J. (2001) Biological effects of growth hormone and its antagonist. *Trends Mol. Med.* 7, 5: 126-132.
- (2) KAMEL, A.; NERGREN, S.; ELMAN, A.; DANIELSON, P.; MARENS, C. (2000) Effects of growth hormone treatment in obese prepuberal boys. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 85: 1412-1419.
- (3) ETHEERTON, T.D. (2000) The biology of somatotropin in adipose tissue growth and nutrient partitioning. *J. Nutr.* 130: 2623-2625.
- (4) BATES P.C.; LOUGHNA, P.T.; PELL, J.M.; SCHULSTER, D.; MILLWARD, D.J. (1993) Interactions between growth hormone and nutrition in hypophysectomized rats, body composition and production of insulin-like growth factor I. *J. Endocrinol.* 139: 117-126.
- (5) ZHAO, X.; UNTERMAN, T.G.; DONOVAN, S.M. (1995) Human growth hormone but not human insulin-like growth factor I enhances recovery from neonatal malnutrition in rats. *J. Nutr.* 125: 1316-1327.
- (6) ZHAO, X. y DONOVAN, S.M. (1995) Combined growth hormone and insulin-like growth factor I treatment is more effective than GH or IGF-I alone at enhancing recovery from neonatal malnutrition in rats. *J. Nutr.* 125: 2773-2776.
- (7) GAUTSCH, T.C.; KANDL, M.; DONOVAN, S.M.; LAYMAN, D.K. (1999) Growth hormone promotes somatic and skeletal muscle growth recovery in rats following chronic protein-energy malnutrition. *J. Nutr.* 129: 828-837.
- (8) SOLOMON, M.G.; CAPERNA, T.J.; MROZ, R.J.; STEELE, N.C. (1994) Influence of dietary protein and recombinant porcine somatotropin administration in young pigs. III. Muscle fiber morphology and shear force, *J. Anim. Sci.* 72: 615-621.
- (9) MCLAREN, D.P.G.; BECHTEL, P.J.; GREBNER, G.L.; NOVAKOFSKI, J.; MCKEITH, F.K.; JONES, R.W.; DALRYMPLE, R.M.; EASTER, R.A. (1990) Dose response in growth of pigs injected daily with porcine somatotropin from 57 to 103 Kg. *J. Anim. Sci.* 68: 640-647.
- (10) KANIS, E.; NIEUWHOF, G.J.; DEGREEF, K.H.; VAN DER HEL, W.; VERSTEGEN, M.W.; HUISMAN, J.; VAN DER WAL, P. (1990) Effect of recombinant porcine somato-

- tropin on growth and carcass quality in growing pigs: interactions with genotype, gender and slaughter weight. *J. Anim. Sci.* 68: 1193-1200.
- (11) BARK, L.I.; STAHLY, T.S.; CROMWELL, G.L. (1989) Influence of genetic capacity for lean tissue growth on responses of pigs to recombinant somatotropin. *J. Anim. Sci.* 67 (Suppl. 1): 212 (Abstr.).
 - (12) NEWCOMB, M.D.; VAN KEMPEN, T.; BECHTEL, P.J.; MCKERTH, F.K.; NOVAKOFSKI, J.; EASTER, R.A.; DALRYMPLE, R.H. (1990) Response of finishing pigs treated with porcine somatotropin (pST) to hyperalimentation. *J. Anim. Sci.* 68 (suppl 1): 385 (abstr).
 - (13) GOLDSPIK, D.F. y GOLDBERG, A.L. (1975) Influence of pituitary growth hormone on DNA synthesis in rat tissues. *Am. J. Physiol.* 228: 302-309.
 - (14) HAUSMAN, G.J.; HENTGES, E.J.; THOMAS, G.B. (1987) Differentiation of adipose tissue and muscle in hypophysectomized pig fetuses. *J. Anim. Sci.* 64: 1255-1258.
 - (15) MCCUSKER, R. y CAMPION, D. (1986) Effect of growth hormone-secreting tumors on body composition and feed intake in young female Wistar-Furth rats. *J. Anim. Sci.*: 1126-1132.
 - (16) ULMAN, M. y OLDFORS, A. (1989) Effects of growth hormone on skeletal muscle. I Studies on normal adult rats. *Acta Physiol. Scand.* 135: 531-536.
 - (17) CAMPION, D.R.; MCCUSKER, R.H.; RICHARDSON, R.L. (1987) Ultrastructure of muscle satellite cells in hypersomatotrophic rats. *Acta Anat.* 128: 67-70.
 - (18) KOSTYO, J.L. (1968) Rapid effects of growth hormone on aminoacid transport and protein synthesis. *Ann. NY. Acad. Sci.* 148: 389-407.
 - (19) BOISCLAIR, Y.R.; BAUMAN, D.E.; BELL, A.W.; DUNSHEA, F.R.; HARKINS, M. (1994) Nutrient utilization and protein turnover in the hindlimb of cattle treated with bovine somatotropin. *J. Nutr.* 124: 664-673.
 - (20) FRYBURG, D.A. y BARRET, E.J. (1993) Growth hormone acutely stimulates skeletal muscle but not whole-body protein synthesis in humans. *Metabolism.* 42: 1223-1227.
 - (21) WOLF, R.F.; HESLIN, M.J.; NEWMAN, E.; PEARLSTONE, D.B.; GONENNE, A.; BRENNAN, M.F. (1992) Growth hormone and insulin combine to improve whole-body and skeletal muscle protein kinetics. *Surgery.* 112: 284-291.
 - (22) CHUNG, E.S.; ETHERTON, T.D.; WIGGINS, J.P. (1985) Stimulation of swine growth by porcine growth hormone. *J. Anim. Sci.* 60: 118-130.
 - (23) RUSSELL-JONES, D.L.; WEISBERGER, A.J.; BOWES, S.B.; KELLY, J.M.; THOMASON, M. (1993) The effects of growth hormone on protein metabolism in adult growth hormone deficient patients. *Clin. Endocrinol.* 38: 427-431.
 - (24) WESTER, T.J.; DAVIS, T.A.; FIOROTTO, M.L.; BURRIN, D.G. (1998) Exogenous growth hormone stimulates somatotrophic axis function and growth in neonatal pigs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 274: E29-E37.
 - (25) VANN, R.C.; NGUYEN, H.V.; REEDS, P.J.; STEELE, N.C.; DEEVER, D.R.; DAVIS, T. A. (2000b) Somatotropin increases protein balance independent of insulin's effects on protein metabolism in growing pigs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279: E1-E10.
 - (26) VANN, R.C.; NGUYEN, H.V.; REEDS P.J.; BURRIN, D.G.; FIOROTTO, M.L.; STEELE, N.C.; DEEVER, D.R.; DAVIS, T.A. (2000a) Somatotropin increases protein ba-

- lance by lowering body protein degradation in fed growing pigs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278: E477-E483.
- (27) NØRRELUND, H.; NAIR, K.S.; JØRGESEN, J.O.L.; CHRISTIANSEN, J.S.; MØLLER, N. (2001) The protein-retaining effects of growth hormone during fasting involve inhibition of muscle-protein breakdown. *Diabetes*. 50: 96-104.
- (28) SÈVE, B.; BALLEVRE, O.; NOBLET, J.; PRUGNAUD, J.; OBLÉD, C. (1993) Recombinant porcine somatotropin and dietary protein enhance protein synthesis in growing pigs. *J. Nutr.* 123: 529-540.
- (29) BATES, P.C. y PELL, J.M. (1991) Action and interaction of growth hormone and the β -agonist clenbuterol on growth, body composition and protein turnover in dwarf mice. *Br. J. Nutr.* 65: 115-129.
- (30) CARTER-SU, C.; SCHWARTZ, J.; SMITH, L.S. (1996) Molecular mechanism of growth hormone action. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 187-207.
- (31) DAUGHADAY, W.H. (1997) From sulphation factor to IGF-I, 40 years of research on the regulation of cartilage growth. In: TAKANO, K.; HIZUKA, N.; TAKAHASHI, S. (ed). The 4th International Symposium on Insulin-like growth factors. Elsevier. Tokyo. Japan.
- (32) DAUGHADAY, W.H.; HALL, K.; RABEN, M.S.; SALMON, JR. W.D.; BRANDE, J.L. WYK, J.J. (1972) Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 235: 107-109.
- (33) ISAKSSON, O.G.; LINDAHL, A.; NILSSON, A.; ISGAARD, J. (1987) Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. *Endocr. Rev.* 8: 426-438.
- (34) LI, H.; BARTOLD, P.M.; ZHANG, C.Z.; CLARKSON, R.W.; YOUNG, W.G.; WATERS, M.J. (1998) Growth hormone and insulin growth factor I induce bone morphogenetic proteins 2 and 4: a mediator role in bone and tooth formation? *Endocrinology*, 139: 3855-3862.
- (35) BILLESTRUP, N. y NIELSEN, J.H. (1991) The stimulatory effect of growth hormone, prolactin, and placental lactogen on β -cell proliferation is not mediated by insulin-like growth factor -I. *Endocrinology* 129: 883-88.
- (36) SJÖGREN, K.; LIU, J.L.; BLAD, K.; SKRTIC, S.; VIDAL, O.; WALLENIUS, V.; LEROITH, D.; TORNELL, J.; ISAKSSON, O.G.P.; JANSSON, J.O.; OHLSSON, C. (1999) Liver-derived insulin-like growth factor-I is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 7088-7092.
- (37) YAKAR, S.; LIU, J.L.; STANNARD, B.; BUTLER, A.; ACCILI, D.; SAUER, B.; LEROITH, D. (1999) Normal growth and development in absence of hepatic insulin-like growth factor-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 7324-7329.
- (38) LIU, J.L. y LEROITH, D. (1999) Insulin-like growth factor I is essential for postnatal growth in response to growth hormone. *Endocrinology*, 140: 5178-5184.
- (39) LEROITH, D.; BONDY, C.; YAKAR, S.; LIU, J.L.; BUTLER, A. (2001) The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr. Rev.* 22: 53-74.
- (40) FLINT, D.J. y GARDNER, M.J. (1993) Influence of growth hormone deficiency on growth and body composition in rats: site-specific effects upon adipose tissue development. *J. Endocrinol.* 137: 202-211.

- (41) DORIS, R.; VERNON, R.G.; HOUSLEY, M.D.; KILGOUR, E. (1994) Growth hormone decreases the response to anti-lipolytic agents and decreases the levels of G¹² in rat adipocytes. *Biochem. J.* 297: 41-45.
- (42) MARCUS, C.; MARGERY, V.; KAMEL, A.; BRÖNNEGARD, M. (1994) Effect of growth hormone on lipolysis in humans. *Acta. Pediatric. (Suppl.)* 406: 54-58.
- (43) WATT, P.W.; FINLEY, E.; CORK, S.; CLEGG, R.A.; VERNON, R.G. (1991) Chronic control of the β and α adrenergic systems of sheep adipose tissue by growth hormone and insulin. *Biochem. J.* 273: 39-42.
- (44) DIETZ, J. y SCHWARTZ, J. (1991) Growth hormone alters lipolysis and hormone-sensitive lipase activity in 3T3-F442A adipocytes. *Metabolism.* 40: 800-806.
- (45) RICHELSEN, B. (1997) Action of growth hormone in adipose tissue. *Horm. Res.* 48 (suppl 5): 105-110.
- (46) RICHELSEN, B.; PEDERSEN, S.B.; BØRGLUN, J.D.; JØRGENSEN, J.; JØRGENSEN, J.O.L. (1994) Growth hormone treatment of obese women for 5 wk: effect on body composition and adipose tissue LPL activity. *Am. J. Physiol.* 266: E211-E216.
- (47) OTTOSON, M.; VIKMAN-ADOLFSSON, K.; ENERBACK, S.; ELANDER, A.; BJÖRNTORP, P.; EDEN, S. (1995) Growth hormone inhibits lipoprotein-lipase activity in human adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 936-941.
- (48) O'HEA, E.K. y LEVILLE, G.A. (1969) Significance of adipose tissue and liver as sites of fatty acid synthesis in the pig and the efficiency of utilization of various substrates for lipogenesis. *J. Nutr.* 99: 338-344.
- (49) DUNSHEA, F.R.; HARRIS, D.M.; BAUMAN, D.E.; BOYD, R.D.; BELL, A.W. (1992) Effect of porcine somatotropin on in vivo glucose kinetics and lipogenesis in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 70: 141-151.
- (50) DONKIN, S.S.; McNALL, A.D.; SWENCKI, B.; PETERS, J.L. ETHERTON, T.D. (1996) The growth hormone-dependent decrease in hepatic fatty acid synthase mRNA is the result of a decrease in gene transcription. *J. Mol. Endocrinol.* 16: 151-158.
- (51) YIN, D.; CLARKE, S.D.; PETERS, J.L.; ETHERTON, T.D. (1995) Somatotropin-dependent decrease in fatty acid synthetase mRNA abundance in 3T3-F442A adipocytes is the result of a decrease in gene transcription and mRNA stability. *Biochem. J.* 331: 815-820.
- (52) ETHERTON, T.D. y BAUMAN, D. (1998) Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol. Rev.* 78, 3: 745-761.
- (53) WALTON, P.E. y ETHERTON, T.D. (1986) Stimulation of lipogenesis by insulin in swine adipose tissue: antagonism by porcine growth hormone. *J. Anim. Sci.* 62: 1584-1595.
- (54) ETHERTON, T.D.; LOUVEAU, I.; SORENSEN, M.T.; CHAUDHURI, S. (1993) Mechanisms by which somatotropin decreases adipose tissue growth. *Am. J. Clin. Nutr.* 58 (suppl), 2875-2955.
- (55) KLINDT, J.; YEN, J.T.; BUONOMO, F.C.; WISE, T. (1998) Growth, body composition and endocrine responses to chronic administration of insulin-like growth factor-I and (or) porcine growth hormone in pigs. *J. Anim. Sci.* 76: 2368-2381.

- (56) BRAMELD, J.M.; ATKINSON, J.L.; SAUNDERS, J.C.; PELL, J.M.; BUTTERY, P.J.; GILMOUR, R.S. (1996) Effects of growth hormone administration and dietary protein intake on insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor mRNA expression in porcine liver, skeletal muscle and adipose tissue. *J. Anim. Sci.* 74: 1832-1841.
- (57) VERNON, R.G. y FLINT, D.J. (1989) Role of growth hormone in the regulation of adipocyte growth function. In *Biotechnology in growth regulation*, pp. 57-71 Heap, R.B.; Prosser, C.G. Lamming, E E. ed. London. Butterworth.
- (58) THISSEN, J.P.; KETELSLEGER, J.M.; UNDERWOOD, L.E. (1994) Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr. Rev.* 15: 80-101.
- (59) HAREL, Z. y TANNENBAUM, G.S. (1993) Dietary protein restriction impairs both spontaneous and growth hormone-releasing factor stimulated growth hormone release in the rat. *Endocrinology.* 133: 1035-1043.
- (60) VILLARES, S.M.F.; GOUJON, L.; MANIAR, S.; DELEHAYE-ZERVAS, M.C.; MARTÍN, J.F.; KLEINCKNECHT, C.; POSTEL-VINAY, M.C. (1994) Reduced food intake is the main cause of low growth hormone receptor in uremic rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 106: 51-56.
- (61) KASSER, T.R.; MARTIN, R.J.; GAHAGAN, J.H.; WANGNESS, P.J. (1981) Fasting plasma hormones and metabolites in feral and domestic newborn pigs. *J. Anim. Sci.* 53: 420-426.
- (62) DAUNCEY, M.J.; BURTON, K.A.; WHITE, P.; HARRISON, A.P.; GILMOUR, R.S.; DUCHAMP, C.; CATTANEO, D. (1994) Nutritional regulation of growth hormone receptor gene expression. *FASEB J.* 8: 81-88.
- (63) MAITER, D.; MAES, M.; UNDERWOOD, L.E.; FLIESEN, T.; GERARD, G.; KETELSLEGGERS, J.M. (1988) Early changes in serum concentration of somatomedin-C induced by dietary protein deprivation in rats: contributions of growth hormone receptor and post-receptor defects. *J. Endocrinol.* 118: 113-120.
- (64) BUONOMO, F.C. y BAILE, C.A. (1991) Influence of nutritional deprivation on insulin-like growth factor I, somatotropin and metabolic hormones in swine. *J. Anim. Sci.* 69: 755-760.
- (65) THISSEN, J.P.; TRIEST, S.; MOATS-STAATS, B.M.; UNDERWOOD, L.E.; MAUERHOFF, T.; MAITER, D.; KETELSLEGGERS, J.M. (1991) Evidence that pretranslational and translational defects decrease serum insulin-like growth factor-I concentrations during protein-restriction. *Endocrinology* 129: 429-435.
- (66) VAN DER HAAR, M.; MOATS-STAATS, R.M.; DAVENPORT, M.L.; WALKER, J.L.; KETELSLEGGERS, J.M.; SHARMA, B.K.; UNDERWOOD, L.E. (1991) Reduced serum concentrations of insulin-like growth factor-I in protein-restricted growing rats are accompanied by reduced IGF-I mRNA levels in liver and skeletal muscle. *J. Endocrinol.* 130: 305-312.
- (67) THISSEN, J.P. y UNDERWOOD, L.E. (1992) Translational status of the insulin-like growth factor-I mRNAs in liver of protein-restricted rats. *J. Endocrinol.* 132: 141-147.
- (68) COMBES, S.; LOUVEAU, I.; BORISCAN, M. (1997) Moderate food restriction affects skeletal muscle and liver growth hormone receptors differently in pigs. *J. Nutr.* 127: 10, 1944-1949.

- (69) SÁNCHEZ-GÓMEZ, M.; MALMLÖF, K.; MEJÍA, W.; BERMÚDEZ, A.; OCHOA, M.T.; CARRASCO RODRÍGUEZ, S.; SKOTTNER, A. (1999) Insulin-like growth factor I, but not growth hormone, is dependent on a high protein intake to increase nitrogen balance in the rat. *Brit. J. Nutr.* 81: 145-152.
- (70) KETELSLEGGERS, J.M.; MAITER, D.; MAES, M.; UNDERWOOD, L.E.; THISSEN, J.P. (1996) Nutritional regulation of growth hormone and insulin-like growth factor-binding proteins. *Horm. Res.* 45: 252-257.
- (71) POSTEL-VINAY, M.C.; SAAB, CH.; GOURMELEIN, M. (1995) Nutritional status and growth hormone-binding protein. *Horm. Res.* 44: 177-181.
- (72) COUNTS, D.R.; GWIRTSMAN, H.; CARLSSON, L.M.S.; LESSEM, M.; CUTLER, G.B. JR. (1992) The effect of anorexia nervosa and refeeding on growth-hormone binding protein, the insulin-like growth factors (IGFs), and the IGF-I binding proteins *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75: 762-767.
- (73) HOCHBERG, Z.; HERTZ, P.; COLIN, V.; ISH-SHALOM, SYESHURUM, D.; YODIN, M.B.H.; AMIT, T. (1992) The distal axis of growth hormone (GH) in nutritional disorders: GH-binding protein insulin-like growth factor I (IGF-I), and IGF-I receptors in obesity and anorexia nervosa. *Metabolism.* 41: 106-112.
- (74) TSENG, L.Y.; OOI, G.T.; BROWN, A.L.; STRAUS, D.S.; RECHLER, M.M. (1992) Transcription of the insulin-like factor-binding protein-2-gene is increased in neonatal and fasted adults rat liver. *Mol. Endocrinol.* 6: 1195-1201.
- (75) WELLER, P.A.; DAUNCEY, M.J.; BATES, P.C.; BRAMELD, J.M.; BUTTERY, P.J.; GILMOUR, R.S. (1994) Regulation of porcine insulin-like growth factor I and growth hormone receptor mRNA expression by energy status. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 266: E776-E785.
- (76) HUA, K.M.; HODGKINSON, S.C.; BASS, J.J. (1995) Differential regulation of plasma levels of insulin-like growth factors I and II by nutrition, age and growth hormone treatment in sheep. *J. Endocrinol.* 147: 507-516.
- (77) DAWSON, J.M.; GREATHEAD, H.M.R.; CRAIGON, J.; HACHEY, D.L.; REEDS, P.J.; PELL, J.M.; BUTTERY, P.J. (1998) The interaction between nutritional status and growth hormone in young cattle: differential responsiveness of fat and protein metabolism. *Br. J. Nutr.* 79: 275-286.
- (78) CAMPBELL, R.G.; JOHNSON, R.G.; TAVERNER, M.R.; KING, R.H. (1991) Interrelationships between exogenous porcine somatotropin administration and dietary protein and energy intake on protein deposition capacity and energy metabolism of pig. *J. Anim. Sci.* 69: 1522-1531.
- (79) CAMPBELL, R.G.; JOHNSON, R.G.; TAVERNER, M.R.; MEISINGER, D. (1990) Interaction of dietary protein content and exogenous porcine growth hormone administration on protein and lipid accretion rates in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 68: 3217-3225.
- (80) GLUCKMAN, P.D.; GUAN, A.J.; WRAY, A. (1992) Congenital idiopathic growth hormone deficiency is associated with prenatal and early postnatal growth failure. *J. Pediatric.* 121: 920-923.
- (81) LARON, Z. (1984) Laron-type dwarfism (hereditary somatomedin deficiency). A review. *Ergebaisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde.* 51: 117-150.

- (82) DANILOVICH, N.; WERNING, D.; COSCHIGANO, K.T.; KOPCHICK, J.; BARTKÉ, A. (1999) Deficits in female reproductive function in GHR-KO mice: role of IGF-I. *Endocrinology*, 140: 2637-2640.
- (83) WATERS, M.J. y KAYE, P.L. (2002) The role of growth hormone in fetal development. *Growth hormone & IGF-I Res.* 12: 137-146.
- (84) PANTALEON, M.; WHITESIDE, E.J.; HARVEY, M.B.; BARNARD, R.T.; WATERS, M.V.; KAYE, P.L. (1997) Functional growth hormone (GH) receptors and GH are expressed by preimplantation mouse embryos: A role for GH in early embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 5125-5130.
- (85) IZADYAR, F.; VAN TOL, H.T.A.; HAGE, W.G.; BEVERS, M.M. (2000) Preimplantation bovine embryos express mRNA of GH receptor and respond to GH addition during in vitro development. *Mol. Reprod. Dev.* 57: 247-255.
- (86) KLEMPF, M.; BINGHAM, B.; BREIER, B.H.; BAUMBACH, W.R.; GLUCKMAN, P.D. (1993) Tissue distribution and ontogeny of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and ligand binding to hepatic tissue in the midgestation sheep fetus. *Endocrinology.* 132: 1071-1077.
- (87) SIMARD, M.; MANTHOS, H.; GIAID, A.; LEFEVRE, Y.; GOODYER, C.G. (1996) Ontogeny of GH receptors in human tissues: an immunohistochemical study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 3097-3102.
- (88) PARKS, J.S. (2001) The ontogeny of growth hormone sensitivity. *Horm. Res.* 55 (suppl 2): 27-31.
- (89) BELL, A.W.; BAUMAN, D.E.; BEERMANN, D.H.; HARRELL, R.J. (1998) Nutrition development and efficacy of growth modifiers in livestock species. *J. Nutr.* 128: 360S-363S.
- (90) BOYD, R.D.; BAUMAN, D.E.; FOX, G.; SCANES, C.G. (1991) Impact of metabolism modifiers on protein accretion and protein and energy requirements of livestock. *J. Anim.Sci.* 69, Suppl. 2; 56-75.
- (91) HARREL, R.J.; THOMAS, M.J.; BOYD, R.D.; CZERWINSKI, S.M.; STEELE, N.C.; BAUMANN, D.E. (1999) Ontogenic maturation of the somatotropin insulin-like growth factor axis. *J. Anim. Sci.* 77: 2934-2941.
- (92) DUNSHEA, F.R.; KING, R.H.; OWENS, P.C.; WALTON, P.E. (1999) Moderate doses of porcine somatotropin do not increase plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) or IGF binding protein 3. *Domest. Anim. Endocrinol.* 16 (3): 149-157.
- (93) AGIS-TORRES, A. (1994) Efectos de la administración exógena de rhGH sobre la ingesta, composición corporal y eficacia de depósito de sustratos en ratón BALB/c entre el destete y la pubertad. Influencia de su interacción con la edad, la dieta y el sexo. Tesis doctoral. U.C.M. Madrid.
- (94) LÓPEZ-OLIVA, M.E. (1994) Crecimiento celular y metabolismo proteico en músculo gastrocnemio de ratón BALB/c entre el destete y la pubertad, durante la respuesta bifásica a la administración exógena de rhGH. Influencia de la edad, la dieta y el sexo. Tesis doctoral. U.C.M. Madrid.
- (95) GLORE, S.R.; ORTH, V.L.; KNEHANS, A.W.; ERDMAN, J.W. (1993) Efficacy of dietary zinc supplementation on catch-up growth after protein-malnutrition. *J. Nutr. Biochem.* 4: 281-285.

- (96) VACCARINO, F.J.; KENNEDY, S.H.; RALEWSKI, E.P.; BLACK, R. (1994) The effects of growth hormone releasing factor on food consumption in anorexia nervosa patients and normal. *Biol. Psychiatry*. 35: 446-451.
- (97) CONSINDINE, R.V. y CARO, J.F. (1997) Leptin and the regulation of body weight. *Inter. J. Biochem. Cell Biol.* 29: 1255-1272.
- (98) FRIEDMAN, J.M. y HALAAS, J.L. (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770.
- (99) HOUSCKNECHT, K.L.; PORTOCARRERO, C.P.; LEMENAGER, R.; SPURLOCK, M.E. (2000). Growth hormone regulates leptin gene expression in bovine adipose tissue; correlation with adipose IGF-I expression. *J. Endocrinol.* 164, 51-57.
- (100) TERRETTAZ, J.; ASSIMACOPOULOS, J.F.; JEANRENAUD, B. (1986) Inhibition of hepatic glucose production in vivo in rats. Contribution of glycolysis. *Am. J. Physiol.* 250: E346-E351.
- (101) GIRARD, J.; FERRÉ, P.; PÉGORIER, J.P.; DUÉE, PH. (1992) Adaptation of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. *Physiol. Rev.* 72: 507-562.
- (102) BARBER, M.C.; CLEGG, R.A.; TRAVERS, M.T.; VERNON, R.G. (1997) Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochim. Biophys. Acta.* 1347: 101-126.
- (103) ISSAD, T.; COUPÉ, CH.; PASTOR-ANGLADA, M.; FERRÉ, P.; GIRARD, J. (1988) Development of insulin sensitivity at weaning in the rat. *Biochem. J.* 251: 685-690.
- (104) ROSENFELD, R.G.; WILTON, D.M.; DOLLAR, L.A.; BENNETT, A.; HINTZ, R.L. (1982) Both human pituitary growth hormone and recombinant DNA-derived human growth hormone cause insulin resistance at post-receptor site. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54, 1033-38.
- (105) LÓPEZ-OLIVA, M.E.; AGIS TORRES, A.; ÚNZAGA, M.T.; MUÑOZ-MARTÍNEZ, E. (1995) Age, protein level and sex as factors influencing gastrocnemius muscle growth in BALB/c mice from weaning to 50 days of age. *Can. J. Anim. Sci.* 75: 593-601.
- (106) LÓPEZ-OLIVA, M.E.; AGIS TORRES, A.; ÚNZAGA, M.T.; MUÑOZ-MARTÍNEZ, E. (1998) Effect of interaction of recombinant human hormone administration and age on gastrocnemius muscle growth in weaning mice fed a medium protein diet. *J. Physiol.* 509 P: 100 (abstr).
- (107) LÓPEZ-OLIVA, M.E.; AGIS TORRES, A.; ÚNZAGA, M.T.; MUÑOZ-MARTÍNEZ, E. (2000) Feed intake and protein skeletal muscle in growing mice treated with growth hormone: time course effects *J. Physiol. Biochem.* 56: 9-16.
- (108) LÓPEZ-OLIVA, M.E.; AGIS TORRES, A.; MUÑOZ-MARTÍNEZ, E. (2001) Growth hormone administration produces a biphasic cellular muscle growth in weaning mice *J. Physiol. Biochem* 57: 255-264.
- (109) LÓPEZ-OLIVA, M.E.; AGIS TORRES, A.; ÚNZAGA, M.T.; MUÑOZ-MARTÍNEZ, E. (1999) Growth hormone and dietary protein level changed nucleic acid and protein muscle growth patterns. *J. Physiol. Biochem.* 55: 281 (abstr).
- (110) LEDIVIDICH, J. y SÈVE, B. (2000) Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism and hormonal adjustments in the piglet. *Domest. Anim. Endocrinol.* 19: 63-74.

- (111) GLORE, S.R. y LAYMAN, D.K. (1987) Cellular development of skeletal muscle of rats during recovery from prolonged undernutrition. *J. Nutr.* 117: 1767-1774.
- (112) AHIMA, R.S.; KELLY, J.; ELMQUIST, J.K.; FLIER, J.S. (1999) Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. *Endocrinology* 140, 4923-4931.
- (113) BLOCK, S.S.; BUTLER, W.R.; EHRHARDT, R.A.; BELL, A.W.; VAN AMBURGH, M.E.; BOISCLAIR, Y.R. (2001) Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *J. Endocrinol.* 171: 339-348.
- (114) WATERS, M.; CONSINDINE, R.V.; VAN-GAAL, L.F. (2000) Human leptin from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur. J. Endocrinol.* 143: 293-311.
- (115) AHIMA, R.S.; PRABAKARAN, D.; MANTZOROS, C.; QU, D.; LOWELL, B.; MARATOS-FLIER, J.S. (1996) Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 382, 250-252.
- (116) BLACHE, D.; TELLAN, R.L.; CHAGAS, L.M.; BLACKBERRY, M.A.; VERCOE, P.E.; MARTIN, G.B. (2000) Level of nutrition affects leptin concentration in plasma and cerebrospinal fluid in sheep. *J. Endocrinol.* 165: 625-637.
- (117) AGIS-TORRES, A.; LÓPEZ-OLIVA, M.E.; ÚNZAGA, M.T.; MUÑOZ-MARTÍNEZ, E. (1996) Recombinant human growth hormone modifies the inherent partition of nutrients in growing female and male BALB/c mice. *Comp. Biochem. Physiol.* 115A, 4: 317-322.
- (118) AGIS-TORRES, A.; LÓPEZ-OLIVA, M.E.; ÚNZAGA, M.T.; MUÑOZ-MARTÍNEZ, E. (1999) rhGH administration induced a shift in the body fat gain/protein gain ratio towards body fat deposition in mice fed 12% or 20 protein diet. *Proc. Nutr. Soc.* 59: 121 (abstr).
- (119) AGIS-TORRES, A.; LÓPEZ-OLIVA, M.E.; ÚNZAGA, M.T.; MUÑOZ-MARTÍNEZ, E. (1997) Recombinant human growth hormone induces a biphasic response on growth performance in female and male BALB/c mice. *J. Physiol. Biochem.* 53 (abstr).
- (120) DULLOO, A.G. y GIRARDIER, L. (1992) Influence of dietary composition on energy expenditure during recovery of body weight in the rat: implications for catch-up growth and obesity relapse. *Metabolism* 41: 1336-1342.
- (121) HORNICK, J.L.; VAN EENAEME, C.; GÉRARD, O.; DUFRASNE, I.; ISTASSE, L. (2000) Mechanisms of reduced and compensatory growth. *Domest. Anim. Endocrinol.* 19: 121-132.
- (122) AGIS-TORRES, A.; LÓPEZ-OLIVA, M.E.; ÚNZAGA, M.T.; MUÑOZ-MARTÍNEZ, E. (2002) Body growth and substrate partitioning for fat and protein gain in weaned BALB/c mice treated with growth hormone. *Comp. Biochem. Physiol* 132A: 247-256.
- (123) MCLEAN, W.C. y GRAHAM, G.G. (1980) The effect of energy intake on nitrogen of weight gained by recovering malnourished infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 33: 903-909.
- (124) THISSEN, J.P.; TRIEST, S.; UNDERWOOD, L.E.; MAES, M.; KETELSLEGERS, J.M. (1990) Divergent responses of serum insulin-like growth factor-I and liver growth

- hormone (GH) receptors to exogenous GH in protein-restricted rats. *Endocrinology* 126: 908-913.
- (125) BREIER, B.H. y SAUERWEIN, H. (1995) Regulation of growth in ruminants by the somatotrophic axis. In: Ruminant: metabolism, growth and reproduction; pp. 451-474 (von Engelhardt., S. Leonhard-Mareck, G. Breves and D. Giesecke, ed.) Stuttgart. Germany, Verlag.
- (126) JAIN, S.; GOLDE, D.W.; BAILEY, R.; GEFFNER, J.H. (1998) Insulin-like growth factor-I resistance. *Endocr. Rev.* 19: 625-646.
- (127) JANSSON, J.O.; EDEN, S.; ISAKSSON, O.G.P. (1985) Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocr. Rev.* 6: 128-132.
- (128) AGIS-TORRES, A.; LÓPEZ-OLIVA, M.E.; UNZAGA, M.T.; MUÑOZ-MARTÍNEZ, E. (1995) Recombinant human growth hormone changes the intrinsic sex-effect differences on body composition in mice. *Proc. Soc. Nutr.* 54: 76 (abstr).

Aspectos físico-químicos de los contrastes radiológicos iodados y sus posibles reacciones secundarias *

ÁLVARO DOMÍNGUEZ GIL

Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es exponer un grupo de compuestos iodados con tres y seis átomos de yodo en su molécula que son derivados del ácido benzoico y son utilizados en Radiología como medios de contraste de gran interés clínico.

Se estudian sus constantes físico-químicas y las ventajas que presentan los contrastes no iónicos sobre los iónicos.

Se describen también los posibles efectos colaterales indeseables en un pequeño pero importante número de pacientes que pueden producirse por su inyección intravascular.

Palabras clave: Contraste iodado.— Iónico.— No iónico.— Ácido diatrizoico.— Iohexol.

ABSTRACT

Physical and chemical aspects of the iodine radiological contrasts and its possible secondary reactions

The aim of the present work is to expose a group of compounds with three and six atoms of iodine in its molecule, which is derived from the benzoic acid and are used in radiology as means of contrast of a great clinical interest.

* Discurso pronunciado en su toma de posesión como Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia el día 29 de mayo de 2003.

Physical and chemical constants are studied and also the advantages that the non ionic contrasts present over the ionic ones.

The possible undesirable collateral effects due to an intravenous injection are described in a small but important number of patients.

Key words: Iodine contrast.— Ionic.— No ionic.— Diatrizoic Acid.— Iohexol.

EXTENSIVE ABSTRACT

The aim of the radiological contrasts has the mission to visualize the internal structures of our organism that are not generally visible to the rays X for having a radiological density to the next tissues.

To avoid the toxicity of the free iodine, in the radiological compounds the iodine is joined to the ring benzoic, so the atom of iodine remains strongly joined to other atoms, being avoided its sensitive aggressiveness.

The most used organic compounds are acids with three or six atoms of iodine, being those that confer him the opacity. The density, viscosity, solubility and tolerance will depend on the radicals that have been incorporated.

Chemically, a benzoic ring constitutes all of them whose positions, 2, 4 and 6 have three atoms of iodine. In position 1, they have a group COOH partially responsible of the product's solubility. In positions 3 and 5, they have two radicals on which, it depend the toxicity and tolerance.

There are been studied of preference the acids Diatrizóic, Iotalámic and Metrizóic, as well as the acids Ioxaglic and Iocarmic among the ionic ones. Among those no ionics, the Metrizamida and the Iohexol.

The intravascular injection of the iodine contrasts mediums, especially the ionic ones due to their hyper tonicity, they can produce undesirable collateral effects in a small but important number of patients. When such reactions are serious, they constitute a risk for the patient and therefore to be able to predict them. Then, to know them and to treat is very important for the radiologists that carry out these explorations.

The possible secondary reactions are classified in three levels: Light, moderate and serious.

INTRODUCCIÓN

El objetivo de los contrastes radiológicos iodados tiene como misión visualizar estructuras internas de nuestro organismo que generalmente no son visibles a los rayos X por tener una densidad radiológica similar a los tejidos próximos.

Normalmente en la exploración radiológica sólo se diferencian bien aquellas estructuras que tienen muy distinta opacidad, tal sucede con los huesos (más opacos), o el tejido pulmonar (menos

opaco). Hay sin embargo una serie de órganos (corazón, riñón y cerebro) y de conductos (arterías, venas, tubo digestivo y uréteres) que no es posible observarlos de no ser rellenados con alguna sustancia de elevada opacidad a los rayos X, que nos ofrezca la imagen de la estructura o cavidad interior. La opacidad de un elemento es mayor cuanto más elevado sea su número atómico. Hay elementos como el plomo y el mercurio que tienen una elevada opacidad, pero son muy tóxicos y por lo tanto impiden su utilización.

Otros como el torio, es muy radiopaco, pero al ser radioactivo y no eliminarse, tampoco puede ser utilizado.

Existen, sin embargo, otros elementos que alcanzan una opacidad aceptable y tienen una tolerancia muy superior a los mencionados anteriormente. Son el bario y el yodo. Las soluciones hidrosolubles de bario tienen una elevada toxicidad, pero el sulfato de bario que no es hidrosoluble, permite preparar suspensiones estables no absorbibles para visualizar el tracto gastrointestinal, sin que aparezcan reacciones tóxicas, aunque debido a su baja sensibilidad (66%) limita sus indicaciones en favor de otros procedimientos diagnósticos como la endoscopia o la medicina nuclear. Con el yodo se pueden formar compuestos orgánicos de baja toxicidad, que se pueden administrar por vía parenteral a elevadas dosis permitiendo la visualización de la mayor parte de las estructuras de nuestro organismo.

Para evitar la toxicidad del yodo libre, en los compuestos radiológicos va unido al anillo bencénico, de modo que el átomo de yodo queda fuertemente unido a otros átomos, evitándose de esta manera su sensible agresividad. Los compuestos orgánicos más utilizados son ácidos con tres o seis átomos de yodo, siendo estos los que le confieren la opacidad. De los radicales que se incorporen dependerá la densidad, viscosidad, solubilidad y tolerancia. Entre las combinaciones de yodo orgánico conocidas existe un grupo de derivados yodados hidrosolubles que debido a su empleo en Radiología urinaria y vascular han tenido y siguen teniendo un extraordinario interés clínico.

Este grupo al cual nos referimos es el de los radiopacos utilizados para urografías, colecistografías y arteriografías cerebrales. Químicamente todos ellos están constituidos por un anillo bencénico en cuyas posiciones 2, 4 y 6 tienen tres átomos de yodo. En posición 1 tienen un grupo COOH responsable parcialmente de la solubilidad

del producto. En las posiciones 3 y 5 tienen dos radicales de los cuales dependerá su toxicidad y tolerancia (Figura 1).

El primer producto iodado utilizado por vía intravenosa fue el ioduro sódico en 1918 por **E. H. Weld**, antes había sido utilizado por vía uretral por **D. F. Cameron**. El producto no dio resultado por dar malas imágenes y por su toxicidad y su uso fue desechado.

El desarrollo de los ácidos benzoicos iodados como agentes de contraste opacos a los rayos X tiene sus inicios en la observación de **Swick** en 1933, de que la sal sódica del ácido o- iodo hipúrico (ácido 2 iodo benzamido acético) podría ser un excelente agente de contraste en urografía, si bien unos años antes y en colaboración con **Binz** y **Von Lichtenberg**, en Berlín (1919), había desarrollado derivados iodados de piridonas, uno de los cuales, la sal sódica del ácido 5 iodo 2 piridona N.acético fue comercializado bajo el nombre de **Uroselectan** (Figura 2). Sin embargo, fueron necesarios veinte años más hasta que, en colaboración con **Wallindford**, desarrollan en 1953 el primer agente de contraste para urografía derivado del ácido 2,4,6 triiodo benzoico, el ácido acetrizoico (Figura 3).

La introducción de un segundo grupo acetamido en el anillo bencénico del ácido acetrizoico condujo al ácido diatrizoico (1954), ácido 3,5 diacetilamino, 2,4,6 triiodo benzoico (Figura 4) que representó un importantísimo avance sobre aquél como agente urográfico y angiográfico.

Casi paralelamente (1955) con el ácido diatrizoico fue desarrollado el isómero, ácido iotalámico (Figura 5) y posteriormente en 1960 el ácido metrizoico, 2,4,6 triiodo, 3 metil acetamido benzoico (Figura 6). Estos tres últimos compuestos están conceptuados como los agentes de contraste standard, y siguen utilizándose masivamente en los departamentos de radiología.

Dada la absoluta insolubilidad en agua de estos ácidos benzoicos triiodados para su inyección intravascular en las diferentes técnicas radiográficas se utilizan en forma de sales. Estas sales han de presentar una elevada hidrosolubilidad (superior al 50%) junto con una escasa toxicidad y una adecuada viscosidad. Sin embargo, algunas de estas propiedades, que son deseables para estos agentes intravasculares, son incompatibles entre sí, por lo que en la mayor parte de los casos es necesario optar por soluciones de compromiso.

CONTRASTES IODADOS IÓNICOS

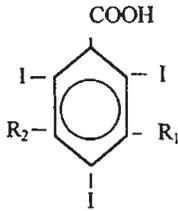


Figura 1

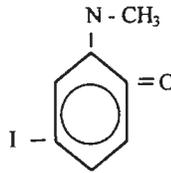


Figura 2. Selectan

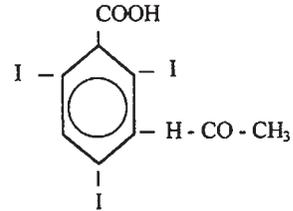


Figura 3. Acido acetrizoico

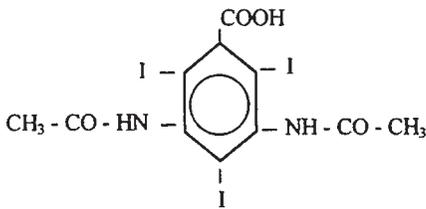


Figura 4. Acido diatrizoico

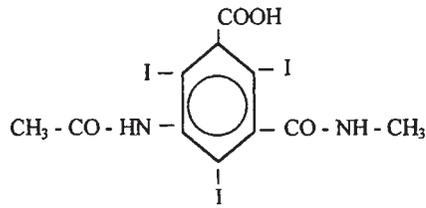


Figura 5. Acido iotalamico

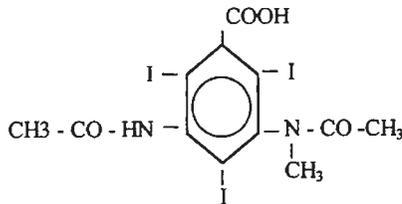


Figura 6. Acido metrizoico

Los factores que se consideran imprescindibles son la inercia farmacológica, que proporciona seguridad de uso, y la alta solubilidad de la sales. Solamente las sales sódica, metilglucamínica y cálcica de estos ácidos pueden proporcionar las altas concentraciones de iodo necesarias para producir la opacidad, pero su uso conduce necesariamente a soluciones muy hipertónicas, del orden de 1.500 a

2.000 mOs/Kg de agua, cuando la osmolaridad de la sangre, con la que va a entrar en contacto, es aproximadamente de 300. Esta elevada hipertonidad de las soluciones de medio de contraste es la responsable de gran parte de los efectos secundarios que se producen, y es una de las cuestiones a resolver por el farmacéutico preparador.

Un requisito, asimismo importante, es que el medio de contraste debe mostrar un alto grado de estabilidad química, es decir, que no libere yodo por degradación química o metabólica. Esta condición es cumplida por los compuestos del ácido diatrizoico y a ella se debe el éxito que tiene después de tantos años en la clínica.

En resumen, podemos concretar que el agente de contraste a los rayos X ideal deberá reunir las siguientes condiciones:

- Máxima opacidad a los rayos X.
- Inercia farmacológica.
- Estabilidad química.
- Efectos osmóticos mínimos.
- Rápida eliminación.
- Adecuada viscosidad.

Las soluciones acuosas de los contrastes clásicos de primera generación citados anteriormente, son generalmente bien tolerados por el paciente. En algunos casos pueden producirse efectos adversos que van desde náuseas, manifestaciones anafilácticas, hasta efectos cardiovasculares respiratorios y neurológicos, como veremos más adelante.

Las toxicidades experimental y clínica de estos compuestos se ha demostrado que están directamente relacionadas con los tres factores siguientes:

- Quimiotoxicidad del agente.
- Hipertonidad.
- Carga eléctrica.

La quimiotoxicidad depende de su estructura química, ésta juntamente con la hipertonidad, producen efectos aditivos indeseables, por lo que un medio de contraste intravascular mejorado debe tratar de obviar, dentro de lo posible, estas características, de forma

que la hipótesis de trabajo ha de consistir en la búsqueda de un contraste biológicamente inerte, entendiendo como tal que cumpla las siguientes condiciones:

- Baja presión osmótica, la más cercana posible al plasma.
- Marcado carácter hidrofílico para evitar su quimiotoxicidad.
- Ausencia de cargas eléctricas para no interferir en el balance electrolítico del cuerpo y con el tejido nervioso, es decir, el medio de contraste debe de ser no iónico.

Además de estas tres características integrantes de lo que hemos llamado inercia biológica, debe tener una adecuada viscosidad.

La viscosidad es uno de los factores determinantes de la toxicidad de los radiopacos yodados, ya que afecta al tiempo durante el cual un órgano o vaso está expuesto a los efectos del agente, también es determinante para la facilidad y rapidez de la administración del contraste. Una elevada viscosidad puede ser problemática, si se emplean catéteres de pequeño calibre interior. Como alta concentración y baja viscosidad están inversamente relacionadas, en muchos casos hay que llegar a situaciones intermedias.

La osmolaridad de las soluciones acuosas de los contrastes iónicos es directamente proporcional al número de partículas disueltas, cuanto menor sea este número, menor será la presión osmótica ejercida por la solución. La introducción en el organismo de una solución hiperosmolar produce un aumento de la osmolaridad plasmática con deshidratación intracelular y una perturbación de electrolitos de la sangre.

Las soluciones acuosas de las sales sódica y meglumínica de los ácidos benzoicos triiodados se disocian, dando un anión triiodado de gran tamaño y un catión no iodado, de forma que la relación de átomos de yodo/partículas totales en solución es 3/2.

Tanto el anión iodado como el catión contribuyen cada uno al 50% de la osmolaridad de la solución. Para reducir la presión osmótica es preciso disminuir el número de partículas disueltas, pero esta reducción no puede efectuarse eliminando el anión iodado, ya que éste es el responsable de la información radiológica. El problema se ha resuelto sintetizando compuestos no iónicos en los cuales la hi-

drosolubilidad necesaria se puede alcanzar mediante la conversión del grupo carboxilo del ácido benzoico en un grupo carboxamido y la introducción en el anillo bencénico de grupos hidrosolubles. De esta forma, en comparación con los compuestos iónicos y para aproximadamente el mismo peso molecular y contenido en yodo, un compuesto no iónico reduce en un 50% el número de partículas en solución la relación de átomos de yodo/partículas totales en solución es 3/1. Esta fue la idea básica de la que partieron **Almen** y colaboradores a principios de los años setenta y que tuvo como resultado el desarrollo del producto Metrizamida (Figura 9).

La carga iónica del medio de contraste es responsable de ciertas reacciones tóxicas, principalmente en coronariografías, neurografías y mielografías. La solución clínica en estos casos es el empleo de contrastes no iónicos.

En cuanto a la toxicidad (DL 50) de los contrastes clásicos, diatrizoico, metrizoico e iotalámico es baja. La DL 50 para el diatrizoico es de 10 gs/Kg de peso en ratón. La dosis utilizada en la clínica está muy por debajo de esta cifra, del orden de 0,2 gs/Kg de peso en las urografías y de 0,5-2 gs/Kg en las angiocardigrafías.

Además de los contrastes iónicos comentados anteriormente, se utilizan en la clínica el ácido ioxáglico (Figura 7), químicamente es un dímero monoácido que permite reducir la hipertonía de las soluciones de contraste, y el ácido iocármico (Figura 8), dímero dicarboxílico derivado del ácido iotalámico. En estos dos dímeros, al tener seis átomos de yodo en lugar de tres, se reduce la relación de partículas disociadas y átomos de yodo 2/6, reduciéndose la hipertonía.

Otro contraste iónico triiodado es el ácido iopanoico que se emplea para colecistografía por vía oral, debido a su alto peso molecular y ser capaz de unirse a las proteínas plasmáticas en proporción elevada. Se elimina sólo el 10% por el riñón y el 90% a través del hígado.

CONTRASTES IODADOS IÓNICOS

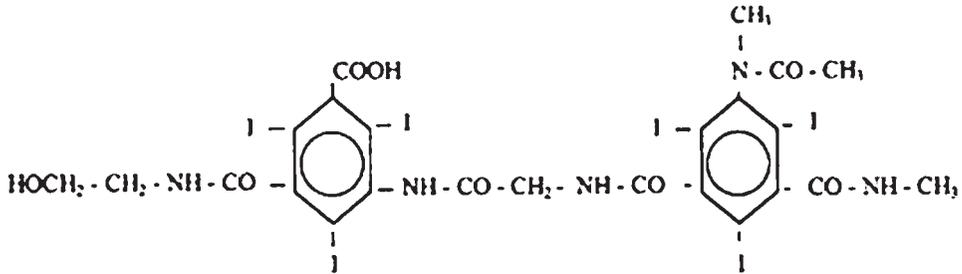


Figura 7. Ácido ioxálgico

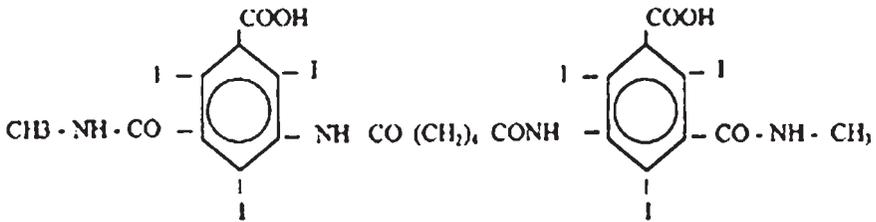


Figura 8. Ácido iocármico

Contrastes no iónicos

Los más genuinos representantes son la Metrizamida y el Iohexol.

La Metrizamida (Figura 9) es la amida entre el ácido metrizoico y la glucosamina. Tiene un contenido en yodo del 48,2% y todas las ventajas anteriormente citadas sobre los contrastes iónicos. Tiene un inconveniente, que es la poca estabilidad que presentan sus soluciones, solamente unas pocas horas. Esta inestabilidad en solución es debida a que el compuesto presenta un radical polihidroxilado unido por un enlace amida que es susceptible a la hidrólisis. Debido a esto, se presenta en forma liofilizada para preparar su solución en el momento de ser inyectada, este inconveniente ha reducido su empleo en la clínica.

Un contraste no iónico que ha tenido y sigue teniendo un gran éxito por sus grandes ventajas sobre los demás es el Iohesol (Figura 10) con un contenido en yodo del 46,36%, tiene una osmolaridad intermedia entre la metrizamida y el ácido metrizoico y una estabilidad suficiente para poderse suministrar en soluciones esterilizadas por autoclavado listas para su uso.

CONTRASTES IODADOS NO IÓNICOS

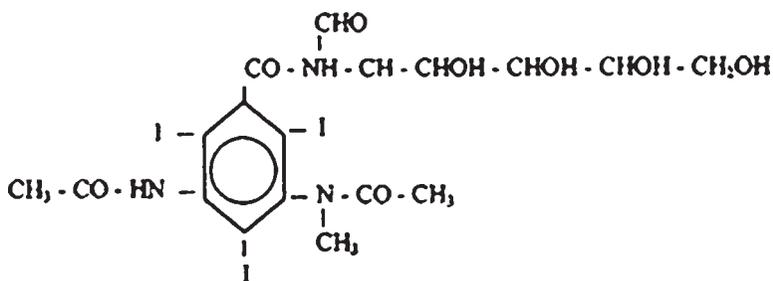


Figura 9. Metrizamida

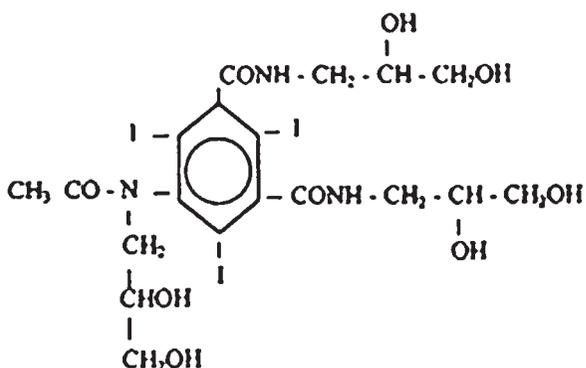


Figura 10. Iohexol

Iohexol no se disocia en solución acuosa, sino que forma una disolución en la cual cada molécula triiodada constituye una sola partícula, siendo de esta forma la relación átomos de yodo/partículas

totales: 3/1. Debido a que es altamente soluble en agua por sus seis grupos oxidrilos de su molécula, es uno de los contrastes preferidos en la actualidad, siendo indicado su empleo para realizar angiografías, artrografías e isterosalpincografías.

En tomografía computarizada (TAC) es el apropiado para detección de tumores y otras lesiones de la cavidad craneal.

En mielografía se ha ensayado paralelamente con la metrizamida. Con los dos medios de contraste, la imagen fue igualmente buena, pero los efectos secundarios fueron aproximadamente el doble de frecuentes con metrizamida que con iohexol, según **P. Nakstadd** y colaboradores del **Hospital Nacional de Oslo**.

El iohexol es rápidamente excretado a través del riñón, el 90% del inyectado se encuentra en la orina a las tres horas de la inyección y el 99% a las veinticuatro.

Su viscosidad es ligeramente más alta que la de las sales sódicas de un contraste iónico y comparable a la de las sales meglumínicas. Su unión a proteínas plasmáticas es del orden del 1,5%, inferior a la de la metrizamida, que es del 4%, y la del ioxaglato, que es del 7,5%. Las ventajas fundamentales de este medio de contraste comparado con los convencionales iónicos son los siguientes:

Toxicidad aguda menor y mejor tolerancia tisular.

Reacciones alérgicas raras, menor neurotoxicidad y efectos hemodinámicos y cardiovasculares.

Igual o mejor visualización radiográfica, dada la posibilidad de poder inyectar mayores volúmenes debido a su menor toxicidad.

Por su baja quimiotoxicidad es el contraste ideal para niños y ancianos y personas alérgicas, ya que libera menos histamina que los demás, así como también su empleo está indicado en personas que padecen insuficiencia renal.

Como resumen, podemos decir que debido a sus características fisicoquímicas y farmacológico-tóxicas se aproxima en gran medida a lo que se ha definido como el agente de contraste ideal yodado.

La Resonancia Magnética (2) también emplea sustancias para mejorar la calidad de la información anatómica conseguida. No se

trata de contrastes al estilo de la radiografía, sino agentes conteniendo átomos paramagnéticos, como el Gadolinio, elemento de las tierras raras, que alcanzan un momento magnético relativamente grande al ser sometidos a un campo magnético. Esto afecta a la respuesta de los núcleos de hidrógeno de los átomos de agua próximos al agente paramagnético e incrementa la señal, mejorando la calidad de la información.

La RM se ha consolidado como una modalidad diagnóstica desde su introducción en la práctica clínica a principios de la década de los ochenta, especialmente en el campo de la neuroradiología. Sin embargo, el principal avance de la RM en la exploración del sistema nervioso central y en otras aplicaciones sólo se produjo tras la aparición en 1988 de medios de contraste que contenían Gadolinio.

Por otro lado, el empleo de los radiofármacos se ha generalizado, entrando de pleno en las técnicas diagnósticas hospitalarias.

Efectos secundarios de los contrastes radiológicos iodados

La inyección intravascular de los medios de contraste iodados, especialmente los iónicos debido a su hipertonicidad, pueden producir efectos colaterales indeseables en un pequeño pero importante número de pacientes. Cuando son graves tales reacciones constituyen un riesgo bien conocido para el paciente y por lo tanto el poder predecirlas, conocerlas y tratarlas es de capital importancia para todos los radiólogos que realizan estas exploraciones con fines diagnósticos.

Como consecuencia de inyectar un contraste hipertónico en sangre, se eleva la osmolaridad y viscosidad de ésta, se produce agregación de hematíes y también se producen alteraciones de la permeabilidad vascular que permite la extravasación del contraste y pueden producir efectos secundarios.

El Servicio de Radiología del **Hospital Civil de Basurto** en **Bilbao** (3) realizó un estudio de reacciones adversas producidas por medios de contraste sobre 815 pacientes (323 mujeres y 492 hombres), durante un año y a los que se les practicó urografía intravenosa. Los pacientes presentaban patologías diversas, entre ellas,

cólicos nefríticos, prostatismo, cálculos, tuberculosis renal y carcinomas. Se utilizaron medios de contraste iónicos clásicos, diatrizoatos de sodio y de meglumina e iotalamato de meglumina.

El tanto por ciento de reacciones fue del 4,53%, que está dentro del intervalo 2-8%, recogido en la literatura, siendo la mayoría de las veces efectos leves o moderados, solamente en un caso se requirió tratamiento de urgencia por aparición de convulsiones. A pesar de que el grupo de niños fue escaso, la incidencia de efectos adversos representó un porcentaje elevado: 16%, que va disminuyendo a medida que aumenta la edad hasta que, a partir de los sesenta años, vuelve a aumentar. Los niños menores de un año y los ancianos de más de ochenta representan un grupo de elevado riesgo. En cuanto al sexo, no se encontraron diferencias en las reacciones entre hombres y mujeres, siendo semejante el porcentaje de reacciones adversas que afectó a ambos.

Los síntomas de intolerancia se presentan generalmente entre el primero y tercer minuto de la inyección, y virtualmente todos aparecen dentro de los primeros diez minutos. Las reacciones tardías suelen ser raras. Los efectos secundarios directamente atribuibles al contraste pueden ser debidos a:

a) *Naturaleza del ácido iodado*

Los primeros ácidos iodados eran peor tolerados que los actuales considerados como clásicos, concretamente el ácido diatrizoico, metrizoico e iotalámico que tienen buena tolerancia.

b) *Características de la sal*

La sal meglumínica es la mejor tolerada debido al elevado volumen de la molécula, ya que por este motivo no se extravasa con facilidad. La sal sódica se tolera peor por su agresividad sobre territorio cerebral, cardíaco y renal. La sal cálcica empleada a las dosis adecuadas aumenta la tolerancia del contraste.

Los mecanismos a través de los cuales se manifiestan los efectos secundarios no están absolutamente aclarados, y se justifican a través

de distintas teorías. En unas ocasiones pueden ser atribuidas a la liberación de histamina (4), en otras a mecanismos alérgicos, en ocasiones a que atraviesan la barrera hematoencefálica y aún en ocasiones se piensa pueden ser debidas a una idiosincrasia o respuesta especial de determinadas personas, también la ansiedad puede ser un factor importante de algún tipo de reacción, según algunos autores.

Las manifestaciones de los efectos secundarios de los contrastes iodados pueden clasificarse en tres niveles:

Leves

Se manifiestan en forma de sofocación, sensación de calor, mareos, náuseas, cefaleas, palpitaciones, etc., y se caracterizan por no precisar actuación terapéutica por parte del médico. Son el 99%.

Moderadas

Aparición de vómitos, manchas en la piel, urticaria, prurito, habones, convulsiones, taquicardia, que precisan la actuación médica aplicando antihistamínicos o corticosteroides. Constituyen el 1% de las reacciones adversas.

Graves

Cuando aparecen edema laríngeo, hipotensión, fibrilación, convulsiones, fracaso renal agudo, shock, que en ocasiones pueden llegar a ser mortales. La morbilidad está situada entre uno y dos por millón de exploraciones. Sobre las alteraciones de carácter leve es muy importante el papel que juega el componente psicológico (5). Si el paciente se encuentra tranquilo y con confianza en las personas que van a realizar la exploración, la incidencia de efectos es pequeña. Por el contrario, cuando el paciente no está adecuadamente preparado o incluso tiene información de los problemas que han sufrido otras personas, los efectos secundarios aumentan en frecuencia e intensidad.

En otras ocasiones, efectos de carácter leve o moderados, son atribuidos al contraste, y pueden estar producidos por las técnicas de exploración (cateterismo de las arterias o del corazón), ambientales (contaminación) o residuos de óxido de etileno en los equipos de perfusión que han sido esterilizados con este gas.

Pruebas previas

Desde los albores de la urografía de excreción se han repetido los intentos de conseguir pruebas de sensibilización para determinar por adelantado qué pacientes podrían presentar más probablemente reacciones. Las pruebas intradérmicas, subcutáneas, oculares, sublinguales o intravenosas han sido sugeridas y abandonadas sucesivamente por falta de validez. La prueba más ampliamente utilizada ha sido la inyección intravenosa de contraste de 0,5 a 1 ml, pocos minutos antes de la inyección de la dosis completa.

Fischer y **Doust** (6) encontraron al revisar las experiencias de 347 hospitales universitarios de los Estados Unidos, que el 75% de los radiólogos realizaban prueba previa, de manera rutinaria o en casos específicos, y que el 96% de éstas eran realizadas por vía intravenosa.

El análisis de sus datos sugiere una posible correlación entre una prueba positiva y reacciones de tipo alérgico, ligeras o intermedias, pero estas observaciones no han sido confirmadas por otros estudios. Todos los autores están de acuerdo en que no se ha encontrado una diferencia significativa en la incidencia de reacciones graves o muertes entre los pacientes que fueron sometidos a estas pruebas previas. Hoy día existe el criterio unánime de que estas pruebas no son necesarias, ya que no solucionan nada, y se hacen directamente las exploraciones.

Según estadísticas de los años cincuenta, la incidencia de muertes era 8,6 por millón de exploraciones realizadas.

Actualmente con las posibilidades terapéuticas, las técnicas de reanimación y que la mayoría de estas exploraciones se realizan en centros hospitalarios, la mortalidad ha descendido notablemente. Según los decesos relatados y publicados por autores como **Kataya-**

ma, Yagamuchi y Takashima (7) oscilan alrededor de uno en un millón de exploraciones.

Como resumen de lo expuesto, actualmente con las mejoras tecnológicas introducidas por la industria farmacéutica, se fabrican contrastes iodados de gran seguridad que cumplen ampliamente las especificaciones exigidas por las farmacopeas de los distintos países en lo que respecta a los límites de yodo inorgánico libre, amina aromática libre y metales pesados, responsables de algunas de las reacciones indeseables que hemos mencionado, proporcionando una gran seguridad para el paciente y para el radiólogo.

En la actualidad, España es el único país fabricante de ácido diatrizoico con una capacidad de producción de más de ochocientas toneladas/año. Gran parte de esta producción es exportada a países como Alemania, Estados Unidos e Italia. Este es el mejor aval de calidad del producto fabricado. Por último, quiero expresar mi gratitud y satisfacción a la industria farmacéutica por haber trabajado en ella, y especialmente al Laboratorio Juste donde desarrollé gran parte de mi labor profesional.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) DOMÍNGUEZ GIL A. (1980) *Pharmaceutical Anal.* Vol. 92, 353.
- (2) Panorama actual del medicamento. Agentes de diagnóstico (2002) 26 (E) 102.
- (3) LACASA DÍAZ C. (1988) *Farmacia Clínica* Vol. 5, n.º 4, 288-294.
- (4) LASSER, E.C.; WALTERS, A.J.; LANG, J.H. (1974) *Radiology* 110: 49-59.
- (5) LALLY, A.F. (1974) *Radiology* 122: 267-271.
- (6) FISCHER, H.W.; DOUST, U.L. (1972) *Radiology* 103: 497-501.
- (7) KATAYAMA, H.; YAGAMUCHI, K.; TAKASHIMA, T. (1990) *Radiology* 175-261.

Interacciones microorganismos-suelo-planta en la preservación del Medio Ambiente y la Salud *

M.^a ROSARIO DE FELIPE ANTÓN

*Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional
de Farmacia*

*Directora del Centro de Ciencias Medioambientales del CSIC.
Madrid*

RESUMEN

Se pone de relieve la importancia de los microorganismos del suelo, que establecen simbiosis con las plantas como biofertilizantes y su aplicación en el control biológico de patógenos. Las interacciones beneficiosas: bacteria-planta y hongo-planta tienen gran interés por su impacto en la Agricultura, Silvicultura y Medioambiente y constituyen una alternativa a la aplicación de fertilizantes químicos que actúan como contaminantes de suelos y aguas con gran perjuicio para la salud. Las bacterias fijadoras de nitrógeno y los hongos micorrizógenos se encuentran entre los simbioses de plantas más extendidos y ecológicamente más importantes. El potencial de los microorganismos del suelo parece ilimitado. Corresponde a la ciencia realizar el estudio profundo de las interacciones de organismos autóctonos del suelo con las plantas, con el fin de que éstas puedan autoabastecerse y autodefenderse en condiciones ambientales adversas, y además se cumpla con el deber de mantener nuestro planeta en óptimas condiciones de salud ambiental para las generaciones futuras.

* Discurso pronunciado en su toma de posesión como Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia el día 26 de junio de 2003.

Palabras clave: Biofertilizantes.— Control biológico.— Fijación biológica de N₂.— Rhizobiaceas.— Simbiosis hongo-planta.— Micorrizas.— Rizosfera.— Rizobacterias.

ABSTRACT

Plant-soil-microorganisms interactions on the protection of the Environment and Health

Soil microorganisms establish beneficial symbiosis with plants and can be considered as biofertilizers and also useful in biological control applications. The beneficial symbiosis: «bacteria-plant» and «fungy-plant», have great interest for its great impact in Agriculture, Forestry and Environment and constitute an alternative to the application of chemical fertilizers, avoiding its negative effects at health and environmental level. The nitrogen-fixing bacteria and mycorrhizal fungi are among the plant symbionts more extended and ecologically more important. The potential of soil microorganisms is unlimited. It is necessary to study more deeply the interaction between endogenous organisms with plant roots, to get a better knowledge of them. With these technologies we are trying both: the self-supplying and self-defending of the plants under adverse environmental conditions and to let to our planet in good health for the future generations.

Key words: Biofertilizers.— Biological control.— Biological N₂ fixation.— Rhizobiaceae.— Symbiosis fungi-plants.— Rhizosphere.— Rhizobacteria.

EXTENSIVE ABSTRACT

This dissertation deals at a field of increasing interest, the interactions between microorganisms, soil and plants, which needs to be studied more deeply, since given its complexity, our knowledge is still very limited. It starts with a previous comments on the soil, as a living agent, the fundamental role played by soil microorganisms on the soil structure, growth of the plants and C and N cycles. Between all ecosystems, the soil presents the major richness of species, living together a great amount of microorganisms as bacteria, fungi, virus, protozoae, and algae. From all of these groups, the bacteria is one of the most abundant and diverse, possibly because they are able of a rapid growth by using a great amount on nitrogen and carbon sources. The bacteria interact with plant roots and colonize the root surface that has a high concentration of nutrients.

Plant life is conditioned by the presence of these wide range of microorganisms associated to the roots which can alter the nutrient absorption, by direct effect on the roots, on the environment or by competition for soil nutrients. The plant rhizosphere is considered as a zone with intense microbial activity surrounding the root surface and stimulating the plant growth. The microbial density in the rhizosphere is higher with respect to the rest of the soil. It is a dynamic and changeable zone with different characteristics to the rest of the soil.

There is an increasing interest for the use of microorganisms as biofertilizers, to achieve the dream of a sustainable agriculture and silviculture to exclude the use of phytosanitary products that are expensive and toxic for human health. These microorganisms can be classified as beneficial or harmful and infective and non infective. The beneficial infective microorganisms include the N_2 fixing bacteria, Gram-negatives, from the Rhizobiaceae family, including the genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium*, all of them living in symbiosis with legume roots. The actinomycete *Frankia* fix N_2 in some trees and bushes such as *Alnus*, *Myrica*, *Eleagnus*, *Casuarina*, etc. The ectomycorrhiza fungi establish symbiosis with a great number of trees, while the arbuscular mycorrhiza (AM) establish symbiosis with most of the higher plants.

Between the non-symbiotic fixing bacteria are the eubacteria *Rhodobacter* and some cyanobacteria and green-blue algae as *Azolla*, *Anabaena* and *Nostoc*, specially important in flooding soils cultures as rice, by permitting a notable saving of nitrogen fertilizers and avoiding soil contamination.

Some beneficial non-infective microorganisms have developed the ability to colonize the plant root surface and they are known as promoting growth plant rhizobacteria (PGPRs). They stimulate plant growth through different ways: by hormone secretion, by inhibiting phytopathogens or by activating nutrient assimilation, mainly nitrogen and phosphorus. The genera *Pseudomonas* and *Bacillus* (*B. thuringensis*) are good examples of rhizobacteria.

The dissertation also focuses on the great interest of legume plants in agriculture and environment for being able to fix N_2 in arid and semiarid zones under symbiosis with the *Rhizobiaceae* family increasing nitrogen content in these areas. The legumes are divided in three subfamilies: *Cesalpinoideae*, *Mimosoideae* and *Papilionoideae*, there are about 750 genera and 18000 to 19000 species. The 88% of the examined species from the three families, form N_2 -fixing nodules in their roots infected by *Rhizobium*. The process of nitrogen fixation is controlled by the plant from the initiation of the infection by the bacteria, and successful nodulation depends on the availability of the combined nitrogen and the adequate photosynthetic energy. As the whole process is governed by genes, the genetic programmes that order the symbiotic compartments, infection thread and symbiosomes, are discussed in the text, as also the programmes controlling the nodule histogenesis, nodule autoregulation and differentiation of bacteria in bacteroids. It is also mentioned some biotechnology strategies to obtain more efficient and competitive strains as good nitrogen fixers.

Besides the symbiosis bacteria-plant, it is described briefly the symbiosis fungi-plant which is carried out by the mycorrhizal fungi of the soil. Most of the plants present mycorrhizal roots, helping to them to obtain mineral nutrients and water from the soil, as complementary roots and inducing resistance against pathogens. Two types of mycorrhiza fungi are described: the ectomycorrhiza, of great value in forestry since they help to the growth and development of the trees and are of great economical interest for industry by the commercialization of the fungi carpophores (mushrooms). The other type, the arbuscular mycorrhiza establish symbiosis with agricultural plants acting as biofertilizers of crops under stress conditions.

The potential of soil microorganisms is unlimited. However, it will be necessary to study more deeply the interactions between the soil endogenous organisms with plant roots, to get a better knowledge of them. Food in undeveloping countries depends on a monoculture as rice, corn, wheat etc., and the use of fertilizers can be expensive for farmers. Our challenge nowadays is to extend nitrogen fixation to non-legumes plants. With these biotechnologies, we are trying both: the self-supplying and self-depending of the plants under adverse environmental conditions and to let to our Planet in good health for the future generations.

«Entremos más adentro en la espesura»

SAN JUAN DE LA CRUZ

INTRODUCCIÓN

La ciencia en general surge de un interrogarse el hombre desde sus comienzos en este planeta. Podría decirse que el científico se parece a un explorador que al recorrer montañas desconocidas tras las que aparecen siempre otras más altas y lejanas envueltas en una creciente niebla, no puede dejar de preguntarse por lo que hay más allá. Pues las grandes leyes que sigue la naturaleza son como picachos que asoman sobre nubes brumosas en una incitación apremiante a buscar lo que hay detrás.

Mi discurso va a versar sobre un campo de interés creciente, las interacciones microorganismos-suelo-planta, que necesita ser investigado en profundidad, dada su complejidad, pues a pesar de los muchos estudios que se han realizado, nuestro conocimiento es todavía muy limitado. Los estudios que he llevado a cabo en este campo a nivel de Fisiología y Bioquímica Vegetal los he complementado siempre con técnicas histoquímicas para lograr un mejor conocimiento de estos mecanismos mediante la interrelación estructura-función.

Así pues, la aportación de mis investigaciones a las interacciones estudiadas han ido dirigidas en gran parte al conocimiento de las estructuras vegetales implicadas y a la localización de los compo-

nentes químicos *in situ* para poder comprender mejor la función que ambos realizan en la interacción.

Las técnicas histoquímicas disponibles en la actualidad se han desarrollado ampliamente, constituyendo un potencial muy eficaz para el estudio complementario de los mecanismos bioquímicos y moleculares de un determinado proceso, y han alcanzado un gran nivel paralelamente al desarrollo de la Genética y la Biología Molecular.

Hagamos unas consideraciones previas:

Si miramos atentos, con mirada profunda, constatamos la perfección de la creación, pues el mundo macroscópico que vemos está formado por micro unidades microscópicas integradoras de los seres vivos, relacionadas entre sí y entrelazadas, siguiendo una perfecta armonía, lo que nos lleva a pensar, a menudo, en la creación de un planeta armónico, capaz de autodefenderse y autorregularse por sí mismo, siguiendo las leyes de la naturaleza en cada uno de sus componentes.

La humanidad desde hace siglos, y por voluntad del Creador, tiene colgada su existencia del misterioso hilo de sucesos que se producen cuando las semillas se alojan en el generoso seno del suelo, que convierte en realidad el misterio, en potencia, del equipo hereditario. El suelo es un arca mágica, un sistema complejo, que alberga entre otros componentes, el misterio de las membranas radiculares, capaces de unir el mundo vivo y el mundo muerto.

Si consideramos la diversidad de fenómenos inorgánicos y orgánicos que se producen en el suelo y las variaciones de todos los órdenes a que está sujeto, podríamos decir que el suelo es la capa viviente de transformación de la esfera sólida terrestre, surgida bajo el influjo de la vida y de las especiales condiciones ambientales de un hábitat biológico que está sometido a un constante cambio y desarrollo peculiar (26). Puesto que el suelo surge bajo la influencia del desarrollo de la vida, es necesario tener ésta muy en cuenta, pues el proceso de desarrollo corre paralelo generalmente al de colonización del suelo por los organismos (microorganismos, vegetación, animales y el hombre). Pero son muchos los factores que intervienen en su formación, y por ello en cada caso el suelo es una individua-

lidad, un conjunto resultante de acciones variadísimas, entre las que las condiciones ambientales juegan un papel clave. Si la vida ejerce (directa o indirectamente) tan gran influjo sobre el suelo, éste delimita las condiciones de vida. De ahí la estrecha relación entre las Ciencias del Suelo, y la Biología, y existen métodos de estudio del suelo análogos a los biológicos, como es, por ejemplo, la micromorfología del suelo, introducida en España por el profesor Kubiena, que estudia el suelo *in situ* en preparaciones de cortes delgados para conocer sus componentes, de un modo similar a los métodos histológicos que informan de la composición anatómica de un tejido.

El profesor Albareda tuvo una visión muy amplia cuando creó nuestro Instituto en 1942, relacionando las Ciencias del Suelo con la Fisiología Vegetal y la Ecología. La filosofía de su creación se fundamentó en que planta y suelo constituyen una unidad, con las más extensas interacciones, de las que brotarán conocimientos de ciencia natural pura y aplicaciones agrícolas y forestales.

EL SUELO, AGENTE DE VIDA

Rocas y sedimentos geológicos han sufrido alteraciones durante la formación del suelo por factores geológicos, topográficos, climáticos, físicos, químicos y biológicos, para formar una entidad viviente, compuesta de una asociación de partículas inorgánicas o minerales, entrelazadas con materia orgánica y gases difundidos. Cuando el suelo es humedecido con agua, este complejo sistema se transforma en un sustrato fértil, donde brota la vida en el planeta. Esta es la zona de la pedosfera, que sostiene la vida sobre la tierra y que es biológicamente un medio activo y estructurado al servicio de su verdadera función, como es su aprovechamiento para el desarrollo de los seres vivos.

En su estado natural, el suelo constituye una entidad biológica, regulada por sí misma, que evoluciona lentamente en el tiempo. Podría compararse a una esponja, regulando y amortiguando el suministro de nutrientes y agua para el crecimiento de la macro y microflora, y de la fauna, y determinando el reparto del agua, entre la que fluye por la superficie hacia los ríos y lagos y la que percola para reponer los acuíferos y reservorios de aguas subterráneas.

Pero el suelo no solamente sirve para promover y sostener la vida en sus formas variadas, sino que también actúa como un filtro viviente de los restos generados por hombres y animales. En este papel, limpia, purifica, recicla y disminuye el daño de muchas toxinas y patógenos que de otro modo irreparablemente contaminarían y degradarían el ambiente. Algunos de sus componentes (los microorganismos) producen antídotos, que controlan las infecciones y enfermedades de las raíces. Pero la manipulación del hombre puede romper esta autorregulación y puede conducir a situaciones difíciles para la vida, ya que el suelo es un recurso no renovable que hay que mantener y proteger.

Los organismos juegan un papel fundamental en la estructura del suelo, crecimiento de las plantas y ciclos del carbono y del nitrógeno. El suelo es de entre todos los ecosistemas terrestres el que presenta una mayor riqueza en especies. En él conviven una gran cantidad de microorganismos, como bacterias, hongos, virus, protozoos y algas. Pero de todos los grupos anteriormente enumerados, uno de los más abundantes y diversos es el constituido por bacterias, posiblemente por ser capaces de crecer más rápidamente y poder utilizar una gran variedad de compuestos como fuentes de carbono y de nitrógeno. Las bacterias se localizan en la superficie de las partículas del suelo, pudiendo interactuar con las raíces de las plantas, ya que hay una alta concentración de nutrientes en esa zona. Las bacterias además poseen, quizá más que otros organismos, una gran adaptabilidad, tanto fisiológica como genética (transferencias horizontales y verticales), elevada tasa de mutación, variación de fase, etc., frente a la variación de las condiciones del suelo. Por el contrario, muchos microorganismos pueden no tener la capacidad de adaptarse a ese ambiente, y no llegan a sobrevivir en él, de ahí que no prosperen ciertas inoculaciones con bacterias, usadas en prácticas biotecnológicas.

Los avances en biología molecular que han hecho posible el estudio de organismos que crecen en el laboratorio en medios de crecimiento seleccionados deberían hacer posible el crecimiento de las poblaciones del suelo en estos medios para poder identificarlas y tener un mayor conocimiento de sus propiedades y poder manipularlas en nuestro beneficio. Se calcula que existen en el suelo unas 30.000 especies de bacterias y 1.500 especies de hongos, de las cua-

les sólo han sido identificadas un 8 y un 1%, respectivamente. En el suelo se encuentran un gran número de bacterias viables, que no son cultivables. Así pues, la biología del suelo se encuentra todavía en un periodo de infancia.

Los microorganismos que crecen alrededor de las raíces de las plantas constituyen la biomasa mayor de nuestro planeta. Las bacterias son, sin duda alguna, el grupo de organismos metabólicamente más significativos de los organismos del suelo. En cuanto a los hongos, son los organismos más dominantes por los múltiples procesos que realizan y por su gran biomasa.

En algunos suelos la biomasa de los hongos excede la formada por todos los demás organismos combinados, siendo su papel la descomposición y mineralización de compuestos de origen vegetal y animal (celulosa, hemicelulosa, lignina y quitina) y también su implicación en simbiosis beneficiosas con raíces de plantas, a las que capacitan para vivir en condiciones limitantes de nutrientes o de agua e incluso aumentan su resistencia a patógenos, los cuales causan billones de euros en pérdidas de los cultivos.

LA RIZOSFERA

La vida de las plantas está condicionada por la existencia de esta amplia gama de microorganismos que viven asociados con ellas, los cuales pueden alterar la absorción de nutrientes por efecto directo sobre las raíces, por efecto sobre el medio y por competir directamente por los nutrientes del suelo. Estos microorganismos, actuando principalmente desde la rizosfera, condicionan la nutrición y la salud de las plantas y por tanto el correcto funcionamiento de toda la biosfera. Se considera a la rizosfera como una zona de intensa actividad microbiana alrededor de las raíces, cuya influencia estimula el crecimiento y aumenta la densidad de microorganismos entre 10^2 a 10^3 respecto al resto del suelo. Esta zona es dinámica y cambiante, y tiene unas características físicas, químicas y biológicas diferentes del resto del suelo. En 1904 Hiltner definió la rizosfera como aquella porción de suelo en torno a las raíces, con una mayor actividad microbiana, resultante de la alta concentración de carbono y otros nutrientes existentes en esta zona, ampliándose este concep-

to en la actualidad hasta considerar como rizosfera la porción de suelo influida por las raíces vivas.

El interés cada vez mayor de utilizar microorganismos para lograr el sueño de una agricultura y silvicultura sostenibles donde se excluya el uso de fitosanitarios caros y nocivos, conduce a una mayor atención sobre la manipulación más efectiva de la rizosfera. Desde que Hiltner la definió, ha habido bastantes avances en reconocimiento al importante papel de los microorganismos sobre el crecimiento de las plantas. Son muchos los trabajos realizados (3, 4, 38 y 31), destacando sobre todos ellos los llevados a cabo por Rovira y su grupo en Australia, llegando a denominarse «efecto rizosfera» a la influencia de la planta sobre el suelo, aunque a medida que los trabajos han ido progresando, podemos considerar el «efecto rizosfera» más que como un efecto, como un sistema natural con propiedades, elementos y fronteras definidas en el que se identifican tres zonas:

- a) La ectorizosfera: región del suelo en contacto directo con la raíz.
- b) El rizoplano: región radical que está en contacto directo con el suelo.
- c) La endorizosfera: región del tejido cortical de la planta colonizada por microorganismos.

La mayoría del conocimiento sobre la existencia física de la rizosfera se deriva de la microscopía electrónica de transmisión y barrido (13, 14). Estos estudios han mostrado que las células epidérmicas de las raíces están recubiertas de polisacáridos de doble origen, vegetal y microbiano, de grosor variado, en el cual las colonias de microorganismos están incluidas y asentadas. Los azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, etc., son responsables de las especies, variedades y número de microorganismos que en ella viven. Un componente puede estimular el crecimiento de un microorganismo y puede ser neutral o inhibidor para otros. Así, los sideróforos exudados por gramíneas del mismo modo a los excretados por ciertas bacterias, pueden inhibir el crecimiento de algunos microorganismos, llegando a reducir la disponibilidad del hierro en la rizosfera.

Las condiciones ambientales de crecimiento de la planta influyen decisivamente sobre estos exudados en cantidad y composición. Las raíces cambian física y fisiológicamente con la edad y el medio que las rodea, por lo que las sustancias excretadas son diferentes, siendo la producción de aminoácidos, siempre mayor cerca de la cofia, zona muy metabólica y de mayor absorción de agua y nutrientes.

El mucilago que rodea la cofia de las raíces y se extiende a lo largo de los primeros centímetros de la raíz (18) juega un importante papel en el dinamismo de la zona rizosférica. Durante mi estancia en la Universidad de California (1964), colaboré con los profesores Jen-ny y McLaren en el esclarecimiento del origen de la capa mucilagino-rosa de las raíces, ya que en dicha Universidad había dos teorías. Los partidarios de que su formación se debía exclusivamente a los exudados de las raíces (Departamento de Suelos y Nutrición Vegetal) y los que opinaban que su origen era exclusivamente microbiano (Departamento de Microbiología). Utilizando plantas estériles y no estériles y analizando la rizosfera por microscopía óptica y electrónica concluimos que la capa mucilagino-rosa es producto de la planta y de las excrecciones de microorganismos que viven sobre ella.

A pesar de muchos años de aislamiento de microorganismos de la rizosfera, nuestro conocimiento real es fragmentario. Los métodos tradicionales de cultivo *in vitro* recobran solamente un pequeño porcentaje de los organismos reconocidos previamente por el microscopio y los contados directamente. La temperatura de incubación y la riqueza del medio juegan un papel importante para el organismo aislado y especialmente la composición del medio de cultivo tiene un papel primordial. Así las *Pseudomonas* fluorescentes han sido calificadas como el mayor grupo bacteriano de la rizosfera, lo que obedece únicamente a que dado el interés de estas bacterias para su uso como protectores de plantas, se han buscado medios selectivos para su aislamiento (25).

Pero si se conocieran las características específicas que controlan el crecimiento y supervivencia de las especies, sería posible modificarlas para favorecer el crecimiento de los microorganismos deseables y eliminar a los indeseables. El interés de la manipulación se basa también en que las raíces colonizadas pueden ser un vector eficaz de introducción de bacterias con características adecuadas para procesos de Bioremediación de suelos contaminados (5).

TIPOS DE ORGANISMOS DEL SUELO

Los microorganismos del suelo pueden ser separados en beneficiosos o perjudiciales e infectivos y no infectivos. Los organismos beneficiosos infectivos incluyen los fijadores de nitrógeno, bacterias Gram negativas, tales como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, que viven en simbiosis con leguminosas. El actinomiceto *Frankia* que fija nitrógeno en determinados árboles y arbustos, tales como *Alnus*, *Myrica*, *Eleagnus*, *Casuarina*, etc., los hongos ectomicorrizicos que establecen simbiosis con un gran número de árboles, y las micorrizas arbusculares (AM), que se asocian a las raíces de la mayoría de las plantas superiores excepto con las *Brassicaceas* y *Quenopodiaceas*.

Otros fijadores de nitrógeno en asociación no simbiótica han demostrado gran capacidad para sustituir a los fertilizantes nitrogenados y contribuir a la sostenibilidad de los sistemas agrícolas, siendo pioneros en su utilización algunos países como Brasil, en cultivos de caña de azúcar y maíz, caracterizándose Brasil por ser uno de los países menos contaminados por fertilizantes sintéticos. Los organismos responsables de este tipo de fijación se encuentran en estado libre en el suelo, obteniendo la energía requerida para la fijación de nitrógeno de la fotosíntesis o de la oxidación de productos orgánicos del suelo.

Entre los fijadores libres fotosintéticos se encuentran eubacterias fototrofas como *Rhodobacter* y algunas cianofíceas, algas verdes azuladas: *Azolla*, *Anabaena* y *Nostoc*, que fijan el nitrógeno en células especiales llamadas «heterocistos». Estas algas son particularmente importantes en cultivos de suelos encharcados como el arroz, donde la fijación puede alcanzar 30 kg de nitrógeno por hectárea y año, permitiendo un notable ahorro de fertilizantes nitrogenados y evitando la contaminación de estos suelos.

Los organismos heterotróficos no-fotosintéticos fijan el nitrógeno obteniendo la energía de compuestos del suelo excretados por las raíces. Estas bacterias pertenecen al género *Clostridium* (anaeróbicos), *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Beijerinckia* (aeróbicos). Mediante técnicas de N¹⁵ ha sido posible seguir la contribución significativa del nitrógeno fijado por *Clostridium* en suelos forestales caracteriza-

dos por pHs bajos (19). Las cantidades de nitrógeno fijadas por estas bacterias permiten suponer que se pueden alcanzar los 100 kg. de N por hectárea y año. Son asociaciones de gran potencial agronómico, presentando especial interés la asociación de *Azospirillum* con cultivos forrajeros tropicales (*Panicum maximum*) y con cultivos de maíz, caña de azúcar, trigo, centeno y sorgo.

BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Una parte de los microorganismos beneficiosos, no infectivos, ha desarrollado la habilidad de colonizar la raíz, y se conocen en su conjunto como rizobacterias. Las rizobacterias beneficiosas que promueven el crecimiento de las plantas, bien específicamente mediante la secreción de hormonas o indirectamente inhibiendo organismos fitopatógenos o activando la asimilación de nutrientes, se conocen como bacterias promotoras del crecimiento (PGPRs) y a su identificación y mecanismos de acción ha contribuido el profesor Gutiérrez Mañero y su grupo de la Universidad San Pablo-CEU, con los cuales hemos colaborado en los últimos años en proyectos comunes.

Aunque la interacción de estos microorganismos con las plantas ha sido convenientemente estudiada, aún estamos lejos de entender las complejas interrelaciones metabólicas y ecológicas que resultan en efectos beneficiosos o perjudiciales para los cultivos, y uno de los mayores retos es conseguir una descripción precisa y completa de estos complejos sistemas. Este conocimiento permitiría responder a la pregunta, de gran interés práctico, sobre si podemos manipular los microorganismos o las plantas para conseguir una óptima asociación que resulte en mejoras de la productividad y salud de los cultivos.

BIOTECNOLOGÍAS LIMPIAS EN AGRICULTURA

El suelo es un recurso natural con una función primordial, soportar una vegetación, y en él se deben dar las condiciones necesarias para el desarrollo permanente de la misma. La salud del suelo está estrechamente relacionada con la alimentación humana a través de la producción agrícola y ganadera.

El hombre puede perturbar este recurso natural, bien sobreexplotando la productividad del sistema, que incapaz de regenerarse se empobrece y degrada, o mediante el vertido de residuos en una proporción muy superior al que el medio puede absorber y transformar. El deterioro del medio hace peligrar lo que habitualmente denominamos «calidad de vida», pero el agotamiento de los recursos naturales, por encima del nivel de sostenibilidad, lo hace sobre el «nivel de vida».

Sin embargo, las prácticas agrarias que se han venido utilizando en las últimas décadas para conseguir un aumento de la producción, mediante el uso de especies vegetales con una alta respuesta a la fertilización química, han conducido a la contaminación de los suelos y han causado graves problemas de eutrofización en las aguas de bebida, en ríos, lagos, lagunas y aguas subterráneas con grave repercusión sobre la salud humana.

Se hace necesario producir evitando efectos nocivos, mantener limpia la naturaleza sin pensar en grandes producciones, sino más bien atendiendo a la calidad del producto obtenido y sobre todo intentando una agricultura más respetuosa con el medio. Todo ello conduce a una «Nueva Agricultura» a una Agricultura Sostenible con capacidad de mantenerse y prolongarse en la agricultura del futuro.

Las prácticas biotecnológicas ofrecen una posible solución, de manera responsable, para mejorar la producción agrícola, atendiendo a las nuevas tendencias ambientales, impulsando el estudio de nuevas tecnologías que permitan aumentar la producción agrícola y forestal en el marco de una agricultura y silvicultura sostenibles.

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (1992) definió la biotecnología como toda aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos y organismos vivos, o sus derivados, para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos. Abarca una amplia gama de tecnologías diferentes, como el empleo de biofertilizantes, agentes de biocontrol y además incluye la manipulación, transferencia de genes o clonación de plantas, que ha llevado a la selección de genotipos de forma más rápida y selectiva.

Una alternativa complementaria a la utilización de los OMGs es la potenciación del aprovechamiento de organismos nativos del sue-

lo, bacterias y hongos (24), su incidencia en la nutrición y protección vegetal y su interés, especialmente en países subdesarrollados, con baja productividad agrícola y con dificultades económicas.

Se abre así un campo de investigación de gran importancia, que requiere ser estudiado en profundidad, atendiendo a sus posibles repercusiones bióticas y abióticas sobre el Medio Ambiente y la Salud. Las simbiosis «bacteria-planta» y «hongo-planta» han sido estrechamente estudiadas.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno y los hongos micorrícicos están entre los endosimbiontes de plantas más extendidos y ecológicamente más importantes, y a ellos nos vamos a referir a continuación.

Fijación biológica de nitrógeno (FBN)

El nitrógeno, después del agua, es el principal nutriente limitante para el desarrollo de las plantas. Precisamente por esta razón en el periodo entre 1950 y 1990 se incrementó diez veces en España el uso de fertilizantes nitrogenados, lo cual llevó a un aumento sin precedentes de la productividad en los cereales. Sin embargo, la aplicación de estos fertilizantes y otras acciones industriales y antrópicas han alterado las condiciones básicas del ciclo natural del nitrógeno y han contribuido a la contaminación por nitratos de los ecosistemas terrestres y acuáticos con grave riesgo para la salud humana. Los efectos sobre la salud han sido puestos de manifiesto en diversos estudios epidemiológicos y clínicos, estudios que han demostrado que la ingestión de nitratos en el agua de bebida o en alimentos conduce a la aparición de metahemoglobinemia e incluso se han relacionado con la aparición de cáncer. El nitrato se transforma en el organismo en nitrito que oxida el Fe^{2+} ferroso de la hemoglobina a Fe^{3+} férrico, que es incapaz de fijar el oxígeno y transportarlo a los tejidos; es lo que se llama enfermedad azul de los lactantes. Otro producto secundario resultante de los nitratos son las nitrosaminas, cuyo carácter cancerígeno fue demostrado por Mirvish en 1981.

El nitrógeno es el elemento más abundante de la atmósfera terrestre y sin embargo es una fuente nutritiva muy escasa. Esta paradoja se debe a que el nitrógeno atmosférico es inerte y no puede

ser aprovechado por la mayoría de los seres vivos, únicamente se incorpora a los sistemas biológicos cuando ha sido fijado por organismos fijadores o combinado con ciertos elementos como el hidrógeno o el oxígeno, en forma de nitrato o de amonio.

La FBN aporta la mayor parte del nitrógeno fijado a los ecosistemas terrestres. La fijación global se estima en unos 275 millones de toneladas de nitrógeno al año. De esta cantidad, 30 millones se fijan por causas naturales como descargas eléctricas, erupciones volcánicas, etc.; 70 millones se fijan mediante fijación industrial en el proceso de Haber-Bosch, en el cual se gasta gran cantidad de energía procedente del petróleo, y 175 millones de toneladas se fijan mediante fijación biológica. De estos 175 millones, 35 se fijan mediante fijación en vida libre y 140 mediante fijación simbiótica (40).

Así pues, la Fijación Biológica de Nitrógeno representa una alternativa a la fertilización nitrogenada, y está restringida a organismos procariontes, capaces de reducir el nitrógeno molecular a amoniaco, tanto en vida libre como en simbiosis.

LAS LEGUMINOSAS

A partir de las experiencias de Hellriegel en 1886 se han intensificado los estudios dirigidos al importante papel que juegan las leguminosas en el medioambiente y la salud. Las leguminosas son base de la dieta mediterránea y tienen un papel crítico en los ecosistemas naturales, en la agricultura y en el sector agroforestal, donde su habilidad para fijar nitrógeno en simbiosis hace de ellas excelentes colonizadoras en medios deficientes de nitrógeno. Existen alrededor de 750 géneros y entre 18.000 a 19.000 especies distribuidas en tres subfamilias: *Caesalpinodeae*, con numerosas especies tropicales; *Mimosoideae*, con especies arbóreas como *Acacia* sp., y *Papilionoideae*, con especies de elevada importancia agrícola. El 88% de las especies examinadas forman en sus raíces nódulos con *Rhizobium* (12).

El éxito adaptativo de las leguminosas les permite colonizar suelos pobres en nutrientes. La abundancia de sus raíces hace también posible la mejora de las características fisicoquímicas de suelos de zonas áridas y semiáridas. Su uso para pasto y mejora de suelos data

de los romanos, que recomendaban en los tratados de Agricultura el cultivo alternativo de gramíneas y leguminosas, con el fin de aumentar la producción de trigo y cebada. En 1932, Fred y col., en su libro titulado *Root nodule bacteria and leguminous plants*, incluyen una cita de Varro (37 BC) que dice: «las legumbres deben plantarse en suelos, no tanto por su importancia como cultivo, sino como por sus buenos efectos sobre los cultivos sucesivos».

Las bases científicas de este proceso fueron presentadas primeramente por Boussingault a mediados del tercer decenio del siglo XIX en Francia. En 1907, en el libro de Primera Enseñanza Superior de Forcadell se puede leer: «Los agrónomos han clasificado las plantas en dos grupos: reparadoras y esquiladoras. Las primeras en lugar de empobrecer el suelo lo enriquecen, por nutrirse más de la atmósfera que de los jugos de la tierra...», propiedad relativa a las plantas leguminosas.

El proceso de fijación biológica de nitrógeno, que hermana a las leguminosas con las bacterias, estableciendo un diálogo entre los dos simbioses, constituye una de las biotecnologías más sorprendentes y excepcionales, por su gran repercusión en el sector sanitario y agroalimentario. Se estima que aproximadamente 100 leguminosas agrícolamente importantes contribuyen anualmente con casi la mitad del nitrógeno fijado biológicamente. En el mundo se estima que sólo las leguminosas grano ocupan cerca de 150 millones de hectáreas con una producción anual de 200 millones de toneladas grano.

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa y la actinomicorrícica se originaron en el cretácico cuando los suelos eran pobres en N combinado. La fuerte presión por la captación de N favoreció a estas plantas para establecer simbiosis con microorganismos del suelo. Su antigüedad data de 60 a 70 millones de años, cuando las familias mayores de angiospermas se separaron (11).

Según algunos autores, la simbiosis entre las leguminosas y *Rhizobiaceas* existía ya antes de que el oxígeno existiera en la tierra. Según Oparín y Haldane, la primitiva atmósfera sólo contaba con agua, CO₂ y NH₄, y ésta puede ser la causa de las condiciones de anaerobiosis que requiere este proceso.

Las leguminosas pueden realizar asociaciones simbióticas tanto con bacterias del suelo como con hongos micorrícicos. Investigacio-

nes actuales apuntan a que los mecanismos de reconocimiento de uno u otro microsimbionte por las leguminosas son similares a nivel genético. El estudio de estos mecanismos comunes en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa y micorriza-planta permitirá no sólo la mejor comprensión de ambos procesos, sino también la mejor utilización de su potencial en una Agricultura Sostenible, respetuosa con el Medio Ambiente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA FORMACIÓN DEL NÓDULO DE LEGUMINOSAS

El establecimiento de la simbiosis *Rhizobium-leguminosa* comienza con el reconocimiento específico entre la bacteria y su planta hospedadora. La especificidad de la interacción simbiótica viene dada por el intercambio inicial de señales químicas entre la planta y el rizobio, que activan programas genéticos específicos de nodulación en ambos simbioses.

Los exudados radiculares de las leguminosas, azúcares, aminoácidos, así como compuestos flavonoides (flavonas, isoflavonas, chalconas y flavononas) atraen a las bacterias que emigran hacia sus raíces. La respuesta bacteriana, mediada por la proteína NodD constitutiva, emite a su vez señales de nodulación, el Factor Nod, para la activación y transcripción de genes implicados en el proceso simbiótico, que origina la curvatura de los pelos radiculares, la formación de células meristemáticas en la corteza de la raíz (primordio nodular) y la expresión de genes de nodulinas tempranas (ENOD12 y ENOD20). Los factores Nod son reguladores de desarrollo muy potentes, ya que su efecto se expresa a concentraciones de 10^{-8} a 10^{-12} M. Se trata de un lipo-chito-oligosacárido que induce los estadios más tempranos de la nodulación y cuya composición química difiere según el tipo de interacción.

La infección comienza con la digestión localizada de la pared del pelo radicular por *Rhizobium* y la formación del canal de infección, siendo las bacterias liberadas por endocitosis en el citosol de las células corticales.

La raíz aísla a las bacterias recién liberadas, facilitándoles la membrana peribacteroidal, de origen vegetal, formada a expensas de

cisternas de retículo endoplásmico y vesículas de Golgi. En el interior de la membrana peribacteroidal las bacterias se diferencian en bacteroides, de mayor tamaño que las bacterias en vida libre, dando lugar al «simbiosoma» o unidad fijadora de nitrógeno formada por uno o más bacteroides rodeados por la membrana peribacteroidal. El simbiosoma es un orgánulo subcelular exclusivo de raíces de leguminosas. La síntesis del enzima nitrogenasa es inmediatamente inducida en los bacteroides (genes *Nif*), que les capacita para reducir el nitrógeno atmosférico a amonio con un gran coste de energía para la planta.

En algunos nódulos, en su mayoría indeterminados, los bacteroides se dividen dentro de los simbiosomas, paralelamente a la multiplicación de las células infectadas para crear la zona infectada. Finalmente se llega a la formación del nódulo en el que la zona infectada está rodeada de una corteza interna y externa de donde parten los haces vasculares que transportan los fotosintatos de la planta al nódulo, y los compuestos nitrogenados en forma de amidas o ureidos elaborados por el nódulo a la parte aérea de la planta. En nódulos indeterminados (trébol, guisante, alfalfa, etc.) existe un meristemo apical responsable del crecimiento continuo del nódulo, que no poseen los nódulos determinados (soja).

La infección de las raíces por las bacterias puede realizarse de modo diferente al canal de infección, aunque ésta es la forma más frecuente. Otras formas de infección se realizan por heridas producidas en la emergencia de las raíces laterales, como ocurre en el género *Arachis* (cacahuete), en *Sylosanthes*, *Aeschynomene* y en otras plantas. En simbiosis primitivas de la familia Cesalpinoideas (p.e., en *Cassia*), y también en las papilionáceas leñosas *Andyra* e *Hymenolobium*, las bacterias no eran liberadas del canal de infección, la fijación de nitrógeno se realizaba en estas estructuras o «canales de fijación».

Aunque la interacción *Rhizobium*-planta es bastante específica, lo que significa que cada planta será nodulada por su rizobio o rizobios característicos, sin embargo, una misma cepa bacteriana es capaz de establecer simbiosis con diferentes leguminosas como *R. leguminosarum*, que puede nodular *Pisum* y *Cicer*. El caso extremo es la especie de amplio rango de hospedador *Synorhizobium* sp. NGR234, que puede establecer simbiosis con 353 leguminosas. A su vez, una

misma planta puede ser nodulada por diferentes rizobios, como ocurre en soja, que es nodulada por *B. japonicum* y *Sinorhizobium fredii*.

En todo momento, el establecimiento de la simbiosis está controlado por la planta. Es la planta la que determina que se inicie o no la infección, en función de la disponibilidad de nitrógeno combinado y de la energía fotosintética adecuada.

EVOLUCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS SIMBIÓTICAS

La simbiosis entre leguminosas y bacterias rizobiáceas es el sistema mejor estudiado en el marco de las interacciones planta-microorganismo. Estas bacterias son simbioses facultativos, cultivados fácilmente ex-planta y accesibles a su investigación por métodos genéticos y moleculares modernos.

Todo el proceso de la fijación de nitrógeno está gobernado por genes y el uso de mutantes, defectuosos en componentes estructurales, ha sido de gran ayuda para esclarecer las distintas etapas de iniciación y desarrollo del nódulo.

Los nódulos representan un modelo apropiado para estudiar un amplio rango de funciones clave en las plantas, incluyendo la señalización inicial entre los simbioses, diferenciación celular y organogénesis, así como expresión de genes responsables del desarrollo del nódulo y su envejecimiento. Usando mutantes de diferentes leguminosas (guisante, soja, alfalfa, trébol, judía, etc.), se han identificado alrededor de 100 genes responsables del desarrollo del nódulo. De ellos, más de 40 genes han sido identificados en *Pisum sativum*, que sigue siendo uno de los modelos más adecuados.

Los análisis genéticos pueden ser de gran utilidad para diferenciar los estadios más significativos de la simbiosis, cuando cada uno de ellos está controlado por uno o varios genes. De este modo se ha podido hacer un seguimiento del proceso de infección en *Medicago sativa* desde la iniciación del canal de infección, crecimiento en el interior del pelo radical y su avance en la corteza de la raíz, mediante mutantes de *Rhizobium meliloti*, defectuosos en diferentes componentes de exopolisacaridos, e igualmente se ha seguido la liberación de las bacterias en la corteza radicular, diferenciación en bacteroides y formación del joven nódulo.

La secuencia funcional de los genes simbióticos de la planta, identificados mediante el uso de genotipos mutantes, coincide en general con la ordenación de los estadios de desarrollo identificados en los genotipos silvestres. Sin embargo existe una excepción muy notable: las mutantes defectuosas en la autorregulación sistemática de la nodulación, usualmente retienen la capacidad fijadora de nitrógeno, por lo que la respuesta a la autorregulación no debe ser considerada como elemento a valorar en el proceso «escalonado» del desarrollo de los compartimentos simbióticos. Esto también sucede en la formación histológica del nódulo, ya que algunas mutantes de alfalfa forman estructuras pseudonodulares sin haber sido inoculadas con *Rhizobium* (8).

Todos estos datos sugieren que el programa integral del desarrollo del nódulo no está formado por una cadena lineal de etapas sucesivas, sino por diferentes subprogramas, que son implementados en cierto grado, independientemente uno de otro, pudiendo cada subprograma, a su vez, constar de varios pasos sucesivos.

El más importante es el subprograma genético que ordena el desarrollo de los compartimentos simbióticos: canal de infección y simbiosomas, que separa las bacterias del citosol vegetal y asegura un diálogo íntimo entre ellos. En paralelo, los subprogramas que controlan la histogénesis del nódulo, la autorregulación de la nodulación y la diferenciación de las bacterias en bacteroides, ocupan también un especial relieve.

La identificación de los subprogramas mencionados no es en todos los casos un resultado específico de la investigación con mutantes. Es evidente que con independencia del desarrollo de los componentes simbióticos, las mutantes defectuosas en la síntesis de exopolisacáridos y lipopolisacáridos, componentes específicos del nódulo, no infectan usualmente las raíces, pero inducen la formación de pseudonódulos. También se ha evidenciado que cuando los factores Nod purificados son añadidos, pueden inducir a la formación del primordio nodular e incluso estados iniciales de la estructura nodular. Sin embargo, para estudiar la inducción de los genes que se expresan en los estadios iniciales de la infección por *Rhizobium* y los genes *Nif* de fijación de nitrógeno es necesario el empleo de bacterias mutantes.

Los genes simbióticos identificados, usando sus productos moleculares, son las llamadas «nodulinas» y a su estudio ha cooperado el doctor Bisseling y su grupo del *Department of Molecular Biology* de la Universidad de Agricultura de Wageningen. Estos componentes pueden representar más de la mitad del contenido de proteínas de los nódulos. Para identificar estos genes se ha comparado la expresión de proteínas (RNAs) de plantas noduladas con raíces no inoculadas y nódulos Fix^+ y Fix^- . Este abordaje ha permitido diferenciar entre «nodulinas tempranas», activadas antes de la aparición de la fijación de nitrógeno, y «nodulinas tardías», que aparecen durante y después del comienzo de la fijación de nitrógeno. Nuestro laboratorio ha contribuido al estudio de una de estas nodulinas tardías, la «leghemoglobina» o «hemoglobina» de las plantas.

Algunas nodulinas están relacionadas con la formación de estructuras simbióticas, por ejemplo, la nodulina temprana ENOD2, activamente sintetizada en el parénquima nodular, mientras que las nodulinas ENOD5 y ENOD12 están localizadas en las paredes del canal de infección (Mylona y col., 1995). La nodulina N-26, sintetizada durante la liberación de las bacterias del canal de infección, es un componente de la membrana peribacteroidal y puede estar relacionada con el transporte de nutrientes entre los simbiositos. La nodulina ENOD40 está relacionada con el balance hormonal durante los estadios iniciales del establecimiento del nódulo. Esta nodulina parece controlar el cociente auxinas/citoquininas que se altera enormemente después de la inoculación con *Rhizobium* y juega un papel importante en la formación del primordio nodular y anatomía general del nódulo (16, 29).

MECANISMOS DE DEFENSA A LA INFECCIÓN

Inmediatamente después de la inducción de la nodulación, se inician las reacciones propias del endosimbionte en la planta hospedadora, en la que tiene especial relieve las interacciones previas a la separación de las bacterias del citosol de las células infectadas. Podrían asemejarse estos mecanismos a las reacciones de defensa de las plantas contra patógenos, que incluyen la síntesis de muchos compuestos, como ácido salicílico, quitinasa, peroxidasa, callosa,

extensinas, proteínas de defensa, etc. En la nodulación las reacciones no son tan intensas como durante la patogénesis y están estrechamente relacionadas con la especificidad de la simbiosis. La síntesis de factores de defensa es mucho más baja, no inactivando a las bacterias, pero sí controlando su número y desarrollo en los compartimientos simbióticos. El balance final de la interacción dependerá del contenido de polisacáridos exo y lipo y de los glucanos cíclicos, componentes de las paredes bacterianas. Estas moléculas de superficie pueden inhibir los sistemas de defensa de la planta o bien hacer que las bacterias resistan a estos mecanismos. La alteración de los mecanismos de defensa comienza ya en estadios iniciales de la infección, en los cuales ocurren interacciones entre los exopolisacáridos de *Rhizobium* y los receptores de la planta. En ausencia de exopolisacáridos, estos receptores pueden ser afectados por algunos elicitores (p.e., productos de la degradación de la pared celular), induciendo una intensa respuesta inmune (33). Intensas reacciones de defensa pueden también estar sumamente implicadas en el desarrollo de los canales de infección, gran parte de los cuales son bloqueados o abortados en tempranos estados de preinfección (6, 7). El grupo del profesor Olivares Pascual ha contribuido al estudio de estos mecanismos de defensa en plantas de alfalfa inoculadas con *Rhizobium* incompatibles (28).

Además de los mecanismos que controlan al endosimbionte en la planta hospedadora, las leguminosas tienen la capacidad de autorregular el número de nódulos formados en sus raíces mediante señales sistemáticas hipersensibles que se comunican entre las raíces y la parte aérea de la planta. Así por ejemplo, se han seleccionado ciertos mutantes de autorregulación negativa, como plantas supernodulantes Nod⁺⁺ que generalmente mantienen la nodulación en presencia de altas dosis de nitrato (fenotipos tolerantes al nitrato) que inhibirían la simbiosis en las plantas silvestres. El aborto de excesivos canales de infección en las células corticales de alfalfa vía un mecanismo similar de reacción hipersensible puede ser también consecuencia de la respuesta de autorregulación de la planta (41).

SIMBIOSIS *LUPINUS-BRADYRHIZOBIUM*_{sp}

Por ser la simbiosis mayormente estudiada en nuestro laboratorio y por tener características propias, voy a hacer una reseña muy breve de algunos de los resultados obtenidos en estos trabajos.

El lupino o altramuz es una leguminosa de origen mediterráneo con gran potencialidad agrícola debido al alto contenido de proteínas en sus semillas que le asemeja a la soja, y su potencial como oleaginosa. Este género corresponde a la tribu *Geneistae*, *subtribu Lupininae*, de la que es el único representante.

Respecto a su nodulación, el lupino presenta diversas características propias que le diferencia de otras leguminosas. El nódulo de lupino es un subtipo especial y único dentro de los nódulos indeterminados, por lo que se le ha llamado «lupinoide», carece de meristemo terminal, presentando el meristemo una localización basal-lateral. Es la única leguminosa de clima templado que transporta el N fijado en las raíces a la parte aérea, en forma de amidas, y es nodulada por bacterias del género *Bradyrhizobium*.

El proceso de infección es diferente, no sigue el patrón estándar, no observándose cordones de infección. Al conocimiento de esta infección «peculiar» ha contribuido recientemente nuestro grupo de investigación, mediante la realización de una tesis doctoral que se presentará en breve en la Universidad Autónoma de Madrid.

Nuestra aportación a la estructura-función de esta simbiosis se ha dirigido al estudio de las características estructurales del nódulo y su funcionamiento fisiológico. Una de nuestras aportaciones más significativas se refiere al estudio de los mecanismos de regulación de O₂, dado el interés del control de su concentración en el proceso simbiótico. Mediante técnicas inmunocitoquímicas localizamos específicamente la leghemoglobina, de composición similar a la hemoglobina de la sangre en el citosol de las células infectadas (42). Esta proteína es mayoritaria en el nódulo y uno de los reguladores de O₂ más importantes. Transformándose en oxileghemoglobina transporta este elemento a los bacteroides para su respiración, manteniendo una atmósfera microaeróbica. Su presencia es imprescindible para el comienzo de la fijación de nitrógeno. También identificamos otro componente de la regulación de O₂ en los nódulos, la barrera mor-

fológica de resistencia a la difusión de O₂ en la corteza interna del nódulo (21) a nivel de sus componentes estructurales y localización de ciertas glicoproteínas que regulan su operación en condiciones de estrés de la planta (17, 20), resultando el lupino una planta adecuada para estos estudios.

Otras aportaciones de interés han ido dirigidas a conocer el papel de los plastidios en el desarrollo nodular mediante la localización de proteínas de hierro en estos orgánulos, como ferritina, cuyo contenido aumenta con la senescencia, regulando la concentración de hierro catalítico en las células infectadas y retrasando la senescencia nodular (22). Deseo también destacar por su importancia la localización del enzima nítrico óxido sintasa, identificada por vez primera en raíces de lupino en nuestro laboratorio (9).

También nuestro grupo ha sido pionero en la localización de alcaloides *in situ* en las semillas de varias especies de lupino, mediante la obtención y utilización de anticuerpos específicos tipo lupanina (36), en colaboración con el doctor Greirson del *Chemical Centre*, Perth (Australia).

ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS

Los estudios de genética molecular sobre bacterias fijadoras de nitrógeno van dirigidos a obtener cepas más eficientes y competitivas, que sean buenas fijadoras de N₂. También es necesario que la planta huésped esté bien desarrollada para aportar suficiente energía para la realización del proceso simbiótico. Las condiciones óptimas de los dos simbioses, planta y microorganismo, van a ser decisivas para lograr la máxima productividad y calidad de la legumbre.

Poco a poco las empresas del sector agrícola van interesándose por la producción de inoculantes de *Rhizobium* para transferir a la agricultura esta biotecnología.

Se investiga la obtención de cepas con genes capaces de reciclar el hidrógeno que se desprende en el proceso de la FBN, construyendo cepas con hidrogenasas oxidativas que reciclan el hidrógeno (genes *hup*), que se han caracterizado ya en *B. japonicum* y en *R. leguminosarum*, pero que todavía se enfrentan a diversos problemas,

siendo el profesor Ruiz Argüeso y su grupo, de la Universidad Politécnica de Madrid, laboratorio de referencia para estos estudios (39).

Además de los genes *hup* se han descrito también otros métodos que mejoran la efectividad de las cepas. Se han obtenido mutantes de *B. japonicum* por mutagénesis química, con capacidad superior a las cepas silvestres, o cepas de *R. leguminosarum*, resistentes a la acidez. La adición exógena de flavonoides a los inoculantes es otro de los procedimientos prometedores para aumentar la nodulación de los inoculantes comerciales.

La competitividad entre cepas representa un problema económico importante. Es primordial que la cepa de *Rhizobium* seleccionada sea efectiva, frente a las autóctonas, en condiciones de campo. Una de las estrategias actuales es construir leguminosas que restrinjan la nodulación de cepas nativas y permitan el establecimiento de las cepas inoculadas, o la utilización de cepas que produzcan antibióticos para inhibir la nodulación de las cepas nativas. Sin embargo una seria objeción al uso de esta estrategia reside en su impacto sobre las poblaciones microbianas de la *Rhizosfera*, ya que pueden inhibirse bacterias Gram (-) beneficiosas para el agrosistema.

Los mayores esfuerzos para potenciar la simbiosis se han centrado en las bacterias, pero la mejora de la simbiosis se obtendrá por la manipulación de la planta hospedadora. Por ello se hace necesario conocer la biología de las leguminosas a nivel básico, y elucidar los componentes genéticos de la planta que determinan la interacción. Estos avances han culminado el año 2002 con el clonaje posicional de genes de las leguminosas *Medicago* spp. *Lotus japonicus* y *Glycine max*, y es de esperar que a partir de ahora, un mayor número de investigadores hagan uso de herramientas genéticas y genómicas para profundizar en el proceso simbiótico.

Hasta aquí nos hemos referido a la simbiosis bacteria-planta. A continuación pasamos a hacer un breve resumen de la simbiosis hongo-planta o simbiosis micorrícica.

SIMBIOSIS MICORRÍCICA

La mayoría de las plantas presentan micorrizadas sus raíces. El hongo, una vez que alcanza la rizosfera, coloniza la corteza de la raíz y desarrolla un micelio externo que a modo de sistema radical complementario ayuda a la planta a adquirir nutrientes minerales y agua. Puede considerarse a estos hongos como los componentes metabólicamente más activos para la captación de nutrientes.

Las ectomicorrizas tienen un gran valor en el ámbito forestal, permitiendo el establecimiento de plantas leñosas en zonas degradadas. Aunque las plantas ectomicorrizadas ocupen solamente del 3 al 5% del total, dada la importancia de éstas en la masa de la producción arbórea, no pueden pasar desapercibidas, ya que constituyen los bosques que cubren la tierra, que corresponden a las familias Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Salicaceae y Myrtaceae, así como muchos miembros de otras familias, como las Rosaceae, Leguminosae, Ericaceae, Junglaceae y otras. Estos hongos tienen un valor añadido en cuanto a la comercialización de sus carpóforos, comúnmente llamados setas en la industria de la alimentación. Algunas especies tienen interés en medicina como, por ejemplo: *Calocybe gambosa*, seta de San Jorge, con propiedades hipoglucémicas; *Lactarius deliciosus*, el apreciado níscolo, puede utilizarse como indicador de la función renal; *Coprinus atramentarius*, para combatir el alcoholismo, etc.

En suelos marginales, el potencial de micorrización suele disminuir drásticamente, e incluso desaparecer. Es conveniente micorrizar las plantas antes de ser transferidas a los suelos que se pretende remediar con inóculos de hongos que además incluyan otros organismos beneficiosos. En esta dirección nuestro laboratorio está realizando trabajos de establecimiento de plantas micorrizadas de *P. halepensis* en zonas degradadas del sudeste de la comunidad de Madrid, enriqueciendo estos suelos con micorrizas autóctonas, una vez que han sido identificadas, y con bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

En los sistemas agrícolas la mayoría de las plantas forman simbiosis con micorrizas arbusculares (AM), que facilitan la absorción de agua y nutrientes, principalmente P y algunos micronutrientes. Estas simbiosis son mucho más ancestrales que la fijación de N₂ y

son características de la gran mayoría de plantas contemporáneas y biológica de otras ya desaparecidas. La hipótesis de una evolución coevolutiva de la tierra por plantas y hongos sugiere que el origen de las plantas terrestres ocurrió debido a una integración con hongos que les suministraban agua y nutrientes (10).

Dados los efectos de las micorrizas arbusculares y ectomicorrizas como biofertilizantes y como bioprotectores de los cultivos, su uso apropiado puede reducir la aplicación de fertilizantes y fitosanitarios. El laboratorio del profesor José Miguel Barea de la EEZ del CSIC en Granada, es grupo de referencia en la aplicación de las micorrizas arbusculares en la agricultura. Una de sus características más importantes consiste en que las plantas micorrizadas pueden superar situaciones de estrés, sobre todo en suelos degradados por la erosión, escasez de nutrientes, estrés hídrico, salinidad, suelos contaminados con metales pesados, escombreras, etc.

Es especialmente relevante su interés en fitoremediación. Inmovilizan los metales pesados en las hifas del hongo reduciendo su traslocación a la parte aérea de la planta y eliminando su paso a la cadena trófica. En la revegetación de antiguas zonas mineras, la micorrización permitió el crecimiento de plantas como *Andropogon gerardii* y *Festuca rubra*. También se ha observado su beneficio en suelos salinos incrementando la tolerancia de las plantas a la salinidad (1). Se han sugerido varios mecanismos para justificar este comportamiento, como inducción de cambios hormonales en la planta y mejora en la capacidad de captación de agua y nutrientes.

Aunque la micorrización aparece como una práctica atractiva, sin embargo, para lograr una verdadera eficacia es necesario identificar de antemano las micorrizas autóctonas de la zona de estudio, ya que se trata de enriquecer la rizosfera con algunos de los hongos indígenas que manifiestan una acción específica en el desarrollo y adaptación de la planta a esas condiciones ambientales.

La dificultad de las micorrizas arbusculares estriba en que ninguna de las cerca de 150 especies del orden *Glomales* ha podido ser cultivada en condiciones axénicas, por lo que no ha sido posible la preparación de inoculantes comerciales. A esto hay que añadir que se trata de simbioses obligados, y para la obtención del inóculo se hace necesario utilizar una planta hospedadora. Por el contrario, la

inoculación con ectomicorrizas presenta ventajas experimentales, ya que estos hongos pueden ser cultivados *in vitro* a partir de esporas o de micelios crecidos en medios sólidos o líquidos.

SIMILITUD ENTRE NODULACIÓN Y MICORRIZACIÓN

En la simbiosis micorriza-planta, al igual que en la simbiosis «*Rhizobium*-leguminosa» se pone de manifiesto un intercambio de señales de reconocimiento y aceptación entre los simbiosites, mediado por la expresión de genes. Básicamente en el desarrollo de las micorrizas arbusculares se producen etapas similares a la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa: las hifas infectivas colonizan las células corticales y forman arbuscúlos muy ramificados rodeados por membranas periarbusculares de origen vegetal. El contenido de RE y vesículas de Golgi también aumenta considerablemente para asegurar la síntesis de membranas periarbusculares (2), al igual que ocurre en la simbiosis con *Rhizobium* para la formación de la membrana peribacteroidal.

Por aceptar las leguminosas los dos tipos de simbiosis, se han utilizado mutantes de *Rhizobium* defectuosos en el desarrollo del nódulo para el estudio del control genético de las micorrizas. Este procedimiento ha conducido a la identificación de mutantes *Nod*⁻ y *Myc*⁻ (15). Las *Myc*⁻ han sido identificadas con las mutantes de guisante, en las cuales el canal de infección aborta en el interior de los pelos radiculares. Después de la inoculación con el hongo, estos mutantes forman micelios intercelulares, pero no llegan a formarse ramificaciones arbusculares.

La micorrización estimula la síntesis de proteínas *de novo*, *micorrizinas*, ausentes en plantas no inoculadas (2), algunas de ellas comunes en nódulos y micorrizas. Estos productos comunes incluyen algunas proteínas constitutivas de las membranas peribacteroidal y periarbuscular, algunas nodulinas tempranas (ENOD 2, NOD 11, ENOD 12 y ENOD 40) e incluso la leghemoglobina del nódulo, que también es sintetizada en las células colonizadas por arbuscúlos.

Similitud entre nodulación y micorrización es también evidente por el hecho de que los factores *Nod* estimulan el desarrollo de los hongos micorrícicos (43). También los factores de defensa de la planta contra ambas infecciones son similares, originándose la sín-

tesis de componentes líticos que desarticulan la estabilidad de ambos microsimbiontes durante la infección.

Un rango de genes comunes han sido identificados para nódulos de leguminosas y micorrizas arbusculares. Al menos parte del sistema genético de la planta que controla el desarrollo del nódulo fue originado durante la coevolución de las plantas arcaicas con los hongos micorrízicos (35). Estos genes ancestrales se han ido adaptando en las leguminosas durante la evolución de la nodulación. Esta preadaptación puede incluir la capacidad de las plantas para tolerar la presencia de bacterias en la corteza radical y formar compartimentos subcelulares simbióticos. En este contexto resulta altamente interesante la existencia de genes *nif* en hongos endomicorrízicos (30), (32). La naturaleza de estas preadaptaciones será probablemente clarificada mediante análisis moleculares comparativos, usando como planta modelo *Lotus japonicus* (27), cuyo genoma ha sido determinado.

El análisis de las micorrizas arbusculares y de los nódulos fijadores de N_2 sugiere que las plantas disponen de sistemas universales para controlar sus afinidades por los microorganismos que pueden ser mutualistas o antagonistas, dependiendo del simbiote, de las condiciones ambientales y de los caracteres genéticos del organismo. Estos sistemas reguladores fueron aparentemente muy importantes para la aparición en la tierra de las interacciones beneficiosas y han contribuido en gran medida al potencial adaptativo de las plantas terrestres (37).

Por último, permítanme ustedes una breve mención del papel de los microorganismos del suelo sobre el control biológico.

BIOCONTROL

La mayoría de las prácticas de control de enfermedades de plantas se ha basado, bien en la resistencia genética de la planta, al manejo de la planta en su medio ambiental y sobre todo al uso de pesticidas sintéticos. Pero se hace necesario crear alternativas a estos pesticidas corrientemente usados, ya que muchos de ellos no podrán utilizarse, bien debido a reglamentaciones sanitarias o al desarrollo de resistencias por parte de los patógenos del suelo.

El reto en este campo está en buscar nuevas soluciones que logren un control efectivo, minimizando las consecuencias negativas para la salud humana y el medio ambiente. El control biológico por microorganismos ofrece una poderosa alternativa al uso de compuestos fitosanitarios. La rica diversidad de microorganismos del suelo promete una fuente inagotable para este propósito. Se trata de que el incremento de un determinado microorganismo en la rizosfera permita suprimir una enfermedad concreta de la planta sin afectar al resto de los microorganismos de la comunidad rizosférica o a otros organismos del ecosistema.

Las rizobacterias Gram (-), como la *Pseudomonas fluorescens*, son de las más estudiadas, produciendo un amplio rango de metabolitos con capacidad antimicrobiana, confiriendo a la planta resistencia sistémica inducida, y produciendo sideroforos que secuestran el hierro en la rizosfera.

También las bacterias Gram (+) han resultado muy útiles en el control de enfermedades. Entre ellas merece destacarse el *B. thuringensis*, que en los estadios de esporulación produce *endotoxinas*, dotadas de propiedades bioinsecticidas. El maíz Bt es un maíz que ha sido modificado genéticamente para protegerlo contra los insectos, plaga conocida como taladro (géneros *Ostrinia* y *Sesania*), gracias a las proteínas del *B. thuringensis*.

Para lograr una mayor eficacia en su utilización es necesario investigar más a fondo estas interacciones para conocer sus mecanismos de acción, antagonismo con el patógeno y respuesta de la planta, y conseguir formulaciones adecuadas para su aplicación.

CONSIDERACIONES FINALES

El potencial de los microorganismos del suelo parece ilimitado. La naturaleza, en su sabiduría, ha creado las soluciones para resolver todos los problemas, que aseguren la permanencia de la vida sobre la Tierra sin alterar la armonía natural del Planeta.

Corresponde a la ciencia estudiar más profundamente el potencial de organismos autóctonos del suelo, que nos han sido dados gratuitamente, como el aire, el agua y la luz del sol. Con estas tecnologías se pretende, por un lado, que las plantas puedan autoabastecerse y auto-

defenderse en condiciones ambientales adversas, allí donde se desarrollen, y por otro cumplir con el deber moral de cuidar nuestro planeta y dejarlo en buen estado a las generaciones venideras.

Que las interacciones beneficiosas citadas sean cada vez más entendidas y puedan repercutir: en la mejor calidad de las cosechas y en el aumento de la productividad en países en desarrollo. Cerca de 190 millones de personas, un tercio de la población de África, son susceptibles de carecer definitivamente de alimentos. En este sentido, el reto de extender la simbiosis a plantas como maíz y arroz, cultivos básicos en países subdesarrollados, que dependen únicamente de estos monocultivos, es todavía una utopía, pero estamos seguros que dejaría de serlo si estamos convencidos que no habrá paz en el mundo si el desarrollo y el bienestar no llegan a todos los países de la Tierra, pues, «O hay futuro para todos, o no hay futuro».

BIBLIOGRAFÍA

- (1) AZCON, R. y EL-ATRASH, F. (1997) Influence of arbuscular mycorrhizae and phosphorus fertilization on growth, nodulation and N₂ fixation in *Medicago sativa* at four salinity levels. *Biol. Fert. Soil.*, 24: 81-86.
- (2) BARKER, S.J.; TAGU, D. y DELP, G. (1998) Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol.*, 116: 1201-1207.
- (3) BOWEN, G.D. y ROVIRA, A.D. (1991) The Rhizosphere: The hidden half of the hidden half. In: «Plant Roots: The hidden half». (Y. Waisel A. Eshel and U. Kafkafi. eds.) pp. 641-669. Marcel Dekker, New York. 641-649.
- (4) BOWEN, G.D. y ROVIRA, A.D. (1999) The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy*. 66: 1-102.
- (5) BRAZIL, G.M.; KENEFICK, L.; CALLANAN, M.; HARO, A.; DE LORENZO, V.; DOWLING, D.N. y O'GARA, F. (1995) Construction of a Rhizosphe *Pseudomonad* with potential to degrade polychlorinated biphenyls and detection of *bpn* gene expression in the Rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (5): 1946-1952.
- (6) BREWIN, N.J. (1998) Tissue and cell invasion by *Rhizobium*: the structure and development of infection threads and symbiosomes. In: The Rhizobiaceae (Spaink H., Kondorosi A. y Hooykaas P. J.J., eds.), pp. 417-429. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publisher.
- (7) BROUGHTON, W.J. y PERRET, X. (1999) Genealogy of legume-*Rhizobium* symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2: 305-311.
- (8) CAETANO-ANOLLÉS, G., JOSHI, P. y GRESSHOFF, P.M. (1992) Nodulation in the absence of *Rhizobium*. In: Plant Biotechnology Development (Gresshoff P.M., ed.) pp. 61-70. Boca Raton, FL: CRC Press.

- (9) CUETO, M.; HERNÁNDEZ, O.; MARTÍN, R.; VENTURA, M.L.; RODRIGO, J.; LAMAS, S. y GOLVANO, M.P. (1996) Presence of Nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Letters*, 398: 159-164.
- (10) DOUGLAS, A.E. (1994) Symbiotic Interactions. 148 pp. Oxford, New York, Toronto, Oxford University Press.
- (11) DOYLE, J.J. y DOYLE, J.L. (1997) Phylogenetic perspectives on the origins and evolution of nodulation in the legumes and allies. In: Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture (Legocki A., Bothe H. and Puhler A., eds.), NATO ASI Series G. Ecological Science, Vol. 39, pp. 307-312. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- (12) DE FARIA, S.M.; LEWIS, G.P.; SPRENT, J.I. y SUTHERLAND, J.M. (1989) Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytol.*, 111: 607-6129.
- (13) FOSTER, R.C. (1986) The ultrastructure of the rhizoplane and the rhizosphere. *Ann. Rev. Phytopath.* 24: 211-234.
- (14) FOSTER, R.C.; ROVIRA, A.D. y COCK, T.W. (1983) Ultrastructure of the root-soil-interface, p. 157. The American Phytopathological Society, St Paul, MN.
- (15) GIANINAZZI-PEARSON, V. (1996) Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell*, 8: 1871-1883.
- (16) HIRSCH, A.M. y LA RUE, T.A. (1997) Is the legume nodule a modified root or stem or an organ «*sui generis*»? *Crit. Rev. Plant Sci.*, 16: 361-392.
- (17) IANNETTA, P.P.M.; DE LORENZO, C.; JAMES, E.K.; FERNÁNDEZ PASCUAL, M.; SPRENT, J.I.; LUCAS, M.M.; WITTY, J.F.; DE FELIPE, M.R. y MINCHIN, F.R. (1993) Oxygen diffusion in lupin nodules. I: visualization of diffusion barrier operation. *J. Exp. Bot.*, 44: 1461-1467.
- (18) JENNY, H. y GROSSENBACHER, K.A. (1963) Root soil boundary zone as seen in the electron microscope. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 27: 273-277.
- (19) JURGENSEN, M.F. y DAVEY, C.B. (1971) Nonsymbiotic nitrogen-fixing microorganisms in forest and tundra soils. *Plant and Soil*, 34: 341-356.
- (20) DE LORENZO, C.; IANNETTA, P.P.M.; FERNÁNDEZ PASCUAL, M.; JAMES, E.K.; LUCAS, M.M.; SPRENT, J.I.; WITTY, J.F.; MINCHIN, F.R. y DE FELIPE, M.R. (1993) Oxygen diffusion in lupin nodules II: Mechanisms of diffusion barrier operation. *J. Exp. Bot.*, 4: 1469-1474.
- (21) DE LORENZO, C. (1992) Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. E.T.S.I. Agrónomos.
- (22) LUCAS, M.M.; VAN DE SYPE, G.; HÉROUART, D.; HERNÁNDEZ, M.J.; PUPPO, A. y DE FELIPE, M.R. (1998) Immunolocalization of ferritin in determinate and indeterminate legume root nodules. *Protoplasma* 204: 61-70.
- (23) KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; SCHROTH, M.N. y TEINTZ, M. (1980) Pseudomonas siderophoros: a mechanism explaining disease-suppressive soils. *Curr. Microbiol.*, 4: 317-320.
- (24) KLOEPPER, J.W.; ZABLOTOWICZ, R.M.; TIPPING, EM. y LIFSHITZ, R. (1986) Emergence-promoting rhizobacteria: description and implication for agriculture. In: Swinburne TR ed. Iron, Siderofores and Plant Diseases. New York: Plenum Press, 155-164.
- (25) KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. y KUC, J.A. (1992) Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Sci. Technol.*, 2: 349-351.

- (26) KUBIENA, W. (1944) Suelo y formación del suelo desde el punto de vista biológico. Nuevas Gráficas. Madrid. 1944.
- (27) LARSEN, K.; BORISOV, A.Y.; SANDAL, N.; MADSEN, L.K.; TSYGANOV, V.E.; VOROSHILOVA, V.A.; BATAGOV, A.O.; STOUGAARD, J. y TIKHONOVICH, I.A. (2001) The first example of a use of achievements in model legumes to clone symbiotic genes of traditional legumes identified by means of chemical mutagenesis. Pea (*Pisum sativum* L.) gene *Sym 35* is likely homologous to the gene *Nin* of *Lotus japonicus*. In: Abstracts of the 13th International Congress on Nitrogen Fixation. Hamilton. Canada. pp. 101.
- (28) MARTÍNEZ ABARCA, F.; HERRERA-CERVERA, J.A.; BUENO, P.; SANJUÁN, J.; BISSELING, T. y OLIVARES, J. (1998) Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *MPMI*. 11(2): 153-155.
- (29) MATHESIUS, U.; SCHLAMMAN, H.R.M.; SPAINK, H.P.; SAUTER, C.; ROLFE, B.G. y DJORDJEVIC, M.A. (1998) Auxin transport inhibition precedes root nodule formation on white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J.*, 14: 23-34.
- (30) MINERDI, D.; FANI, R.; GALLO, R.; BOARINO, A. y BONFANTE, P. (2001) Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *Burkholderia* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 725-732.
- (31) MOLINA, J.A.E.; CLAPP, C.E.; LINDEN, D.R.; ALLMARAS, R.R.; LAYESE, M.F.; DOWDY, R.H. y CHENG, R.H. (2001) Modeling the incorporation of corn (*Zea mays* L.) carbon from roots and rhizodeposition into soil organic matter. *Soil Biol. Biochem.*, 33: 83-93.
- (32) MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B. y BOIVIN-MASSON, C. (2001) Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411: 948-950.
- (33) NIEHAUS, K.; ALBUS, U.; BAIER, R.; SCHIENE, K.; SCHROEDER, S. y PUHLER, A. (1998) Symbiotic suppression of the *Medicago sativa* plant defence system by *Rhizobium meliloti* oligosaccharides. In: Biological Nitrogen Fixation for 21st century (Elmerich, C.; Kondorosi, A. y Newton, W., eds.) pp. 225-226. Dordrecht, Boston, London: Kluwer. Academic Publishers.
- (34) PAUL, A. y CLARK, F.E. (1989) Occurrences and distribution of soil organics. In: Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, San Diego, 81-84.
- (35) PARNISKE, M. (2000) Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3: 320-328.
- (36) POZUELO, J.M.; LUCAS, M.M.; DE LORENZO, C.; FERNÁNDEZ PASCUAL, M.; MALDONADO, S. y DE FELIPE, M.R. (2001) Immunolocalization of alkaloids and X-Ray microanalysis of elements in lupin seeds. *Protoplasma*, 218, 104-111.
- (37) PROVOROV, N.A.; BORISOV, A.Y.; TIKHONOVICH, I.A. (2002) Developmental genetics and evolution of symbiotic structures in nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza. *J. Theor. Biol.*, 214: 215-232.
- (38) ROVIRA, A.D. (1956) Plant root excretions in relation to the rizosphere effect. I. The nature of root exudate from oats and peas. *Plant and Soil*, 7: 178-194.
- (39) RUIZ-ARGÜESO, T.; PALACIOS, J.M.; IMPERIAL, S. (2000) Uptake hydrogenases in root nodule bacteria. In: E. Triplett (ed.): «Prokaryotic Nitrogen Fixation:

- A model system for the analysis of a biological process». Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K.
- (40) SEVILLANO, F. y RODRÍGUEZ BARRUECO, C. (1987) Sistemas simbióticos fijadores de nitrógeno de interés aplicado en agricultura. En: Avances en la biología de la fijación de nitrógeno atmosférico. Eds: M. Megías y I. Ruiz, pp. 9-29. Universidad de Sevilla. Jurgensen y Davey. 1970.
- (41) VASSE J.; DE BILLY F. y TRUCHET G. (1993) Abortion of infection during *Rhizobium* meliloti-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant J.*, 4, 555-566.
- (42) VIVO, A.; ANDREU, J.M.; DE LA VIÑA, S.; DE FELIPE, M.R. (1989) Inmunogold localization of leghemoglobin in plants of *Lupinus albus* L. cv Multolupa. *Plant Physiology*, 90: 452-457.
- (43) XIE, Z.P.; MULLER, J.; WIEMKEN, A.; BROUGHTON, W.J. y BOLLER, T. (1997) Nod factors and Tri-iodobenzoic acid stimulate mycorrhizal colonization and affect carbohydrate partitioning in mycorrhizal roots of *Lablab purpureus*. *New Phytol.*, 139: 361-366.

Interacciones microorganismos-suelo-planta en la preservación del Medio Ambiente y la Salud *

M.^a ROSARIO DE FELIPE ANTÓN

*Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional
de Farmacia*

*Directora del Centro de Ciencias Medioambientales del CSIC.
Madrid*

RESUMEN

Se pone de relieve la importancia de los microorganismos del suelo, que establecen simbiosis con las plantas como biofertilizantes y su aplicación en el control biológico de patógenos. Las interacciones beneficiosas: bacteria-planta y hongo-planta tienen gran interés por su impacto en la Agricultura, Silvicultura y Medioambiente y constituyen una alternativa a la aplicación de fertilizantes químicos que actúan como contaminantes de suelos y aguas con gran perjuicio para la salud. Las bacterias fijadoras de nitrógeno y los hongos micorrizógenos se encuentran entre los simbioses de plantas más extendidos y ecológicamente más importantes. El potencial de los microorganismos del suelo parece ilimitado. Corresponde a la ciencia realizar el estudio profundo de las interacciones de organismos autóctonos del suelo con las plantas, con el fin de que éstas puedan autoabastecerse y autodefenderse en condiciones ambientales adversas, y además se cumpla con el deber de mantener nuestro planeta en óptimas condiciones de salud ambiental para las generaciones futuras.

* Discurso pronunciado en su toma de posesión como Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia el día 26 de junio de 2003.

Palabras clave: Biofertilizantes.— Control biológico.— Fijación biológica de N₂.— Rhizobiaceas.— Simbiosis hongo-planta.— Micorrizas.— Rizosfera.— Rizobacterias.

ABSTRACT

Plant-soil-microorganisms interactions on the protection of the Environment and Health

Soil microorganisms establish beneficial symbiosis with plants and can be considered as biofertilizers and also useful in biological control applications. The beneficial symbiosis: «bacteria-plant» and «fungy-plant», have great interest for its great impact in Agriculture, Forestry and Environment and constitute an alternative to the application of chemical fertilizers, avoiding its negative effects at health and environmental level. The nitrogen-fixing bacteria and mycorrhizal fungi are among the plant symbionts more extended and ecologically more important. The potential of soil microorganisms is unlimited. It is necessary to study more deeply the interaction between endogenous organisms with plant roots, to get a better knowledge of them. With these technologies we are trying both: the self-supplying and self-defending of the plants under adverse environmental conditions and to let to our planet in good health for the future generations.

Key words: Biofertilizers.— Biological control.— Biological N₂ fixation.— Rhizobiaceae.— Symbiosis fungi-plants.— Rhizosphere.— Rhizobacteria.

EXTENSIVE ABSTRACT

This dissertation deals at a field of increasing interest, the interactions between microorganisms, soil and plants, which needs to be studied more deeply, since given its complexity, our knowledge is still very limited. It starts with a previous comments on the soil, as a living agent, the fundamental role played by soil microorganisms on the soil structure, growth of the plants and C and N cycles. Between all ecosystems, the soil presents the major richness of species, living together a great amount of microorganisms as bacteria, fungi, virus, protozoae, and algae. From all of these groups, the bacteria is one of the most abundant and diverse, possibly because they are able of a rapid growth by using a great amount on nitrogen and carbon sources. The bacteria interact with plant roots and colonize the root surface that has a high concentration of nutrients.

Plant life is conditioned by the presence of these wide range of microorganisms associated to the roots which can alter the nutrient absorption, by direct effect on the roots, on the environment or by competition for soil nutrients. The plant rhizosphere is considered as a zone with intense microbial activity surrounding the root surface and stimulating the plant growth. The microbial density in the rhizosphere is higher with respect to the rest of the soil. It is a dynamic and changeable zone with different characteristics to the rest of the soil.

There is an increasing interest for the use of microorganisms as biofertilizers, to achieve the dream of a sustainable agriculture and silviculture to exclude the use of phytosanitary products that are expensive and toxic for human health. These microorganisms can be classified as beneficial or harmful and infective and non infective. The beneficial infective microorganisms include the N_2 fixing bacteria, Gram-negatives, from the Rhizobiaceae family, including the genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium*, all of them living in symbiosis with legume roots. The actinomycete *Frankia* fix N_2 in some trees and bushes such as *Alnus*, *Myrica*, *Eleagnus*, *Casuarina*, etc. The ectomycorrhiza fungi establish symbiosis with a great number of trees, while the arbuscular mycorrhiza (AM) establish symbiosis with most of the higher plants.

Between the non-symbiotic fixing bacteria are the eubacteria *Rhodobacter* and some cyanobacteria and green-blue algae as *Azolla*, *Anabaena* and *Nostoc*, specially important in flooding soils cultures as rice, by permitting a notable saving of nitrogen fertilizers and avoiding soil contamination.

Some beneficial non-infective microorganisms have developed the ability to colonize the plant root surface and they are known as promoting growth plant rhizobacteria (PGPRs). They stimulate plant growth through different ways: by hormone secretion, by inhibiting phytopathogens or by activating nutrient assimilation, mainly nitrogen and phosphorus. The genera *Pseudomonas* and *Bacillus* (*B. thuringensis*) are good examples of rhizobacteria.

The dissertation also focuses on the great interest of legume plants in agriculture and environment for being able to fix N_2 in arid and semiarid zones under symbiosis with the *Rhizobiaceae* family increasing nitrogen content in these areas. The legumes are divided in three subfamilies: *Cesalpinoideae*, *Mimosoideae* and *Papilionoideae*, there are about 750 genera and 18000 to 19000 species. The 88% of the examined species from the three families, form N_2 -fixing nodules in their roots infected by *Rhizobium*. The process of nitrogen fixation is controlled by the plant from the initiation of the infection by the bacteria, and successful nodulation depends on the availability of the combined nitrogen and the adequate photosynthetic energy. As the whole process is governed by genes, the genetic programmes that order the symbiotic compartments, infection thread and symbiosomes, are discussed in the text, as also the programmes controlling the nodule histogenesis, nodule autoregulation and differentiation of bacteria in bacteroids. It is also mentioned some biotechnology strategies to obtain more efficient and competitive strains as good nitrogen fixers.

Besides the symbiosis bacteria-plant, it is described briefly the symbiosis fungi-plant which is carried out by the mycorrhizal fungi of the soil. Most of the plants present mycorrhizal roots, helping to them to obtain mineral nutrients and water from the soil, as complementary roots and inducing resistance against pathogens. Two types of mycorrhiza fungi are described: the ectomycorrhiza, of great value in forestry since they help to the growth and development of the trees and are of great economical interest for industry by the commercialization of the fungi carpophores (mushrooms). The other type, the arbuscular mycorrhiza establish symbiosis with agricultural plants acting as biofertilizers of crops under stress conditions.

The potential of soil microorganisms is unlimited. However, it will be necessary to study more deeply the interactions between the soil endogenous organisms with plant roots, to get a better knowledge of them. Food in undeveloping countries depends on a monoculture as rice, corn, wheat etc., and the use of fertilizers can be expensive for farmers. Our challenge nowadays is to extend nitrogen fixation to non-legumes plants. With these biotechnologies, we are trying both: the self-supplying and self-depending of the plants under adverse environmental conditions and to let to our Planet in good health for the future generations.

«Entremos más adentro en la espesura»

SAN JUAN DE LA CRUZ

INTRODUCCIÓN

La ciencia en general surge de un interrogarse el hombre desde sus comienzos en este planeta. Podría decirse que el científico se parece a un explorador que al recorrer montañas desconocidas tras las que aparecen siempre otras más altas y lejanas envueltas en una creciente niebla, no puede dejar de preguntarse por lo que hay más allá. Pues las grandes leyes que sigue la naturaleza son como picachos que asoman sobre nubes brumosas en una incitación apremiante a buscar lo que hay detrás.

Mi discurso va a versar sobre un campo de interés creciente, las interacciones microorganismos-suelo-planta, que necesita ser investigado en profundidad, dada su complejidad, pues a pesar de los muchos estudios que se han realizado, nuestro conocimiento es todavía muy limitado. Los estudios que he llevado a cabo en este campo a nivel de Fisiología y Bioquímica Vegetal los he complementado siempre con técnicas histoquímicas para lograr un mejor conocimiento de estos mecanismos mediante la interrelación estructura-función.

Así pues, la aportación de mis investigaciones a las interacciones estudiadas han ido dirigidas en gran parte al conocimiento de las estructuras vegetales implicadas y a la localización de los compo-

nentes químicos *in situ* para poder comprender mejor la función que ambos realizan en la interacción.

Las técnicas histoquímicas disponibles en la actualidad se han desarrollado ampliamente, constituyendo un potencial muy eficaz para el estudio complementario de los mecanismos bioquímicos y moleculares de un determinado proceso, y han alcanzado un gran nivel paralelamente al desarrollo de la Genética y la Biología Molecular.

Hagamos unas consideraciones previas:

Si miramos atentos, con mirada profunda, constatamos la perfección de la creación, pues el mundo macroscópico que vemos está formado por micro unidades microscópicas integradoras de los seres vivos, relacionadas entre sí y entrelazadas, siguiendo una perfecta armonía, lo que nos lleva a pensar, a menudo, en la creación de un planeta armónico, capaz de autodefenderse y autorregularse por sí mismo, siguiendo las leyes de la naturaleza en cada uno de sus componentes.

La humanidad desde hace siglos, y por voluntad del Creador, tiene colgada su existencia del misterioso hilo de sucesos que se producen cuando las semillas se alojan en el generoso seno del suelo, que convierte en realidad el misterio, en potencia, del equipo hereditario. El suelo es un arca mágica, un sistema complejo, que alberga entre otros componentes, el misterio de las membranas radiculares, capaces de unir el mundo vivo y el mundo muerto.

Si consideramos la diversidad de fenómenos inorgánicos y orgánicos que se producen en el suelo y las variaciones de todos los órdenes a que está sujeto, podríamos decir que el suelo es la capa viviente de transformación de la esfera sólida terrestre, surgida bajo el influjo de la vida y de las especiales condiciones ambientales de un hábitat biológico que está sometido a un constante cambio y desarrollo peculiar (26). Puesto que el suelo surge bajo la influencia del desarrollo de la vida, es necesario tener ésta muy en cuenta, pues el proceso de desarrollo corre paralelo generalmente al de colonización del suelo por los organismos (microorganismos, vegetación, animales y el hombre). Pero son muchos los factores que intervienen en su formación, y por ello en cada caso el suelo es una individua-

lidad, un conjunto resultante de acciones variadísimas, entre las que las condiciones ambientales juegan un papel clave. Si la vida ejerce (directa o indirectamente) tan gran influjo sobre el suelo, éste delimita las condiciones de vida. De ahí la estrecha relación entre las Ciencias del Suelo, y la Biología, y existen métodos de estudio del suelo análogos a los biológicos, como es, por ejemplo, la micromorfología del suelo, introducida en España por el profesor Kubiena, que estudia el suelo *in situ* en preparaciones de cortes delgados para conocer sus componentes, de un modo similar a los métodos histológicos que informan de la composición anatómica de un tejido.

El profesor Albareda tuvo una visión muy amplia cuando creó nuestro Instituto en 1942, relacionando las Ciencias del Suelo con la Fisiología Vegetal y la Ecología. La filosofía de su creación se fundamentó en que planta y suelo constituyen una unidad, con las más extensas interacciones, de las que brotaran conocimientos de ciencia natural pura y aplicaciones agrícolas y forestales.

EL SUELO, AGENTE DE VIDA

Rocas y sedimentos geológicos han sufrido alteraciones durante la formación del suelo por factores geológicos, topográficos, climáticos, físicos, químicos y biológicos, para formar una entidad viviente, compuesta de una asociación de partículas inorgánicas o minerales, entrelazadas con materia orgánica y gases difundidos. Cuando el suelo es humedecido con agua, este complejo sistema se transforma en un sustrato fértil, donde brota la vida en el planeta. Esta es la zona de la pedosfera, que sostiene la vida sobre la tierra y que es biológicamente un medio activo y estructurado al servicio de su verdadera función, como es su aprovechamiento para el desarrollo de los seres vivos.

En su estado natural, el suelo constituye una entidad biológica, regulada por sí misma, que evoluciona lentamente en el tiempo. Podría compararse a una esponja, regulando y amortiguando el suministro de nutrientes y agua para el crecimiento de la macro y microflora, y de la fauna, y determinando el reparto del agua, entre la que fluye por la superficie hacia los ríos y lagos y la que percola para reponer los acuíferos y reservorios de aguas subterráneas.

Pero el suelo no solamente sirve para promover y sostener la vida en sus formas variadas, sino que también actúa como un filtro viviente de los restos generados por hombres y animales. En este papel, limpia, purifica, recicla y disminuye el daño de muchas toxinas y patógenos que de otro modo irreparablemente contaminarían y degradarían el ambiente. Algunos de sus componentes (los microorganismos) producen antídotos, que controlan las infecciones y enfermedades de las raíces. Pero la manipulación del hombre puede romper esta autorregulación y puede conducir a situaciones difíciles para la vida, ya que el suelo es un recurso no renovable que hay que mantener y proteger.

Los organismos juegan un papel fundamental en la estructura del suelo, crecimiento de las plantas y ciclos del carbono y del nitrógeno. El suelo es de entre todos los ecosistemas terrestres el que presenta una mayor riqueza en especies. En él conviven una gran cantidad de microorganismos, como bacterias, hongos, virus, protozoos y algas. Pero de todos los grupos anteriormente enumerados, uno de los más abundantes y diversos es el constituido por bacterias, posiblemente por ser capaces de crecer más rápidamente y poder utilizar una gran variedad de compuestos como fuentes de carbono y de nitrógeno. Las bacterias se localizan en la superficie de las partículas del suelo, pudiendo interactuar con las raíces de las plantas, ya que hay una alta concentración de nutrientes en esa zona. Las bacterias además poseen, quizá más que otros organismos, una gran adaptabilidad, tanto fisiológica como genética (transferencias horizontales y verticales), elevada tasa de mutación, variación de fase, etc., frente a la variación de las condiciones del suelo. Por el contrario, muchos microorganismos pueden no tener la capacidad de adaptarse a ese ambiente, y no llegan a sobrevivir en él, de ahí que no prosperen ciertas inoculaciones con bacterias, usadas en prácticas biotecnológicas.

Los avances en biología molecular que han hecho posible el estudio de organismos que crecen en el laboratorio en medios de crecimiento seleccionados deberían hacer posible el crecimiento de las poblaciones del suelo en estos medios para poder identificarlas y tener un mayor conocimiento de sus propiedades y poder manipularlas en nuestro beneficio. Se calcula que existen en el suelo unas 30.000 especies de bacterias y 1.500 especies de hongos, de las cua-

les sólo han sido identificadas un 8 y un 1%, respectivamente. En el suelo se encuentran un gran número de bacterias viables, que no son cultivables. Así pues, la biología del suelo se encuentra todavía en un periodo de infancia.

Los microorganismos que crecen alrededor de las raíces de las plantas constituyen la biomasa mayor de nuestro planeta. Las bacterias son, sin duda alguna, el grupo de organismos metabólicamente más significativos de los organismos del suelo. En cuanto a los hongos, son los organismos más dominantes por los múltiples procesos que realizan y por su gran biomasa.

En algunos suelos la biomasa de los hongos excede la formada por todos los demás organismos combinados, siendo su papel la descomposición y mineralización de compuestos de origen vegetal y animal (celulosa, hemicelulosa, lignina y quitina) y también su implicación en simbiosis beneficiosas con raíces de plantas, a las que capacitan para vivir en condiciones limitantes de nutrientes o de agua e incluso aumentan su resistencia a patógenos, los cuales causan billones de euros en pérdidas de los cultivos.

LA RIZOSFERA

La vida de las plantas está condicionada por la existencia de esta amplia gama de microorganismos que viven asociados con ellas, los cuales pueden alterar la absorción de nutrientes por efecto directo sobre las raíces, por efecto sobre el medio y por competir directamente por los nutrientes del suelo. Estos microorganismos, actuando principalmente desde la rizosfera, condicionan la nutrición y la salud de las plantas y por tanto el correcto funcionamiento de toda la biosfera. Se considera a la rizosfera como una zona de intensa actividad microbiana alrededor de las raíces, cuya influencia estimula el crecimiento y aumenta la densidad de microorganismos entre 10^2 a 10^3 respecto al resto del suelo. Esta zona es dinámica y cambiante, y tiene unas características físicas, químicas y biológicas diferentes del resto del suelo. En 1904 Hiltner definió la rizosfera como aquella porción de suelo en torno a las raíces, con una mayor actividad microbiana, resultante de la alta concentración de carbono y otros nutrientes existentes en esta zona, ampliándose este concep-

to en la actualidad hasta considerar como rizosfera la porción de suelo influida por las raíces vivas.

El interés cada vez mayor de utilizar microorganismos para lograr el sueño de una agricultura y silvicultura sostenibles donde se excluya el uso de fitosanitarios caros y nocivos, conduce a una mayor atención sobre la manipulación más efectiva de la rizosfera. Desde que Hiltner la definió, ha habido bastantes avances en reconocimiento al importante papel de los microorganismos sobre el crecimiento de las plantas. Son muchos los trabajos realizados (3, 4, 38 y 31), destacando sobre todos ellos los llevados a cabo por Rovira y su grupo en Australia, llegando a denominarse «efecto rizosfera» a la influencia de la planta sobre el suelo, aunque a medida que los trabajos han ido progresando, podemos considerar el «efecto rizosfera» más que como un efecto, como un sistema natural con propiedades, elementos y fronteras definidas en el que se identifican tres zonas:

- a) La ectorizosfera: región del suelo en contacto directo con la raíz.
- b) El rizoplano: región radical que está en contacto directo con el suelo.
- c) La endorizosfera: región del tejido cortical de la planta colonizada por microorganismos.

La mayoría del conocimiento sobre la existencia física de la rizosfera se deriva de la microscopía electrónica de transmisión y barrido (13, 14). Estos estudios han mostrado que las células epidérmicas de las raíces están recubiertas de polisacáridos de doble origen, vegetal y microbiano, de grosor variado, en el cual las colonias de microorganismos están incluidas y asentadas. Los azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, etc., son responsables de las especies, variedades y número de microorganismos que en ella viven. Un componente puede estimular el crecimiento de un microorganismo y puede ser neutral o inhibidor para otros. Así, los sideróforos exudados por gramíneas del mismo modo a los excretados por ciertas bacterias, pueden inhibir el crecimiento de algunos microorganismos, llegando a reducir la disponibilidad del hierro en la rizosfera.

Las condiciones ambientales de crecimiento de la planta influyen decisivamente sobre estos exudados en cantidad y composición. Las raíces cambian física y fisiológicamente con la edad y el medio que las rodea, por lo que las sustancias excretadas son diferentes, siendo la producción de aminoácidos, siempre mayor cerca de la cofia, zona muy metabólica y de mayor absorción de agua y nutrientes.

El mucilago que rodea la cofia de las raíces y se extiende a lo largo de los primeros centímetros de la raíz (18) juega un importante papel en el dinamismo de la zona rizosférica. Durante mi estancia en la Universidad de California (1964), colaboré con los profesores Jen-ny y McLaren en el esclarecimiento del origen de la capa mucilagino-rosa de las raíces, ya que en dicha Universidad había dos teorías. Los partidarios de que su formación se debía exclusivamente a los exudados de las raíces (Departamento de Suelos y Nutrición Vegetal) y los que opinaban que su origen era exclusivamente microbiano (Departamento de Microbiología). Utilizando plantas estériles y no estériles y analizando la rizosfera por microscopía óptica y electrónica concluimos que la capa mucilagino-rosa es producto de la planta y de las excrecciones de microorganismos que viven sobre ella.

A pesar de muchos años de aislamiento de microorganismos de la rizosfera, nuestro conocimiento real es fragmentario. Los métodos tradicionales de cultivo *in vitro* recobran solamente un pequeño porcentaje de los organismos reconocidos previamente por el microscopio y los contados directamente. La temperatura de incubación y la riqueza del medio juegan un papel importante para el organismo aislado y especialmente la composición del medio de cultivo tiene un papel primordial. Así las *Pseudomonas* fluorescentes han sido calificadas como el mayor grupo bacteriano de la rizosfera, lo que obedece únicamente a que dado el interés de estas bacterias para su uso como protectores de plantas, se han buscado medios selectivos para su aislamiento (25).

Pero si se conocieran las características específicas que controlan el crecimiento y supervivencia de las especies, sería posible modificarlas para favorecer el crecimiento de los microorganismos deseables y eliminar a los indeseables. El interés de la manipulación se basa también en que las raíces colonizadas pueden ser un vector eficaz de introducción de bacterias con características adecuadas para procesos de Bioremediación de suelos contaminados (5).

TIPOS DE ORGANISMOS DEL SUELO

Los microorganismos del suelo pueden ser separados en beneficiosos o perjudiciales e infectivos y no infectivos. Los organismos beneficiosos infectivos incluyen los fijadores de nitrógeno, bacterias Gram negativas, tales como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, que viven en simbiosis con leguminosas. El actinomiceto *Frankia* que fija nitrógeno en determinados árboles y arbustos, tales como *Alnus*, *Myrica*, *Eleagnus*, *Casuarina*, etc., los hongos ectomicorrizos que establecen simbiosis con un gran número de árboles, y las micorrizas arbusculares (AM), que se asocian a las raíces de la mayoría de las plantas superiores excepto con las *Brassicaceas* y *Quenopodiaceas*.

Otros fijadores de nitrógeno en asociación no simbiótica han demostrado gran capacidad para sustituir a los fertilizantes nitrogenados y contribuir a la sostenibilidad de los sistemas agrícolas, siendo pioneros en su utilización algunos países como Brasil, en cultivos de caña de azúcar y maíz, caracterizándose Brasil por ser uno de los países menos contaminados por fertilizantes sintéticos. Los organismos responsables de este tipo de fijación se encuentran en estado libre en el suelo, obteniendo la energía requerida para la fijación de nitrógeno de la fotosíntesis o de la oxidación de productos orgánicos del suelo.

Entre los fijadores libres fotosintéticos se encuentran eubacterias fototrofas como *Rhodobacter* y algunas cianofíceas, algas verdes azuladas: *Azolla*, *Anabaena* y *Nostoc*, que fijan el nitrógeno en células especiales llamadas «heterocistos». Estas algas son particularmente importantes en cultivos de suelos encharcados como el arroz, donde la fijación puede alcanzar 30 kg de nitrógeno por hectárea y año, permitiendo un notable ahorro de fertilizantes nitrogenados y evitando la contaminación de estos suelos.

Los organismos heterotróficos no-fotosintéticos fijan el nitrógeno obteniendo la energía de compuestos del suelo excretados por las raíces. Estas bacterias pertenecen al género *Clostridium* (anaeróbicos), *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Beijerinckia* (aeróbicos). Mediante técnicas de N¹⁵ ha sido posible seguir la contribución significativa del nitrógeno fijado por *Clostridium* en suelos forestales caracteriza-

dos por pHs bajos (19). Las cantidades de nitrógeno fijadas por estas bacterias permiten suponer que se pueden alcanzar los 100 kg. de N por hectárea y año. Son asociaciones de gran potencial agronómico, presentando especial interés la asociación de *Azospirillum* con cultivos forrajeros tropicales (*Panicum maximum*) y con cultivos de maíz, caña de azúcar, trigo, centeno y sorgo.

BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Una parte de los microorganismos beneficiosos, no infectivos, ha desarrollado la habilidad de colonizar la raíz, y se conocen en su conjunto como rizobacterias. Las rizobacterias beneficiosas que promueven el crecimiento de las plantas, bien específicamente mediante la secreción de hormonas o indirectamente inhibiendo organismos fitopatógenos o activando la asimilación de nutrientes, se conocen como bacterias promotoras del crecimiento (PGPRs) y a su identificación y mecanismos de acción ha contribuido el profesor Gutiérrez Mañero y su grupo de la Universidad San Pablo-CEU, con los cuales hemos colaborado en los últimos años en proyectos comunes.

Aunque la interacción de estos microorganismos con las plantas ha sido convenientemente estudiada, aún estamos lejos de entender las complejas interrelaciones metabólicas y ecológicas que resultan en efectos beneficiosos o perjudiciales para los cultivos, y uno de los mayores retos es conseguir una descripción precisa y completa de estos complejos sistemas. Este conocimiento permitiría responder a la pregunta, de gran interés práctico, sobre si podemos manipular los microorganismos o las plantas para conseguir una óptima asociación que resulte en mejoras de la productividad y salud de los cultivos.

BIOTECNOLOGÍAS LIMPIAS EN AGRICULTURA

El suelo es un recurso natural con una función primordial, soportar una vegetación, y en él se deben dar las condiciones necesarias para el desarrollo permanente de la misma. La salud del suelo está estrechamente relacionada con la alimentación humana a través de la producción agrícola y ganadera.

El hombre puede perturbar este recurso natural, bien sobreexplotando la productividad del sistema, que incapaz de regenerarse se empobrece y degrada, o mediante el vertido de residuos en una proporción muy superior al que el medio puede absorber y transformar. El deterioro del medio hace peligrar lo que habitualmente denominamos «calidad de vida», pero el agotamiento de los recursos naturales, por encima del nivel de sostenibilidad, lo hace sobre el «nivel de vida».

Sin embargo, las prácticas agrarias que se han venido utilizando en las últimas décadas para conseguir un aumento de la producción, mediante el uso de especies vegetales con una alta respuesta a la fertilización química, han conducido a la contaminación de los suelos y han causado graves problemas de eutrofización en las aguas de bebida, en ríos, lagos, lagunas y aguas subterráneas con grave repercusión sobre la salud humana.

Se hace necesario producir evitando efectos nocivos, mantener limpia la naturaleza sin pensar en grandes producciones, sino más bien atendiendo a la calidad del producto obtenido y sobre todo intentando una agricultura más respetuosa con el medio. Todo ello conduce a una «Nueva Agricultura» a una Agricultura Sostenible con capacidad de mantenerse y prolongarse en la agricultura del futuro.

Las prácticas biotecnológicas ofrecen una posible solución, de manera responsable, para mejorar la producción agrícola, atendiendo a las nuevas tendencias ambientales, impulsando el estudio de nuevas tecnologías que permitan aumentar la producción agrícola y forestal en el marco de una agricultura y silvicultura sostenibles.

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (1992) definió la biotecnología como toda aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos y organismos vivos, o sus derivados, para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos. Abarca una amplia gama de tecnologías diferentes, como el empleo de biofertilizantes, agentes de biocontrol y además incluye la manipulación, transferencia de genes o clonación de plantas, que ha llevado a la selección de genotipos de forma más rápida y selectiva.

Una alternativa complementaria a la utilización de los OMGs es la potenciación del aprovechamiento de organismos nativos del sue-

lo, bacterias y hongos (24), su incidencia en la nutrición y protección vegetal y su interés, especialmente en países subdesarrollados, con baja productividad agrícola y con dificultades económicas.

Se abre así un campo de investigación de gran importancia, que requiere ser estudiado en profundidad, atendiendo a sus posibles repercusiones bióticas y abióticas sobre el Medio Ambiente y la Salud. Las simbiosis «bacteria-planta» y «hongo-planta» han sido estrechamente estudiadas.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno y los hongos micorrícicos están entre los endosimbiontes de plantas más extendidos y ecológicamente más importantes, y a ellos nos vamos a referir a continuación.

Fijación biológica de nitrógeno (FBN)

El nitrógeno, después del agua, es el principal nutriente limitante para el desarrollo de las plantas. Precisamente por esta razón en el periodo entre 1950 y 1990 se incrementó diez veces en España el uso de fertilizantes nitrogenados, lo cual llevó a un aumento sin precedentes de la productividad en los cereales. Sin embargo, la aplicación de estos fertilizantes y otras acciones industriales y antrópicas han alterado las condiciones básicas del ciclo natural del nitrógeno y han contribuido a la contaminación por nitratos de los ecosistemas terrestres y acuáticos con grave riesgo para la salud humana. Los efectos sobre la salud han sido puestos de manifiesto en diversos estudios epidemiológicos y clínicos, estudios que han demostrado que la ingestión de nitratos en el agua de bebida o en alimentos conduce a la aparición de metahemoglobinemia e incluso se han relacionado con la aparición de cáncer. El nitrato se transforma en el organismo en nitrito que oxida el Fe^{2+} ferroso de la hemoglobina a Fe^{3+} férrico, que es incapaz de fijar el oxígeno y transportarlo a los tejidos; es lo que se llama enfermedad azul de los lactantes. Otro producto secundario resultante de los nitratos son las nitrosaminas, cuyo carácter cancerígeno fue demostrado por Mirvish en 1981.

El nitrógeno es el elemento más abundante de la atmósfera terrestre y sin embargo es una fuente nutritiva muy escasa. Esta paradoja se debe a que el nitrógeno atmosférico es inerte y no puede

ser aprovechado por la mayoría de los seres vivos, únicamente se incorpora a los sistemas biológicos cuando ha sido fijado por organismos fijadores o combinado con ciertos elementos como el hidrógeno o el oxígeno, en forma de nitrato o de amonio.

La FBN aporta la mayor parte del nitrógeno fijado a los ecosistemas terrestres. La fijación global se estima en unos 275 millones de toneladas de nitrógeno al año. De esta cantidad, 30 millones se fijan por causas naturales como descargas eléctricas, erupciones volcánicas, etc.; 70 millones se fijan mediante fijación industrial en el proceso de Haber-Bosch, en el cual se gasta gran cantidad de energía procedente del petróleo, y 175 millones de toneladas se fijan mediante fijación biológica. De estos 175 millones, 35 se fijan mediante fijación en vida libre y 140 mediante fijación simbiótica (40).

Así pues, la Fijación Biológica de Nitrógeno representa una alternativa a la fertilización nitrogenada, y está restringida a organismos procariontes, capaces de reducir el nitrógeno molecular a amoniaco, tanto en vida libre como en simbiosis.

LAS LEGUMINOSAS

A partir de las experiencias de Hellriegel en 1886 se han intensificado los estudios dirigidos al importante papel que juegan las leguminosas en el medioambiente y la salud. Las leguminosas son base de la dieta mediterránea y tienen un papel crítico en los ecosistemas naturales, en la agricultura y en el sector agroforestal, donde su habilidad para fijar nitrógeno en simbiosis hace de ellas excelentes colonizadoras en medios deficientes de nitrógeno. Existen alrededor de 750 géneros y entre 18.000 a 19.000 especies distribuidas en tres subfamilias: *Caesalpinodeae*, con numerosas especies tropicales; *Mimosoideae*, con especies arbóreas como *Acacia* sp., y *Papilionoideae*, con especies de elevada importancia agrícola. El 88% de las especies examinadas forman en sus raíces nódulos con *Rhizobium* (12).

El éxito adaptativo de las leguminosas les permite colonizar suelos pobres en nutrientes. La abundancia de sus raíces hace también posible la mejora de las características fisicoquímicas de suelos de zonas áridas y semiáridas. Su uso para pasto y mejora de suelos data

de los romanos, que recomendaban en los tratados de Agricultura el cultivo alternativo de gramíneas y leguminosas, con el fin de aumentar la producción de trigo y cebada. En 1932, Fred y col., en su libro titulado *Root nodule bacteria and leguminous plants*, incluyen una cita de Varro (37 BC) que dice: «las legumbres deben plantarse en suelos, no tanto por su importancia como cultivo, sino como por sus buenos efectos sobre los cultivos sucesivos».

Las bases científicas de este proceso fueron presentadas primeramente por Boussingault a mediados del tercer decenio del siglo XIX en Francia. En 1907, en el libro de Primera Enseñanza Superior de Forcadell se puede leer: «Los agrónomos han clasificado las plantas en dos grupos: reparadoras y esquiladoras. Las primeras en lugar de empobrecer el suelo lo enriquecen, por nutrirse más de la atmósfera que de los jugos de la tierra...», propiedad relativa a las plantas leguminosas.

El proceso de fijación biológica de nitrógeno, que hermana a las leguminosas con las bacterias, estableciendo un diálogo entre los dos simbioses, constituye una de las biotecnologías más sorprendentes y excepcionales, por su gran repercusión en el sector sanitario y agroalimentario. Se estima que aproximadamente 100 leguminosas agrícolamente importantes contribuyen anualmente con casi la mitad del nitrógeno fijado biológicamente. En el mundo se estima que sólo las leguminosas grano ocupan cerca de 150 millones de hectáreas con una producción anual de 200 millones de toneladas grano.

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa y la actinomicorrícica se originaron en el cretácico cuando los suelos eran pobres en N combinado. La fuerte presión por la captación de N favoreció a estas plantas para establecer simbiosis con microorganismos del suelo. Su antigüedad data de 60 a 70 millones de años, cuando las familias mayores de angiospermas se separaron (11).

Según algunos autores, la simbiosis entre las leguminosas y *Rhizobiaceas* existía ya antes de que el oxígeno existiera en la tierra. Según Oparín y Haldane, la primitiva atmósfera sólo contaba con agua, CO₂ y NH₄, y ésta puede ser la causa de las condiciones de anaerobiosis que requiere este proceso.

Las leguminosas pueden realizar asociaciones simbióticas tanto con bacterias del suelo como con hongos micorrícicos. Investigacio-

nes actuales apuntan a que los mecanismos de reconocimiento de uno u otro microsimbionte por las leguminosas son similares a nivel genético. El estudio de estos mecanismos comunes en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa y micorriza-planta permitirá no sólo la mejor comprensión de ambos procesos, sino también la mejor utilización de su potencial en una Agricultura Sostenible, respetuosa con el Medio Ambiente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA FORMACIÓN DEL NÓDULO DE LEGUMINOSAS

El establecimiento de la simbiosis *Rhizobium-leguminosa* comienza con el reconocimiento específico entre la bacteria y su planta hospedadora. La especificidad de la interacción simbiótica viene dada por el intercambio inicial de señales químicas entre la planta y el rizobio, que activan programas genéticos específicos de nodulación en ambos simbioses.

Los exudados radiculares de las leguminosas, azúcares, aminoácidos, así como compuestos flavonoides (flavonas, isoflavonas, chalconas y flavononas) atraen a las bacterias que emigran hacia sus raíces. La respuesta bacteriana, mediada por la proteína NodD constitutiva, emite a su vez señales de nodulación, el Factor Nod, para la activación y transcripción de genes implicados en el proceso simbiótico, que origina la curvatura de los pelos radiculares, la formación de células meristemáticas en la corteza de la raíz (primordio nodular) y la expresión de genes de nodulinas tempranas (ENOD12 y ENOD20). Los factores Nod son reguladores de desarrollo muy potentes, ya que su efecto se expresa a concentraciones de 10^{-8} a 10^{-12} M. Se trata de un lipo-chito-oligosacárido que induce los estadios más tempranos de la nodulación y cuya composición química difiere según el tipo de interacción.

La infección comienza con la digestión localizada de la pared del pelo radicular por *Rhizobium* y la formación del canal de infección, siendo las bacterias liberadas por endocitosis en el citosol de las células corticales.

La raíz aísla a las bacterias recién liberadas, facilitándoles la membrana peribacteroidal, de origen vegetal, formada a expensas de

cisternas de retículo endoplásmico y vesículas de Golgi. En el interior de la membrana peribacteroidal las bacterias se diferencian en bacteroides, de mayor tamaño que las bacterias en vida libre, dando lugar al «simbiosoma» o unidad fijadora de nitrógeno formada por uno o más bacteroides rodeados por la membrana peribacteroidal. El simbiosoma es un orgánulo subcelular exclusivo de raíces de leguminosas. La síntesis del enzima nitrogenasa es inmediatamente inducida en los bacteroides (genes *Nif*), que les capacita para reducir el nitrógeno atmosférico a amonio con un gran coste de energía para la planta.

En algunos nódulos, en su mayoría indeterminados, los bacteroides se dividen dentro de los simbiosomas, paralelamente a la multiplicación de las células infectadas para crear la zona infectada. Finalmente se llega a la formación del nódulo en el que la zona infectada está rodeada de una corteza interna y externa de donde parten los haces vasculares que transportan los fotosintatos de la planta al nódulo, y los compuestos nitrogenados en forma de amidas o ureidos elaborados por el nódulo a la parte aérea de la planta. En nódulos indeterminados (trébol, guisante, alfalfa, etc.) existe un meristemo apical responsable del crecimiento continuo del nódulo, que no poseen los nódulos determinados (soja).

La infección de las raíces por las bacterias puede realizarse de modo diferente al canal de infección, aunque ésta es la forma más frecuente. Otras formas de infección se realizan por heridas producidas en la emergencia de las raíces laterales, como ocurre en el género *Arachis* (cacahuete), en *Sylosanthes*, *Aeschynomene* y en otras plantas. En simbiosis primitivas de la familia Cesalpinoideas (p.e., en *Cassia*), y también en las papilionáceas leñosas *Andyra* e *Hymenolobium*, las bacterias no eran liberadas del canal de infección, la fijación de nitrógeno se realizaba en estas estructuras o «canales de fijación».

Aunque la interacción *Rhizobium*-planta es bastante específica, lo que significa que cada planta será nodulada por su rizobio o rizobios característicos, sin embargo, una misma cepa bacteriana es capaz de establecer simbiosis con diferentes leguminosas como *R. leguminosarum*, que puede nodular *Pisum* y *Cicer*. El caso extremo es la especie de amplio rango de hospedador *Synorhizobium* sp. NGR234, que puede establecer simbiosis con 353 leguminosas. A su vez, una

misma planta puede ser nodulada por diferentes rizobios, como ocurre en soja, que es nodulada por *B. japonicum* y *Sinorhizobium fredii*.

En todo momento, el establecimiento de la simbiosis está controlado por la planta. Es la planta la que determina que se inicie o no la infección, en función de la disponibilidad de nitrógeno combinado y de la energía fotosintética adecuada.

EVOLUCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS SIMBIÓTICAS

La simbiosis entre leguminosas y bacterias rizobiáceas es el sistema mejor estudiado en el marco de las interacciones planta-microorganismo. Estas bacterias son simbioses facultativos, cultivados fácilmente ex-planta y accesibles a su investigación por métodos genéticos y moleculares modernos.

Todo el proceso de la fijación de nitrógeno está gobernado por genes y el uso de mutantes, defectuosos en componentes estructurales, ha sido de gran ayuda para esclarecer las distintas etapas de iniciación y desarrollo del nódulo.

Los nódulos representan un modelo apropiado para estudiar un amplio rango de funciones clave en las plantas, incluyendo la señalización inicial entre los simbioses, diferenciación celular y organogénesis, así como expresión de genes responsables del desarrollo del nódulo y su envejecimiento. Usando mutantes de diferentes leguminosas (guisante, soja, alfalfa, trébol, judía, etc.), se han identificado alrededor de 100 genes responsables del desarrollo del nódulo. De ellos, más de 40 genes han sido identificados en *Pisum sativum*, que sigue siendo uno de los modelos más adecuados.

Los análisis genéticos pueden ser de gran utilidad para diferenciar los estadios más significativos de la simbiosis, cuando cada uno de ellos está controlado por uno o varios genes. De este modo se ha podido hacer un seguimiento del proceso de infección en *Medicago sativa* desde la iniciación del canal de infección, crecimiento en el interior del pelo radical y su avance en la corteza de la raíz, mediante mutantes de *Rhizobium meliloti*, defectuosos en diferentes componentes de exopolisacáridos, e igualmente se ha seguido la liberación de las bacterias en la corteza radicular, diferenciación en bacteroides y formación del joven nódulo.

La secuencia funcional de los genes simbióticos de la planta, identificados mediante el uso de genotipos mutantes, coincide en general con la ordenación de los estadios de desarrollo identificados en los genotipos silvestres. Sin embargo existe una excepción muy notable: las mutantes defectuosas en la autorregulación sistemática de la nodulación, usualmente retienen la capacidad fijadora de nitrógeno, por lo que la respuesta a la autorregulación no debe ser considerada como elemento a valorar en el proceso «escalonado» del desarrollo de los compartimentos simbióticos. Esto también sucede en la formación histológica del nódulo, ya que algunas mutantes de alfalfa forman estructuras pseudonodulares sin haber sido inoculadas con *Rhizobium* (8).

Todos estos datos sugieren que el programa integral del desarrollo del nódulo no está formado por una cadena lineal de etapas sucesivas, sino por diferentes subprogramas, que son implementados en cierto grado, independientemente uno de otro, pudiendo cada subprograma, a su vez, constar de varios pasos sucesivos.

El más importante es el subprograma genético que ordena el desarrollo de los compartimentos simbióticos: canal de infección y simbiosomas, que separa las bacterias del citosol vegetal y asegura un diálogo íntimo entre ellos. En paralelo, los subprogramas que controlan la histogénesis del nódulo, la autorregulación de la nodulación y la diferenciación de las bacterias en bacteroides, ocupan también un especial relieve.

La identificación de los subprogramas mencionados no es en todos los casos un resultado específico de la investigación con mutantes. Es evidente que con independencia del desarrollo de los componentes simbióticos, las mutantes defectuosas en la síntesis de exopolisacáridos y lipopolisacáridos, componentes específicos del nódulo, no infectan usualmente las raíces, pero inducen la formación de pseudonódulos. También se ha evidenciado que cuando los factores Nod purificados son añadidos, pueden inducir a la formación del primordio nodular e incluso estados iniciales de la estructura nodular. Sin embargo, para estudiar la inducción de los genes que se expresan en los estadios iniciales de la infección por *Rhizobium* y los genes *Nif* de fijación de nitrógeno es necesario el empleo de bacterias mutantes.

Los genes simbióticos identificados, usando sus productos moleculares, son las llamadas «nodulinas» y a su estudio ha cooperado el doctor Bisseling y su grupo del *Department of Molecular Biology* de la Universidad de Agricultura de Wageningen. Estos componentes pueden representar más de la mitad del contenido de proteínas de los nódulos. Para identificar estos genes se ha comparado la expresión de proteínas (RNAs) de plantas noduladas con raíces no inoculadas y nódulos Fix^+ y Fix^- . Este abordaje ha permitido diferenciar entre «nodulinas tempranas», activadas antes de la aparición de la fijación de nitrógeno, y «nodulinas tardías», que aparecen durante y después del comienzo de la fijación de nitrógeno. Nuestro laboratorio ha contribuido al estudio de una de estas nodulinas tardías, la «leghemoglobina» o «hemoglobina» de las plantas.

Algunas nodulinas están relacionadas con la formación de estructuras simbióticas, por ejemplo, la nodulina temprana ENOD2, activamente sintetizada en el parénquima nodular, mientras que las nodulinas ENOD5 y ENOD12 están localizadas en las paredes del canal de infección (Mylona y col., 1995). La nodulina N-26, sintetizada durante la liberación de las bacterias del canal de infección, es un componente de la membrana peribacteroidal y puede estar relacionada con el transporte de nutrientes entre los simbiositos. La nodulina ENOD40 está relacionada con el balance hormonal durante los estadios iniciales del establecimiento del nódulo. Esta nodulina parece controlar el cociente auxinas/citoquininas que se altera enormemente después de la inoculación con *Rhizobium* y juega un papel importante en la formación del primordio nodular y anatomía general del nódulo (16, 29).

MECANISMOS DE DEFENSA A LA INFECCIÓN

Inmediatamente después de la inducción de la nodulación, se inician las reacciones propias del endosimbionte en la planta hospedadora, en la que tiene especial relieve las interacciones previas a la separación de las bacterias del citosol de las células infectadas. Podrían asemejarse estos mecanismos a las reacciones de defensa de las plantas contra patógenos, que incluyen la síntesis de muchos compuestos, como ácido salicílico, quitinasa, peroxidasa, callosa,

extensinas, proteínas de defensa, etc. En la nodulación las reacciones no son tan intensas como durante la patogénesis y están estrechamente relacionadas con la especificidad de la simbiosis. La síntesis de factores de defensa es mucho más baja, no inactivando a las bacterias, pero sí controlando su número y desarrollo en los compartimientos simbióticos. El balance final de la interacción dependerá del contenido de polisacáridos exo y lipo y de los glucanos cíclicos, componentes de las paredes bacterianas. Estas moléculas de superficie pueden inhibir los sistemas de defensa de la planta o bien hacer que las bacterias resistan a estos mecanismos. La alteración de los mecanismos de defensa comienza ya en estadios iniciales de la infección, en los cuales ocurren interacciones entre los exopolisacáridos de *Rhizobium* y los receptores de la planta. En ausencia de exopolisacáridos, estos receptores pueden ser afectados por algunos elicitores (p.e., productos de la degradación de la pared celular), induciendo una intensa respuesta inmune (33). Intensas reacciones de defensa pueden también estar sumamente implicadas en el desarrollo de los canales de infección, gran parte de los cuales son bloqueados o abortados en tempranos estados de preinfección (6, 7). El grupo del profesor Olivares Pascual ha contribuido al estudio de estos mecanismos de defensa en plantas de alfalfa inoculadas con *Rhizobium* incompatibles (28).

Además de los mecanismos que controlan al endosimbionte en la planta hospedadora, las leguminosas tienen la capacidad de autorregular el número de nódulos formados en sus raíces mediante señales sistemáticas hipersensibles que se comunican entre las raíces y la parte aérea de la planta. Así por ejemplo, se han seleccionado ciertos mutantes de autorregulación negativa, como plantas supernodulantes Nod⁺⁺ que generalmente mantienen la nodulación en presencia de altas dosis de nitrato (fenotipos tolerantes al nitrato) que inhibirían la simbiosis en las plantas silvestres. El aborto de excesivos canales de infección en las células corticales de alfalfa vía un mecanismo similar de reacción hipersensible puede ser también consecuencia de la respuesta de autorregulación de la planta (41).

SIMBIOSIS *LUPINUS-BRADYRHIZOBIUM*_{sp}

Por ser la simbiosis mayormente estudiada en nuestro laboratorio y por tener características propias, voy a hacer una reseña muy breve de algunos de los resultados obtenidos en estos trabajos.

El lupino o altramuz es una leguminosa de origen mediterráneo con gran potencialidad agrícola debido al alto contenido de proteínas en sus semillas que le asemeja a la soja, y su potencial como oleaginosa. Este género corresponde a la tribu *Geneistae*, *subtribu Lupininae*, de la que es el único representante.

Respecto a su nodulación, el lupino presenta diversas características propias que le diferencia de otras leguminosas. El nódulo de lupino es un subtipo especial y único dentro de los nódulos indeterminados, por lo que se le ha llamado «lupinoide», carece de meristemo terminal, presentando el meristemo una localización basal-lateral. Es la única leguminosa de clima templado que transporta el N fijado en las raíces a la parte aérea, en forma de amidas, y es nodulada por bacterias del género *Bradyrhizobium*.

El proceso de infección es diferente, no sigue el patrón estándar, no observándose cordones de infección. Al conocimiento de esta infección «peculiar» ha contribuido recientemente nuestro grupo de investigación, mediante la realización de una tesis doctoral que se presentará en breve en la Universidad Autónoma de Madrid.

Nuestra aportación a la estructura-función de esta simbiosis se ha dirigido al estudio de las características estructurales del nódulo y su funcionamiento fisiológico. Una de nuestras aportaciones más significativas se refiere al estudio de los mecanismos de regulación de O₂, dado el interés del control de su concentración en el proceso simbiótico. Mediante técnicas inmunocitoquímicas localizamos específicamente la leghemoglobina, de composición similar a la hemoglobina de la sangre en el citosol de las células infectadas (42). Esta proteína es mayoritaria en el nódulo y uno de los reguladores de O₂ más importantes. Transformándose en oxileghemoglobina transporta este elemento a los bacteroides para su respiración, manteniendo una atmósfera microaeróbica. Su presencia es imprescindible para el comienzo de la fijación de nitrógeno. También identificamos otro componente de la regulación de O₂ en los nódulos, la barrera mor-

fológica de resistencia a la difusión de O₂ en la corteza interna del nódulo (21) a nivel de sus componentes estructurales y localización de ciertas glicoproteínas que regulan su operación en condiciones de estrés de la planta (17, 20), resultando el lupino una planta adecuada para estos estudios.

Otras aportaciones de interés han ido dirigidas a conocer el papel de los plastidios en el desarrollo nodular mediante la localización de proteínas de hierro en estos orgánulos, como ferritina, cuyo contenido aumenta con la senescencia, regulando la concentración de hierro catalítico en las células infectadas y retrasando la senescencia nodular (22). Deseo también destacar por su importancia la localización del enzima nítrico óxido sintasa, identificada por vez primera en raíces de lupino en nuestro laboratorio (9).

También nuestro grupo ha sido pionero en la localización de alcaloides *in situ* en las semillas de varias especies de lupino, mediante la obtención y utilización de anticuerpos específicos tipo lupanina (36), en colaboración con el doctor Greirson del *Chemical Centre*, Perth (Australia).

ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS

Los estudios de genética molecular sobre bacterias fijadoras de nitrógeno van dirigidos a obtener cepas más eficientes y competitivas, que sean buenas fijadoras de N₂. También es necesario que la planta huésped esté bien desarrollada para aportar suficiente energía para la realización del proceso simbiótico. Las condiciones óptimas de los dos simbioses, planta y microorganismo, van a ser decisivas para lograr la máxima productividad y calidad de la legumbre.

Poco a poco las empresas del sector agrícola van interesándose por la producción de inoculantes de *Rhizobium* para transferir a la agricultura esta biotecnología.

Se investiga la obtención de cepas con genes capaces de reciclar el hidrógeno que se desprende en el proceso de la FBN, construyendo cepas con hidrogenasas oxidativas que reciclan el hidrógeno (genes *hup*), que se han caracterizado ya en *B. japonicum* y en *R. leguminosarum*, pero que todavía se enfrentan a diversos problemas,

siendo el profesor Ruiz Argüeso y su grupo, de la Universidad Politécnica de Madrid, laboratorio de referencia para estos estudios (39).

Además de los genes *hup* se han descrito también otros métodos que mejoran la efectividad de las cepas. Se han obtenido mutantes de *B. japonicum* por mutagénesis química, con capacidad superior a las cepas silvestres, o cepas de *R. leguminosarum*, resistentes a la acidez. La adición exógena de flavonoides a los inoculantes es otro de los procedimientos prometedores para aumentar la nodulación de los inoculantes comerciales.

La competitividad entre cepas representa un problema económico importante. Es primordial que la cepa de *Rhizobium* seleccionada sea efectiva, frente a las autóctonas, en condiciones de campo. Una de las estrategias actuales es construir leguminosas que restrinjan la nodulación de cepas nativas y permitan el establecimiento de las cepas inoculadas, o la utilización de cepas que produzcan antibióticos para inhibir la nodulación de las cepas nativas. Sin embargo una seria objeción al uso de esta estrategia reside en su impacto sobre las poblaciones microbianas de la *Rhizosfera*, ya que pueden inhibirse bacterias Gram (-) beneficiosas para el agrosistema.

Los mayores esfuerzos para potenciar la simbiosis se han centrado en las bacterias, pero la mejora de la simbiosis se obtendrá por la manipulación de la planta hospedadora. Por ello se hace necesario conocer la biología de las leguminosas a nivel básico, y elucidar los componentes genéticos de la planta que determinan la interacción. Estos avances han culminado el año 2002 con el clonaje posicional de genes de las leguminosas *Medicago* spp. *Lotus japonicus* y *Glycine max*, y es de esperar que a partir de ahora, un mayor número de investigadores hagan uso de herramientas genéticas y genómicas para profundizar en el proceso simbiótico.

Hasta aquí nos hemos referido a la simbiosis bacteria-planta. A continuación pasamos a hacer un breve resumen de la simbiosis hongo-planta o simbiosis micorrícica.

SIMBIOSIS MICORRÍCICA

La mayoría de las plantas presentan micorrizadas sus raíces. El hongo, una vez que alcanza la rizosfera, coloniza la corteza de la raíz y desarrolla un micelio externo que a modo de sistema radical complementario ayuda a la planta a adquirir nutrientes minerales y agua. Puede considerarse a estos hongos como los componentes metabólicamente más activos para la captación de nutrientes.

Las ectomicorrizas tienen un gran valor en el ámbito forestal, permitiendo el establecimiento de plantas leñosas en zonas degradadas. Aunque las plantas ectomicorrizadas ocupen solamente del 3 al 5% del total, dada la importancia de éstas en la masa de la producción arbórea, no pueden pasar desapercibidas, ya que constituyen los bosques que cubren la tierra, que corresponden a las familias Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Salicaceae y Myrtaceae, así como muchos miembros de otras familias, como las Rosaceae, Leguminosae, Ericaceae, Junglaceae y otras. Estos hongos tienen un valor añadido en cuanto a la comercialización de sus carpóforos, comúnmente llamados setas en la industria de la alimentación. Algunas especies tienen interés en medicina como, por ejemplo: *Calocybe gambosa*, seta de San Jorge, con propiedades hipoglucémicas; *Lactarius deliciosus*, el apreciado níscolo, puede utilizarse como indicador de la función renal; *Coprinus atramentarius*, para combatir el alcoholismo, etc.

En suelos marginales, el potencial de micorrización suele disminuir drásticamente, e incluso desaparecer. Es conveniente micorrizar las plantas antes de ser transferidas a los suelos que se pretende remediar con inóculos de hongos que además incluyan otros organismos beneficiosos. En esta dirección nuestro laboratorio está realizando trabajos de establecimiento de plantas micorrizadas de *P. halepensis* en zonas degradadas del sudeste de la comunidad de Madrid, enriqueciendo estos suelos con micorrizas autóctonas, una vez que han sido identificadas, y con bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

En los sistemas agrícolas la mayoría de las plantas forman simbiosis con micorrizas arbusculares (AM), que facilitan la absorción de agua y nutrientes, principalmente P y algunos micronutrientes. Estas simbiosis son mucho más ancestrales que la fijación de N₂ y

son características de la gran mayoría de plantas contemporáneas y biológica de otras ya desaparecidas. La hipótesis de una evolución coevolutiva de la tierra por plantas y hongos sugiere que el origen de las plantas terrestres ocurrió debido a una integración con hongos que les suministraban agua y nutrientes (10).

Dados los efectos de las micorrizas arbusculares y ectomicorrizas como biofertilizantes y como bioprotectores de los cultivos, su uso apropiado puede reducir la aplicación de fertilizantes y fitosanitarios. El laboratorio del profesor José Miguel Barea de la EEZ del CSIC en Granada, es grupo de referencia en la aplicación de las micorrizas arbusculares en la agricultura. Una de sus características más importantes consiste en que las plantas micorrizadas pueden superar situaciones de estrés, sobre todo en suelos degradados por la erosión, escasez de nutrientes, estrés hídrico, salinidad, suelos contaminados con metales pesados, escombreras, etc.

Es especialmente relevante su interés en fitoremediación. Inmovilizan los metales pesados en las hifas del hongo reduciendo su traslocación a la parte aérea de la planta y eliminando su paso a la cadena trófica. En la revegetación de antiguas zonas mineras, la micorrización permitió el crecimiento de plantas como *Andropogon gerardii* y *Festuca rubra*. También se ha observado su beneficio en suelos salinos incrementando la tolerancia de las plantas a la salinidad (1). Se han sugerido varios mecanismos para justificar este comportamiento, como inducción de cambios hormonales en la planta y mejora en la capacidad de captación de agua y nutrientes.

Aunque la micorrización aparece como una práctica atractiva, sin embargo, para lograr una verdadera eficacia es necesario identificar de antemano las micorrizas autóctonas de la zona de estudio, ya que se trata de enriquecer la rizosfera con algunos de los hongos indígenas que manifiestan una acción específica en el desarrollo y adaptación de la planta a esas condiciones ambientales.

La dificultad de las micorrizas arbusculares estriba en que ninguna de las cerca de 150 especies del orden *Glomales* ha podido ser cultivada en condiciones axénicas, por lo que no ha sido posible la preparación de inoculantes comerciales. A esto hay que añadir que se trata de simbioses obligados, y para la obtención del inóculo se hace necesario utilizar una planta hospedadora. Por el contrario, la

inoculación con ectomicorrizas presenta ventajas experimentales, ya que estos hongos pueden ser cultivados *in vitro* a partir de esporas o de micelios crecidos en medios sólidos o líquidos.

SIMILITUD ENTRE NODULACIÓN Y MICORRIZACIÓN

En la simbiosis micorriza-planta, al igual que en la simbiosis «*Rhizobium*-leguminosa» se pone de manifiesto un intercambio de señales de reconocimiento y aceptación entre los simbioses, mediado por la expresión de genes. Básicamente en el desarrollo de las micorrizas arbusculares se producen etapas similares a la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa: las hifas infectivas colonizan las células corticales y forman arbuscúlos muy ramificados rodeados por membranas periarbusculares de origen vegetal. El contenido de RE y vesículas de Golgi también aumenta considerablemente para asegurar la síntesis de membranas periarbusculares (2), al igual que ocurre en la simbiosis con *Rhizobium* para la formación de la membrana peribacteroidal.

Por aceptar las leguminosas los dos tipos de simbiosis, se han utilizado mutantes de *Rhizobium* defectuosos en el desarrollo del nódulo para el estudio del control genético de las micorrizas. Este procedimiento ha conducido a la identificación de mutantes *Nod*⁻ y *Myc*⁻ (15). Las *Myc*⁻ han sido identificadas con las mutantes de guisante, en las cuales el canal de infección aborta en el interior de los pelos radiculares. Después de la inoculación con el hongo, estos mutantes forman micelios intercelulares, pero no llegan a formarse ramificaciones arbusculares.

La micorrización estimula la síntesis de proteínas *de novo*, *micorrizinas*, ausentes en plantas no inoculadas (2), algunas de ellas comunes en nódulos y micorrizas. Estos productos comunes incluyen algunas proteínas constitutivas de las membranas peribacteroidal y periarbuscular, algunas nodulinas tempranas (ENOD 2, NOD 11, ENOD 12 y ENOD 40) e incluso la leghemoglobina del nódulo, que también es sintetizada en las células colonizadas por arbuscúlos.

Similitud entre nodulación y micorrización es también evidente por el hecho de que los factores *Nod* estimulan el desarrollo de los hongos micorrícicos (43). También los factores de defensa de la planta contra ambas infecciones son similares, originándose la sín-

tesis de componentes líticos que desarticulan la estabilidad de ambos microsimbiontes durante la infección.

Un rango de genes comunes han sido identificados para nódulos de leguminosas y micorrizas arbusculares. Al menos parte del sistema genético de la planta que controla el desarrollo del nódulo fue originado durante la coevolución de las plantas arcaicas con los hongos micorrízicos (35). Estos genes ancestrales se han ido adaptando en las leguminosas durante la evolución de la nodulación. Esta preadaptación puede incluir la capacidad de las plantas para tolerar la presencia de bacterias en la corteza radical y formar compartimentos subcelulares simbióticos. En este contexto resulta altamente interesante la existencia de genes *nif* en hongos endomicorrízicos (30), (32). La naturaleza de estas preadaptaciones será probablemente clarificada mediante análisis moleculares comparativos, usando como planta modelo *Lotus japonicus* (27), cuyo genoma ha sido determinado.

El análisis de las micorrizas arbusculares y de los nódulos fijadores de N_2 sugiere que las plantas disponen de sistemas universales para controlar sus afinidades por los microorganismos que pueden ser mutualistas o antagonistas, dependiendo del simbiote, de las condiciones ambientales y de los caracteres genéticos del organismo. Estos sistemas reguladores fueron aparentemente muy importantes para la aparición en la tierra de las interacciones beneficiosas y han contribuido en gran medida al potencial adaptativo de las plantas terrestres (37).

Por último, permítanme ustedes una breve mención del papel de los microorganismos del suelo sobre el control biológico.

BIOCONTROL

La mayoría de las prácticas de control de enfermedades de plantas se ha basado, bien en la resistencia genética de la planta, al manejo de la planta en su medio ambiental y sobre todo al uso de pesticidas sintéticos. Pero se hace necesario crear alternativas a estos pesticidas corrientemente usados, ya que muchos de ellos no podrán utilizarse, bien debido a reglamentaciones sanitarias o al desarrollo de resistencias por parte de los patógenos del suelo.

El reto en este campo está en buscar nuevas soluciones que logren un control efectivo, minimizando las consecuencias negativas para la salud humana y el medio ambiente. El control biológico por microorganismos ofrece una poderosa alternativa al uso de compuestos fitosanitarios. La rica diversidad de microorganismos del suelo promete una fuente inagotable para este propósito. Se trata de que el incremento de un determinado microorganismo en la rizosfera permita suprimir una enfermedad concreta de la planta sin afectar al resto de los microorganismos de la comunidad rizosférica o a otros organismos del ecosistema.

Las rizobacterias Gram (-), como la *Pseudomonas fluorescens*, son de las más estudiadas, produciendo un amplio rango de metabolitos con capacidad antimicrobiana, confiriendo a la planta resistencia sistémica inducida, y produciendo sideroforos que secuestran el hierro en la rizosfera.

También las bacterias Gram (+) han resultado muy útiles en el control de enfermedades. Entre ellas merece destacarse el *B. thuringensis*, que en los estadios de esporulación produce *endotoxinas*, dotadas de propiedades bioinsecticidas. El maíz Bt es un maíz que ha sido modificado genéticamente para protegerlo contra los insectos, plaga conocida como taladro (géneros *Ostrinia* y *Sesania*), gracias a las proteínas del *B. thuringensis*.

Para lograr una mayor eficacia en su utilización es necesario investigar más a fondo estas interacciones para conocer sus mecanismos de acción, antagonismo con el patógeno y respuesta de la planta, y conseguir formulaciones adecuadas para su aplicación.

CONSIDERACIONES FINALES

El potencial de los microorganismos del suelo parece ilimitado. La naturaleza, en su sabiduría, ha creado las soluciones para resolver todos los problemas, que aseguren la permanencia de la vida sobre la Tierra sin alterar la armonía natural del Planeta.

Corresponde a la ciencia estudiar más profundamente el potencial de organismos autóctonos del suelo, que nos han sido dados gratuitamente, como el aire, el agua y la luz del sol. Con estas tecnologías se pretende, por un lado, que las plantas puedan autoabastecerse y auto-

defenderse en condiciones ambientales adversas, allí donde se desarrollen, y por otro cumplir con el deber moral de cuidar nuestro planeta y dejarlo en buen estado a las generaciones venideras.

Que las interacciones beneficiosas citadas sean cada vez más entendidas y puedan repercutir: en la mejor calidad de las cosechas y en el aumento de la productividad en países en desarrollo. Cerca de 190 millones de personas, un tercio de la población de África, son susceptibles de carecer definitivamente de alimentos. En este sentido, el reto de extender la simbiosis a plantas como maíz y arroz, cultivos básicos en países subdesarrollados, que dependen únicamente de estos monocultivos, es todavía una utopía, pero estamos seguros que dejaría de serlo si estamos convencidos que no habrá paz en el mundo si el desarrollo y el bienestar no llegan a todos los países de la Tierra, pues, «O hay futuro para todos, o no hay futuro».

BIBLIOGRAFÍA

- (1) AZCON, R. y EL-ATRASH, F. (1997) Influence of arbuscular mycorrhizae and phosphorus fertilization on growth, nodulation and N₂ fixation in *Medicago sativa* at four salinity levels. *Biol. Fert. Soil.*, 24: 81-86.
- (2) BARKER, S.J.; TAGU, D. y DELP, G. (1998) Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol.*, 116: 1201-1207.
- (3) BOWEN, G.D. y ROVIRA, A.D. (1991) The Rhizosphere: The hidden half of the hidden half. In: «Plant Roots: The hidden half». (Y. Waisel A. Eshel and U. Kafkafi. eds.) pp. 641-669. Marcel Dekker, New York. 641-649.
- (4) BOWEN, G.D. y ROVIRA, A.D. (1999) The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy*. 66: 1-102.
- (5) BRAZIL, G.M.; KENEFICK, L.; CALLANAN, M.; HARO, A.; DE LORENZO, V.; DOWLING, D.N. y O'GARA, F. (1995) Construction of a Rhizosphe *Pseudomonad* with potential to degrade polychlorinated biphenyls and detection of *bpn* gene expression in the Rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (5): 1946-1952.
- (6) BREWIN, N.J. (1998) Tissue and cell invasion by *Rhizobium*: the structure and development of infection threads and symbiosomes. In: The Rhizobiaceae (Spaink H., Kondorosi A. y Hooykaas P. J.J., eds.), pp. 417-429. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publisher.
- (7) BROUGHTON, W.J. y PERRET, X. (1999) Genealogy of legume-*Rhizobium* symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2: 305-311.
- (8) CAETANO-ANOLLÉS, G., JOSHI, P. y GRESSHOFF, P.M. (1992) Nodulation in the absence of *Rhizobium*. In: Plant Biotechnology Development (Gresshoff P.M., ed.) pp. 61-70. Boca Raton, FL: CRC Press.

- (9) CUETO, M.; HERNÁNDEZ, O.; MARTÍN, R.; VENTURA, M.L.; RODRIGO, J.; LAMAS, S. y GOLVANO, M.P. (1996) Presence of Nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Letters*, 398: 159-164.
- (10) DOUGLAS, A.E. (1994) Symbiotic Interactions. 148 pp. Oxford, New York, Toronto, Oxford University Press.
- (11) DOYLE, J.J. y DOYLE, J.L. (1997) Phylogenetic perspectives on the origins and evolution of nodulation in the legumes and allies. In: Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture (Legocki A., Bothe H. and Puhler A., eds.), NATO ASI Series G. Ecological Science, Vol. 39, pp. 307-312. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- (12) DE FARIA, S.M.; LEWIS, G.P.; SPRENT, J.I. y SUTHERLAND, J.M. (1989) Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytol.*, 111: 607-6129.
- (13) FOSTER, R.C. (1986) The ultrastructure of the rhizoplane and the rhizosphere. *Ann. Rev. Phytopath.* 24: 211-234.
- (14) FOSTER, R.C.; ROVIRA, A.D. y COCK, T.W. (1983) Ultrastructure of the root-soil-interface, p. 157. The American Phytopathological Society, St Paul, MN.
- (15) GIANINAZZI-PEARSON, V. (1996) Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell*, 8: 1871-1883.
- (16) HIRSCH, A.M. y LA RUE, T.A. (1997) Is the legume nodule a modified root or stem or an organ «*sui generis*»? *Crit. Rev. Plant Sci.*, 16: 361-392.
- (17) IANNETTA, P.P.M.; DE LORENZO, C.; JAMES, E.K.; FERNÁNDEZ PASCUAL, M.; SPRENT, J.I.; LUCAS, M.M.; WITTY, J.F.; DE FELIPE, M.R. y MINCHIN, F.R. (1993) Oxygen diffusion in lupin nodules. I: visualization of diffusion barrier operation. *J. Exp. Bot.*, 44: 1461-1467.
- (18) JENNY, H. y GROSSENBACHER, K.A. (1963) Root soil boundary zone as seen in the electron microscope. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 27: 273-277.
- (19) JURGENSEN, M.F. y DAVEY, C.B. (1971) Nonsymbiotic nitrogen-fixing microorganisms in forest and tundra soils. *Plant and Soil*, 34: 341-356.
- (20) DE LORENZO, C.; IANNETTA, P.P.M.; FERNÁNDEZ PASCUAL, M.; JAMES, E.K.; LUCAS, M.M.; SPRENT, J.I.; WITTY, J.F.; MINCHIN, F.R. y DE FELIPE, M.R. (1993) Oxygen diffusion in lupin nodules II: Mechanisms of diffusion barrier operation. *J. Exp. Bot.*, 4: 1469-1474.
- (21) DE LORENZO, C. (1992) Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. E.T.S.I. Agrónomos.
- (22) LUCAS, M.M.; VAN DE SYPE, G.; HÉROUART, D.; HERNÁNDEZ, M.J.; PUPPO, A. y DE FELIPE, M.R. (1998) Immunolocalization of ferritin in determinate and indeterminate legume root nodules. *Protoplasma* 204: 61-70.
- (23) KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; SCHROTH, M.N. y TEINTZ, M. (1980) Pseudomonas siderophoros: a mechanism explaining disease-suppressive soils. *Curr. Microbiol.*, 4: 317-320.
- (24) KLOEPPER, J.W.; ZABLOTOWICZ, R.M.; TIPPING, EM. y LIFSHITZ, R. (1986) Emergence-promoting rhizobacteria: description and implication for agriculture. In: Swinburne TR ed. Iron, Siderofores and Plant Diseases. New York: Plenum Press, 155-164.
- (25) KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. y KUC, J.A. (1992) Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Sci. Technol.*, 2: 349-351.

- (26) KUBIENA, W. (1944) Suelo y formación del suelo desde el punto de vista biológico. Nuevas Gráficas. Madrid. 1944.
- (27) LARSEN, K.; BORISOV, A.Y.; SANDAL, N.; MADSEN, L.K.; TSYGANOV, V.E.; VOROSHILOVA, V.A.; BATAGOV, A.O.; STOUGAARD, J. y TIKHONOVICH, I.A. (2001) The first example of a use of achievements in model legumes to clone symbiotic genes of traditional legumes identified by means of chemical mutagenesis. Pea (*Pisum sativum* L.) gene *Sym 35* is likely homologous to the gene *Nin* of *Lotus japonicus*. In: Abstracts of the 13th International Congress on Nitrogen Fixation. Hamilton. Canada. pp. 101.
- (28) MARTÍNEZ ABARCA, F.; HERRERA-CERVERA, J.A.; BUENO, P.; SANJUÁN, J.; BISSELING, T. y OLIVARES, J. (1998) Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *MPMI*. 11(2): 153-155.
- (29) MATHESIUS, U.; SCHLAMMAN, H.R.M.; SPAINK, H.P.; SAUTER, C.; ROLFE, B.G. y DJORDJEVIC, M.A. (1998) Auxin transport inhibition precedes root nodule formation on white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J.*, 14: 23-34.
- (30) MINERDI, D.; FANI, R.; GALLO, R.; BOARINO, A. y BONFANTE, P. (2001) Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *Burkholderia* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 725-732.
- (31) MOLINA, J.A.E.; CLAPP, C.E.; LINDEN, D.R.; ALLMARAS, R.R.; LAYESE, M.F.; DOWDY, R.H. y CHENG, R.H. (2001) Modeling the incorporation of corn (*Zea mays* L.) carbon from roots and rhizodeposition into soil organic matter. *Soil Biol. Biochem.*, 33: 83-93.
- (32) MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B. y BOIVIN-MASSON, C. (2001) Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411: 948-950.
- (33) NIEHAUS, K.; ALBUS, U.; BAIER, R.; SCHIENE, K.; SCHROEDER, S. y PUHLER, A. (1998) Symbiotic suppression of the *Medicago sativa* plant defence system by *Rhizobium meliloti* oligosaccharides. In: Biological Nitrogen Fixation for 21st century (Elmerich, C.; Kondorosi, A. y Newton, W., eds.) pp. 225-226. Dordrecht, Boston, London: Kluwer. Academic Publishers.
- (34) PAUL, A. y CLARK, F.E. (1989) Occurrences and distribution of soil organics. In: Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, San Diego, 81-84.
- (35) PARNISKE, M. (2000) Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3: 320-328.
- (36) POZUELO, J.M.; LUCAS, M.M.; DE LORENZO, C.; FERNÁNDEZ PASCUAL, M.; MALDONADO, S. y DE FELIPE, M.R. (2001) Immunolocalization of alkaloids and X-Ray microanalysis of elements in lupin seeds. *Protoplasma*, 218, 104-111.
- (37) PROVOROV, N.A.; BORISOV, A.Y.; TIKHONOVICH, I.A. (2002) Developmental genetics and evolution of symbiotic structures in nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza. *J. Theor. Biol.*, 214: 215-232.
- (38) ROVIRA, A.D. (1956) Plant root excretions in relation to the rizosphere effect. I. The nature of root exudate from oats and peas. *Plant and Soil*, 7: 178-194.
- (39) RUIZ-ARGÜESO, T.; PALACIOS, J.M.; IMPERIAL, S. (2000) Uptake hydrogenases in root nodule bacteria. In: E. Triplett (ed.): «Prokaryotic Nitrogen Fixation:

- A model system for the analysis of a biological process». Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K.
- (40) SEVILLANO, F. y RODRÍGUEZ BARRUECO, C. (1987) Sistemas simbióticos fijadores de nitrógeno de interés aplicado en agricultura. En: Avances en la biología de la fijación de nitrógeno atmosférico. Eds: M. Megías y I. Ruiz, pp. 9-29. Universidad de Sevilla. Jurgensen y Davey. 1970.
- (41) VASSE J.; DE BILLY F. y TRUCHET G. (1993) Abortion of infection during *Rhizobium* meliloti-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant J.*, 4, 555-566.
- (42) VIVO, A.; ANDREU, J.M.; DE LA VIÑA, S.; DE FELIPE, M.R. (1989) Inmunogold localization of leghemoglobin in plants of *Lupinus albus* L. cv Multolupa. *Plant Physiology*, 90: 452-457.
- (43) XIE, Z.P.; MULLER, J.; WIEMKEN, A.; BROUGHTON, W.J. y BOLLER, T. (1997) Nod factors and Tri-iodobenzoic acid stimulate mycorrhizal colonization and affect carbohydrate partitioning in mycorrhizal roots of *Lablab purpureus*. *New Phytol.*, 139: 361-366.

La microencapsulación de células. ¿Una nueva alternativa terapéutica? *

JOSÉ LUIS PEDRAZ y GORKA ORIVE

*Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica
Universidad del País Vasco (UPV/EHU)*

RESUMEN

La microencapsulación de células es una estrategia terapéutica que permite el tratamiento de un gran número de enfermedades crónicas sin la necesidad de agentes inmunosupresores. Para lograr este objetivo es necesario inmovilizar células secretoras de productos terapéuticos en microcápsulas convenientemente diseñadas, de forma que se asegure la funcionalidad del injerto a largo plazo. Los avances realizados en este campo, a lo largo de los últimos años, auguran que la microencapsulación de células pueda convertirse, en un futuro no muy lejano, en una estrategia terapéutica de uso clínico habitual.

Palabras clave: Microcápsula.— Célula— Encapsulación.— Biotecnología.

ABSTRACT

The cell microencapsulation technology. A new therapeutic alternative?

The aim of cell microencapsulation technology is to treat multiple diseases in the absence of immunosuppression. On this purpose, cells are immobilized within carefully designed capsules that allow the long-term function of the graft. Although

* Conferencia impartida en la Real Academia Nacional de Farmacia el día 6 de mayo de 2004.

the potential impact of this field is still far broader, the past few years have seen several firsts which has brought the whole technology much closer to a realistic proposal for clinical application.

Key words: Microcapsule.— Cell.— Encapsulation.— Biotechnology.

EXTENSIVE ABSTRACT

In the past decades, much effort has been focused on the development of immunoisolation technologies for the long-term transplantation of biologically active molecules to restore or improve native tissue function. The potential impact of these technologies from a therapeutic and economic standpoint of view is enormous since chronic administration of immunosuppressants and implementation of strict immunosuppressive protocols might be eliminated, thereby facilitating patients' life quality.

Microcapsules are probably the current preferable system for cell transplantation and represent an exciting biotechnological approach for both organ replacement and continuous and controlled drug delivery. The concept of cell microencapsulation is in theory fairly simple. It consists of enclosing the biologically active material within a polymeric matrix surrounded by a semipermeable membrane that is designed to circumvent immune rejection. This membrane allows the bidirectional diffusion of nutrients, oxygen and waste, yet prevents immune cells and antibodies, which might destroy the enclosed cells, from entering. In this way, it is possible to maintain the long-term function of the transplant in a sequestered environment.

In light of increasing incidence of age-related diseases and the current desperate shortage of donor organs, the hope that encapsulated cells may be used as therapeutics seems increasingly to be realized. Furthermore, the potential of this approach includes encapsulated cells which supply the host with regulated and/or continuous «de novo» delivery of therapeutic product. These artificial cells can be transplanted into a variety of tissues and organs, making the technology suitable for a local (solid tumors), regional (brain), oral or systemic delivery (intraperitoneal) of therapeutics. When long-term continuous delivery of therapeutics is required, the cost of encapsulated cells may be off-set by the cost of the therapeutic product. Further, the same capsule chemistries could be used for a large number of patients regardless of the Human Leukocyte Antigen (HLA), making this approach cost-effective.

Recent progress in the field has brought the whole technology much closer to a realistic proposal for clinical application. In fact, the results achieved from small and large animal models have provided the scientific basis for several clinical trials including the encapsulation of allogeneic islets for the treatment of diabetes, or the most recent immobilization of cytochrome P450 enzyme expressing cells for the eradication of pancreatic cancer.

INTRODUCCIÓN

La microencapsulación de células es una prometedora estrategia biotecnológica basada en la inmovilización de células, tejidos o enzimas en estructuras poliméricas, con el fin de sustituir, parcial o totalmente, tejidos u órganos dañados o disfuncionales, así como desarrollar un sistema farmacéutico que permita la liberación continua y controlada de productos terapéuticos (1). De esta forma, el espectro de aplicación de esta tecnología abarca un gran número de patologías (Figura 1).

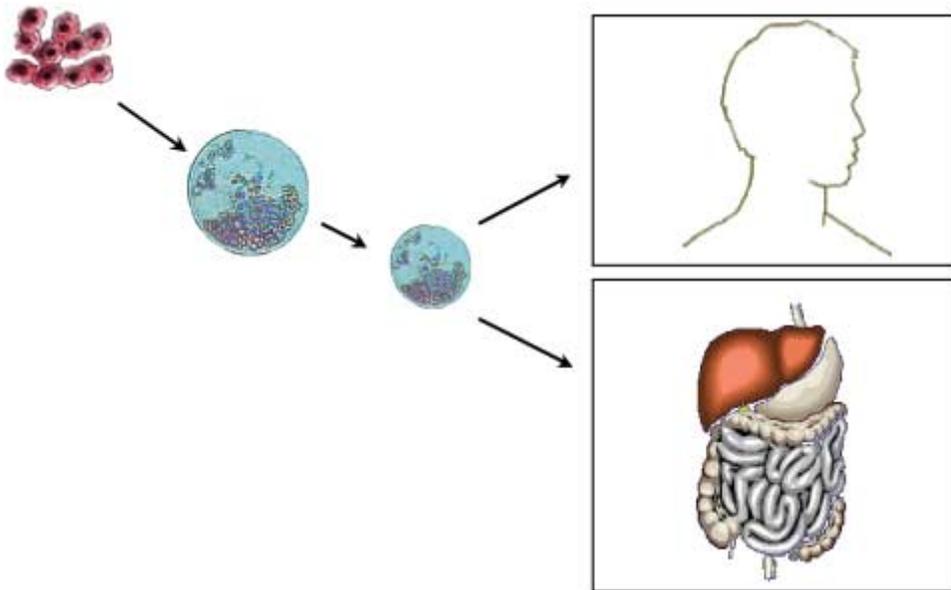


FIGURA 1. *Inmovilización de células en microcápsulas poliméricas para el tratamiento de un gran número de patologías.*

Aplicaciones terapéuticas

- **Enfermedades del sistema nervioso central:** Alzheimer, Parkinson, Enfermedad de Huntington.
- **Alteraciones endocrinas:** Enanismo, Hipoparatiroidismo...
- **Cáncer.**

- **Desarrollo órganos bioratificiales:** Diabetes, cirrosis...
- **Otros:** Hemofilia, Anemia...

La inclusión de células terapéuticamente activas en sistemas de microencapsulación, asegura tanto la protección mecánica como el inmuno aislamiento del injerto, esto es, el enmascaramiento frente a la respuesta inmune del huésped y consecuentemente su actividad a largo plazo. Además, una vez implantadas las células secretarán el producto *de novo*, lográndose un tratamiento más fisiológico y efectivo. Por otra parte, a diferencia de otras alternativas biomédicas actuales en estudio, como la terapia génica *in vivo*, la tecnología de encapsulación celular no altera el genoma del huésped, lo que ofrece mayores garantías para su uso clínico (2). Finalmente, la gran versatilidad de esta estrategia permite que las células encapsuladas puedan emplearse tanto para tratamientos localizados (tumores sólidos), regionales (cerebro) como sistémicos (diabetes).

El desarrollo de esta emergente tecnología deriva del interés por parte de la comunidad científica de dar solución a un creciente número de patologías funcionales como la diabetes, cirrosis, enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC). Este interés se inició en la década de los treinta cuando un científico llamado Bisceglie comprobó cómo al introducir células tumorales de ratón en membranas poliméricas y trasplantarlas en la cavidad abdominal de cerdos, éstas eran capaces de sobrevivir sin ser destruidas por la respuesta inmune del huésped (3). Una década más tarde, Algire observó que la encapsulación de aloinjertos y xenoinjertos (injertos procedentes de sujetos de la misma especie o de especies diferentes respectivamente), previa a su trasplante, retrasaba notablemente la aparición de una respuesta de rechazo (4). Años después se introdujo el concepto de encapsulación como medida de inmuno-protección para trasplantar células y tejidos sin el requerimiento de inmunosupresión farmacológica.

REQUERIMIENTOS TECNOLÓGICOS Y BIOLÓGICOS

La tecnología de microencapsulación de células requiere de una perfecta combinación entre el desarrollo tecnológico de las micro-

cápsulas y el estudio biológico y genético de las líneas celulares. Una de las primeras necesidades es la correcta selección de los materiales que van a constituir tanto el núcleo como la cubierta de la microcápsula. Un gran número de polímeros naturales y sintéticos han sido empleados en el desarrollo de la matriz, destacando fundamentalmente el alginato, un polímero natural procedente de las algas y con excelentes propiedades de biocompatibilidad y atoxicidad (5). Es precisamente la biocompatibilidad, es decir, la capacidad de un material de no inducir respuesta inmune en el huésped una vez implantado, uno de los criterios que dictará la selección de uno u otro biomaterial.

Por su parte, la poli-L-lisina es el polímero más frecuentemente empleado en el diseño de la membrana semipermeable característica de los sistemas de inmovilización. Esta membrana permitirá la entrada de nutrientes y oxígeno y la salida de desechos y productos terapéuticos de interés. En cambio, los receptores de las células T no podrán interactuar con los antígenos de superficie de las células protegidas y las inmunoglobulinas y el complemento quedarán parcialmente impedidos gracias a los poros de la membrana, disminuyendo o incluso reduciendo totalmente su poder citotóxico.

Otro aspecto importante es el diseño uniforme y reproducible de las microcápsulas, ya que la elaboración y trasplante de sistemas heterogéneos e irregulares está relacionada con una mayor probabilidad de rechazo. En los últimos años, sistemas como el goteador electrostático y el «Jet Cutter» han sido empleados satisfactoriamente en la fabricación de microcápsulas uniformes. La estabilidad mecánica es otro criterio a tener en cuenta en la elaboración de estos sistemas farmacéuticos, ya que una correcta estabilidad permitirá reducir posibles rupturas derivadas de la manipulación, administración, estrés osmótico, golpes mecánicos, movimientos del huésped, etc. Por último, pero no por ello menos importante, es la bioseguridad de las microcápsulas. Es prioritario que la microcápsula impida la salida de las células terapéuticas, ya que existe el riesgo de un crecimiento incontrolado de las mismas (6, 7).

El segundo componente a considerar es la línea celular terapéuticamente activa. Determinados criterios como la prolongada viabilidad y la elevada secreción intrínseca del producto terapéutico por

parte del clon celular se antojan decisivos en la selección del componente biológico. En los últimos años se ha priorizado el uso de células con baja o nula capacidad de proliferación, una vez encapsuladas, de forma que la bioseguridad del sistema sea óptima (8). En la Tabla 1 se recogen algunos ejemplos de líneas celulares inmovilizadas en microcápsulas poliméricas.

TABLA 1. *Ejemplos de líneas celulares microencapsuladas y sus correspondientes aplicaciones terapéuticas*

| <i>Línea celular</i> | <i>Aplicación terapéutica</i> |
|---|---|
| Fibroblastos | Cáncer, Enf. Metabólicas, SNC, Enf. Genéticas |
| Mioblastos | Cáncer, Enf. Metabólicas, SNC, Enf. Genéticas |
| Células renales | Cáncer, hemofilia, SNC |
| Islotes de Langerhams | Diabetes |
| Células ováricas | Enfermedad de Fabry |
| Células paratifoideas | Hipoparatiroidismo |
| Hepatocitos | Transplante de hígado |
| Condriocitos | Regeneración de hueso y cartílago |
| Células de Leydig | Reemplazamiento hormonal |
| Células adrenales cromafines | Enfermedad de Parkinson, dolor crónico |
| Células madre | Regeneración de hueso, SNC, Enf. Endocrinas |
| PC12 feocromocitoma | Enfermedad de Parkinson |
| Mieloma | Factor de crecimiento hepático |
| Hibridoma | Cáncer, producción de anticuerpos |
| Células tumorales | Vacuna antitumoral, interleuquinas |
| Células de retina | Enfermedad de Parkinson |
| Células productoras de vectores virales | Cáncer |
| Bacterias | Eliminación de urea |

Abreviaturas: Enf.: enfermedad.

APLICACIONES TERAPÉUTICAS

La microencapsulación de células ha sido aplicada en numerosas ocasiones al tratamiento de enfermedades endocrinas debido en parte a la existencia de modelos animales que simulan perfectamente la patología, pero también como consecuencia de que dosis muy reducidas del producto terapéutico son suficientes para una total corrección sintomática. Ésta es una consideración fundamental, ya que el número de células por cápsula es limitado, así como el número de micropartículas transplantables.

Entre las enfermedades endocrinas, una gran parte de grupos de investigación han dirigido sus esfuerzos al tratamiento de la diabetes, mediante la inmovilización de islotes de Langerhams en microcápsulas de alginato. Los buenos resultados obtenidos tanto en roedores como en animales superiores impulsaron, a mediados de la década de los noventa, la realización del primer ensayo clínico en humanos. El único paciente incluido en este estudio no necesitó la administración de insulina exógena durante un mes, redujo considerablemente sus niveles de albúmina sérica glicosilada y hemoglobina A1C, mejorando también la sintomatología ligada a su neuropatía periférica (9). En la actualidad, un nuevo ensayo clínico estudia la actividad de islotes encapsulados en matrices de alginato recubiertas con poli-L-ornitina. El uso de vitaminas, antioxidantes o células inmunomoduladoras, conjuntamente con los islotes, también está siendo motivo de estudio, al igual que el empleo de factores angiogénicos que aumenten la vascularización en el lugar del implante y favorezcan de este modo un mayor aporte de oxígeno y nutrientes al injerto (10).

Otra aplicación terapéutica de las células microencapsuladas es el tratamiento de patologías del SNC. Estas alteraciones se caracterizan por el deterioro continuo de las funciones cognitivas y motoras, dando lugar a una pérdida progresiva de las células nerviosas, tanto de forma crónica como aguda. En el caso de la enfermedad de Parkinson, se han inmovilizado células secretoras de dopamina como las PC12 al igual que células genéticamente manipuladas para liberar factores neurotróficos como el GDNF (factor neurotrófico derivado de células gliales). De hecho, en un trabajo en el que se implantaron por estereotaxia fibroblastos encapsulados en ratas,

se comprobó que los animales tratados presentaban una marcada reducción en la rotación inducida por apomorfina y un aumento de más del 40% en el número de células tiroxin-hidrosilasa positivas que el grupo control (11). En el caso de la enfermedad de Huntington, el CNTF (factor neurotrófico ciliar) es el factor trófico de mayor eficacia. Emerich y col., demostraron que el implante de cápsulas con fibroblastos secretores de CNTF en monos, ejercía un efecto neuroprotector sobre diversas poblaciones estriatales como neuronas colinérgicas y GABAérgicas (12).

Una de las aplicaciones que mayor interés está despertando en la comunidad científica es el tratamiento del cáncer. La vía de actuación sobre esta compleja patología ha sido muy variada, incluyendo el empleo de células encapsuladas y genéticamente modificadas que expresan la enzima citocromo P450 (13), la vectorización del agente terapéutico hacia el foco tumoral mediante la secreción continua de un complejo formado por interleuquina-2 y la región Fv de un anticuerpo humanizado con gran afinidad por tumores HER-2/*neu* (14) o la inhibición de la angiogénesis tumoral, es decir, la formación de vasos sanguíneos que nutran e irrigan a la masa tumoral. Esta última estrategia ha sido ensayada tanto mediante la secreción de anticuerpos monoclonales que bloqueen proteínas indispensables en la construcción endotelial (15), como mediante la liberación de factores antiangiogénicos endógenos que inhiban e impidan la formación de estructuras vasculares (16, 17).

CONCLUSIONES

La microencapsulación de células representa una alternativa en el desarrollo de sistemas citomédicos que liberen de forma controlada el producto terapéutico y un hito en el trasplante de tejidos sin el requerimiento de las dosis habituales de inmunosupresores. Los avances llevados a cabo en animales de experimentación han dado lugar a un amplio número de ensayos clínicos, tal y como resume la Tabla 2. El interés en esta herramienta biotecnológica ha llegado también al sector industrial en el que un destacable número de compañías farmacéuticas y biotecnológicas han apostado en el empleo de sistemas de inmovilización de células para tratar patologías tan dispares como la diabetes, la retinitis pigmentosa, enfermedades

del SNC o diabetes (18). En la actualidad son muchos los retos por alcanzar, incluyendo una normativa oficial para el desarrollo e investigación en humanos, un mayor grado de biocompatibilidad, reproducibilidad y duración de los sistemas tras su trasplante en huéspedes y un mayor grado de confianza y financiación pública. No obstante, el avance continuo de disciplinas científicas como la genética, biología y tecnología farmacéutica pronostican que la tecnología de encapsulación de células podrá en un futuro ser empleada eficazmente en el tratamiento de muchas de las patologías que hoy en día nos asolan.

TABLA 2. *Ejemplos de ensayos clínicos realizados con la tecnología de la microencapsulación de células*

| <i>Autores</i> | <i>Año</i> | <i>Aplicación</i> | <i>Producto terapéutico</i> |
|----------------------------------|------------|----------------------|-----------------------------|
| Soon Shiong y col. | 1994 | Diabetes | Insulina |
| Circe Biomedical Hepatassist® | 1995 | Cirrosis hepática | — |
| Aebischer y col. | 1996 | EAL | CNTF |
| Vitagen, Hepatix® | 1996 | Cirrosis hepática | — |
| Buschner y col. | 1996 | Dolor crónico | Catecolaminas |
| Hasse y col. | 1997 | Hipoparatiroidismo | Hormona paratiroidea |
| Löhr y col. | 1999 | Cáncer pancreático | Proteína CYP2B1 |
| Bachoud-Levi y col. | 2000 | Enf. de Hungtinton | CNTF |
| Titan Pharmaceuticals | 2001 | Parkinson | Dopamina |
| Neurotech | 2003 | Retinitis Pigmentosa | CNTF |
| Calafiore y col. | 2003 | Diabetes | Insulina |
| Aebischer y col. | 2004 | Parkinson | GNTF |
| Aebischer y col. | 2004 | Anemia | EPO |

Abreviaturas: EAL: esclerosis amiotrófica lateral; CNTF: factor neurotrófico ciliar; Enf.: enfermedad; GNTF: factor neurotrófico derivado de células gliales; EPO: eritropoyetina.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ORIVE, G.; HERNÁNDEZ, R.M.; GASCÓN, A.R.; IGARTUA, M.; PEDRAZ, J.L. (2003) Cell encapsulation technology for biomedical purposes: novel insights and challenges. *Trends Pharm. Sci.* 24, 207-210.
- (2) ORIVE, G.; HERNÁNDEZ, R.M.; GASCÓN, A.R.; CALAFIORE, R.; CHANG, T.M.S.; DE VOS, P.; HORTELANO, G.; HUNKELER, D.; LACÍK, I.; SHAPIRO, A.M.J.; PEDRAZ, J.L. (2003) Cell encapsulation: promise and progress. *Nat. Med.* 9, 104-107.
- (3) BISCEGLIE, V. (1933) Über die antineoplastische immunität; heterologe Einplanung von tumoren in Huhner-embryonen. *Ztschr. Krebsforsch.* 40: 45-58.
- (4) ALGIRE, G.H. (1943) An adaptation of the transparent chamber technique to the mouse. *J. Natl. Cancer Inst.*, 4: 1-11.
- (5) ANGELOVA, N.; HUNKELER, D. (1999) Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends Biotechnol.* 17, 409-421.
- (6) HUNKELER, D.; SUN, A.M.; KORBUTT, G.S.; RAJOTTE, R.V.; GILL, R.G.; CALAFIORE, R.; MOREL, P. (1999) Bioartificial organs and acceptable risk. *Nat. Biotechnol.* 17, 1045.
- (7) HUNKELER, D. (2000) Objectively assessing bioartificial organs. *Nat. Biotechnol.* 18, 1021.
- (8) ORIVE, G.; HERNÁNDEZ, R.M.; GASCÓN, A.R.; CALAFIORE, R.; CHANG, T.M.S.; DE VOS, P.; HORTELANO, G.; HUNKELER, D.; LACÍK, I.; PEDRAZ, J.L. (2004) History, challenges and promises of cell microencapsulation. *Trends Biotechnol.* 22, 87-92.
- (9) SOON-SHIONG, P.; HEINTZ, R.; MERIDETH, N.; YAO QUIANG, X.; YAO, Z.; ZHENG, T. (1994) Insulin independence in a type I diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet* 343, 950-951.
- (10) DE VOS, P.; HAMEL, A.F.; TATARKIEWICZ, K. (2002) Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets. *Diabetologia* 45, 159-173.
- (11) TSENG, J.L.; BAETGE, E.E.; ZURN, A.D.; AEBISCHER, P. (1997) GDNF reduces drug-induced rotational behaviour after medial forebrain bundle transection by a mechanism not involving striatal dopamine. *J. Neurosci.* 17, 325-333.
- (12) EMERICH, D.F.; WINN, S.R.; HANTRAYE, P.M.; PESCHANSKI, M.; CHEN, E.Y.; CHU, Y.; McDERMOTT, P.; BAETGE, E.E.; KORDOWER, J.H. (1997) Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature*, Vol. 386, 395-399.
- (13) LÖRH, M.; HOFFMEYER, A.; KRÖGER, J.C.; FREUND, M.; HAIN, J.; HOLLE, A. (2001) Microencapsulated cell-mediated treatment of inoperable pancreatic carcinoma. *Lancet* 357, 1591-1592.
- (14) CIRONE, P.; BOURGEOIS, M.; AUSTIN, R.C.; CHANG, P.L. (2002) A novel approach to tumor suppression with microencapsulated recombinant cells. *Hum. Gene Ther.* 13, 1157-1166.
- (15) ORIVE, G.; HERNÁNDEZ, R.M.; GASCÓN, A.R.; IGARTUA, M.; ROJAS, A.; PEDRAZ, J.L. (2001) Microencapsulation of an anti VE-cadherin antibody secreting 1B5 hybridoma cells. *Biotechnol. Bioeng.* 76, 285-294.

- (16) READ, T.A.; SORENSEN, D.R.; MAHESPARAN, R.; ENGER, P.Ø.; TIMPL, R.; OLSEN, B.R. (2001) Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 29-34.
- (17) JOKI, T.; MACHLUF, M.; ATALA, A.; ZHU, J.; SEYFRIED, N.T.; DUNN, I.F. (2001) Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. *Nat. Biotechnol.* 19, 35-39.
- (18) ORIVE, G.; HERNÁNDEZ, R.M.; GASCÓN, A.R.; IGARTUA, M.; PEDRAZ, J.L. (2002) Encapsulated cell technology: from research to market. *Trends Biotechnol.* 20, 382-387.

INFORMACIÓN ACADÉMICA

Sesiones Científicas

23 de septiembre

Conferencia del Profesor Enrique Alcaraz Varó, Catedrático de Universidad del Departamento de Filología inglesa. Universidad de Alicante, titulada: «Diccionario Terminológico Bilingüe de Ciencias Farmacéuticas».

Noticias

En el marco del Forum Cultural Barcelona 2004, se han desarrollado más de 50 seminarios y simposios en el seno del Parlamento de las Religiones del Mundo, durante los días 7-13 del mes de julio, con participación de unos 7.700 asistentes que convergían bajo el lema de «Religiones por la Paz».

El acto de clausura fue cerrado con un largo y excepcional discurso del Profesor Federico Mayor Zaragoza, Académico de la Real Academia Nacional de Farmacia, quien abogó por el incasable trabajo de los ciudadanos del mundo de cualquier creencia que debe centrarse en conseguir la paz. Asimismo se refirió a la gran responsabilidad de los gobernantes de las naciones a quienes conminó a «cambiar las armas por las palabras», instándoles a buscar soluciones, mediante el diálogo, a los problemas mundiales.

* * *

El Presidente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas ha concedido a la Doctora María Cascales Angosto, la condición de Doctora Vinculada «Ad Honorem» hasta el 31 de agosto de 2007.

* * *

La Ilma. Sra. Doña Margarita Lorenzo Balado ha tomado posesión de su plaza de Catedrática de Universidad, adscrita al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, el día 15 de septiembre de 2004, en una sesión solemne que ha tenido lugar en el Rectorado de dicha Universidad.

* * *

Durante los días 13 al 20 de julio próximo pasado se desarrolló, en el marco del Forum Cultural Barcelona 2004, el Parlamento de las Religiones, con asistencia de unas 7.700 personas de todo el mundo y de muy diversas tradiciones religiosas; como colofón del intenso trabajo —20 aulas simultáneas, durante siete días, más las

sesiones plenarias en el enorme Auditorio—, se celebró la Clausura en dicho Auditorio, en la que el principal discurso final estuvo a cargo del Académico de esta Real Academia, el Profesor Federico Mayor Zaragoza, quien abogó, en su larga y espléndida alocución, no sólo por el papel que las religiones han de representar en el mundo, sino por la ética que debe dirigir a los gobernantes para luchar contra el hambre, la enfermedad y la pobreza, siendo prioritario el logro de alcanzar la paz.

* * *

El día 4 de octubre, en la *Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya*, tendrá lugar una sesión solemne en la que el Presidente de la misma y Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia, Doctor José Esteve, presentará el Libro del Museo Cusí.

Seguidamente pronunciará su discurso de ingreso en tal Academia el Profesor don Juan Tamargo Menéndez, Académico de Número de esta Real Academia Nacional de Farmacia. El discurso versará sobre «Los remedios contra el envejecimiento», tema de gran actualidad en la sociedad.

Necrológica

El Excmo. Señor don Gregorio González Trigo que había nacido el 28 de enero de 1920 en Villagarcía de Arosa, ha fallecido en Madrid el día 7 de septiembre de 2004.

El Doctor González Trigo fue Catedrático de Química Orgánica Aplicada de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, Director del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de dicha Universidad y tras su jubilación fue nombrado Profesor Emérito. Son muchos los alumnos que recibieron sus enseñanzas, así como cuenta con numerosos discípulos entre los Profesores de Universidad y Académicos de nuestra Corporación.

El Doctor González Trigo tomó posesión como Académico de Número en la Medalla número 40, el día 14 de marzo de 1985 con su discurso titulado «Las conquistas de la síntesis orgánica». Su vinculación con la Real Academia Nacional de Farmacia ha sido constante y su interés en participar en las tareas académicas ha permanecido inalterable a pesar de la larga enfermedad que ha sufrido. Tanta ha sido su devoción a la Corporación que, enterado de las obras de restauración realizadas, quiso conocer las modificaciones efectuadas en las diferentes dependencias, y gracias al Doctor Tena y a dos de sus hijos, nos visitó el día 3 de diciembre de 2003, animado de una gran ilusión por reencontrarse nuevamente con algunos de nuestros compañeros académicos, y encantado de observar, según sus propias palabras en la carta que nos dirigió en 5 de diciembre, «las reformas que se han realizado en el edificio: El resultado es, sin duda, magnífico».

Descanse en paz nuestro profesor y compañero, que nos hizo el obsequio de su amistad, y nuestras condolencias a sus hijos y demás familiares.

Bibliografía

La Academia de Farmacia Santa María de España de la Región de Murcia. Antecedentes históricos y perfil científico.—Ferrándiz Araújo, C.—Academia de Farmacia Santa María de España de la Región de Murcia.—2004.—Murcia.—Fundación HEFAME.—ISBN: 84-933713-4-3.—224 págs.

La obra está prologada por el Presidente de la Academia de Farmacia Santa María de España de la Región de Murcia, quien expone la idea de concebir esta obra es que esta Corporación, además de «hacernos ver que ... tiene un origen... dos siglos atrás» se convierte en la actualidad en «un lugar de encuentro para promocionar el estudio, la investigación y la divulgación de las ciencias farmacéuticas y mantener el diálogo con la comunidad académica y con la sociedad».

El autor es el Doctor en Medicina y Cirugía, don Carlos Ferrándiz Araújo, es Académico de Número de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Murcia y Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Medicina.

La publicación realizada en papel couché contiene numerosas ilustraciones, en su mayoría referentes al Hospital de la Caridad de Cartagena, a farmacias de propiedad privada de esa ciudad, a objetos naturales e instrumental farmacéutico, así como a diversos personajes, entre los que hay que destacar en el párrafo 162 la fotografía de los académicos constituyentes.

Tras una introducción en la que el autor hace referencia a la Academia Médico-Farmacéutica de Cartagena, fundada en 1879, órgano creado a instancias del movimiento asociacionista de la segunda mitad del siglo XIX y en quien el autor quiere ver el origen de la actual Academia de Farmacia de la Región de Murcia; siguen cuatro partes.

La primera parte está dedicada a exponer los «Antecedentes científico-sociales en el positivismo», la segunda se ocupa de la creación y devenir de «la Academia Médico-Farmacéutica de Cartagena», así como de la labor científico-farmacéutica de la misma a través de su órgano oficial que era la revista *La Unión de las Ciencias Médicas*

(1881-1887), que se publicaba mensualmente y estaba dedicado a «medicina, cirugía, farmacia y ciencias auxiliares». Asimismo, realiza un perfil biocientífico de los farmacéuticos que pertenecieron a esa Corporación, destacando entre ellos al Doctor don Joaquín Sancho del Río (1853-1917), que fue farmacéutico del Hospital de la Caridad y tuvo un importante papel en la Academia Médico-Farmacéutica de Cartagena especialmente durante los años 1880-1886.

La tercera parte se refiere a la actual Academia de Farmacia de la Región de Murcia, cuyos Estatutos fueron aprobados por Decreto de la Consejería de Cultura de esa región, número 67/2002, de 15 de marzo, siendo su fin ser un «foro de reflexión, estudio, investigación y difusión de la cultura y el patrimonio científico, particularmente, farmacéutico», y que tiene su sede social en el último piso de la Casa Moreno, sita en la calle de la Caridad y cedida por el Ayuntamiento.

Por último, la cuarta parte comprende un apéndice documental, las notas o referencias citadas en el texto y un índice onomástico.

Para los farmacéuticos son interesantes los datos relativos a los farmacéuticos establecidos en Cartagena, ya que el autor no sólo ha utilizado como fuentes no sólo los Libros Capitulares del Ayuntamiento de Cartagena, Libros de Cartas Reales, donde se inscribían los títulos profesionales, los Protocolos Notariales, sino también la prensa sanitaria y la prensa periódica como son, respectivamente, *La Unión de las Ciencias Médicas* y *El Eco de Cartagena*.

M.^a CARMEN FRANCÉS

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 vicisitudes 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.

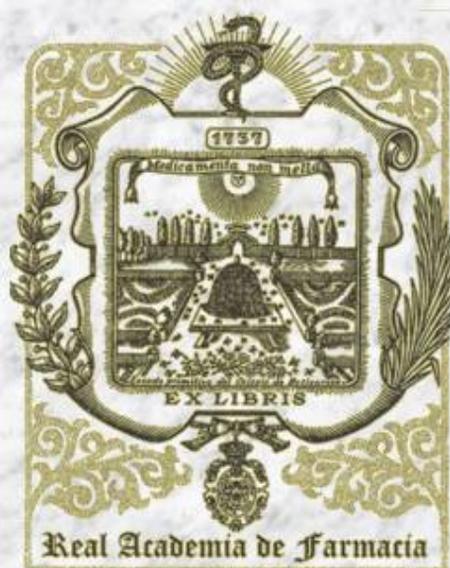
— Triple underline - CAPITAL LETTERS.

— 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.



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA

www.ranf.com